



Takrolimuusi- ja siklosporiininäytteiden säilyvyys

Bioanalytiikan koulutusohjelma,
bioanalyttikko
Opinnäytetyö
26.10.2010

Tanja Sillanpää

Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto
Bioanalytiikan koulutusohjelma		-
Tekijä/Tekijät		
Tanja Sillanpää		
Työn nimi		
Takrolimuusi- ja siklosporiininäytteiden säilyvyys		
Työn laji	Aika	Sivumäärä
Opinnäytetyö	Syky 2010	54 + 3 liitettä
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Takrolimuusi ja siklosporiini ovat immunosuppressiivisia lääkkeitä, joita käytetään elinsiirtopotilaan hoidossa estämään hyljintäreaktioita. Takrolimuusin ja siklosporiinin annostelu perustuu verinäytteestä määritettävään lääkeainepitoisuuteen. Takrolimuusimääryksiä tehdään Kirurgisen sairaalan laboratorion lisäksi muutamassa yliopistosairaalan laboratoriossa, ja siklosporiinimääryksiä näiden lisäksi joissakin keskussairaaloiden laboratorioissa. Kirurgisen sairaalan laboratorioon lähetetään takrolimuusi- ja siklosporiininäytteitä analysoitavaksi ympäri Suomen. Näytekuljetukset ja näytteiden analysointi saattavat joskus viivästyä, jolloin tarvitaan tietoa näytteiden säilyvyydestä. Säilyvyyttä haluttiin tutkia, jotta voidaan vastata asiakkaiden kyselyihin säilyvyydestä ja arvioida näytteiden analysointikelpoisuutta. Lähetysohjeen mukaan näytteet lähetetään huoneenlämpöisenä, jos ne ovat perillä 24 tunnin kuluessa, ja tämän jälkeen ne lähetetään kylmäkuljetuksena. Menetelmävalmistajan mukaan näytteet säilyvät jääkaapissa (+2–8 °C) seitsemän vuorokautta, ja tämän jälkeen pakastettuna vähintään -10 °C.</p> <p>Työn tarkoituksena oli tutkia takrolimuusin ja siklosporiinin säilyvyyttä huoneenlämmössä (+21 °C) ja jääkaappilämpötilassa (+4 °C) seitsemän vuorokauden ajan. Lisäksi tutkittiin siklosporiinin säilyvyyttä pakastettuna (-20 °C). Säilyvyystutkimus tehtiin Kirurgisen sairaalan laboratoriossa. Näytemäärä oli 40 takrolimuusi- ja 40 siklosporiininäytettä, joista kummankin lääkeaineen 20 näytettä säilytettiin huoneenlämmössä ja 20 jääkaapissa. Lääkeaineiden pitoisuudet määritettiin CMIA-menetelmällä vuorokauden välein seitsemän vuorokauden ajan. Pakastettuja siklosporiininäytteitä oli 20, ja ne määritettiin 1 viikon, 2 viikon, 1 kuukauden, 3 kuukauden ja 6 kuukauden pakastamisen jälkeen.</p> <p>Työn tuloksena saatiin selville, että takrolimuusi- ja siklosporiininäytteet säilyvät sekä huoneenlämmössä että jääkaappilämpötilassa seitsemän vuorokautta. Pitoisuuksissa ilmeni pientä edestakaista vaihtelua, mutta vaihtelu tapahtui menetelmän tarkkuudelle määritetyissä rajoissa. Pakastettujen siklosporiininäytteiden pitoisuuden lasku oli selvempää, ja näytteitä ei ole suositeltavaa säilyttää pakastettuna.</p> <p>Tulosten perusteella takrolimuusi- ja siklosporiininäytteille voidaan sallia 24 tuntia pidempi kuljetusaika huoneenlämpöisenä. Tulokset jääkaappisäilyvyydelle olivat yhteneviä valmistajan ilmoittaman säilyvyyden kanssa, kuten myös tulokset huoneenlämpö- ja jääkaappisäilyvyydelle ulkomaisissa tutkimuksissa saatujen tulosten kanssa.</p>		
Avainsanat		
takrolimuusi, siklosporiini, verinäytteiden säilyvyys		

Degree Programme in		Degree
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care
Author/Authors		
Tanja Sillanpää		
Title		
Stability of Tacrolimus and Cyclosporine Samples		
Type of Work	Date	Pages
Final Project	Autumn 2010	54 + 3 appendices
<p>ABSTRACT</p> <p>Tacrolimus and cyclosporine are immunosuppressant medicines, which are used for organ transplant patients in order to prevent rejection. The dosage of tacrolimus and cyclosporine medicines is based on the concentration of the medicine measured from the blood sample. Tacrolimus and cyclosporine samples are sent to the HUS Surgical Hospital Laboratory, Helsinki, Finland, around Finland. Sometimes, the sample transportations and analysis may be delayed and, thus, information on the stability of samples is needed. According to the sending instructions, samples are sent at room temperature if the samples arrive at the HUS Surgical Hospital Laboratory, Helsinki, Finland, within 24 hours. If the transportation takes more than 24 hours, samples are sent with cooler. The immunoassay manufacturer (Abbott) says that the samples may be stored for up to 7 days refrigerated at +2–8°C and after that frozen at -10°C or colder.</p> <p>The objective of my study was to examine the stability of tacrolimus and cyclosporine samples at the room temperature (+21 °C) and in the refrigerator (+4 °C) for 7 days. In addition, the stability of cyclosporine as frozen was examined. The examination of the stability was carried out at the HUS Surgical Hospital Laboratory, Helsinki, Finland. The total amount of the samples was 40 tacrolimus and 40 cyclosporine samples, of which 20 samples of both medicines were stored at room temperature and 20 in the refrigerator. Tacrolimus and cyclosporine concentrations were analyzed with the CMIA method at 1-day intervals during 7 days. The amount of cyclosporine samples was 20 and they were analyzed after 1 week, 2 weeks, 1 month, 3 months and 6 months freezing period.</p> <p>The results showed that tacrolimus and cyclosporine samples were stable at room temperature and in the refrigerator for 7 days. There were some changes in the concentrations, but these changes were within the precision characteristics of the immunoassay. The decrease in the concentrations of the frozen cyclosporine samples was greater than at the other temperatures. Hence, it is not recommended to store cyclosporine samples as frozen.</p> <p>According to the results, tacrolimus and cyclosporine samples will tolerate more than 24-hour transportation at the room temperature. The results for the refrigerator storage were congruent with the manufacturer's storage instructions as well as the results for the room temperature and refrigerator storage with the results obtained in some foreign countries.</p>		
Keywords		
tacrolimus, cyclosporine, stability of blood samples		

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET	2
3	ELINSIIRROT	4
3.1	Kudossopivuus	4
3.2	Hyljintäreaktiot	5
4	IMMUNOSUPPRESSIIVINEN LÄÄKITYS	6
4.1	Kalsineuriinin estäjät takrolimuusi ja siklosporiini	7
4.2	Kemiallinen rakenne ja vaikutusmekanismi	8
4.3	Farmakokinetiikka	9
4.4	Lääkkeiden haittavaikutukset	10
5	VERINÄYTTEIDEN SÄILYVYYS	11
5.1	Näytteiden lähettäminen ja kuljetus	12
5.2	Yleistä näytteiden säilyvyydestä ja säilytyksestä	12
5.3	Säilytyksen aikana tapahtuvat muutokset	13
6	TAKROLIMUUSI- JA SIKLOSPORIINIPITOISUUDEN MÄÄRITYS	14
6.1	Immunokemialliset menetelmät	15
6.2	Takrolimuusin ja siklosporiinin preanalytiikka	16
6.3	Takrolimuusin ja siklosporiinin analytiikka	17
6.3.1	Takrolimuusin analytiikka	18
6.3.2	Siklosporiinin analytiikka	20
6.4	Takrolimuusin ja siklosporiinin postanalytiikka	22
7	AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	23
7.1	Tutkimuksia takrolimuusin säilyvyydestä	23
7.2	Tutkimuksia siklosporiinin säilyvyydestä	24
8	SÄILYVYYSTUTKIMUKSEN TOTEUTUS	25
8.1	Näytteiden kerääminen	25
8.2	Näytteiden käsittely	28
8.3	Näytteiden analysointi	28
8.4	Tulosten käsittely	29
9	TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA	29
9.1	Takrolimuusin säilyvyys	30
9.2	Siklosporiinin säilyvyys	35
9.3	Johtopäätökset	42

9.4	Tulosten hyödynnettävyys	44
10	LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTIA	44
10.1	Työprosessin luotettavuus	45
10.2	Tulosten luotettavuus	46
11	POHDINTA	47
	LÄHTEET	
	LIITTEET 1 - 3	

1 JOHDANTO

Elinsiirrot aloitettiin Suomessa vuonna 1964 munuaisensiirrolla. Tänä päivänä Suomessa tehdään munuaisen, maksan, sydämen, keuhkon ja sydänkeuhkon sekä silmän sarveiskalvon ja kudosten siirtoja. (Munuais- ja maksaliitto ry 2008.) Suomalainen elinsiirtokirurgia on maailmassa huippuluokkaa pitkäaikaistulosten suhteen (Soininen 2007). Lääkehoito on myös parantunut niin, että siirrännäisiä menetetään hyljinnän vuoksi vain harvoin (Hankonen 2009: 16). Kun elimistöön siirretään vierasta kudosta, veressä kiertävät lymfosyytit tunnistavat uuden kudoksen pintamolekyylit vieraiksi ja hyökkäävät niitä vastaan, jolloin syntyy hyljintäreaktio. Siirretyn elimen hyljintää estetään immunosuppressiivisella lääkehoidolla. (Aitio – Himberg 2002: 639–640.)

Elinsiirtopotilaan hoidossa käytetään tavallisesti kolmoislääkitystä, johon kuuluvat kalsineuriinin estäjä, nukleotidisynteesin estäjä ja glukokortikoidi (Isoniemi – Jalanko 2004: 1371). Lääkeyhdistelmän avulla yksittäisten lääkeaineiden annokset voidaan pitää pieninä, mikä vähentää niiden haittavaikutuksia (Aitio – Himberg 2002: 640). Immunosuppressiivinen lääkehoito kohdistuu lähinnä T-lymfosyytti-välitteisen immuunivasteen estämiseen (Koulu 2007: 789).

Takrolimuusi ja siklosporiini kuuluvat kalsineuriini-entsyymien estäjiin. Ne estävät T-lymfosyyttien aktivoitumista estämällä kalsineuriinifosfataasin toimintaa. (Moilanen – Vapaatalo 2003: 485.) Takrolimuusilla ja siklosporiinilla on runsaasti haittavaikutuksia, joista hankalin on munuaistoksisuus. Hyljinnänestolääkkeitä pyritään annostelemaan niin, että hyljintä ehkäistään, mutta samalla haittavaikutukset yritetään pitää mahdollisimman vähäisinä. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1371; Mäkisalo – Kastarinen – Saarelma 2004: 1381.)

Molempien lääkkeiden annostelu perustuu lääkeaineiden pitoisuuksien mittaamiseen verestä (Isoniemi – Jalanko 2004: 1374). Takrolimuusin määrityksiä tehdään Suomessa Kirurgisen sairaalan laboratorion lisäksi vain muutamassa muussa laboratoriossa. Siklosporiinin määrityksiä tekeviä laboratorioita on hieman useampi. Takrolimuusi- ja siklosporiininäytteitä lähetetään Kirurgisen sairaalan laboratorioon analysoitavaksi joka puolelta Suomea, jolloin näytekuljetuksen kestoon pitää kiinnittää erityistä huomiota. Ohjeen mukaan takrolimuusi- ja siklosporiininäytteet lähetetään huoneenlämpöisenä, jos

ne ovat perillä vuorokauden kuluessa. Jos kuljetus kestää yli vuorokauden, näytteet lähetetään kylmäkuljetuksena. (HUSLAB 2010a, HUSLAB 2010b.)

Kirurgisen sairaalan laboratorioon tulee usein kyselyjä näytteiden säilyvyydestä. Useat peräkkäiset pyhäpäivät saattavat viivästyttää näytteiden kuljetuksia ja analysointia. Asiakkaat myös tuntuvat suosivan näytteiden lähettämistä huoneenlämpöisinä kylmäkuljetusten sijaan. Tässä opinnäytetyössä pyritään selvittämään, kuinka takrolimuusin ja siklosporiinin pitoisuus säilyy kokoveressä huoneenlämmössä ja jääkaappilämpötilassa seitsemän vuorokauden ajan. Lisäksi selvitetään pakastamisen vaikutusta siklosporiinipitoisuuteen.

2 TYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Opinnäytetyö tehdään Kirurgisen sairaalan laboratorioon. Työ on jatkoa kehittämistehtävälle, jossa selvitettiin takrolimuusin säilyvyyttä huoneenlämmössä ja jääkaappilämpötilassa. Opinnäytetyössä mukaan tulevat siklosporiinin säilyvyys huoneenlämmössä, jääkaappilämpötilassa ja pakastettuna. Työn vaiheita on havainnollistettu kuviossa 1.

Tutkimusongelma		Tulos / Tavoite
Takrolimuusin säilyvyys huoneenlämmössä (+21 °C) ja jääkaapissa (+4 °C)?	Kehittämistehtävä	Takrolimuusi säilyy 7 vrk huoneenlämmössä ja jääkaapissa.
Siklosporiinin säilyvyys huoneenlämmössä (+21 °C) ja jääkaapissa (+4 °C)?	Opinnäytetyö	Pitoisuudet määritettynä päivittäin 7 vrk:n ajalta.
Siklosporiinin säilyvyys pakastettuna (-20 °C)?	Opinnäytetyö	Pitoisuudet määritettynä 1 vko:n, 2 vko:n, 1 kk:n, 3 kk:n ja 6 kk:n kuluttua.

KUVIO 1. Kehittämistehtävän laajentuminen opinnäytetyöksi.

Suomessa takrolimuusin määrityksiä tehdään Kirurgisen sairaalan laboratoriossa sekä muutamassa yliopistosairaalan laboratoriossa. Siklosporiinin määrityksiä tehdään näiden lisäksi joissakin keskussairaaloiden laboratoriossa. Näytteitä lähetetään Kirurgisen sairaalan laboratorioon analysoitavaksi ympäri Suomen. Näytekuljetusten kesto, lähetysolosuhteet ja näytteiden säilyvyys tulee huomioida, jotta näytteet pysyvät analysointikelpoisina.

Ohjeen mukaan kummatkin näytteet lähetetään huoneenlämpöisenä, jos ne ovat perillä 24 tunnin kuluessa. Jos kuljetus kestää yli 24 tuntia, näytteet lähetetään kylmäkuljetuksena. Asiakkaat kokevat kylmäkuljetuksen kuitenkin hankalana ja lähettävät näytteet mieluiten huoneenlämpöisinä. Yleensä, jos asiakas epäilee, että näytteet eivät ehdi perille 24 tunnin kuluessa, näytteitä säilytetään jääkaapissa ja ne lähetetään huoneenlämpöisenä vasta, kun ollaan varmoja näytteiden ehtimisestä ajoissa perille. Asiakkailta tulee myös usein kyselyjä siitä, kuinka kauan näytteet säilyvät analysointikelpoisena. Toisaalta näytekuljetusten perillemeno ja analysointia voivat viivästyttää pitkät pyhäajat (esim. joulukuun, pääsiäinen) tai keskelle viikkoa osuvat pyhäpäivät. Näistä syistä tuli tarve tutkia näytteiden säilyvyyttä huoneenlämmössä ja jääkaapissa.

Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia takrolimuusi- ja siklosporiininäytteiden säilyvyyttä huoneenlämmössä ja jääkaappilämpötilassa seitsemän vuorokauden ajan. Tavoitteena on selvittää, kuinka kauan lääkeainepitoisuus säilyy muuttumattomana säilytettäessä näytettä huoneenlämmössä ja jääkaapissa. Lisäksi tutkitaan pakastamisen vaikutusta siklosporiinipitoisuuteen. Opinnäytetyöllä pyritään vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

1. Miten takrolimuusin ja siklosporiinin pitoisuus muuttuu, kun näytettä säilytetään huoneenlämmössä seitsemän vuorokauden ajan?
2. Miten takrolimuusin ja siklosporiinin pitoisuus muuttuu, kun näytettä säilytetään jääkaappilämpötilassa seitsemän vuorokauden ajan?
3. Miten näytteen pakastaminen vaikuttaa siklosporiinipitoisuuteen?

Opinnäytetyön tuloksena pyritään saamaan tietoa näytteiden säilyvyysajasta ja olosuhteista, joita tarvitaan arvioitaessa näytteiden analysointikelpoisuutta. Työn perusteella voidaan tarvittaessa tarkentaa kuljetus- tai säilyvysohjeita. Tulosten perusteella saadaan varmuutta vastata asiakkaiden kyselyihin säilyvyydestä, mikä auttaa asiakasta

näytteiden lähettämisen ajoittamisessa. Tutkittaessa pakastamisen vaikutusta siklosporiinipitoisuuteen pystytään arvioimaan, voidaanko näytteitä pakastaa esimerkiksi tutkimus- ja testaustarkoituksiin.

3 ELINSIIRROT

Elinsiirroilla voidaan pelastaa yhä useampien ihmisten elämä. Se on monissa tapauksissa ainoa mahdollisuus parantumattoman sairauden hoitona ja potilaan terveyden palauttajana. (Munuais- ja maksaliitto ry 2009.) Hylkimistä estävä lääkitys on kaikissa elinsiirroissa tärkeä, koska siirretty elin tuhoutuu nopeasti, ellei lääkitystä käytetä. Takrolimuusi ja siklosporiini ovat yleisesti käytettyjä hyljinnänestolääkkeitä. (Höckerstedt – Sipponen – Sairanen – Vuola – Kivioja 2010: 1205.) Elinsiirtopotilaan lääkityksestä kerrotaan tarkemmin luvussa 4.

Munuaisen, maksan, sydämen ja keuhkon siirtoja on tehty Suomessa kaikkiaan vajaat 7000, joista yli 5000 on ollut munuaisensiirtoja (Munuais- ja maksaliitto ry 2008). Kiinteiden elinten siirtoja tehdään vuosittain vajaa 300 ja luuytimensiirtoja runsas 100 (Jalanko 2006). Elinsiirrot onnistuvat Suomessa hyvin ja tulokset ovat parantuneet kaikilla elinsiirtoalueilla. Yli 95 % siirteistä toimii vuoden kuluttua siirrosta. Siirretyn elimen keskimääräinen toiminta-aika on jo yli 20 vuotta. (Hankonen 2009: 16.)

Elinsiirrot on keskitetty Suomessa HYKS:n sairaaloihin. Munuaisen- ja maksansiirrot tehdään Kirurgisessa sairaalassa, sydän- ja keuhkosiirrot Meilahden sairaalassa ja lasten elinsiirrot Lastenkllinikalla. (Soininen 2007.) Elinsiirtosairaalat pystyisivät hoitamaan nykyistä enemmän potilaita mutta siirrettävistä elimistä on pulaa. Elinsiirtojonoissa on yli 300 potilasta, ja vuosittain kymmeniä ihmisiä menehtyy odottaessaan sopivaa siirrännäistä. (Hankonen 2009: 16; Munuais- ja maksaliitto ry 2009.)

3.1 Kudossopivuus

Elimistön solujen pinnalla on oma antigeeni, jonka rakenteen perusteella lymfosyytit tunnistavat solun omakseen. Näitä antigeenejä kutsutaan MHC-antigeeneiksi tai MHC-proteiineiksi (Major Histocompatibility Complex). (Leppäluoto ym. 2008: 194–195.)

Elinsiirrossa elimen vastaanottajan kudostyyppi poikkeaa luovuttajan kudostyyppistä. Vastaanottajan immuunijärjestelmä tunnistaa siirteen solujen MHC-proteiinit elimistölle vieraisiksi rakenteiksi. Tällöin vastaanottajan sytotoksiset T-lymfosyytit hyökkäävät auttaja-T-lymfosyyttien avulla siirrettä vastaan, ja tämä johtaa siirretyn elimen hyljintään ja tuhoutumiseen. Tämän vuoksi on selvitettävä luovuttajan ja vastaanottajan MHC-proteiinien sopivuus. MHC tarkoittaa kaikkien selkärankaisten pääkudossopivuusjärjestelmää. Ihmisen MHC:tä vastaa leukosyyttien pinnalla oleva HLA-antigeeni (Human Leukocyte Antigen). (Haug – Sand – Sjaastad – Toverud 1999: 333; Leppäluoto ym. 2008: 195; Partanen 2005: 680.)

Hyljintävaaran pienentämiseksi elimen luovuttajaksi pyritään löytämään henkilö, jonka kudostyyppi on mahdollisimman lähellä vastaanottajan kudostyyppiä. Ensisijaisesti siirre pyritään saamaan vastaanottajan lähisukulaiselta. Tämä koskee etenkin munuaisensiirtoja ja luuydinsiirtoja. (Haug ym. 1999: 333.) Valtaosa siirrettävistä elimistä saadaan kuitenkin aivokuolleilta luovuttajilta (Jalanko 2006).

Ennen elinsiirtoa tutkitaan siirteen vastaanottajan ja luovuttajaehdokkaan kudossopivuus. Kudossopivuutta varten määritetään HLA-A, B- ja DR-geenien samanlaisuus, ABO- ja Rh-veriryhmät, valkosoluvasta-aineet sekä valkosolujen sopivuuskoe. HLA-geenien erot vastaanottajan ja luovuttajan kudostyyppissä pyritään minimoimaan. Veriryhmien tulee olla sopivat ja sopivuuskokeen perusteella vastaanottajalla ei saa olla valmiiksi vasta-aineita luovuttajan valkosoluja kohtaan. (SPR Veripalvelu 2009.)

3.2 Hyljintäreaktiot

Hyljintäreaktiot jaetaan niiden ilmenemisajan ja immunologisen mekanismin mukaan hyperakuuttiin, akuuttiin ja krooniseen hyljintään. Hyperakuutti hyljintä on vakavin hyljintäreaktio, joka alkaa minuuttien tai muutamien tuntien kuluessa elinsiirrosta. Se voi aiheutua, jos siirteen vastaanottaja on aikaisemmin muodostanut vasta-aineita luovuttajan HLA-antigenejä tai ABO-veriryhmäjärjestelmän antigenejä vastaan tai kyseessä on toisesta lajista oleva siirre (ksenografti). Hyperakuutti hyljintä aiheuttaa verisuonten tukkeutumisen ja siirteen verenkierron pysähtymisen. Ennen elinsiirtoa tehtävät veriryhmä- ja kudossopivuuskokeet varmistavat, ettei reaktiota pääse tapahtumaan. (Peakman – Vergani 1997: 151; Rabson – Roitt – Delves 2005: 167.)

Akuutti hyljintä tapahtuu yleensä muutamasta vuorokaudesta kolmeen kuukauteen elinsiirron jälkeen. Se on pääasiassa T-soluvälitteinen reaktio, jossa T-lymfosyytit reagoivat siirteen antigeenien kanssa. Akuutti hyljintä johtaa verisuonten vaurioitumiseen ja tukkeutumiseen. Immunosuppressiivinen hoito kohdistuu pääasiassa akuutin hyljinnän torjuntaan ja vähentämiseen estämällä T-solujen aktivaatiota. (Renkonen – Häyry 2005: 921; Abbas – Lichtman 2009: 200.)

Krooninen hyljintä ilmenee kuukausien tai vuosien kuluessa ja johtaa siirteen toiminnan asteittaiseen hiipumiseen. Siinä keskeisenä piirteenä on verisuonten lievä tulehdus ja siirteen valtimoiden ateroskleroosi. Kroonisessa hyljinnässä ilmenee myös fibroosia sekä elinspesifisiä muutoksia. (Renkonen – Häyry 2005: 922; Abbas – Lichtman 2009: 200.) Kroonisen hyljinnän mekanismeja ei edelleenkään tunneta tarkasti. Nykyisen käsityksen mukaan keskeisenä mekanismina on siirteen jatkuva vaurioituminen ja sitä seuraava korjausreaktio. Sileälihassolu- ja verisuonikasvutekijöillä on keskeinen asema korjausreaktiossa, joka johtaa verisuonten tukkeutumiseen ja siirteen menetykseen. (Koskinen ym. 2004: 1401–1402.) Kroonisen hyljinnän takia menetetään vuosittain 3-4 % kaikista toimivista siirteistä (Renkonen – Häyry 2005: 922).

4 IMMUNOSUPPRESSIIVINEN LÄÄKITYS

Kiinteiden elinten siirrot edellyttävät jatkuvaa hyljinnänestolääkitystä (Jalanko 2006). Elinsiirtopotilaan hoidossa käytetään immunosuppressiivista lääkitystä, jolla pyritään heikentämään immuunivastetta ja suojamaan siirrettä haitalliselta immunologiselta reaktiolta (Renkonen – Häyry 2005: 925). Lääkehoidon tavoitteena on estää lähinnä T-lymfosyytti-välitteistä immuunivastetta (Koulu 2007: 789).

Immunosuppressiivinen hoito aloitetaan yleensä kolmen lääkkeen yhdistelmällä, johon kuuluvat kalsineuriinin estäjä (siklosporiini tai takrolimuusi), nukleotidisynteesin estäjä (atsatiopriini tai mykofenolaattimofetiili) ja glukokortikoidi (metyyliprednisoloni tai prednisoloni). Lääkeyhdistelmän valinta riippuu siirretystä elimestä ja potilaan riskitekijöistä hylkimisen ja lääkkeiden haittavaikutusten suhteen. Lääkitys aloitetaan leikkauksen yhteydessä suurilla annoksilla ja sitä vähennetään seuraavien kuukausien aikana vähitellen. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1371.) Jos akuutin hyljinnän riski on erityisen suuri, siirron yhteydessä voidaan käyttää lisäksi ns. induktiota. Siinä potilaalle annetaan

vasta-aineita, jotka reagoivat veren T-lymfosyyttien kanssa ja lamaavat immunologista toimintaa. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1372; Aitio – Himberg 2002: 640.) Alkuvaiheen hoidolla pyritään estämään akuutti hyljintä, jonka riski on suurimmillaan muutaman viikon kuluttua elinsiirrosta ja pienenee sen jälkeen merkittävästi. Pitkäaikaislääkityksen taso saavutetaan noin vuoden kuluttua. Sillä pyritään ylläpitämään siirteen ja uuden isännän välistä tasapainotilaa ja estämään kroonisen hyljinnän kehittymistä. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1371.)

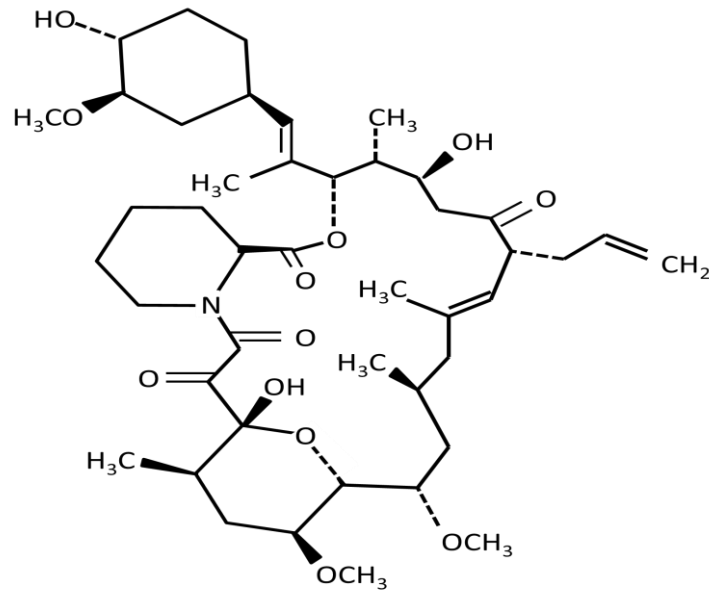
4.1 Kalsineuriinin estäjät takrolimuusi ja siklosporiini

Immunosuppressiivisen lääkeyksen kulmakivenä ovat kalsineuriini-entsyymien estäjät siklosporiini (siklosporiini A, CsA) ja takrolimuusi (FK 506). Suomessa siklosporiini on hyljinnäneston peruslääke kaikissa elinsiirroissa. Takrolimuusia käytetään siklosporiinin tilalla erityisesti silloin, kun potilaalla esiintyy vaikeaa tai pitkittynyttä hyljintää tai lääkeyksen haittavaikutuksia. Esimerkiksi munuaisensiirrosta lääkitys aloitetaan takrolimuusilla silloin, kun potilaalla on runsaasti kudostavasta-aineita tai kun kyseessä on uusintasiirto, ja potilas on menettänyt ensimmäisen siirteen hyljinnän takia. (Koulu 2007: 789, 791; Isoniemi – Jalanko 2004: 1372, 1374.) Maksan- ja munuaisensiirtoa koskevis- sa laajoissa tutkimuksissa potilaan selviämisen- ja siirteiden toimivuusluvut olivat yleisesti ottaen samaa luokkaa sekä siklosporiinia että takrolimuusia käytettäessä. Merkittävänä erona on kuitenkin havaittu takrolimuusin parempi teho akuutin hyljinnän estossa. Siklosporiinilla ei ole osoitettu olevan samanlaista kykyä kumota vaikea akuutti hyljintä kuin takrolimuusilla. (Aitio – Himberg 2002: 642.)

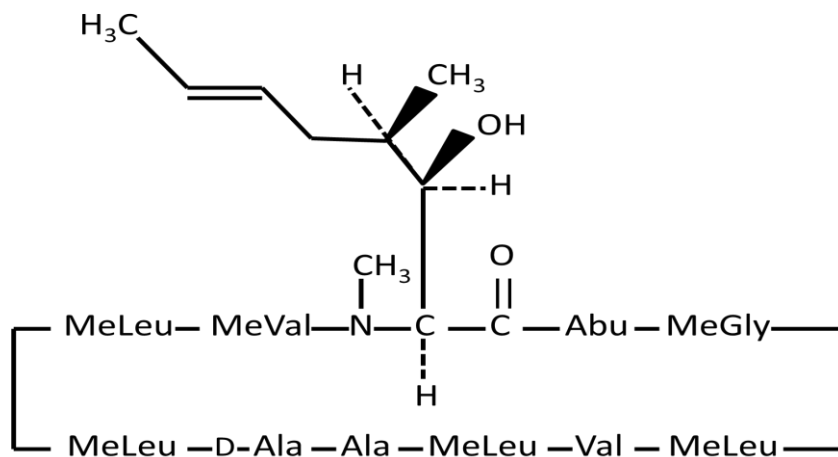
Siklosporiini on ensimmäinen kliiniseen käyttöön tullut spesifisesti vaikuttava immunosuppressiivinen lääkeaine, joka otettiin käyttöön 1980-luvun alussa. Sen ansiosta elinsiirtojen ennuste on merkittävästi parantunut, koska hylkimisreaktio pystytään hallitsemaan entistä paremmin. Siklosporiinin, kuten myös myöhemmin 1990-luvulla käyttöön tulleen takrolimuusin, vaikutus kohdistuu ainoastaan aktivoituneisiin lymfosyytteihin eikä yleisesti kaikkiin jakautuviin soluihin, kuten solunsalpaajilla. (Moilanen – Vaapaatalo 2003: 483; Isoniemi – Jalanko 2004: 1372.)

4.2 Kemiallinen rakenne ja vaikutusmekanismi

Takrolimuusi on makrolideihin kuuluva immunosuppressiivinen antibiootti, joka on peräisin *Streptomyces tsukubaensis* -maabakteerista. Siklosporiini on *Trichoderma polysporum* -sienestä eristetty 11 aminohaposta muodostunut syklinen peptidi (Koulu 2007: 789, 791). Takrolimuusin ja siklosporiinin rakennekaavat ovat esitetty kuvioissa 2 ja 3.

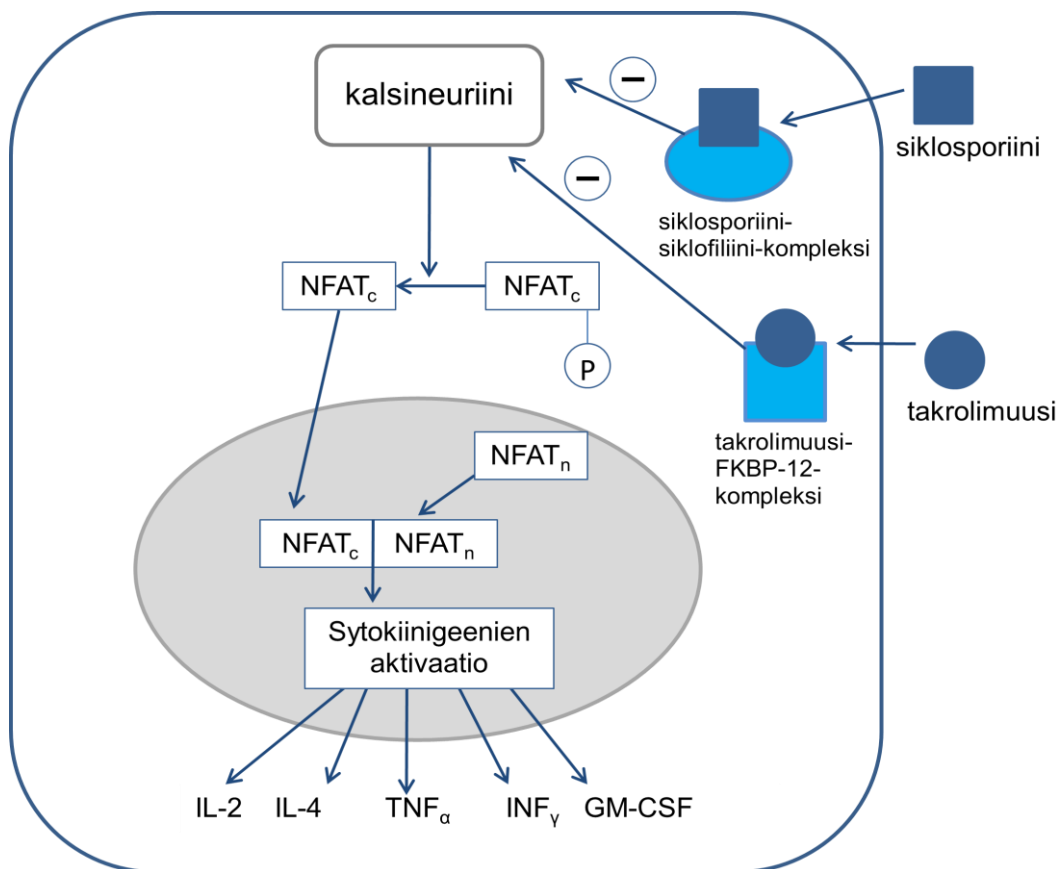


KUVIO 2. Takrolimuusin ($C_{44}H_{69}NO_{12}$) rakennekaava (Mukaillen The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals 2001: 1611).



KUVIO 3. Siklosporiinin ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$) rakennekaava (Mukaillen The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals 2001: 480).

Takrolimuusi ja siklosporiini ovat kemialliselta rakenteeltaan varsin erilaisia, mutta niiden solunsisäinen vaikutusmekanismi on sama (kuvio 4). Molemmat estävät kalsineuriini-entsyymin toimintaa sitoutumalla T-lymfosyyteissä kumpikin omaan reseptoriinsa. Takrolimuusi sitoutuu immunofiiliiniin (FKBP-12) ja siklosporiini siklofiiliiniin. Syntyvä kompleksi estää kalsineuriinifosfataasin välittämää transkriptiotekijä NFAT:n (nuclear factor of activated T cells) aktivoitumista (Moilanen – Vapaatalo 2003: 483–485). Tämä johtaa T-lymfosyyttien aktivaation estoon, sytokiinien erityisesti IL-2:n tuotannon ja erityksen vähenemiseen sekä T-lymfosyyttien proliferaation estoon (Koulu 2007: 789–791).



KUVIO 4: Takrolimuusin ja siklosporiinin vaikutusmekanismi T-lymfosyytissä (Mukaillen Moilanen – Vapaatalo 2003: 486).

4.3 Farmakokinetiikka

Takrolimuusin ja siklosporiinin farmakokinetiikalle on ominaista suuri yksilöiden välinen vaihtelu (Aitio – Himberg 2002: 642). Kumpaakin lääkettä voidaan antaa suun kautta tai injektiona. Suun kautta annetut lääkkeet imeytyvät epätäydellisesti ja vaihtelevasti. (Moilanen – Vapaatalo 2003: 483, 485; Koulu 2007: 790.) Molemmat lääkkeet

sitoutuvat voimakkaasti plasman proteiineihin ja punasoluihin. Pitoisuudet ovat huipussaan 1-3 tunnin kuluttua suun kautta otetun annoksen jälkeen ja puoliintumisajat veressä ovat noin 12–19 tuntia. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1372–1373.)

Takrolimuusi ja siklosporiini metaboloituvat maksassa sytokromi P450 CYP3A4-entsyymien välityksellä. Useat yleisesti käytetyt lääkeaineet metaboloituvat saman entsyymien välityksellä, minkä vuoksi lääkkeillä on runsaasti yhteisvaikutuksia muiden lääkkeiden kanssa. CYP3A4-entsyymien toimintaa indusoivien tai estävien lääkkeiden samanaikainen käyttö saakin aikaan huomattavia lääkeainepitoisuuden muutoksia. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1373; Raunio – Huupponen 2007: 91; Aitio – Himberg 2002: 643.) Takrolimuusi erittyy pääasiassa metaboliitteina suoleen, ja vain 1 % erittyy muuttumattomana virtsaan. Siklosporiinilla on useita virtsaan erittyviä metaboliitteja. (Moi-
lanen – Vapaatalo 2003: 485; Koulu 2007: 790–792.)

4.4 Lääkkeiden haittavaikutukset

Takrolimuusin ja siklosporiinin haittavaikutusten kirjo on samanlainen, mutta yksittäisten reaktioiden voimakkuudessa on eroja lääkeaineiden kesken. Sietämättömien haittavaikutusten ilmaantuessa voidaan kokeilla siklosporiinilääkityksen vaihtamista takrolimuusiin tai päinvastoin. (Aitio – Himberg 2002: 643–644.) Takrolimuusin ja siklosporiinin merkittävin haittavaikutus on munuaistoksisuus, joka on pääasiassa riippuvainen annoksesta. Munuaisvaurion ehkäisyssä olennaista on lääkeaineen pitoisuuden ja munuaisten toiminnan tarkka seuranta sekä annoksen pienentäminen tarvittaessa. Säännöllisestä seurannasta huolimatta pienelle osalle potilaista kehittyy vaikea munuaisvaurio ja vajaatoiminta. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1373; Aitio 2000: 518.)

Tavallisia neurotoksisia oireita kummallakin lääkkeellä ovat etenkin siirron alussa ilmevät vapina, päänsärky ja puutuminen. Muita molempien lääkkeiden käyttöön liittyviä haittavaikutuksia ovat heikentynyt glukoosinsieto ja lisääntynyt diabeteksen vaara, joka on suurempi takrolimuusin käyttäjillä. Siklosporiinilla on enemmän haitallisia vaikutuksia verenpaineeseen ja veren rasva-arvoihin kuin takrolimuusilla. Maha- ja suolikanavan oireet, kuten ripuli tai pahoinvointi, ovat sen sijaan tavallisempia takrolimuusin käyttäjillä. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1373–1374.) Vahvaan immunosuppressioon liittyy aina lisääntynyt vakavien infektioiden vaara ja pitkäaikaiskäytössä pahanlaatuisten kasvainten riskin suureneminen (Aitio – Himberg 2002: 640).

5 VERINÄYTTEIDEN SÄILYVYYS

Takrolimuusin ja siklosporiinin annostusta ohjataan verinäytteestä määritettävän pitoisuuden mukaan (Isoniemi – Jalanko 2004: 1374). Näiden lääkeaineiden pitoisuuksien määrittämisä ei tehdä kaikkien sairaaloiden laboratorioissa, joten näytteitä joudutaan toimittamaan analysoivaan laboratorioon pitkienkin matkojen päästä. Verinäytteessä alkaa välittömästi tapahtua muutoksia, joihin vaikuttavat mm. säilytyslämpötila ja -aika. Tällöin näytteestä mitattavan analyytin kuten tässä tapauksessa takrolimuusin tai siklosporiinin pitoisuus voi muuttua. (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 114; Makkonen – Tuokko 1998: 108.) Tässä luvussa tarkastellaan yleisesti verinäytteen säilyvyyttä ja säilytyksen aikana näytteessä tapahtuvia muutoksia.

Laboratoriotutkimusprosessiin kuuluu preanalyttinen, analyttinen ja postanalyttinen vaihe. Preanalyttiseen vaiheeseen kuuluvat tutkimuksen tarpeen toteaminen, tutkimuspyyntö, potilaan ohjaus tutkimukseen, näytteenotto, näytteen säilytys ja kuljetus laboratorioon, näytteen vastaanotto laboratoriossa sekä näytteen valmistaminen analyysikelpoiseksi. Preanalyttisen vaiheen merkitys on erittäin suuri, sillä suurin osa kliinisesti merkittävistä virheistä syntyy preanalyttisessä vaiheessa. (Tuokko ym. 2008: 7–8.)

Tutkittaessa verestä eri komponentteja näytteenä voidaan käyttää kokoverta, seerumia tai plasmaa (Tapola 2004: 25). Kokoveri- ja plasmanäyte otetaan veren hyytymistä estävää ainetta eli antikoagulanttia sisältävään putkeen (Makkonen – Tuokko 1998: 62). Tavallisimmat antikoagulantit ovat EDTA, sitraatti ja hepariini. Näyte on otettava tutkittavalle analyytille sopivaan antikoagulanttiin, koska antikoagulantti tai sen ainesosa saattaa häiritä tai tulla mitatuksi käytetyssä määritysmenetelmässä. (Tapola 2004: 25.)

Takrolimuusi- ja siklosporiinimäärittämisessä käytetään EDTA-putkeen otettua kokoverta (HUSLAB 2010a, HUSLAB 2010b). EDTA sitoo plasman kalsiumin ja estää siten veren hyytymisen (Makkonen – Tuokko 1998: 69). Näytteenä käytetään kokoverta, koska takrolimuusi ja siklosporiini sitoutuvat voimakkaasti punasoluihin ja plasman proteiineihin (Isoniemi – Jalanko 2004: 1372–1373).

5.1 Näytteiden lähettäminen ja kuljetus

Terveysasemien ja muiden näytteenottopisteinä toimivien laboratorioiden näytteet toimitetaan yleensä keskuslaboratorioon. Laboratorion tutkimusohjekirjasta tai tietokannasta löytyvät jokaiselle näytteelle laaditut ohjeet siitä, miten ja minkälaisissa olosuhteissa näyte tulee toimittaa analysoivaan laboratorioon. Näytteen analysoivan laboratorion tulee varmistaa, että näytteen lähettävällä asiakkaalla on käytettävissään tarkoituksenmukaiset ohjeet ja suositukset näytteen säilytykselle ennen kuljetusta, kuljetusta varten tarvittavat lähetystarvikkeet ja tiedot kriittisistä kuljetusajoista ja -tavoista. (Tanner 2007: 22; Tuokko ym. 2008: 114; Linko – Mäenpää 2000: 190.) Vaikka näytekuljetus on laaja kokonaisuus, muodostavat pakkaaminen, kuljetustapa, lämpötila ja aika sen oleellimmat osatekijät (Linko – Mäenpää 2000: 190).

Laboratoriotoiminnan alueellinen laajentuminen, toimintojen yhtenäistämisen tarve ja kustannustehokkuus ovat lisänneet näytteiden kuljettamista ja lähettämistä. Se vaatii perusteellista suunnittelua, jonka pohjaksi tarvitaan tutkittua tietoa näytteiden säilyvyydestä. Lyhyet alueen sisäiset kuljetukset eivät yleensä aiheuta ongelmia säilyvyyden kannalta. Mikään laboratorio ei kuitenkaan tee kaikkia potilaan hoidossa tarvittavia tutkimuksia itse, ja näytteitä kuljetetaan yhä enemmän sairaanhoitopiirin sisällä ja sen ulkopuolelle. Tämä koskee erityisesti erikoisanalytiikkaa, joka on monesti vaativaa myös säilyvyyden kannalta. (Siloaho 2000: 185; Tanner 2007: 22; Tuokko ym. 2008: 114.)

5.2 Yleistä näytteiden säilyvyydestä ja säilytyksestä

Säilyvyys voidaan määrittellä näytemateriaalin kyvyksi säilyttää alkuperäinen mitattu suure määritellyissä rajoissa määrätyn ajan, kun näytettä säilytetään tietyissä olosuhteissa. (Guder – Narayanan – Wisser – Zawta 2001: annex 12.)

Suurin osa verinäytteistä kuljetetaan huoneenlämmössä, jos ne saapuvat analyysin tekevään laboratorioon näytteenottopäivänä. Näytteet kuljetaan suljettuna pystyasennossa tärinää välttämällä. Kylmäkuljetuksen vaativat näytteet pakataan eristelaatikkoon, johon laitetaan kylmävaraajat. Näytteet eivät saa kuitenkaan olla suorassa kosketuksessa kylmävaraajaan. Pakastetut näytteet (-20 °C tai matalampi lämpötila) lähetetään eristelaatikkossa hiilihappojäähän pakattuna. Kuljetuksen aikana lämpötila ei saa merkittävästi muuttua. Kuljetusolosuhteiden valvontaan voidaan käyttää kuljetuslaatikkoon laitetta-

vaa laitetta, jonka avulla voidaan seurata lämpötilaa ja kuljetusaikaa. (Tuokko ym. 2008: 10, 117.)

Jos näyte määritetään näytteenottopäivänä, se voidaan useimmiten säilyttää huoneenlämmössä siihen asti kunnes määrittäminen aloitetaan. Muussa tapauksessa näytteet säilytetään jääkaapissa tai pakastettuna. Tutkimuskohtaiset ohjeet on kuitenkin aina tarkistettava. Joihinkin näytteisiin liittyy erityisvaatimuksia, kuten kylmänäytteenotto tai suojaaminen UV-valolta. Jotkut näytteet eivät kestä pakastamista ollenkaan ja toiset taas säilyvät pakastettuina kuukausia tai vuosia. Kun näyte pakastetaan, sen eri aineosat jäätyvät eri nopeudella ja ovat pakastetuissa näytteissä siten eri kerroksissa. Tämän takia sulatetut näytteet tulee sekoittaa erittäin huolellisesti. (Makkonen – Tuokko 1998: 106, 108.)

Analyysin jälkeisen näytteiden säilytyksen tarkoituksena on mahdollistaa analyysituloksen varmistus tai näytteen identifioinnin tarkistus. Joissakin tilanteissa näytettä voidaan tarvita lisätutkimuksiin tai oikeuslääketieteellisiin tarkoituksiin. (Siloaho 2000: 186.)

5.3 Säilytyksen aikana tapahtuvat muutokset

Kemiallisen laboratoriotutkimuksen tarkoituksena on määrittää kliinisesti merkityksellisen analyytin pitoisuus tietyssä hetkenä otetusta näytteestä. Tarkoituksena on, että näyte kuvaa näytteenottohetken tilannetta, eikä näyte muutu koostumukseltaan preanalyytin eli analyysiä edeltävän vaiheen aikana. Kuitenkin todellisuudessa muutokset näytteessä alkavat heti näytteenoton jälkeen ja jatkuvat analyysiin asti. (Siloaho 2000: 185.)

Näytteen kuljetuksen ja säilytyksen aikana tapahtuvat muutokset johtuvat fysikaalisista, kemiallisista ja mikrobiologisista ilmiöistä. Solujen aineenvaihdunta ja aineosien siirtyminen soluista plasmaan ja päinvastoin aiheuttavat muutoksia näytteessä silloin, kun plasma- tai seeruminäytettä säilytetään sentrifugoimatta ja erottamatta soluista. Näytteessä voi tapahtua myös osmoottista solujen kutistumista tai turpoamista. Myös näytteessä olevat proteiineja hajottavat entsyymit, proteaasit, saavat aikaan muutoksia näytteessä. Ne voivat hajottaa analysoitavaa yhdistettä tai muuttaa muita määrittämenetelmässä vaikuttavia tekijöitä. (Tuokko ym. 2008: 114–115; Makkonen – Tuokko 1998: 108.)

Mitattava analyytti voi hajota tai muuttua metaboliiteikseen johtuen esimerkiksi säilytykseen ja kuljetukseen kuluneesta ajasta, lämpötilasta, käytettävistä näyteastioista tai mikrobien toiminnasta (Siloaho ym. 1997: 200). Näytteen bakteerikontaminaation ja mikrobiologisen hajoamisen seurauksena bakteerit voivat tuottaa tai käyttää ravinnokseen määritettävää analyyttiä tai muuttaa näytteen pH:ta (Tuokko ym. 2008: 114–115). Kun näyte on kosketuksissa ilman kanssa, tapahtuu haihtumista ja näytteen konsentroidumista, jolloin haihtumattomien analyyttien pitoisuus kasvaa. Jos näyteastia ei ole tiivis tai sen seinämä läpäisee kaasuja, tapahtuu kaasujen diffuusiota ympäröivän ilman kanssa. Jotkut analyytit ovat herkkiä ultravioletivalolle ja voivat tuhoutua tai muuttua toiseksi aineeksi. (Tuokko ym. 2008: 114–115.)

6 TAKROLIMUUSI- JA SIKLOSPORIINIPITOISUUDEN MÄÄRITYS

Immunosuppressiivisten lääkeaineiden pitoisuusmittaukset ovat keskeinen osa elinsiirtopotilaan hoitoa. Lääkehoidon tavoitteena on ehkäistä siirteen hyljintä ja samalla varoa haittavaikutusten kehittymistä. Liiallinen lääkitseminen lisää lääkekohtaisten haittavaikutusten sekä infektioiden ja syövän vaaraa. (Laine 2004: 1763; Isoniemi – Jalanko 2004: 1371.) Lääkkeen riittämätön teho aiheuttaa hylkimisriskin ja toisaalta haittavaikutuksia voi olla vaikea erottaa sairauden oireista. Esimerkiksi munuaistoksisuutta on vaikea erottaa munuaissiirteen hyljintäreaktiosta, jolloin pitoisuusmittauksilla voidaan arvioida, onko lääkevaikutus liian suuri vai liian pieni. (Laine 2004: 1763.)

Takrolimuusin ja siklosporiinin suuren yksilöllisen farmakokineettisen vaihtelun vuoksi lääkehoitoa on ohjattava pitoisuusmittausten perusteella (Aitio – Himberg 2002: 642). Lääkkeen imeytymiseen, jakautumiseen, metaboliaan ja poistumiseen elimistöstä vaikuttavat sekä geneettiset tekijät että ympäristötekijät. Geneettisistä tekijöistä keskeisiä ovat erot lääkeaineita metaboloivien entsyymien aktiivisuudessa yksilöiden välillä. Lisäksi ympäristötekijät kuten yhteisvaikutukset muiden lääkkeiden ja ravinnon kanssa aiheuttavat metabolian vaihtelua. (Laine 2004: 1765.)

6.1 Immunokemialliset menetelmät

Useiden lääkeaineiden määrityksissä käytetään immunokemiallisia menetelmiä (Savolainen – Parviainen 2003: 59). Immunokemiallisissa menetelmissä mitataan joko anti-geenin tai vasta-aineen pitoisuutta käyttäen hyväksi antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen ominaisuutta sitoutua toisiinsa (Halonen 2004: 90). Antigeenin ja vasta-aineen yhteenliittymää kutsutaan immunokompleksiksi (Haug ym. 1999: 334). Menetelmästä riippuen joko antigeeni tai vasta-aine on leimattu jollakin mitattavissa olevalla merkki-aineella. Yleisiä käytössä olevia merkkiaineita ovat entsyymit ja fluoresenssiin tai kemiluminesenssiin perustuvat leimat. (Savolainen – Parviainen 2003: 59.)

Takrolimuusin ja siklosporiinin määrityksessä käytetään immunokemiallista menetelmää CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay), joka perustuu kemiluminesenssiin (HUSLAB 2010a, HUSLAB 2010b). Kemiluminesenssilla tarkoitetaan valon tai säteilyenergian emissiota, joka saadaan aikaan kemiallisella reaktiolla (Jokela 2003: 50–51). Käytettävässä menetelmässä mikropartikkeli on päällystetty takrolimuusi/siklosporiinin vasta-aineella (hiiren monoklonaalinen vasta-aine). Näytteen takrolimuusi/siklosporiini sitoutuu antigeeninä vasta-aineeseen mikropartikkelin pinnalla. Reaktioseokseen lisätään akridiini-leimattu takrolimuusi/siklosporiini-konjugaatti, joka sitoutuu vasta-aineen vapaisiin sitoutumispaikkoihin. Mittaamalla leimatun takrolimuusi/siklosporiinin määrän saadaan selville näytteen sisältämä takrolimuusi/siklosporiinipitoisuus. (Abbott Laboratories 2007: 2; Abbott Laboratories 2008: 2.)

Lääkeaineanalytiikassa vasta-aineen spesifisyys suhteessa lääkeaineen stereoisomeereihin, metaboliitteihin ja muihin rakenteeltaan samankaltaisiin lääkeaineisiin tulisi olla tutkittu (Himberg 1996: 48). Immunokemiallisissa menetelmissä yksi hankala preanalyttisten virheiden aiheuttaja on myös ns. endogeeninen interferenssi. Endogeeninen interferenssi muodostuu potilaan veressä kiertävistä erilaisista tekijöistä, joista eniten ongelmia aiheuttavat erityyppiset vasta-aineet. Merkittävimmät häiritsevät vasta-aineluokat ovat heterofiiliset eläinimmunoglobuliinien kanssa reagoivat vasta-aineet sekä analyttien autovasta-aineet. Suomen populaatiossa heterofiiliset eläinvasta-aineet ovat varsin yleisiä, ja niiden esiintyvyys on 15–20%. Ne ovat ilmeisesti syntyneet immunisaatiosta ruuassa olevia proteiineja vastaan. On myös havaittu, että potilailla, joilla on reumafaktoreita veressään, esiintyy useammin heterofiilivasta-aineita kuin verrokeilla. (Weber 2000: 182–183.)

Interferenssi voi johtua myös ihmisen anti-hiiri-vasta-aineista (HAMA). HAMA-vasta-aineita saattaa muodostua vereen ihmisen altistuessa hiirestä tuotetuille vasta-aineille. Hiiren monoklonaalisia vasta-aineita käytetään esimerkiksi syöpähoidoissa. Näytteessä olevat HAMA-vasta-aineet saattavat johtaa virheellisiin tuloksiin menetelmissä, jotka perustuvat hiiren monoklonaalisten vasta-aineiden käyttöön. (Abbott Diagnostics 2008: 28.)

Takrolimuusin ja siklosporiinin määritysmenetelmän spesifisyys on tutkittu lääkeaineiden tavallisimpien metaboliittien suhteen. Lisäksi on selvitetty muista lääkeaineista, endogeenisista tekijöistä (hematokriitti, bilirubiini, kokonaisproteiini, uraatti, triglyseridit, kolesteroli), HAMA-vasta-aineista sekä reumafaktoreista mahdollisesti aiheutuva interferenssi. Takrolimuusin ja siklosporiinin saanto edellä mainittujen interferenssitekijöiden läsnä ollessa oli 100 ± 10 %. (Abbott Laboratories 2007: 7–8; Abbott Laboratories 2008: 6–7.)

6.2 Takrolimuusin ja siklosporiinin preanalytiikka

HUSLAB:n tutkimusnimikkeet takrolimuusi- ja siklosporiinimäärityksille ovat B-Tacro ja B-CyA. Verinäyte kumpaakin tutkimusta varten otetaan EDTA-putkeen aamulla ennen seuraavaa lääkeannosta. (HUSLAB 2010a, HUSLAB 2010b.) Tällöin mitataan veressä vallitsevaa jäännöspitoisuutta, jolloin edellinen annos on ehtinyt täysin imeytyä ja jakautua. Näytteenoton yhdenmukainen ajoittaminen on tärkeää mitattujen pitoisuuksien tulokinnan luotettavuuden ja vertailukelpoisuuden kannalta. Näytteenoton ajankohta, kuten myös edellisen lääkeannoksen ottamisaika, on oltava tiedossa mittaustuloksen tulkintaa tehdessä. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1374; Ylitalo – Neuvonen 2002: 888.) Lääkeainepitoisuus edustaa aina kokonaispitoisuutta veressä eli vapaan ja proteiineihin sitoutuneen osuuden summaa (Laine 2004: 1766).

Siklosporiinin jäännöspitoisuuden määrittäminen on jonkin verran kritisoitu, koska se kuvaa huonosti potilaan kokonaisaltistusta lääkkeelle. Sen sijaan kaksi tuntia lääkkeenoton jälkeen mitattu veren siklosporiinipitoisuus korreloi hyvin kokonaisaltistukseen. (Isoniemi – Jalanko 2004: 1374.) HUSLAB:ssa kahden tunnin siklosporiininäytteelle on olemassa oma tutkimusnimike B-CyA2 (HUSLAB 2010c).

6.3 Takrolimuusin ja siklosporiinin analytiikka

Takrolimuusi- ja siklosporiinipitoisuus määritetään kokoverinäytteestä CMIA-menetelmällä Architect i2000_{SR} -analysaattorilla. Määritysmenetelmä kontrolloidaan kolmella eritasoisella kaupallisella kontrollilla (Abbott Immunosuppressant-MCC Levels 1, 2, 3). Kontrollien takrolimuusipitoisuudet ovat 4,0 µg/l (taso 1), 8,1 µg/l (taso 2) ja 16,1 µg/l (taso 3), ja vastaavat siklosporiinipitoisuudet ovat 85 µg/l, 419 µg/l ja 1038 µg/l. (Inkinen 2010a: 1–2; Inkinen 2010b: 1–2.) Kontrollien annetaan lämmetä huoneenlämpöiseksi, ja sen jälkeen pulloihin lisätään 2,0 ml 1. lk. laboratoriovettä. Pulloja sekoitetaan varovasti muutaman kerran ja niiden annetaan seistä 60 min suljettuina väkällä sekoittaen. (Inkinen 2009a: 1.)

Kaupallisten kontrollien lisäksi käytetään laboratoriossa valmistettua kontrollia, takro/siklopoolia. Pooli valmistetaan lisäämällä vanhentuneesta punasolupussista tehtyyn hemolysaattiliuokseen tietty pitoisuus takrolimuusi/siklosporiinilääkettä. Takropoolin teoreettinen pitoisuus on n. 15 µg/l ja siklopoolin n. 300 µg/l. Pitoisuus tarkistetaan analysoimalla kolme rinnakkaista näytettä. Liuos jaetaan alikvootteihin ja säilytetään pakastettuna -70 °C. (Stenholm 2010a: 1; Stenholm 2010b: 1.)

Kontrollit esikäsitellään samalla tavalla kuin näytteet. Ne ajetaan ennen ensimmäisiä potilasnäytteitä. Aamulla ajetaan tasot 1, 2 ja 3 sekä takro/siklopooli ja iltapäivällä ajetaan yksi taso. Jos ilta- ja yövuoron aikana ajetaan näytteitä, tehdään yksi taso tasojen vaihdellen. (Inkinen 2009b: 3–4; Inkinen 2009c: 3–4.)

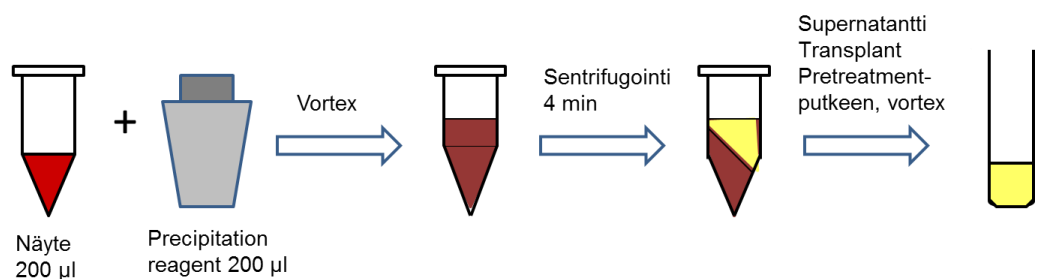
Menetelmä vakioidaan aina otettaessa käyttöön uusi reagenssierä tai kontrollitulosten hälyttäessä toistuvasti. Laite lukee masterkuvaajan reagenssipullon viivakoodista. Käyttäjän suorittama vakiointi korjaa kuvaajan laitteen olosuhteita vastaavaksi (adjustkalibrointi). Tunnetun pitoisuuden omaavat vakiot CAL A, B, C, D, E ja F ovat käyttövalmiita ja niille tehdään esikäsitely samalla tavalla kuin näytteille (1 esikäsitely/vakio). CAL A ei sisällä takrolimuusia/siklosporiinia ja sitä käytetään myös näytteiden laimentamiseen. Analysaattori tekee kustakin vakiosta rinnakkaiset määritykset. Rinnakkaisten määritysten tulokset ja tasojen väliset erot tulee olla annetuissa rajoissa. Näiden parametrien perusteella laite joko hyväksyy tai hylkää vakioinnin. (Inkinen 2009b: 3; Inkinen 2009c: 3; Inkinen 2009d: 1; Inkinen 2009e:1.)

6.3.1 Takrolimuusin analytiikka

Takrolimuusin pitoisuus määritetään yhden vaiheen viivästetyllä menetelmällä. Yhden vaiheen menetelmässä näyte, vasta-aineella päällystetyt mikropartikkelit ja leimatut konjugaatit lisätään reaktioseokseen ennen pesuvaihetta, jossa sitoutumattomat ainesosat pestään pois. (Abbott Laboratories 2007: 2; Abbott Laboratories 2009: 3-31.)

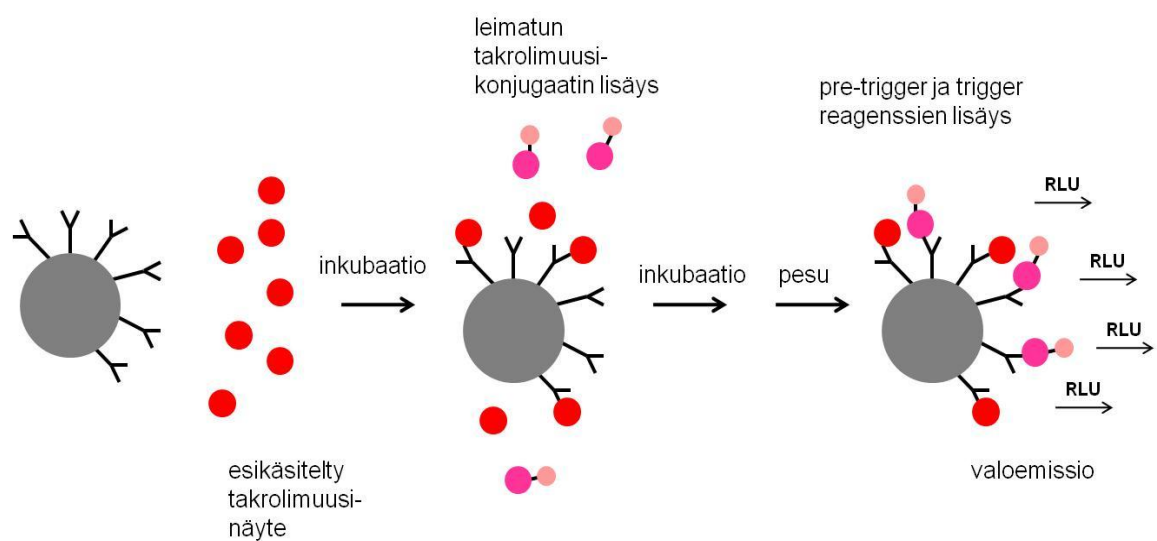
Ennen kuin näytteet voidaan syöttää Architect-analysaattoriin, niille tehdään manuaalinen esikäsitely. Siinä näytteen takrolimuusi erotellaan kokoverestä saostusreagenssin avulla. (Abbott Laboratories 2007: 2.) Esikäsitelyn vaiheita on havainnollistettu kuviossa 5.

Aluksi hyvin sekoitettua näytettä pipetoidaan 200 µl eppendorf-putkeen (1,5 ml). Tämän jälkeen lisätään annostelijalla 200 µl Architect Tacrolimus Whole Blood Precipitation Reagent -liuosta. Eppendorf-putken korkki suljetaan ja putkea sekoitetaan välittömästi vortexilla 5-10 sekuntia. Helposti haihtuvan Precipitation reagent-liuoksen lisäämistä ei voi tehdä sarjassa kaikkiin näytteisiin samalla kertaa. Annostelu on tehtävä yksitellen, ja jokainen eppendorf-putki on suljettava ja sekoitettava heti sen jälkeen. Sekoitamisen jälkeen tarkistetaan, että seos on homogeeninen. Eppendorf-putket sentrifugoidaan 4 min (10 900 G). Sentrifugoinnin jälkeen tarkistetaan, että supernatantti on kirkas. Supernatantti kaadetaan EDTA:ta sisältävään Transplant Pretreatment -putkeen, ja putkea sekoitetaan vortexilla 5-10 sekuntia. Putket asetetaan Architect-näytetelineeseen ja teline laitetaan analysaattoriin. Näytteet on analysoitava 30 minuutin kuluessa, kun ne on siirretty Transplant Pretreatment -putkiin. (Abbott 2006: 2–5; Inkinen 2009c: 3.)



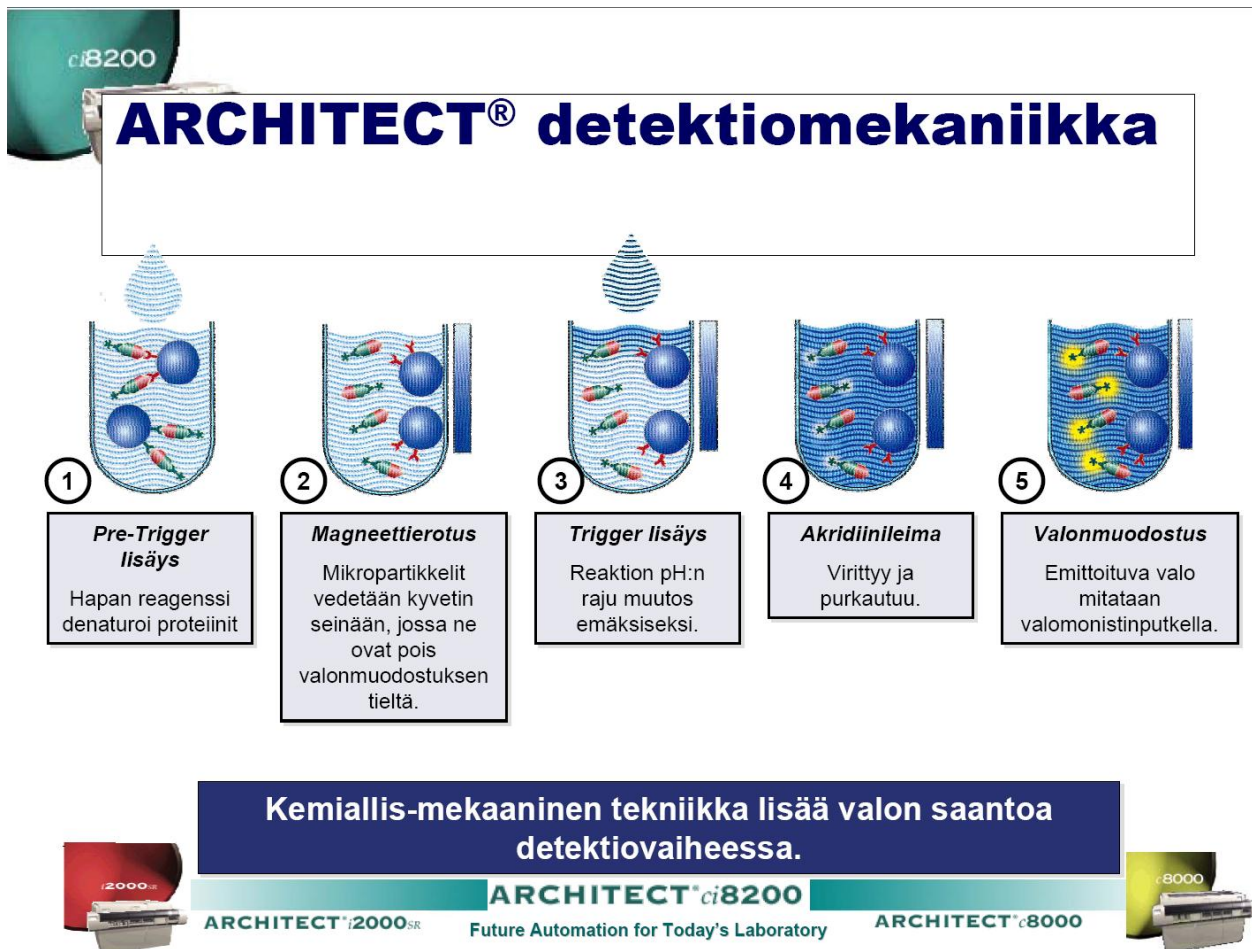
KUVIO 5. Takrolimuusinäytteen esikäsitely (Abbott 2006: 2–5).

Analysaattorissa näyte, laimennuspuskuri ja anti-takrolimuusilla päällystetyt magneettiset mikropartikkelit muodostavat reaktioseoksen. Näytteen takrolimuusi sitoutuu mikropartikkelien anti-takrolimuusiin. Lyhyen inkubaation jälkeen akridiinilla leimattu takrolimuusi-konjugaatti lisätään reaktioseokseen. Konjugaatin takrolimuusi kilpailee mikropartikkelin vapaista sitoutumispaikoista. Sitä seuraavan inkubaation (25 min) jälkeen mikropartikkelit pestään, jolloin sitoutumattomat ainesosat saadaan poistettua. Tämän jälkeen reaktioseokseen lisätään hapan pre-trigger-reagenssi, joka vapauttaa konjugaatit mikropartikkeleista. Mikropartikkelit vedetään magneetin avulla kyvetin seinään, jossa ne ovat pois valomuodostuksen tieltä. Seuraavaksi lisätään trigger-liuos, joka saa aikaan emäksisen liuoksen valonmuodostusta varten. Akridiini-leima virittyy ja purkautuu emittoiden valoa, joka mitataan valomonistinputkella. Emittoitu valo ilmaistaan RLU-yksikköinä (relative light units). (Abbott Laboratories 2007: 2; Abbott Laboratories 2009: 3-25–3-27, 3-31–3-33.) Kuviossa 6 on esitetty menetelmän eri vaiheita.



KUVIO 6. Takrolimuusin määrityksen vaiheet (Mukaiillen Wallemacq ym. 2007).

Valonmuodostusreaktiota edeltäviä vaiheita havainnollistetaan tarkemmin kuviossa 7. Takrolimuusin määrä näytteessä on kääntäen verrannollinen emittoidun valon määrään. Mitä suurempi on valon määrä, sitä vähemmän näytteessä on takrolimuusia. (Abbott Laboratories 2007: 2.)



KUVIO 7. Valonmuodostusreaktio. (© 2010 Abbott Laboratories.) Julkaistu Abbott Finlandin luvalla. (Liite 3.)

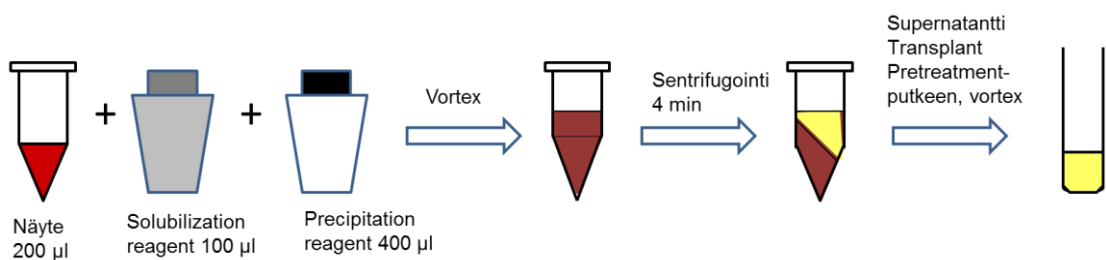
6.3.2 Siklosporiinin analytiikka

Siklosporiinin pitoisuus määritetään kahden vaiheen menetelmällä. Kahden vaiheen menetelmä sisältää kaksi pesua, joiden avulla sitoutumattomat ainesosat poistetaan. Näytteen ja vasta-aineella päällystettyjen mikropartikkelien muodostama seos pestään ennen leimatun konjugaatin lisäämistä sekä sen jälkeen. (Abbott Laboratories 2008: 2; Abbott Laboratories 2009: 3-34.)

Siklosporiininäytteiden esikäsittelyssä kokoverinäyte lysoidaan ja näytteen siklosporiini erotellaan saostusreagenssin avulla (Abbott Laboratories 2008: 2). Esikäsittelyn vaiheita on havainnollistettu kuviossa 8.

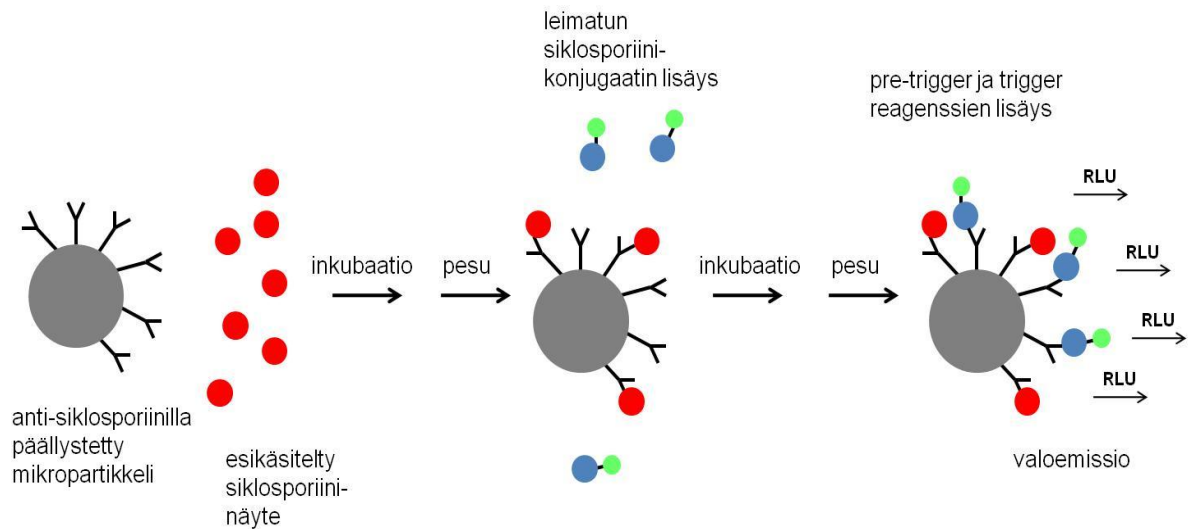
Hyvin sekoitettua näytettä pipetoidaan 200 µl eppendorf-putkeen (1,5 ml). Tämän jälkeen lisätään annostelijalla 100 µl Architect Cyclosporine Whole Blood Solubilization

Reagent -liuosta. Seokseen lisätään annostelijalla 400 µl Architect Cyclosporine Whole Blood Precipitation Reagent -liuosta. Eppendorf-putkien korkit suljetaan ja putkia sekoitetaan vortexilla 5-10 sekuntia. Sekoittamisen jälkeen tarkistetaan, että seos on homogeeninen. Eppendorf-putket sentrifugoidaan 4 min (10 900 G). Sentrifugoinnin jälkeen tarkistetaan, että supernatantti on kirkas. Supernatantti kaadetaan EDTA:ta sisältävään Transplant Pretreatment -putkeen, ja putkea sekoitetaan vortexilla 5-10 sekuntia. Putket asetetaan Architect-näytetelineeseen ja teline laitetaan analysaattoriin. Näytteet on analysoitava kolmen tunnin kuluessa, kun ne on siirretty Transplant Pretreatment -putkiin. (Abbott 2007: 2–6; Abbott Laboratories 2008: 4; Inkinen 2009b: 3.)



KUVIO 8. Siklosporiininäytteen esikäsittely (Abbott 2007: 2–6).

Analysaattorissa näyte, laimennuspuskuri ja anti-siklosporinilla päällystetyt magneettiset mikropartikkelit muodostavat reaktioseoksen. Näytteen siklosporiini sitoutuu mikropartikkelien anti-siklosporiiniin. Inkubaation (18 min) jälkeen mikropartikkelit pestään, jolloin sitoutumattomat ainesosat poistuvat. Tämän jälkeen lisätään akridiinilla leimattu siklosporiini-konjugaatti, ja reaktioseoksen annetaan inkuboitua (4 min). Inkubaation aikana siklosporiini-konjugaatit sitoutuvat vasta-aineiden vapaisiin sitoutumispaikkoihin. Toisen pesun jälkeen reaktioseokseen lisätään hapan pre-trigger-reagenssi, joka vapauttaa konjugaatit mikropartikkeleista. Mikropartikkelit vedetään magneetin avulla kyvetin seinään, jossa ne ovat pois valomuodostuksen tieltä. Seuraavaksi lisätään trigger-liuos, joka saa aikaan emäksisen liuoksen valonmuodostusta varten. Akridiini-leima virittyy ja purkautuu emittoiden valoa, joka mitataan valomonistinputkella. Emittoitu valo ilmaistaan RLU-yksikköinä (relative light units). (Abbott Laboratories 2008: 2; Abbott Laboratories 2009: 3-25–3-27, 3-34–3-36.) Kuvioissa 9 on esitetty menetelmän eri vaiheita. Siklosporiinin määrä näytteessä on kääntäen verrannollinen emittoidun valon määrään. Mitä suurempi on valon määrä, sitä vähemmän näytteessä on siklosporiinia. (Abbott Laboratories 2007: 2.)



KUVIO 9. Siklosporiinin määrittämisen vaiheet (Mukaiillen Wallemacq ym. 2007; Abbott Laboratories 2009: 3-25–3-27).

6.4 Takrolimuusin ja siklosporiinin postanalytiikka

Lääkepitoisuuden viitearvo tarkoittaa jäännöspitoisuutta (minimipitoisuus) annosvälillä vakaassa tilassa. Viitearvot ovat keskimääräisiä terapeuttisia pitoisuuksia, ja potilaalle optimaalinen pitoisuus voi olla viitealueen ylä- tai alapuolella potilaan kliinisestä tilasta riippuen. Jos mittaustulos on viitearvojen äärialueella tai ulkopuolella, tulee potilaan seurannassa olla tavallista huolellisempi. Keskeisin virhe pitoisuusmittauksissa on se, että näyte ei edusta minimipitoisuutta, vaikka se tulkitaan tällaiseksi. Muuta kuin minimipitoisuutta on vaikea verrata viitearvoihin. (Laine 2004: 1764–1766; Ylitalo - Neuvonen 2002; 888, 891.)

Takrolimuusin terapeuttinen alue on 5–15 µg/l. Siklosporiinin terapeuttinen alue määritellään erikseen kullekin potilasryhmälle, ja tavoitetaso vaihtelee indikaatiosta ja hoidon vaiheesta riippuen välillä 50–500 µg/l. Vakaan tilan saavuttamiseen kuuluu takrolimuusilla keskimäärin kolme vuorokautta ja siklosporiinilla kaksi vuorokautta, minkä verran tulee odottaa lääkityksen aloittamisen tai annoksen muuttamisen jälkeen ennen kuin pitoisuusmääritys kannattaa tehdä. (Laine 2004: 1764, 1766; HUSLAB 2010a, HUSLAB 2010b.)

7 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Takrolimuusi- ja siklosporiininäytteiden säilyvyyttä huoneenlämmössä tai jääkaapissa ei ole tutkittu aiemmin Kirurgisen sairaalan laboratoriossa. Menetelmävalmistajan (Abbott) mukaan molemmat näytteet säilyvät analysointikelpoisena seitsemän vuorokautta +2–8 °C lämpötilassa ja sen jälkeen pakastettuna vähintään -10 °C lämpötilassa. Pakastettujen takrolimuusinäytteiden pitoisuuden on todettu laskevan kuudessa kuukaudessa alle 10 % ja yhdeksässä kuukaudessa 46 %. Vastaavia lukuja ei anneta siklosporiininäytteille. Pakastettujen siklosporiininäytteiden useita pakastus-sulatuskertoja tulee välttää. Kummankaan näytteen säilyvyydestä huoneenlämmössä ei ole mainintaa. (Abbott Laboratories 2007: 3; Abbott Laboratories 2008: 3.)

7.1 Tutkimuksia takrolimuusin säilyvyydestä

Yhdysvaltalaisessa (University of Michigan Medical Center) tutkimuksessa tutkittiin takrolimuusin säilyvyyttä kokoveressä +4 °C lämpötilassa ja huoneenlämmössä MEIA-menetelmällä. Näytteet (n=21) analysoitiin kahden ja seitsemän vuorokauden kuluttua ensimmäisestä määrityksestä. Takrolimuusin pitoisuus pysyi stabiilina seitsemän vuorokauden ajan +4 °C lämpötilassa sekä kahden vuorokauden ajan huoneenlämmössä. Seitsemässä vuorokaudessa pitoisuus huoneenlämmössä laski hieman (5 %), mutta muutos oli menetelmän tarkkuudelle annettujen rajojen sisällä. (Annesley – Hunter – Fidler – Giacherio 1995: 361–363.)

MEIA-menetelmää käytettiin myös Kanadassa tehdyssä näytemäärältään (n=4) pienessä tutkimuksessa, jossa näytteitä säilytettiin +22 °C, +4 °C ja -70 °C lämpötiloissa. Näytteet analysoitiin ensimmäisen määrittelyn jälkeen 2, 3, 4, 7 ja 14 vuorokauden jälkeen. Tulosten perusteella takrolimuusin pitoisuus ei muuttunut merkittävästi 14 vuorokaudessa missään tutkituista lämpötiloista. (Freeman – Stawecki – Howson 1995: 266–267.)

Australiassa tehdyssä tutkimuksessa saman takrolimuusipitoisuuden omaavien näytteiden säilyvyyttä tutkittiin +40 °C, +4 °C ja -20 °C lämpötiloissa 28 vuorokauden ajan. Näytteet analysoitiin LC-MS²-menetelmällä. Pitoisuudet pysyivät muuttumattomina tarkastelujakson ajan +4 °C ja -20 °C lämpötiloissa. Sen sijaan +40 °C lämpötilassa

pitoisuus laski asteittain, ja lasku oli merkittävää kolmessa vuorokaudessa. (Taylor 1996: 281, 283–284.)

7.2 Tutkimuksia siklosporiinin säilyvyydestä

Siklosporiininäytteiden säilyvyyttä huoneenlämmössä tutkittiin Saksassa Essenin yliopistossa kymmenen vuorokauden ajan. Näytteet (n=35) analysoitiin 1, 2, 3, 4, 7 ja 10 vuorokauden jälkeen ensimmäisestä määrittämisestä FPIA-menetelmällä. Pitoisuuksissa havaittiin hieman laskua, mutta se jäi alle menetelmän normaalin variaation (<10 %), jonka valmistaja oli ilmoittanut. Tutkimus osoitti, että säilytettäessä näytteitä huoneenlämmössä, pitoisuuksissa ei tapahtunut kliinisesti merkittäviä muutoksia kymmenessä vuorokaudessa. (Michel – Thesing – Wagner – Philipp 1995: 919–911.)

Yhdysvalloissa (Tennessee) tehdyssä tutkimuksessa analysoitiin huoneenlämmössä (+20–24 °C) ja vesihauteessa (+37 °C) säilytetyt siklosporiininäytteet (n=10) RIA-menetelmällä toistuvasti 9–13 vuorokauden asti näytteenotosta. Päivittäisissä tuloksissa ei ollut merkittäviä eroja kummassakaan lämpötilassa tarkastelulla ajanjaksolla. Sarjojen välinen variaatio oli keskimäärin 5,4 CV% ja kolmelle eritasoiselle kontrollille 6,3 CV%. (Smith – Sephel 1990: 1991–1992.)

Toisessa Yhdysvalloissa (West Virginia) tehdyssä tutkimuksessa tarkasteltiin muoviputkien soveltuvuutta siklosporiininäytteille. Siinä näytteet kerättiin lasi- ja muoviputkiin, ja niitä säilytettiin huoneenlämmössä ja +4 °C lämpötilassa. Näytteet analysoitiin FPIA-menetelmällä 1, 4 ja 7 vuorokauden jälkeen näytteenotosta. Tutkimuksen perusteella todettiin, että pitoisuuksissa ei ollut merkittävää eroa lasi- ja muoviputkien välillä, ja näytteet säilyivät stabiilina seitsemän vuorokauden ajan sekä huoneenlämmössä että +4 °C lämpötilassa. (Faynor – Robinson 1998: 2220–2221.)

8 SÄILYVYYSTUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Säilyvyystutkimus toteutettiin Kirurgisen sairaalan laboratoriossa marraskuussa 2009. Huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden keräys ja analysointi tehtiin kahden viikon aikana kehittämistehtävän yhteydessä. Työprosessin vaiheet on esitetty kuviossa 10. Pakastettavat siklosporiininäytteet kerättiin huhtikuussa 2009 ja viimeiset määritykset tehtiin tästä 6 kuukauden kuluttua. Pakastetut näytteet käsitteli laboratorion laboratoriohoitaja. Näytemäärä oli 20 kpl, ja kukin näyte jaettiin lähtötason (0 vrk) määrityksen jälkeen eriin (300 µl) eppendorf-putkiin, jotka pakastettiin (-20 °C). Näytteet analysoitiin 1 viikon, 2 viikon, 1 kuukauden, 3 kuukauden ja 6 kuukauden pakastamisen jälkeen. Näytteiden annettiin sulaa huoneenlämmössä, ja ne sekoitettiin huolellisesti ennen määrittystä. (Inkinen 2010c.) Kappaleissa 8.1–8.3 kuvataan takrolimuusin ja siklosporiinin huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden keräämistä, käsittelyä ja analysointia.

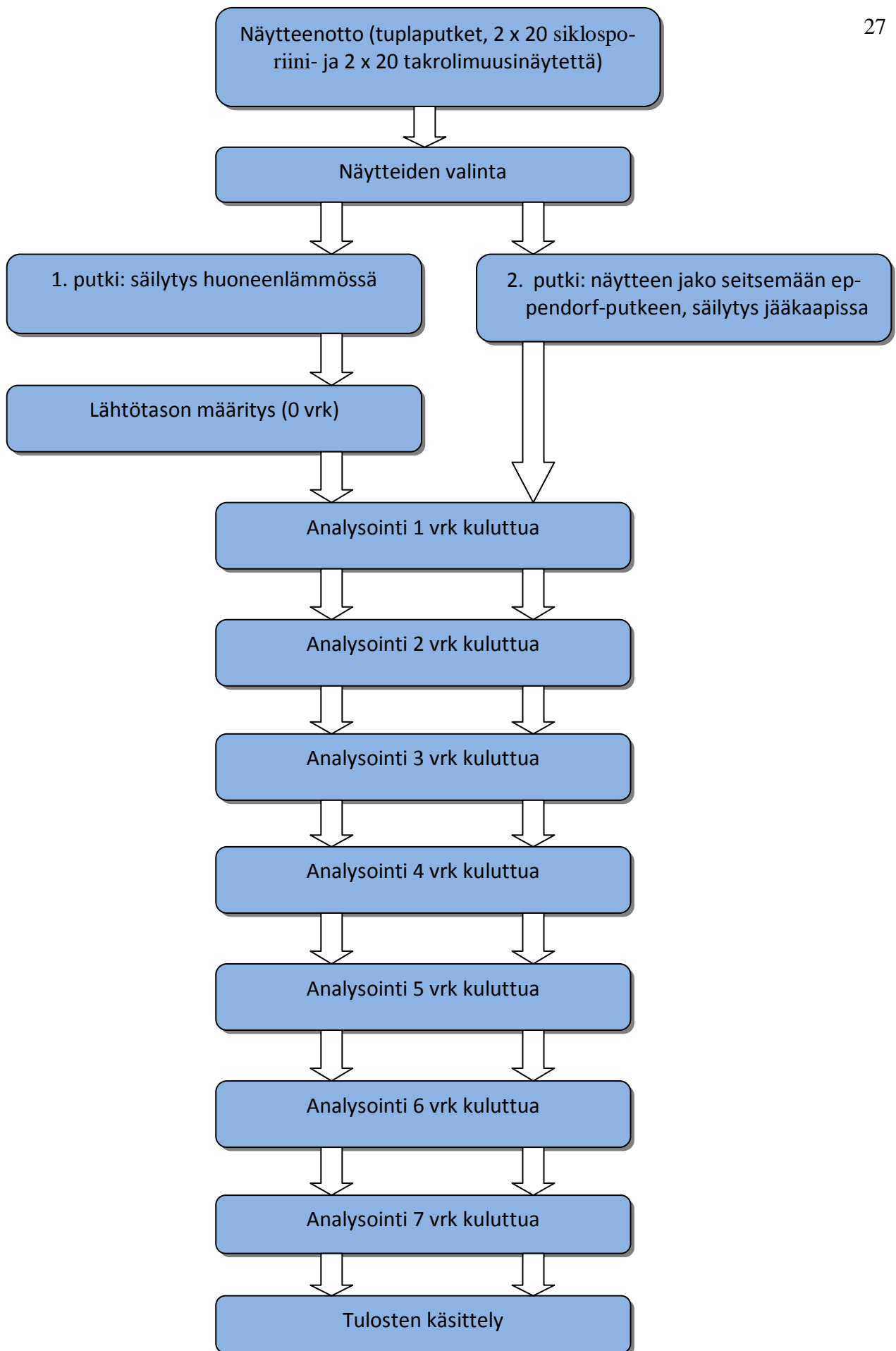
8.1 Näytteiden kerääminen

Takrolimuusin ja siklosporiinin säilyvyystutkimuksen näytteet valittiin Kirurgisen sairaalan potilasnäytteistä, jotka laboratoriohoitajat ottivat aamukierrolla. Tällä tavoin varmistettiin, että näytteet ovat mahdollisimman tuoreita. Kustakin potilaasta, josta oli pyydetty takrolimuusi- (B-Tacro) tai siklosporiinimääritys (B-CyA), otettiin yksi ylimääräinen putki, jotta näytemäärää saatiin lisättyä. Toinen putki oli tarkoitettu säilytettäväksi huoneenlämmössä ja toinen jääkaapissa.

Työpisteen laboratoriohoitaja analysoi potilasnäytteet normaalin käytännön mukaan. Kun tulokset olivat valmiit, tuloslistasta pyrittiin valitsemaan tutkimukseen näytteitä niin, että mukaan tulisi mahdollisimman kattavasti eri tasoja takrolimuusin (2–30 µg/l) ja siklosporiinin (30–1500 µg/l) mittausalueilta. Säilyvyystutkimukseen oli tarkoitus ottaa mukaan kummankin lääkeaineen käyttäjistä 20 potilaan näytteet, joista oli otettu kustakin kaksi näyteputkea. Tällä tavoin saatiin yhteensä 40 takrolimuusi- ja 40 siklosporiininäytettä, joista kummankin 20 näytettä säilytettiin huoneenlämmössä ja 20 jääkaapissa.

Tuplaputkellisia takrolimuusinäytteitä ei saatu aivan suunniteltua näytemäärää (2 x 20 kpl) laboratoriotyölle varatussa ajassa, vaan niitä saatiin 2 x 18 kpl. Peräkkäisinä päivinä tuli hyvin samantasoisia näytteitä ja tämän vuoksi jäätettiin odottamaan, jos saataisiin

mukaan vielä eritasoisia näytteitä. Lopulta näytteitä ei tullutkaan tulevina päivinä riittävästi, jotta haluttu näytemäärä olisi tullut täyteen. Suunnitellusta näytemäärästä neljä näytettä jäi puuttumaan, ja tämän vuoksi mukaan otettiin yksi Kirurgisen sairaalan näyte ja kolme ulkopuolelta tullutta näytettä. Niistä kaksi oli otettu Meilahden sairaalassa ja yksi TYKS:ssä. Ulkopuoliset näytteet oli myös otettu samana aamuna, joten ne olivat yhtä tuoreita kuin muutkin näytteet. Tästä johtuu, että liitteen 1 takrolimuusinäytteet 59 ja 79 sekä 60 ja 80 eivät ole toistensa vastinputkia (huoneenlämpö - jääkaappi).



KUVIO 10. Säilyvyystutkimuksen vaiheet.

8.2 Näytteiden käsittely

Kun tutkimuksen näytteet oli valittu, ne numeroitiin seuraavasti: siklosporiini huoneenlämpö 1–20, siklosporiini jääkaappi 21–40, takrolimuusi huoneenlämpö 41–60 ja takrolimuusi jääkaappi 61–80. Siklosporiinin huoneenlämpönäytettä 1 vastasi jääkaappinäyte 21, huoneenlämpönäytettä 2 vastaavasti jääkaappinäyte 22 jne. Kunkin potilaan toista näyteputkea säilytettiin huoneenlämmössä ja toisesta putkesta näyte jaettiin seitsemään eppendorf-putkeen jääkaappisäilytystä varten. Huoneenlämpö ja jääkaappilämpötila mitattiin päivittäin. Jääkaapin lämpötila vaihteli välillä $+2,7-6,8^{\circ}\text{C}$ ja huoneenlämpötila välillä $+20,0-21,3^{\circ}\text{C}$. Keskilämpötilat olivat $+4,1^{\circ}\text{C}$ ja $+20,9^{\circ}\text{C}$.

Jääkaappisäilytystä varten hyvin sekoitettu näyte jaettiin seitsemään eppendorf-putkeen (1,5 ml). Analyysiin tarvittava näytemäärä oli 200 μl . Eppendorf-putkiin pipetoitiin 300 μl näytettä pipetointivara huomioiden. Näin jokaiselle seitsemälle päivälle oli valmiina analyysiin tarvittava näyte-erä. Jos näytettä olisi säilytetty jääkaapissa näyteputkessa, koko putkea olisi joutunut käyttämään jatkuvasti huoneenlämmössä, koska jääkaappinäytteen annettiin tasaantua huoneenlämpöiseksi ennen työskentelyn aloittamista. Kun näyte oli jaettu eriin, vain tarvittava näyte-erä voitiin ottaa huoneenlämpöön.

8.3 Näytteiden analysointi

Näytteiden valinnan yhteydessä tuloslistasta otettiin ylös kunkin näytteen mittaustulos (merkitty 1.tulos liitteissä 1 ja 2). Näytteille tehtiin rinnakkainen määritys. Tästä saatiin pitoisuuden lähtötaso säilyvyyden seurannalle (0 vrk). Koska näytteiden analyysi vaatii paljon manuaalista esikäsittelyä, rinnakkaisia näytteitä ei liian suuren työmäärän takia tehty muista näytteistä.

Huoneenlämmössä ja jääkaapissa säilytetyt näytteet analysoitiin näytteenottopäivän jälkeen vuorokauden välein seitsemänten vuorokauteen asti. Jääkaapissa säilytetyt näytteet otettiin huoneenlämpöön puoli tuntia ennen analysointia. Näyteputket sekoitettiin huolellisesti putkisekoittajalla ja eppendorf-putket vortexilla, jotta näytteistä saatiin homogeenisia. Työpisteessä vuorossa oleva laboratoriohoitaja teki päivittäiset kontrollit ja tarvittaessa vakioinnit. Näytteet esikäsiteltiin ja analysoitiin Architect i2000_{SR}-laitteella aiemmin kohdissa 6.3.1 ja 6.3.2 esitetyillä tavoilla. Toisella viikolla Kirurgisen

sairaalan laboratorion analysaattoriin tuli laitevika. Tämän vuoksi analysoinnit tehtiin kahtena päivänä Meilahden sairaalan laboratoriossa, jossa on varalaite.

8.4 Tulosten käsittely

Tulokset käsiteltiin Excel-ohjelmalla. Huoneenlämmössä ja jääkaapissa säilytettyjen näytteiden pitoisuuksista seitsemän vuorokauden ajalta piirrettiin viivakaaviot, joissa oli mukana kaikki näytteet. Vastaava viivakaavio piirrettiin myös pakastettujen siklosporiininäytteiden pitoisuuksista tarkastelujaksolta.

Kunkin näytteen tuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin (CV%). Variaatiokertoimien keskiarvosta saatiin sarjojen välinen CV%. (Ks. liitteet 1–2.) Takrolimuusin ja siklosporiinin validointiraporttien tietojen perusteella arvioitiin kokonaisvariaatio. Lisäksi laskettiin keskimääräiset pitoisuudet kussakin mittausajankohdassa huoneenlämmössä, jääkaapissa ja pakastettuna sekä keskiarvon muutos suhteessa 0 vrk:n keskiarvoon. Keskimääräisistä pitoisuuksista piirrettiin viivakaavio. Jotta keskimääräisiä takrolimuusituloksia voitiin verrata keskenään kahtena ryhmänä (huoneenlämpö vs. jääkaappi) otoksesta pudotettiin pois huoneenlämpönäytteet 59 ja 60 sekä jääkaappinäytteet 79 ja 80. Nämä neljä näytettä olivat kaikki eri potilaiden näytteitä, koska tuplaputkellisia näytteitä ei saatu riittävää määrää. Näitä näytteitä lukuun ottamatta saman potilaan näytteelle huoneenlämmössä oli vastinnäyte jääkaappisäilytyksessä.

Pitoisuuden lähtötasona huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteissä käytettiin määrittämäni rinnakkaista tulosta (0 vrk) sen sijaan, että olisi otettu keskiarvo 1. tuloksesta ja rinnakkaisestä tuloksesta. Tähän päädyttiin, koska tällöin kaikki määritykset tulivat tehdyksi samoilla välineillä ja saman henkilön toimesta. Tämä lisää tulosten vertailukelpoisuutta.

9 TULOKSET JA NIIDEN TULKINTA

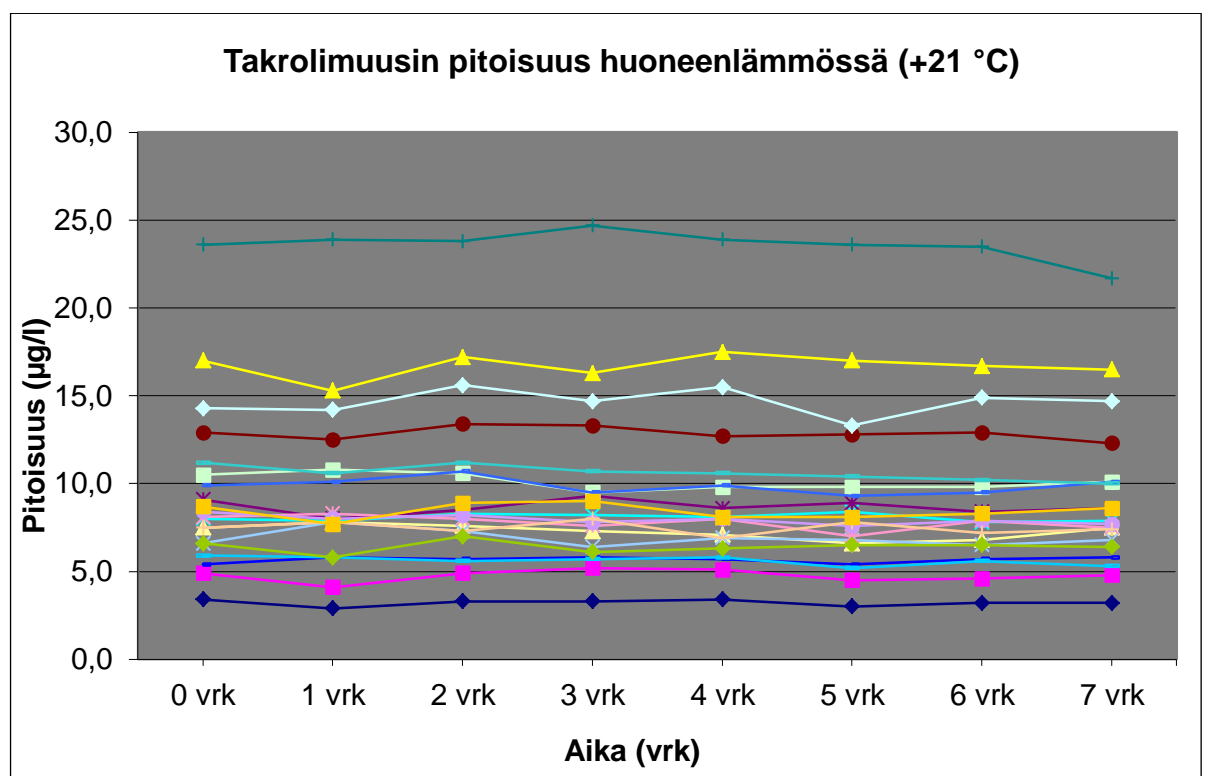
Tässä luvussa tarkastellaan säilyvyystutkimuksesta saatuja tuloksia. Tutkimuksessa käytetty näytemäärä oli:

- takrolimuusi: 20 huoneenlämpönäytettä, 20 jääkaappinäytettä
- siklosporiini: 20 huoneenlämpönäytettä, 20 jääkaappinäytettä ja 20 pakastettua näytettä

9.1 Takrolimuusin säilyvyys

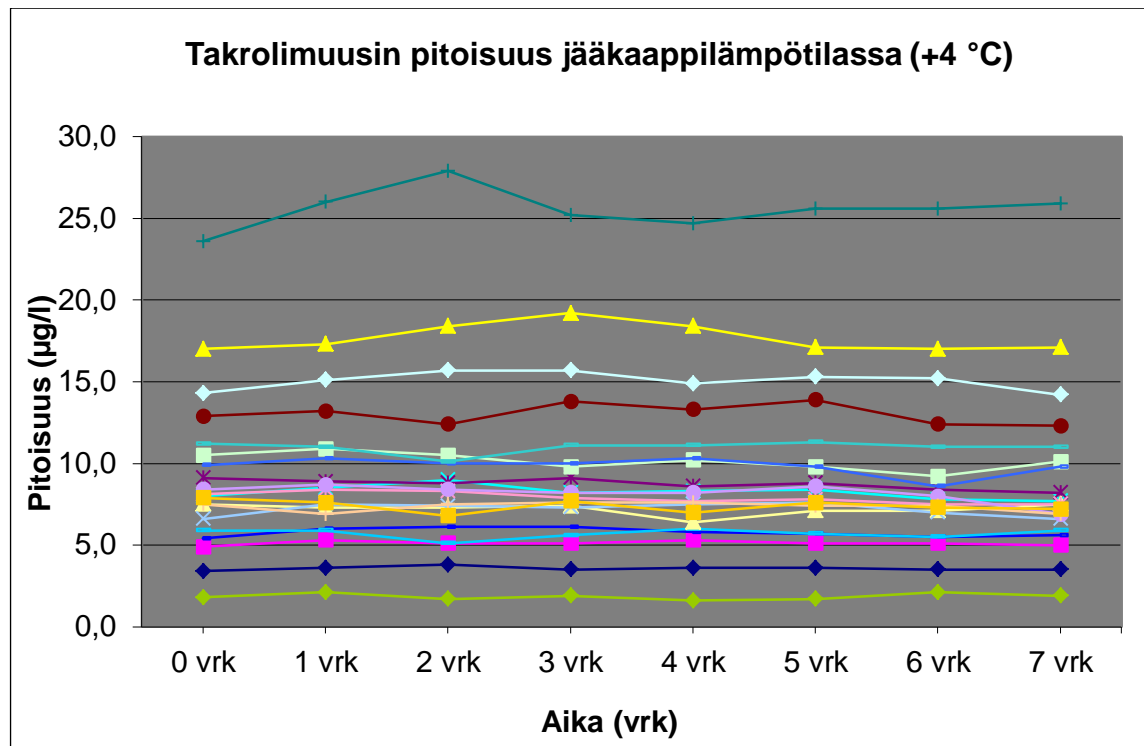
Tarkoituksena oli selvittää, miten takrolimuusin pitoisuus muuttuu, kun näytettä säilytetään huoneenlämmössä ja jääkaappilämpötilassa seitsemän vuorokauden ajan. Seuraavaksi tarkastellaan saatuja tuloksia sekä näytekohtaisesti että keskimääräisinä pitoisuuksina mittausvuorokautta kohti.

Huoneenlämmössä säilytettyjen takrolimuusinäytteiden pitoisuuden mittaustulokset seitsemän vuorokauden ajalta on esitetty kuviossa 11. Silmämääräisesti tarkasteltuna näyttää, että pitoisuus säilyy stabiilina koko tarkastelujakson ajan. Kuvion perusteella pitoisuus näyttäisi säilyvän myös riippumatta pitoisuustasosta ainakin liikuttaessa terapeuttisen alueen tuntumassa (5–15 µg/l). Selvästi tätä korkeamman pitoisuuden omaavia näytteitä ei ollut mukana kuin yksi, koska näin korkeat pitoisuudet ovat potilailla harvinaisia.



KUVIO 11. Takrolimuusin pitoisuus (µg/l) huoneenlämmössä (+21 °C) säilytettynä seitsemän vuorokauden ajalta (n=20).

Vastaavat mittaustulokset jääkaapissa säilytettyjen takrolimuusinäytteiden pitoisuuksille seitsemän vuorokauden ajalta on esitetty kuviossa 12. Tässäkin on silmämääräisesti havaittavissa, että pitoisuus näyttäisi säilyvän yhtä lailla stabiilina kuin huoneenlämmössä.



KUVIO 12. Takrolimuusin pitoisuus ($\mu\text{g/l}$) jääkaapissa (+4 °C) säilytettynä seitsemän vuorokauden ajalta ($n=20$).

Takrolimuusin keskimääräisiä pitoisuuksia jokaisena mittausvuorokautena ja muutoksia 0 vrk:n suhteen on tarkasteltu taulukoissa 1 ja 2. Muutosprosentista havaitaan, että pitoisuuksissa tapahtuu välillä nousua ja välillä laskua.

Prosentuaalisista muutoksista nähdään, että huoneenlämpönäytteiden pitoisuus laskee enimmillään 3,9 % (5 vrk) ja nousee enimmillään 1,7 % (2 vrk) 0 vrk:n suhteen. Seitsemäntenä vuorokautena pitoisuus on laskenut keskimäärin 3,6 % 0 vrk:n suhteen. (Ks. taulukko 1.)

TAULUKKO 1. Huoneenlämmössä (+21 °C) säilytettyjen takrolimuusinäytteiden keskimääräiset pitoisuudet, pitoisuuden muutokset (µg/l) ja prosentuaaliset muutokset (%) 0 vrk:n suhteen seitsemän vuorokauden aikana (n=18).

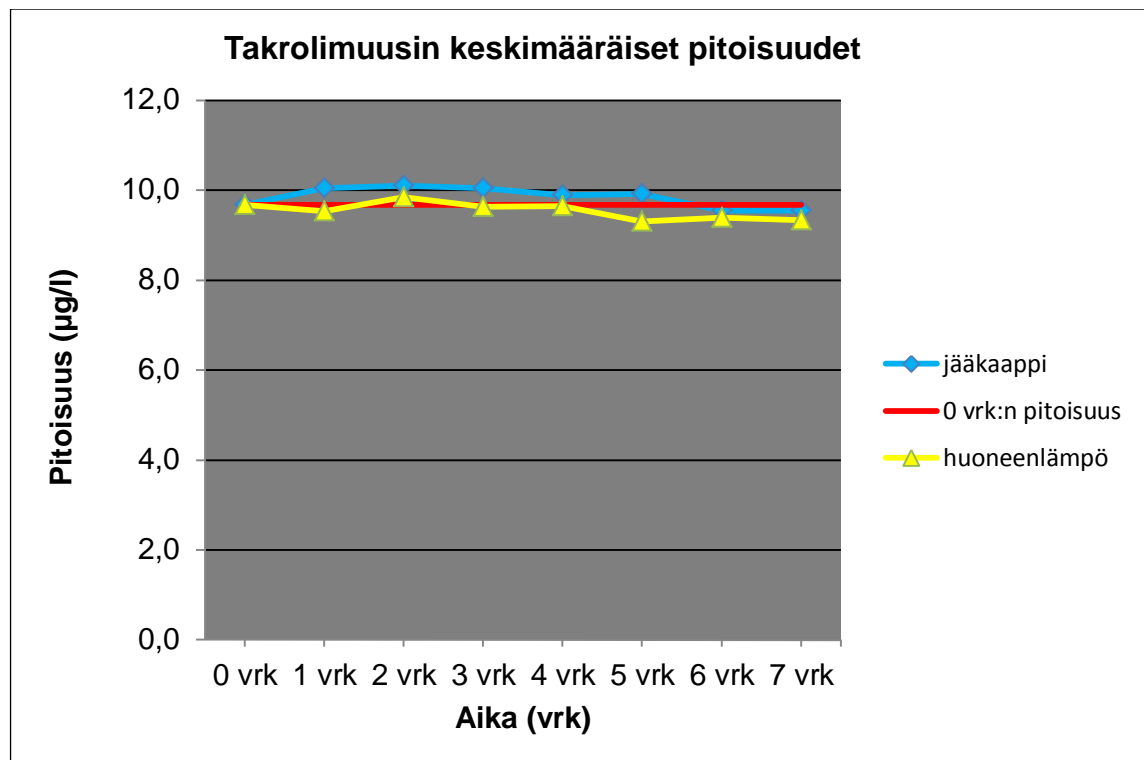
Takrolimuusi (+ 21 °C)	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk
keskiarvo (µg/l)	9,68	9,53	9,84	9,63	9,64	9,30	9,39	9,33
muutos (µg/l) 0 vrk:n suhteen		-0,15	0,16	-0,05	-0,04	-0,38	-0,29	-0,35
muutos (%) 0 vrk:n suhteen		-1,55	1,65	-0,52	-0,41	-3,93	-3,00	-3,62

Jääkaappinäytteiden pitoisuus laskee enimmillään 1,5 % (6 vrk ja 7 vrk) ja nousee enimmillään 4,3 % (2 vrk) 0 vrk:n suhteen. Seitsemäntenä vuorokautena pitoisuus on laskenut keskimäärin 1,5 % 0 vrk:n suhteen. (Ks. taulukko 2.)

TAULUKKO 2. Jääkaapissa (+4 °C) säilytettyjen takrolimuusinäytteiden keskimääräiset pitoisuudet, pitoisuuden muutokset (µg/l) ja prosentuaaliset muutokset (%) 0 vrk:n suhteen seitsemän vuorokauden aikana (n=18).

Takrolimuusi (+4 °C)	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk
keskiarvo (µg/l)	9,68	10,04	10,10	10,04	9,88	9,92	9,54	9,54
muutos (µg/l) 0 vrk:n suhteen		0,36	0,42	0,36	0,2	0,24	-0,14	-0,14
muutos (%) 0 vrk:n suhteen		3,72	4,34	3,72	2,07	2,48	-1,45	-1,45

Keskimääräiset pitoisuudet huoneenlämmössä ja jääkaapissa ajan suhteen on esitetty viivakaaviossa. (Ks. kuvio 13.) Pitoisuuden lähtötaso on piirretty kaavioon punaisella viivalla. Huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden pitoisuudet liikkuvat lähtötason tuntumassa ja sen molemmin puolin jääkaappinäytteiden käyrän ollessa hieman huoneenlämpönäytteiden käyrän yläpuolella.



KUVIO 13. Huoneenlämmössä (n=18) ja jääkaapissa (n=18) säilytettyjen takrolimuusi-näytteiden keskimääräiset pitoisuudet seitsemän vuorokauden ajalta. Viiva ”0 vrk” kuvaa lähtötason keskimääräistä pitoisuutta.

Takrolimuusin pitoisuuksien vaihtelua tarkasteltiin myös laskemalla kunkin näytteen tuloksille variaatiokerroin. Variaatiokerroin (CV) tarkoittaa suhteellista hajontaa, joka saadaan keskihajonnan ja keskiarvon suhteena ja ilmoitetaan yleensä prosentteina (CV%) (Heikkilä 1998: 85–86). Variaatiokertoimista laskettiin keskiarvo molemmissa säilytyslämpötiloissa, jolloin saatiin sarjojen väliset variaatiot (hajonnat).

Hajonnan komponentit s_w (sarjan sisäinen hajonta) ja s_b (sarjojen välinen hajonta) voidaan laskea yhteen variansseina, jolloin saadaan kokonaishajonta s_T . Sarjan sisäisen, sarjojen välisen ja kokonaishajonnan välillä on näin ollen seuraavanlainen yhteys:

$$s_T^2 = s_w^2 + s_b^2. \text{ (Sorto – Törmä – Kaihola 1996: 8.)}$$

Kokonaisvariaatio arvioitiin edellä esitetyn kaavan mukaan sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä variaatiosta. Laskennassa käytettiin sarjan sisäisenä variaationa takrolimuusin validointiraportissa esitettyä tulosta potilasnäytteiden sarjan sisäiselle variaatiolle.

Takrolimuusin huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden sarjojen välisten variaatioiden CV oli 4,6 %. Validointiraportin mukaan potilasnäytteiden sarjan sisäisen variaation CV

oli 5,1 %. Tämän sekä huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden sarjojen välisen variaation perusteella arvioitiin kokonaisvariaatioksi CV 6,9 %. (Ks. taulukko 3.)

Validointiraportissa esitettyjen kolmen eritasoisen kontrollin sarjojen välisten variaatioiden CV:t olivat välillä 4,4 % – 5,6 % ja kokonaisvariaatioiden CV:t välillä 6,7 % – 7,5 %. Koska huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden sarjojen väliset variaatiot (CV 4,6 %) ja kokonaisvariaatiot (CV 6,9 %) ovat kontrollien vastaavien CV%:en vaihteluvälin sisällä, voidaan tämän perusteella todeta, että huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden pitoisuuksien variaatio on menetelmän variaation rajoissa. Sarjan sisäinen variaatio (CV 5,1 %) tukee myös tätä päätelmää. Tällöin myös aiemmin taulukoissa 1 ja 2 esitetyt pitoisuuden prosentuaaliset muutokset sisältyvät menetelmästä johtuvaan vaihteluun. Edellä esitetyt kokonaisvariaatiot ovat myös valmistajan ilmoittaman kokonaisvariaation (CV ≤ 10 %) rajoissa (Abbott Laboratories 2007: 6).

TAULUKKO 3. Sarjojen väliset variaatiot (CV%) ja kokonaisvariaatiot (CV%) takrolimuusin huoneenlämpö-, jääkaappinäytteille ja kontrolleille sekä sarjan sisäinen variaatio potilasnäytteille (CV%).

Takrolimuusi	Sarjojen välinen variaatio (CV%)	Kokonaisvariaatio (CV%)
Huoneenlämpönäytteet (n=18)	4,6	6,9
Jääkaappinäytteet (n=18)	4,6	6,9
Kontrolli: taso 1 (4,0 µg/l), n=20	5,6*	7,5*
Kontrolli: taso 2 (8,1 µg/l), n=20	4,4*	6,7*
Kontrolli: taso 3 (16,1 µg/l), n=20	5,0*	7,1*
Potilasnäytteet (n=30), sarjan sisäinen variaatio CV%: 5,1 *		

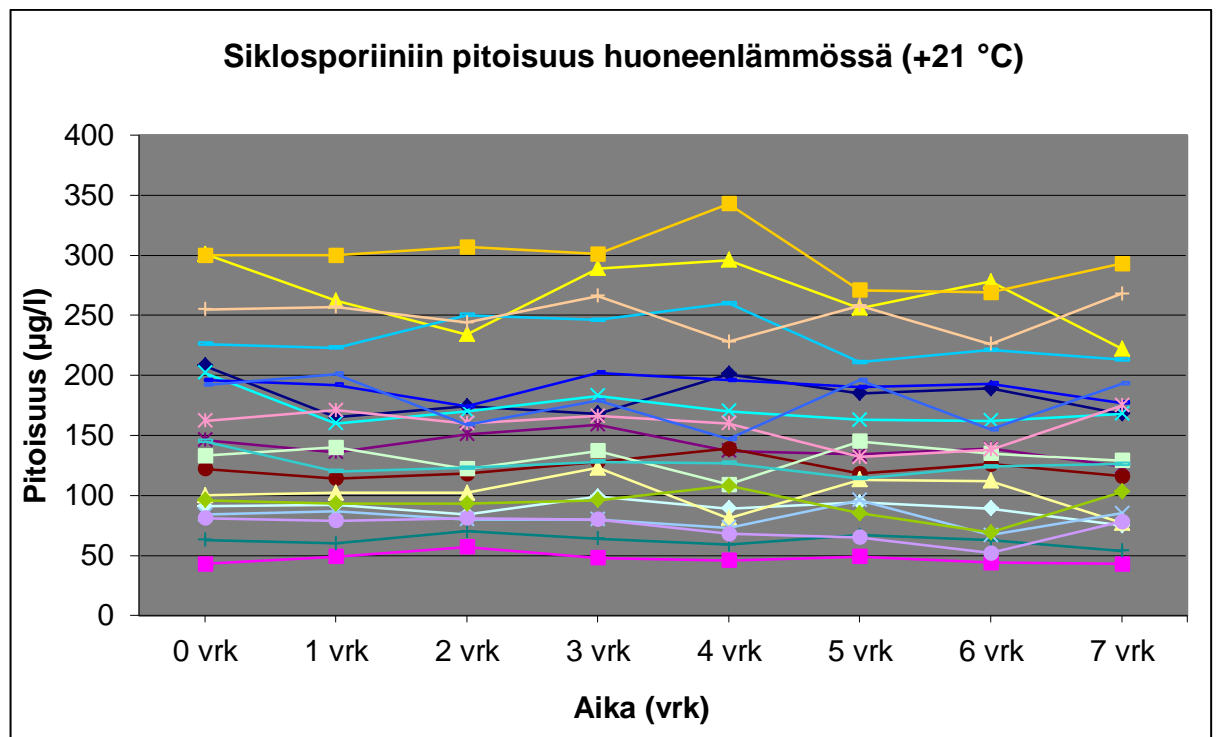
*) (Inkinen 2010b: 2.)

Takrolimuusin näytekohostaisten viivakaavioiden ja keskimääräisten muutosprosenttien perusteella pitoisuudet pysyvät stabiileina seitsemän vuorokauden ajan sekä huoneenlämmössä että jääkaapissa. Koska kontrollien variaatiot ja sarjan sisäinen variaatio ovat samaa luokkaa näytteiden variaatioiden kanssa, sisältyy havaittu vaihtelu menetelmästä johtuvaan vaihteluun.

9.2 Siklosporiinin säilyvyys

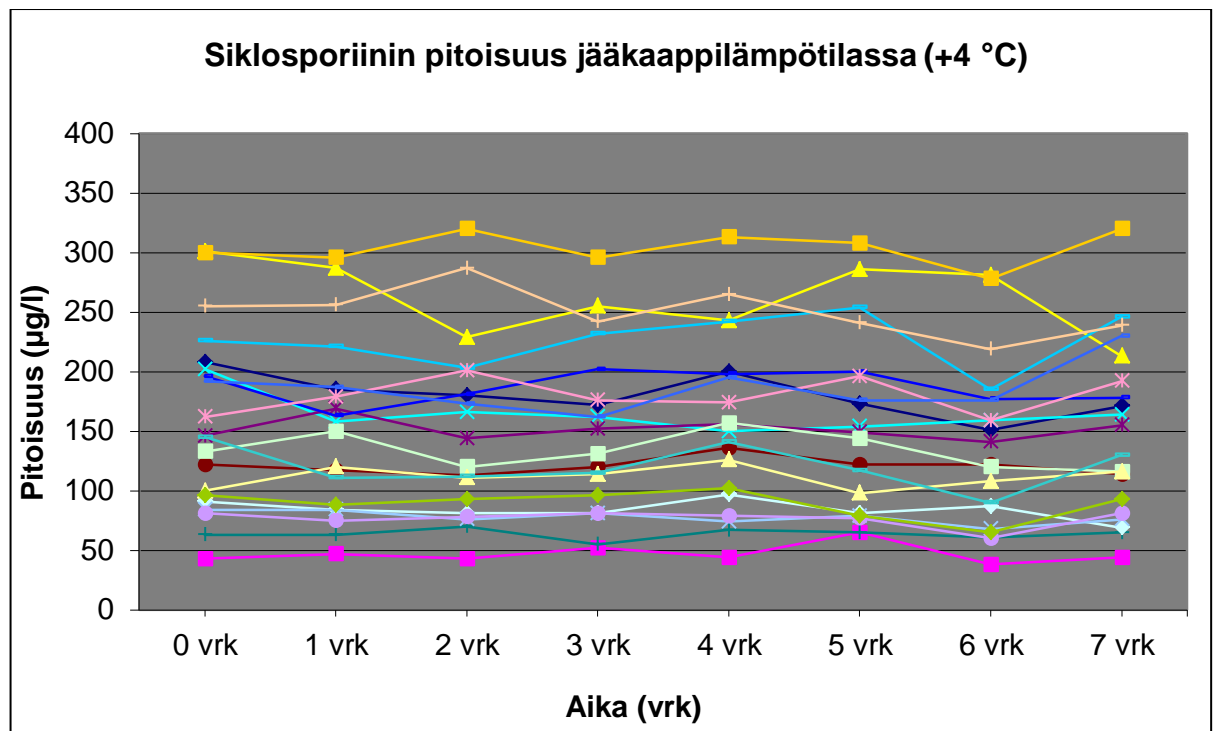
Tarkoituksena oli selvittää, miten siklosporiinin pitoisuus muuttuu, kun näytettä säilytetään huoneenlämmössä ja jääkaappilämpötilassa seitsemän vuorokauden ajan. Lisäksi selvitettiin, miten näytteen pakastaminen vaikuttaa siklosporiinipitoisuuteen.

Huoneenlämmössä säilytettyjen siklosporiininäytteiden pitoisuuden mittaustulokset seitsemän vuorokauden ajalta on esitetty kuviossa 14. Silmämääräisesti tarkasteltuna pitoisuus näyttää säilyvän suhteellisen stabiilina seitsemän vuorokauden ajan. Joidenkin näytteiden kohdalla pitoisuuksissa tapahtuu selkeämpiä muutoksia. Muutoksissa ei kuitenkaan näy selvää suuntaa, vaan pitoisuuksien nousuja ja laskuja tapahtuu lähes vuoron perään.



KUVIO 14. Siklosporiinin pitoisuus ($\mu\text{g/l}$) huoneenlämmössä (+21 °C) säilytettynä seitsemän vuorokauden ajalta ($n=20$).

Kuviossa 15 on esitetty vastaavat mittaustulokset jääkaapissa säilytettyjen siklosporiininäytteiden pitoisuuksille seitsemän vuorokauden ajalta. Pitoisuuskäyrät näyttävät silmämääräisesti tarkasteltuna hyvin paljon huoneenlämpökäyrien kaltaisilta. Vuoroittain tapahtuvia nousuja ja laskuja on havaittavissa myös jääkaappinäytteiden siklosporiinipitoisuuksissa.



KUVIO 15. Siklosporiinin pitoisuus ($\mu\text{g/l}$) jääkaapissa (+4 °C) säilytettynä seitsemän vuorokauden ajalta ($n=20$).

Siklosporiinin keskimääräisiä pitoisuuksia jokaisena mittausvuorokautena ja muutoksia 0 vrk:n suhteen on tarkasteltu taulukoissa 4 ja 5. Taulukon 4 prosentuaalisista muutoksista nähdään, että huoneenlämpönäytteiden pitoisuus on laskenut toisena vuorokautena 6 % lähtötasosta mutta palaa kolmantena vuorokautena takaisin lähtötasolleen. Laskua on enimmillään 9 % (6 vrk), ja seitsemäntenä vuorokautena pitoisuus on laskenut keskimäärin 8 % 0 vrk:n suhteen.

TAULUKKO 4. Huoneenlämmössä (+21 °C) säilytettyjen siklosporiininäytteiden keskimääräiset pitoisuudet, pitoisuuden muutokset ($\mu\text{g/l}$) ja prosentuaaliset muutokset (%) 0 vrk:n suhteen seitsemän vuorokauden aikana ($n=20$).

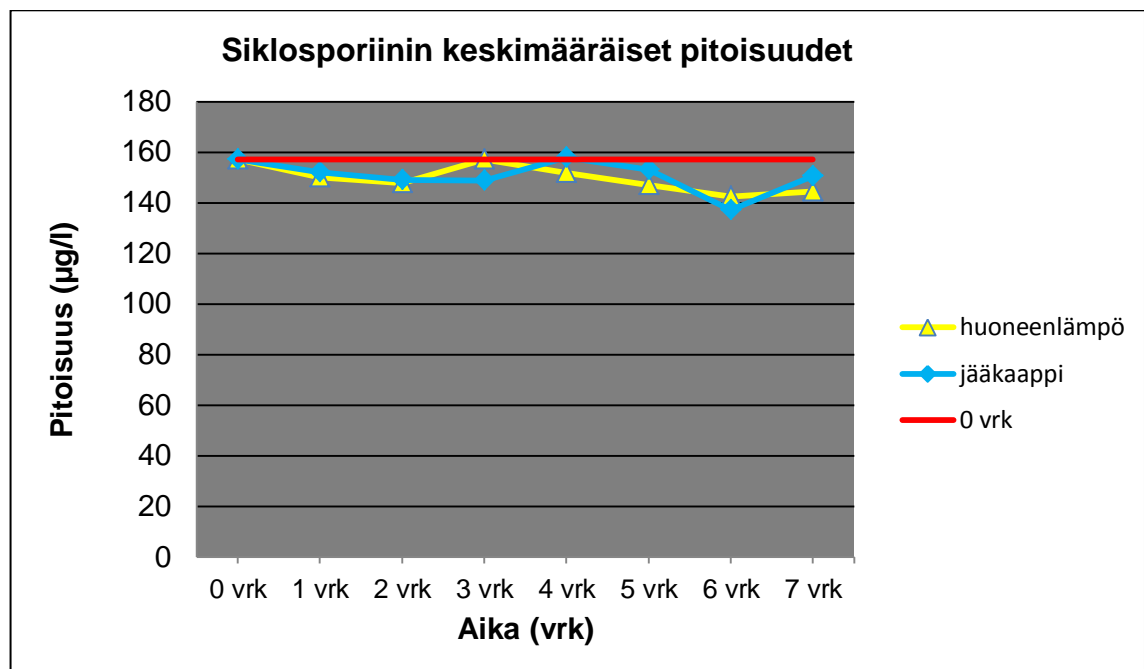
Siklosporiini (+ 21 °C)	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk
keskiarvo ($\mu\text{g/l}$)	157	150	148	157	152	147	143	144
muutos ($\mu\text{g/l}$) 0 vrk:n suhteen		-7	-9	0	-5	-10	-14	-13
muutos (%) 0 vrk:n suhteen		-4	-6	0	-3	-6	-9	-8

Jääkaappinäytteiden pitoisuus laskee kolmanteen vuorokauteen mennessä 5 % ja palaa hieman yli lähtötason neljäntenä vuorokautena. Pitoisuus laskee enimmillään 13 % (6vrk), mutta seitsemäntenä vuorokautena pitoisuus on laskenut vain 4 % 0 vrk:n suhteen. (Ks. taulukko 5.)

TAULUKKO 5. Jääkaapissa (+4 °C) säilytettyjen siklosporiininäytteiden keskimääräiset pitoisuudet, pitoisuuden muutokset ($\mu\text{g/l}$) ja prosentuaaliset muutokset (%) 0 vrk:n suhteen seitsemän vuorokauden aikana (n=20).

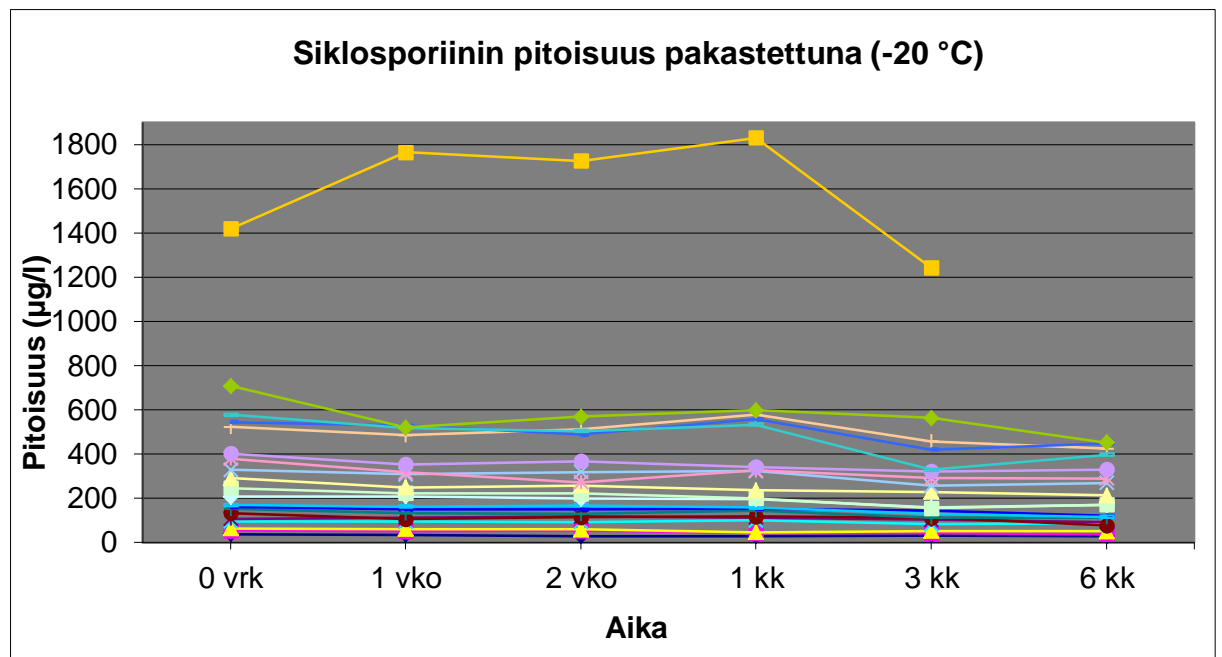
Siklosporiini (+ 4°C)	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk
keskiarvo ($\mu\text{g/l}$)	157	152	149	149	158	153	137	151
muutos ($\mu\text{g/l}$) 0 vrk:n suhteen		-5	-8	-8	1	-4	-20	-6
muutos (%) 0 vrk:n suhteen		-3	-5	-5	1	-2	-13	-4

Kuviossa 16 on esitetty siklosporiinin keskimääräiset pitoisuudet huoneenlämmössä ja jääkaapissa ajan suhteen viivakaaviona. Pitoisuuden lähtötaso on piirretty kaavioon punaisella viivalla. Huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden keskimääräiset pitoisuuskäyrät käyvät lähtötason tuntumassa tarkastelujakson puolivälin tienoolla mutta pysyttelevät suurimmaksi osaksi hieman lähtötason alapuolella.



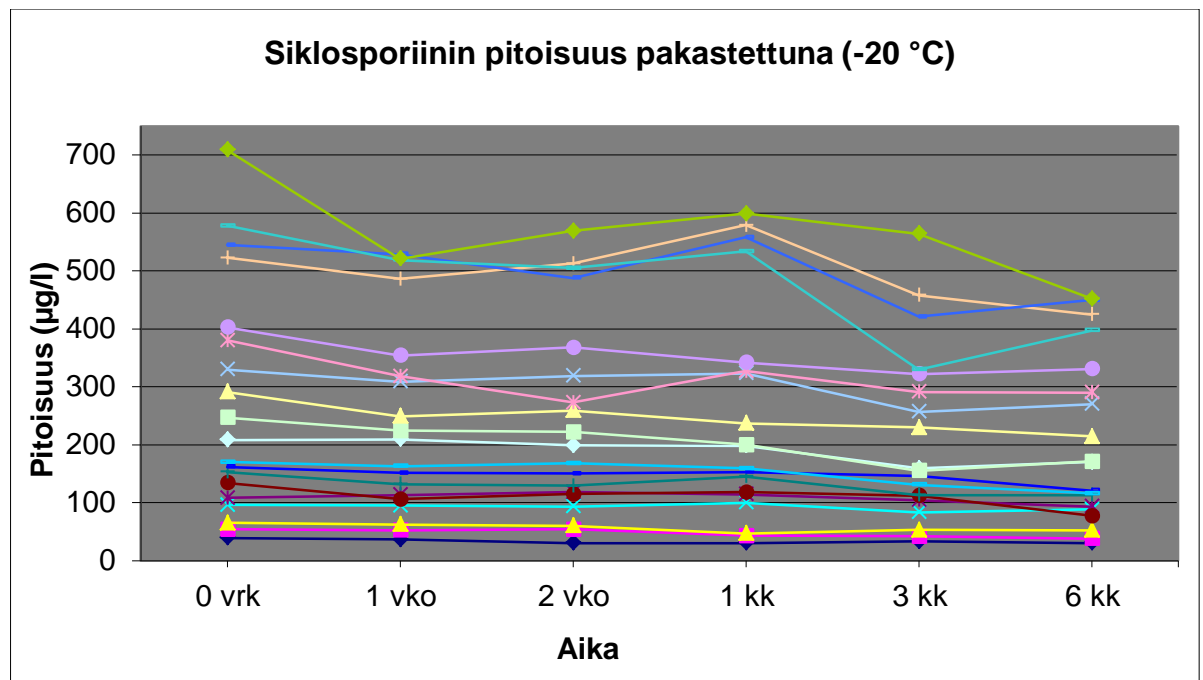
KUVIO 16. Huoneenlämmössä (n=20) ja jääkaapissa (n=20) säilytettyjen siklosporiininäytteiden keskimääräiset pitoisuudet seitsemän vuorokauden ajalta. Viiva ”0 vrk” kuvaa lähtötason keskimääräistä pitoisuutta.

Pakastettujen siklosporiininäytteiden pitoisuudet 6 kk:n tarkastelujaksolta on esitetty kuviossa 17. Näytteet analysoitiin 1 vko:n, 2 vko:n, 1 kk:n, 3 kk:n ja 6 kk:n pakastusajan jälkeen. Yhden näytteen 6 kk:n tulos puuttuu, koska näytettä ei ollut riittänyt enää 6 kk:n analyysiin. Tämä tulos olisi ollut mielenkiintoinen, koska 3 kk:n tulos laski huomattavasti 1 kk:n tuloksesta, ja olisi nähty kumpaan suuntaan pitoisuus muuttuu 6 kk:ta kohti mennessä.



KUVIO 17. Siklosporiinin pitoisuus ($\mu\text{g/l}$) pakastettuna (-20 °C) 6 kk:n ajalta ($n=20$).

Kun korkeimman pitoisuuden näyte otetaan kuviosta 17 pois, nähdään selkeämmin muutokset muissa näytteissä. (Ks. kuvio 18.) Muissa näytteissä pitoisuudet näyttävät pysyvän silmämääräisesti suhteellisen stabiileina alle $400\text{ }\mu\text{g/l}$ tasolla koko jakson ajan. Tässäkin on kuitenkin havaittavissa edestakaista laskua ja nousua jonkin verran. Hie- man suurempaa vaihtelua näyttäisi tapahtuvan tätä korkeamman pitoisuuden näytteissä.



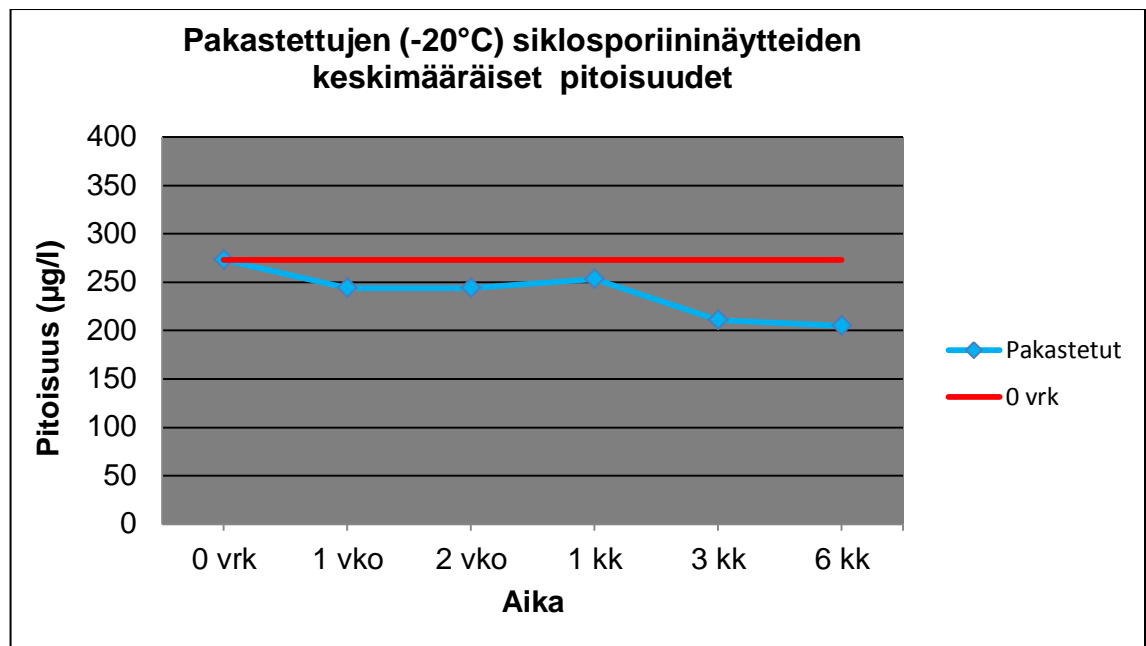
KUVIO 18. Siklosporiinin pitoisuus ($\mu\text{g/l}$) pakastettuna ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 6 kk:n ajalta ($n=19$).

Pakastettujen siklosporiininäytteiden keskimääräisiä pitoisuuksia jokaisena mittausajan kohtana ja muutoksia 0 vrk:n suhteen on tarkasteltu taulukossa 6. Korkeimman pitoisuuden näyte on otettu tästä vertailusta pois puuttuvan 6 kk:n tuloksen takia. Ensimmäisen ja toisen viikon kuluttua keskimääräinen pitoisuus on laskenut 11 % 0 vrk:n tasoon nähden. Yhden kuukauden kohdalla laskua lähtötasosta on 7 %. Kolmen ja kuuden kuukauden kohdalla keskimääräisissä pitoisuuksissa tapahtuu suurempi muutokset prosentuaalisen laskun ollessa 23 % ja 25 % 0 vrk:n tasosta.

TAULUKKO 6. Pakastettuna ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) säilytettyjen siklosporiininäytteiden keskimääräiset pitoisuudet, pitoisuuden muutokset ($\mu\text{g/l}$) ja prosentuaaliset muutokset (%) 0 vrk:n suhteen 6 kk:n aikana ($n=19$).

Siklosporiini ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	0 vrk	1 vko	2 vko	1 kk	3 kk	6 kk
keskiarvo ($\mu\text{g/l}$)	273	244	244	253	211	205
muutos ($\mu\text{g/l}$) 0 vrk:n suhteen		-29	-29	-20	-62	-68
muutos (%) 0 vrk:n suhteen		-11	-11	-7	-23	-25

Kuviossa 19 nähdään taulukossa 6 esitetyt keskimääräiset pitoisuudet viivakaaviona ajan suhteen. Pakastettujen näytteiden pitoisuudet ovat selkeästi 0 vrk:n tason alapuolella ja yhä selvemmin kolmen ja kuuden kuukauden pakastuksen jälkeen.



KUVIO 19. Pakastettujen (n=19) siklosporiininäytteiden keskimääräiset pitoisuudet 6 kk:n ajalta. Viiva ”0 vrk” kuvaa lähtötason keskimääräistä pitoisuutta.

Kuten takrolimuusin kohdalla myös siklosporiinin pitoisuuksien vaihtelua tarkasteltiin laskemalla kunkin näytteen tuloksille variaatiokerroin. Variaatiokertoimien keskiarvosta saatiin sarjojen väliset variaatiot. Kokonaisvariaatio arvioitiin sarjan sisäisestä ja sarjojen välisestä variaatiosta. Sarjan sisäisenä variaationa käytettiin siklosporiinin validointiraportissa esitettyä tulosta potilasnäytteiden sarjan sisäiselle variaatiolle.

Siklosporiinin huoneenlämpönäytteiden sarjojen välisen variaation CV oli 9,3 % ja jääkaappinäytteiden CV 9,6 %. Pakastettujen näytteiden CV oli hieman korkeampi 12,3 %. Validointiraportin mukaan potilasnäytteiden sarjan sisäisen variaation CV oli 5,0 %. Sarjan sisäisen variaation ja edellä mainittujen sarjojen välisten variaatioiden perusteella saatiin kokonaisvariaatioksi huoneenlämpönäytteille CV 10,6 %, jääkaappinäytteille 10,8 % ja pakastetuille näytteille 13,3 %. (Ks. taulukko 7.)

Siklosporiinin validointiraportin mukaan kolmen eritasoisen kontrollin sarjojen välisten variaatioiden CV:t olivat välillä 6,3 % – 9,0 % ja kokonaisvariaatioiden CV:t välillä 8,0 % – 10,3 %. Huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden sekä pakastettujen näytteiden sarjojen väliset variaatiot ja kokonaisvariaatiot ovat kaikki hieman korkeampia kuin kontrollien vastaavat variaatiot. Huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden variaatiot ovat lähellä toisiaan, kun taas pakastettujen näytteiden variaatiot ovat hieman korkeammat.

Kaikki kokonaisvariaatiot ovat kuitenkin alle valmistajan ilmoittaman kokonaisvariaation, joka on korkeintaan 15 CV% (Abbott Laboratories 2008: 5).

Kontrollien variaatioista nähdään, että tason 1 variaatio on ollut suurempi kuin tasojen 2 ja 3, jolloin matalampien pitoisuuksien näytteissä on siis ollut suurempi variaatio. Siklosporiinin huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteet olivat kaikki pitoisuudeltaan alle kontrollitason 2. Kuviossa 17 ja 18 pakastettujen yli 400 µg/l pitoisuuksien näytteissä vaikutti silmämääräisesti olevan enemmän vaihtelua kuin alemmissa pitoisuuksissa. Näitä näytteitä oli kuitenkin vain viisi, joten sen perusteella ei voi vielä tehdä päätelmiä.

TAULUKKO 7. Sarjojen väliset variaatiot (CV%) ja kokonaisvariaatiot (CV%) siklosporiinin huoneenlämpö-, jääkaappinäytteille, pakastetuille näytteille ja kontrolleille sekä sarjan sisäinen variaatio potilasnäytteille (CV%).

Siklosporiini	Sarjojen välinen variaatio (CV%)	Kokonaisvariaatio (CV%)
Huoneenlämpönäytteet, n=20	9,3	10,6
Jääkaappinäytteet, n=20	9,6	10,8
Pakastetut näytteet, n=19	12,3	13,3
Kontrolli: taso 1 (85 µg/l), n=20	9,0*	10,3*
Kontrolli: taso 2 (419 µg/l), n=20	6,3*	8,0*
Kontrolli: taso 3, (1038 µg/l), n=20	6,4*	8,1*
Potilasnäytteet (n=30), sarjan sisäinen variaatio CV%: 5,0*		

*) (Inkinen 2010a: 2.)

Siklosporiinin huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden pitoisuuksissa tapahtuu keskimäärin hieman enemmän vaihtelua kuin kontrollinäytteillä kuten taulukosta 7 nähdään. Aiemmin taulukoista 4 ja 5 havaittiin, että huoneenlämpönäytteillä keskimääräinen pitoisuuden lasku on enimmillään 9 % (6vrk) lähtötasosta. Lasku 7 vrk:n kohdalla on 8 % lähtötasosta. Jääkaappinäytteillä suurin lasku on 13 % (6 vrk), mutta 7 vrk:n lasku on vain 4 % lähtötasosta, ja muissa mittausvuorokausissa lasku on enintään 5 %. Vaikkakin huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden suurimmat muutosprosentit sivuavat tai ylittävät kontrollien sarjojen väliset variaatiot (CV 6,3 % – 9,0 %), muut muutosprosentit pysyvät kontrollien variaatioiden välissä. Tällä perusteella voidaan sanoa, että siklosporiini-

näytteiden pitoisuudet pysyvät suhteellisen stabiileina seitsemän vuorokauden ajan sekä huoneenlämmössä että jääkaapissa.

Pakastettujen siklosporiininäytteiden osalta ero kontrollinäytteiden variaatioon on suurempi kuin huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteillä. Yhden kuukauden jälkeen pakastettujen näytteiden pitoisuus laski enintään 11 %. Selkeä lasku (23 %) pitoisuuksissa tapahtui 3 kk:n kohdalla, ja pitoisuus laski vielä hieman tästä 6 kk mennessä.

9.3 Johtopäätökset

Työn tarkoituksena oli selvittää, miten takrolimuusin ja siklosporiinin pitoisuudet muuttuvat, kun näytteitä säilytetään huoneenlämmössä (+21 °C) ja jääkaappilämpötilassa (+4 °C) seitsemän vuorokauden ajan. Lisäksi selvitettiin, miten siklosporiinin pitoisuus säilyy pakastettuna (-20 °C). Saadut tulokset on esitetty yhteenvetona taulukossa 8.

Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että takrolimuusin pitoisuus kokoveressä pysyi stabiilina sekä huoneenlämmössä että jääkaapissa säilytettynä seitsemän vuorokauden ajan. Pitoisuuksien nousut ja laskut seitsemän vuorokauden aikana tapahtuivat menetelmän tarkkuudelle määritettyjen rajojen sisällä. Takrolimuusin osalta pakastamisen vaikutusta pitoisuuteen ei tutkittu. Valmistajan mukaan pakastettujen takrolimuusinäytteiden pitoisuus laskee kuudessa kuukaudessa alle 10 % ja yhdeksässä kuukaudessa 46 % (Abbott Laboratories 2007: 3).

Siklosporiinipitoisuudet säilyivät suhteellisen stabiileina molemmissa lämpötiloissa (+21 °C ja +4 °C) säilytettynä seitsemän vuorokauden ajan. Pitoisuuksissa tapahtui kuitenkin hieman enemmän laskua kuin takrolimuusinäytteissä. Sarjojen väliset variaatiot olivat hieman kontrollien sarjojen välisiä variaatioita korkeampia. Kokonaisvariaatiot olivat silti alle menetelmän tarkkuudelle annetun kokonaisvariaation.

Siklosporiinipitoisuus säilyi heikommin pakastettuna kuin huoneenlämmössä tai jääkaapissa säilytettynä. Pitoisuuksissa näkyi selkeä lasku jo viikon, kahden ja kuukauden kohdalla lähtötasoon nähden. Kolmen ja kuuden kuukauden pitoisuuksissa lasku oli jo hyvin merkittävä. Siklosporiinia ei tämän perusteella ole suositeltavaa säilyttää pakastettuna. Valmistajan ohjeen mukaan, jos analysointi viivästyy yli seitsemän vuorokautta, näyte säilytetään pakastettuna vähintään -10 °C lämpötilassa (Abbott Laboratories 2007:

3; Abbott Laboratories 2008: 3). Valmistaja ei esitä pakastettujen siklosporiininäytteiden pitoisuuksien laskulle vastaavia lukuja kuten takrolimuusille, eikä myöskään ilmaise sitä, kuinka kauan näytteet säilyvät pakastettuna. Guder'in ym. (2001: 69) mukaan siklosporiininäytteiden pakastamista tulee ehdottomasti välttää. Kirjan kirjoittajat eivät kuitenkaan perustele väitettä mitenkään.

TAULUKKO 8. Takrolimuusin ja siklosporiinin säilyvyystutkimuksen tulokset.

Tutkimusongelma		Tulos
Takrolimuusin säilyvyys huoneenlämmössä (+21 °C) ja jääkaapissa (+4 °C)?	Kehittämistehtävä	Takrolimuusi säilyy 7 vrk huoneenlämmössä ja jääkaapissa.
Siklosporiinin säilyvyys huoneenlämmössä (+21 °C) ja jääkaapissa (+4 °C)?	Opinnäytetyö	Siklosporiini säilyy 7 vrk huoneenlämmössä ja jääkaapissa.
Siklosporiinin säilyvyys pakastettuna (-20 °C)?	Opinnäytetyö	Ei suositella pakastamista.

Tämän tutkimuksen näytemäärän perusteella ei voida arvioida, vaikuttaako pitoisuuden taso säilyvyyteen. Näytemäärä oli kaiken kaikkiaan pieni, ja erityisesti korkeamman pitoisuuden näytteitä oli hyvin vähän. Muutamaa näytettä lukuun ottamatta näytteiden pitoisuudet olivat terapeuttisella alueella.

Pitoisuuksien muutoksia ja niiden merkitsevyyttä ei tarkasteltu tilastollisella testillä, koska muutokset sisältyivät menetelmästä aiheutuvaan vaihteluun. Valmistajan ilmoittama kokonaisvariaatio takrolimuusille on enintään 10 CV% ja siklosporiinille enintään 15 CV% (Abbott Laboratories 2007: 6; Abbott Laboratories 2008: 5).

9.4 Tulosten hyödynnettävyys

Takrolimuusi- ja siklosporiininäytteiden lähetysohjeiden mukaan näytteet lähetetään huoneenlämpöisenä, jos ne ovat perillä vuorokauden sisällä ja tämän jälkeen kylmäkuljetuksena (HUSLAB 2010a, HUSLAB 2010b). Tämän tutkimuksen perusteella näyttää siltä, että takrolimuusi- ja siklosporiininäytteet pysyvät analysointikelpoisena jopa viikon ajan sekä huoneenlämmössä että jääkaappilämpötilassa. Pakastettuna siklosporiininäytteiden pitoisuudet laskivat kuukauden aikana enintään 11 %, minkä jälkeen pitoisuuksissa tapahtui huomattava lasku.

Tutkimuksen perusteella voidaan mielestäni hyväksyä huoneenlämpöisenä lähetettyjen näytteiden kuljetuksen kestolle pidempi aika kuin vuorokausi. Saatujen tulosten perusteella takrolimuusi- ja siklosporiininäytteet voidaan lähettää huoneenlämpöisenä tai kylmäkuljetuksena, kun ne ovat perillä 7 vrk:n sisällä. Säilyvyystutkimuksessa saatuja tuloksia voidaan käyttää vastatessa asiakkaiden tiedusteluihin näytteiden säilyvyydestä ja arvioitaessa analysointikelpoisuutta. Tieto säilyvyydestä auttaa asiakasta näytteiden lähettämisen ajoittamisessa ja suunnittelussa. Siklosporiininäytteitä voidaan säilyttää pakastettuna sellaisia tutkimus- tai testaustarkoituksia varten, joissa pitoisuutta ei verrata aiempaan pitoisuuteen.

10 LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTIA

Tutkimuksen luotettavuuden tarkastelu kuuluu oleellisena osana hyvään tutkimukseen. Luotettavuutta kuvataan perinteisesti kahdella käsitteellä: reliabiliteetilla ja validiteetilla. Reliabiliteetti kuvaa tutkimuksen toistettavuutta. (Metsämuuronen 2005: 27, 64–65.) Sisäinen reliabiliteetti tarkoittaa, että mitattaessa samaa asiaa monta kertaa, saadaan samanlaisia tuloksia. Ulkoinen reliabiliteetti mahdollistaa mittausten toistettavuuden myös muissa tilanteissa tai tutkimuksissa. (Heikkilä 1999: 179.) Reliaabeli tutkimus antaa siis ei-sattumanvaraisia tuloksia (Hirsjärvi – Remes – Sajavaara 2008: 226). Validiteetilla puolestaan tarkoitetaan luotettavuutta siinä mielessä, mitataanko juuri sitä, mitä on tarkoitus mitata (Metsämuuronen 2005: 57). Mittarit ja menetelmät eivät aina vastaa sitä todellisuutta, jota kuvitellaan tutkittavan (Hirsjärvi ym. 2008: 226). Sisäisesti validissa tutkimuksessa mittaukset vastaavat tutkimuksen teoriaosassa esitettyjä käsitteitä.

tä. Ulkoisella validiteetilla tarkoitetaan, että myös muut tutkijat tulkitsevat tutkimustulokset samalla tavalla. (Heikkilä 1999: 178.)

10.1 Työprosessin luotettavuus

Työprosessin luotettavuus pyrittiin varmistamaan hyvällä suunnittelulla ja toimimalla kaikissa vaiheissa työohjeiden mukaan. Etukäteen määritetyt tutkimuskysymykset ja tavoitteet varmistivat, että mittaukset vastaavat sitä, mitä on tarkoitus tutkia. Takroliimuusin ja siklosporiinin määritysmenetelmät olivat ennestään tuttuja harjoittelujaksolta, mikä lisäsi työskentelyn varmuutta. Ennen työskentelyn aloittamista kävin tekemässä valmisteluja tutkimusta varten. Erilliseen työpisteeseen varattiin valmiiksi tarvittavat välineet työskentelyä varten. Lisäksi suunniteltiin näytteiden numerointitapaa ja tutkimuspyyntöjen generointia. Eppendorf-putket numeroitiin valmiiksi näytteiden jakamiseksi eriin jääkaappisäilytystä varten. Samalla kertaa palautin mieleen myös määritysmenetelmät tekemällä muutaman näytesarjan. Hyvällä valmistelulla työskentely lähti käyntiin suunnitelmien mukaisesti.

Ennen näytteen jakoa jääkaappieriin samoin kuin aina ennen analysoinnin aloittamista, näytteet sekoitettiin huolellisesti, jotta lääkeaine olisi jakautunut mahdollisimman tasaisesti vereen. Jääkaappinäytteiden annettiin tasaantua huoneenlämpöön puolen tunnin ajan ennen analysointia. Lukuun ottamatta pakastettuja näytteitä tein kaikki määritykset itse käyttäen samoja välineitä koko työprosessin ajan. Tämä vähentää henkilöstä ja työskentelytavasta riippuvaa sattumanvaraisuutta. Näytteiden manuaalisessa esikäsitteilyvaiheessa on inhimillisen virheen mahdollisuus. Hyvällä pipetointitekniikalla ja huolellisuudella jokaisessa työvaiheessa voidaan minimoida virheiden ilmaantuminen.

Määritysmenetelmän vakioinnilla ja päivittäisillä kontroleilla varmistettiin menetelmän ja tulosten oikeellisuus. Kaikki määritykset oli tarkoitus tehdä Kirurgisen sairaalan laboratorion analysaattorilla, mutta laitevian takia määritykset tehtiin kahtena päivänä Meilahden sairaalan laboratorion analysaattorilla. Siellä tehdyllä vakioinnilla ja kontrolloinnilla varmistettiin, että tulostaso pysyi samana analysaattorin vaihtumisesta huolimatta.

Näytteiden säilytysolosuhteet pyrittiin pitämään mahdollisimman stabiilina koko prosessin ajan. Huoneen ja jääkaapin lämpötiloja seurattiin päivittäin ja ne kirjattiin ylös. Jääkaappinäytteet oli jaettu päivittäisiä analyysjä varten eriin, jolloin vältettiin koko

näytteen siirtely huoneenlämmön ja jääkaapin välillä. Analysoinnit pyrittiin tekemään mahdollisimman samanaikaisesti päivittäin, jolloin määrittysväli pysyi tasaisena. Työkentelyssä oli tietenkin otettava huomioon samalla analysaattorilla tehtävien potilasnäytteiden ensisijaisuus. Analysaattorin laitevika ja siirtyminen Meilahteen viivästyttivät yhtenä päivänä hieman analysoinnin aloittamista.

Tutkimuksen kulku on tässä raportissa pyritty kuvaamaan niin tarkasti, että se olisi toistettavissa raportin perusteella. Tehdyt valinnat tai päätökset on perusteltu, jotta prosessin seuranta olisi johdonmukaista.

10.2 Tulosten luotettavuus

Näytteet pyrittiin valitsemaan, niin että ne edustaisivat mahdollisimman kattavasti koko mittausaluetta. Terapeuttiselta alueelta eri tasoja saatiin hyvin, mutta useita korkean pitoisuuden näytteitä ei ollut valittavissa. Suurin osa potilasnäytteistä sijoittuu kuitenkin terapeuttiselle alueelle, ja tätä selvästi korkeammat pitoisuudet ovat harvinaisempia. Otoskokona oli 20 huoneenlämpö- ja 20 jääkaappinäytettä molemmista lääkaineista sekä 20 pakastettua siklosporiininäytettä. Verrattaessa takrolimuusin huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteitä keskenään ryhminä, molempia otoskokoja jouduttiin pienentämään 18 näytteeseen, koska kaikille näytteille ei saatu tuplaputkia. Riittävällä otoskoolla voidaan vähentää riskiä tulosten sattumanvaraisuudesta (Heikkilä 1999: 73.) Isompi otoskoko kaikissa säilytyslämpötiloissa olisi lisännyt tulosten luotettavuutta, mutta tälle työlle varatun ajan puitteissa isomman näyttemäärän käsittely ei ollut mahdollista.

Takrolimuusi- ja siklosporiininäytteiden pitoisuuksien muutoksia ei tarkasteltu tilastollisella testillä, eikä siten muutosten tilastollista merkitsevyyttä laskettu. Testin käyttö ei ollut perusteltua, koska pitoisuuksissa tapahtuvat muutokset sisältyivät menetelmän tarkkuudelle arvioituun vaihteluun.

Tulosten luotettavuutta puoltaa, että menetelmä oli vakioitu ja päivittäisten kontrollien tulokset olivat niille asetettujen tulosrajojen sisällä. Rinnakkaisten määritysten teko kaikista näytteistä ja kontrollinäytteiden käyttäminen jokaisessa sarjassa olisi lisännyt tulosten luotettavuutta. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista suuren työmäärän ja kustannusten vuoksi.

11 POHDINTA

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia takrolimuusi- ja siklosporiinipitoisuuden säilyvyyttä kokoveressä sekä huoneenlämmössä että jääkaappilämpötilassa. Lisäksi tutkittiin siklosporiinipitoisuuden säilyvyyttä pakastettuna. Näytteet kerättiin pääosin Kirurgisen sairaalan munuais- ja maksansiirtopotilailta. Säilyvyyttä huoneenlämmössä ja jääkaapissa tutkittiin seitsemän vuorokauden ajan sekä pakastettuna kuuden kuukauden ajan. Pitoisuudet määritettiin kemiluminesenssiin perustuvalla CMIA-menetelmällä.

Näytteiden säilyvyyttä oli tarpeen selvittää, koska Kirurgisen sairaalan laboratorioon lähetetään takrolimuusi- ja siklosporiininäytteitä analysoitavaksi joka puolelta Suomesta. Opinnäytetyön aloittamisen aikaan takrolimuusimääriä ei tehty Suomessa muissa laboratorioissa. Sittemmin takrolimuusinäytteitä on alettu analysoida muutamassa muussa laboratorioissa. Näytteiden lähettämisen on huomioitava siihen kuluva aika ja kuljetuksen aikaiset lämpötilat. Tietoa säilyvyydestä tarvitaan arvioitaessa näytteiden analysointikelpoisuutta ja vastattaessa asiakkaiden kyselyihin säilyvyydestä.

Valmistajan mukaan näyte säilyy jääkaapissa seitsemän vuorokautta, jonka jälkeen se tulee säilyttää pakastettuna -10 °C tai kylmemmässä. Näytteen säilyvyyteen huoneenlämmössä valmistaja ei ole ottanut kantaa. Kirurgisen sairaalan laboratorion käytännön mukaan takrolimuusi- ja siklosporiininäytteitä säilytetään huoneenlämmössä, kun ne odottavat saman päivän aikana tapahtuvaa analysointia. Tätä pidempiaikaista säilytystä varten näytteet siirretään jääkaappiin. HUSLAB:in ohjeen mukaan näyte lähetään huoneenlämpöisenä, jos se on perillä vuorokauden sisällä, ja tämän jälkeen kylmäkuljetuksena.

Opinnäytetyön tuloksena saatiin selville, että takrolimuusi- ja siklosporiinipitoisuus säilyy stabiilina seitsemän vuorokauden ajan sekä huoneenlämmössä ($+21\text{ °C}$) että jääkaapissa ($+4\text{ °C}$) säilytettynä. Jääkaappisäilyvyyden tulos on siten yhtenevä valmistajan ilmoittaman säilyvyysajan kanssa. Pitoisuuksissa tapahtui kuitenkin pieniä nousuja ja laskuja tarkastelujakson aikana. Verrattaessa huoneenlämpö- ja jääkaappinäytteiden sarjojen välistä variaatiota ja kokonaisvariaatiota vastaaviin tuloksiin eritasoisille kontrollinäytteille, todettiin tutkittujen takrolimuusinäytteiden CV%:en osuvan kontrollien CV%:en vaihteluvälille ja siklosporiininäytteiden variaatioiden menevän niukasti kontrollien variaatioiden yli. Kokonaisvariaatiot tutkimusnäytteille ja kontrollinäytteille oli-

vat kuitenkin kaikki alle valmistajan ilmoittamien kokonaisvariaatioiden (takrolimuusi $CV\% \leq 10$, siklosporiini $CV\% \leq 15$). Pitoisuuksissa tapahtuneet muutokset olivat tämän perusteella menetelmälle määritetyn tarkkuuden rajoissa. Luvussa 7 mainituissa ulkomaisissa tutkimuksissa saadut säilyvyysajat huoneenlämmössä ja jääkaapissa olivat samansuuntaisia tässä tutkimuksessa saatujen tulosten kanssa.

Pakastettuna siklosporiinipitoisuus laski selvästi jo ensimmäisen kuukauden aikana. Kolmen ja kuuden kuukauden kuluttua lasku oli yhä suurempi. Siklosporiinia ei tämän perusteella kannata säilyttää pakastettuna. Guder ym. (2001: 69) kehottaa ehdottomasti välttämään siklosporiininäytteiden pakastamista mutta ei esitä perusteluja väitteelle. Löytämässäni ulkomaisissa tutkimuksissa siklosporiinin säilyvyyttä tutkittiin huoneenlämmössä, jääkaapissa ja vesihauteessa mutta ei pakastettuna kuten takrolimuusin pitoisuutta. Valmistajan mukaan takrolimuusipitoisuus laskee pakastettuna kuudessa kuukaudessa alle 10 % ja yhdeksässä kuukaudessa 46 %. Tarkastelemisani ulkomaisissa tutkimuksissa takrolimuusin säilytysaika pakastettuna oli pisimmillään 28 vrk, ja pitoisuus säilyi tämän ajan muuttumattomana. Valmistaja ei ilmoita pakastetun siklosporiinin säilyvyydelle vastaavia arvioita kuin takrolimuusille.

Ongelmana tämän laajuisessa työssä on se, että otoskoko joudutaan pitämään suhteellisen pienenä, jotta työ saadaan tehtyä sille varatun ajan ja resurssien puitteissa. Pienessä otoskoossa yksikin suuri pitoisuuden muutos saattaa vaikuttaa huomattavasti mittausajankohdan keskimääräiseen pitoisuuteen. Otoskoon kasvaessa yksittäiset muutokset tasaantuvat keskimääräisiä pitoisuuksia laskettaessa.

Jatkotutkimuksena voitaisiin tarkastella hyvin matalien ja korkeiden lääkainepitoisuuksien säilyvyyttä, ja selvittää vaikuttaako pitoisuuden taso säilyvyyteen. Tässä tutkimuksessa lähes kaikki näytteet olivat terapeuttiselta alueelta. Hyvin matalien ja korkeiden pitoisuuksien näytteitä ei juuri löydy potilasnäytteistä. Tällöin terapeuttisesta alueesta huomattavasti poikkeavien pitoisuuksien näytteet tulisi valmistaa keinotekoisesti. Tutkimusta voitaisiin myös laajentaa tarkastelemalla pitoisuuksien muutoksia huoneenlämmössä, jääkaapissa ja pakastettuna pidemmän ajanjakson kuin tässä tutkimuksessa tehtiin. Pakastettujen näytteiden osalta voitaisiin seurata, tapahtuuko pitoisuuden lasku portaittain. Nyt saaduista tuloksista voidaan havaita, että 1 viikon, 2 viikon ja 1 kuukauden jälkeen pitoisuudet ovat keskenään lähes samalla tasolla. Tämän jälkeen pitoisuudet laskevat huomattavasti, ja 3 ja 6 kuukauden tulokset ovat taas keskenään samalla tasolla.

la. Tässä tutkimuksessa käytettyjen seuranta-aikojen pidentämisellä ei kuitenkaan olisi enää kliinistä merkitystä, koska potilaan hoidossa tulokset pyritään saamaan aina mahdollisimman pian.

Opinnäytetyön tekeminen oli mielenkiintoista ja motivoivaa. Säilyvyyden tutkimisella pyrittiin vastaamaan konkreettisiin kysymyksiin, joiden selvittämisestä olisi hyötyä käytännön laboratoriotyössä. Laboratoriotyöskentely sujui mielestäni hyvin. Työskentelyssä voi kuitenkin tulla vastaan myös odottamattomia tilanteita, kuten toisella laboratorioviikolla tapahtunut analysaattorin laitevika. Tämä ei kuitenkaan aiheuttanut keskeytystä päivittäisiin määrityksiin, koska Meilahden sairaalan laboratoriossa oli käytettävissä vastaavanlainen analysaattori. Kokonaisuutena opinnäytetyön tekeminen antoi hyviä oppimiskokemuksia. Työskentelyn myötä opin, miten säilyvyyden tutkiminen voidaan organisoida ja toteuttaa. Saaduista mittaustuloksista pyrin saamaan esille keskeisen sisällön ja esittämään sen havainnollisesti. Raportoinnin myötä kehittyi taito hahmottaa kokonaisuuksia ja käyttää lähdemateriaalia monipuolisesti, kriittisesti ja valikoivasti.

LÄHTEET

- Abbas, Abul K. – Lichtman, Andrew H. 2009: Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3rd edition. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Abbott 2006: Architect Immunosuppressant Assay Sample Pretreatment Guides, Architect Tacrolimus. Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories.
- Abbott 2007: Architect Immunosuppressant Assay Sample Pretreatment Guides, Architect Cyclosporine. Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories.
- Abbott Diagnostics 2008: Learning Guide Immunoassay. Verkkodokumentti. <http://www.abbottdiagnostics.co.uk/Science/Educational_Materials.cfm>. Luettu 29.3.2010.
- Abbott Laboratories 2007: Tacrolimus. Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories.
- Abbott Laboratories 2008: Cyclosporine. Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories.
- Abbott Laboratories 2009: Architect System Operations Manual. Abbott Park, Illinois: Abbott Laboratories.
- Aitio Mirja-Liisa 2000: Ovatko immunosuppression aiheuttamat munuaisongelmat torjuttavissa? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 116 (5). 511–519.
- Aitio, Mirja-Liisa – Himberg, Jaakko-Juhani 2002: Immunosuppressio. Teoksessa Neuvonen, Pertti J. – Himberg, Jaakko-Juhani – Huupponen, Risto – Kivistö, Kari T. – Ylitalo, Pauli (toim.): Kliininen farmakologia ja lääkehoito. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 637–649.
- Annesley, Thomas M. – Hunter, Brian C. – Fidler, Deirdre R. – Giacherio, Donald A. 1995: Stability of Tacrolimus (FK506) and Cyclosporin G in Whole Blood. Therapeutic Drug Monitoring 17 (4). 361–365.
- Faynor, Steven M. – Robinson, Randy 1998: Suitability of plastic collection tubes for cyclosporine measurements. Clinical Chemistry 44 (10). 2220–2221.
- Freeman, David J. – Stawecki, Marilyn – Howson, Bill 1995: Stability of FK 506 in Whole Blood Samples. Therapeutic Drug Monitoring 17 (3). 266–267.
- Guder, W.G. – Narayanan S. – Wisser, H. – Zawta, B. 2001: Samples: from the patient to the laboratory. 2nd edition. Darmstadt: GIT Verlag.
- Halonen, Toivo 2004: Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. 90–100.
- Hankonen, Riitta 2009: Uuteen elämään. Tehy-lehti (13). 15–19.
- Haug, Egil – Sand, Olav – Sjaastad, Øysten V. – Toverud, Kari C. 1999: Ihmisen fysiologia. 1.–2 painos. Porvoo: WSOY.

- Heikkilä, Tarja 1999: Tilastollinen tutkimus. 2., uudistettu painos. Helsinki: Oy Edita Ab.
- Himberg, Jaakko-Juhani 1996: Lääkeaineiden pitoisuusmittausten häiriöt. *Moodi* 20 (1). 48.
- Hirsjärvi, Sirkka – Remes, Pirkko – Sajavaara, Paula 2008: Tutki ja kirjoita. 13-14., osin uudistettu painos. Helsinki: Tammi.
- HUSLAB 2010a: Tutkimusohjekirja. Takrolimuusi, verestä. Verkkodokumentti. Päivitetty 2.1.2010. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=4360&terms=tacro>. Luettu 11.7.2010.
- HUSLAB 2010b: Tutkimusohjekirja. Siklosporiini A, verestä. Verkkodokumentti. Päivitetty 17.12.2009. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=3606&terms=siklo>. Luettu 11.7.2010.
- HUSLAB 2010c: Tutkimusohjekirja. Siklosporiini A, 2 tunnin näyte, verestä. Verkkodokumentti. Päivitetty 17.12.2009. <http://huslab.fi/cgi-bin/ohjekirja/tt_show.exe?assay=8776&terms=siklo>. Luettu 11.7.2010.
- Höckerstedt, Krister – Sipponen, Jorma – Sairanen, Heikki – Vuola, Jyrki – Kivioja, Aarne 2010: Elinsiirrot. Teoksessa Roberts, Peter J. – Alhava, Esko – Höckerstedt, Krister – Leppäniemi, Ari (toim.): *Kirurgia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 1204–1216.
- Inkinen, Kaija 2009a: Työohje, Abbott Immunosuppressant-MCC-kontrollit. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Inkinen, Kaija 2009b: Menetelmäohje, B-Siklosporiini. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Inkinen, Kaija 2009c: Menetelmäohje, B-Takrolimuusi. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Inkinen, Kaija 2009d: Työohje, Architect Cyclosporine Calibrators. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Inkinen, Kaija 2009e: Työohje, Architect Tacrolimus Calibrators. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Inkinen, Kaija 2010a: Validointiraportti, B-Siklosporiini A (CMIA), Abbott Architect i System. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Inkinen, Kaija 2010b: Validointiraportti, B-Takrolimuusi (CMIA), Abbott Architect i System. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Inkinen, Kaija 2010c. *Kemisti*. Helsinki. Henkilökohtainen tiedonanto 1.4.2010.
- Isoniemi, Helena – Jalanko, Hannu 2004: Elinsiirtolääkkeiden valikoima monipuolistuu. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 120 (11). 1371–1378.

- Jalanko, Hannu 2006: Elinsiirrot. Terveyskirjasto. Lääkärikirja Duodecim. Verkko-dokumentti. Päivitetty 26.1.2006. <http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00116&p_teos=dlk&p_selaus=>. Luettu 11.11.2009.
- Jokela, Hannu 2003: Fotometria. Teoksessa Vilpo, Juhani – Niemelä, Onni (toim.): Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 47–51.
- Koskinen, Petri – Nykänen, Antti – Tikkanen, Jussi – Sihvola, Roope – Krebs, Rainer – Lemström, Karl 2004: Onko krooninen hyljintä voitettavissa? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 120 (11). 1401–1409.
- Koulu, Markku 2007: Immunosuppressiiviset lääkkeet ja nivelreuman hoidossa käytettävät lääkkeet. Teoksessa Koulu, Markku – Tuomisto, Jouko (toim.): Farmakologia ja toksikologia. 7., uudistettu painos. Kuopio: Medicina. 789–804.
- Laine, Kari 2004: Lääkepitoisuudet – mitä tutkin ja milloin. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 120 (14). 1763–1769.
- Leppäluoto, Juhani – Kettunen, Raimo – Rintamäki, Hannu – Vakkuri, Olli – Vierimaa, Heidi – Lätti, Sole 2008: Anatomia ja fysiologia. Helsinki: WSOY.
- Linko, Solveig – Mäenpää, Antti 2000: Näytekuljetukseen liittyvä problematiikka. Moodi 24 (6). 190–192.
- Makkonen, Saara – Tuokko, Seija 1998: Näytteenotto. 4.–5. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Metsämuuronen, Jari 2005: Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä. 3. laitos. Helsinki: International Methelp ky.
- Michel, M.C. – Thesing, A. – Wagner, K. – Philipp, T. 1995: Stability of cyclosporin in blood upon shipping-related extended storage. NDT: Nephrology, Dialysis, Transplantation 10 (6). 910–911.
- Moilanen, Eeva – Vapaatalo, Heikki 2003: Tulehdus- ja immunologisia reaktioita vai-mentavat lääkeaineet. Teoksessa Pelkonen, Olavi – Ruskoaho, Heikki (toim.): Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. 3., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 439–493.
- Munuais- ja maksaliitto ry 2009: Elinsiirrot. Verkko-dokumentti. Päivitetty 30.1.2009. <<http://www.musili.fi/fin/elinsiirrot/>>. Luettu 11.11.2009.
- Mäkisalo, Heikki – Kastarinen, Helena – Saarelma, Osmo 2004: Elinsiirtopotilas terve-yskeskuksessa. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 120 (14). 1381–1390.
- Partanen, Jukka 2005: HLA-järjestelmä. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikro-biologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 680–691.

- Peakman, Mark – Vergani, Diego 2007: Basic and clinical immunology. New York: Churchill Livingstone.
- Rabson, Arthur – Roitt, Ivan M. – Delves, Peter J. 2005: Really essential medical immunology. 2nd edition. Malden: Blackwell Publishing.
- Raunio, Hannu – Huupponen, Risto 2007: Vierasainemetabolia. Teoksessa Koulu, Markku – Tuomisto, Jouko (toim.): Farmakologia ja toksikologia. 7., uudistettu painos. Kuopio: Medicina. 87–97.
- Renkonen, Risto – Häyry, Pekka 2005: Elinten ja kudosten siirrot. Teoksessa Huovinen, Pentti – Meri, Seppo – Peltola, Heikki – Vaara, Martti – Vaheri, Antti – Valtonen, Ville (toim.): Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Kirja I. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 921–926.
- Savolainen, Kari – Parviainen, Markku 2003: Immunokemialliset menetelmät. Teoksessa Vilpo, Juhani – Niemelä, Onni (toim.): Laboratoriolääketiede: Kliininen kemia ja hematologia. 2. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 59–61.
- Siloaho, Maritta 2000: Miten saada näyte säilymään analysointiin saakka? Moodi 24 (6). 185–189.
- Siloaho, Maritta – Elg, Peter – Leppänen, Esa – Loikkanen, Minna – Puukka, Raija – Ruopuro, Marja-Leena – Saarmala, Hannu 1997: Ohjeita mittausepävarmuuden arvioimiseksi ja laskemiseksi kliinisen kemian laboratoriossa. Moodi 21 (4). 196–203.
- Smith, Mary Carole - Sephel, Gregory C. 1990: Long-term in vitro stability of cyclosporine in whole-blood samples. Clinical Chemistry 36 (11). 1991–1992.
- Soininen, Miia 2007: Hyks teki ennätysmäärän elinsiirtoja. Suomen lääkärilehti. Verkkodokumentti. Päivitetty 18.1.2007. <http://www.laakarilehti.fi/uutinen.html?opcode=show/news_id=4347/type=1>. Luettu 14.11.2009.
- Sorto, Aira – Törmä, Ari – Kaihola, Hanna-Leena 1996: Laadunvarmistus kliinisessä laboratoriotyössä. Sisäisen laadunohjauksen periaatteet. Erillisjulkaisu. Moodi 20 (4). 1–23.
- SPR Veripalvelu 2009: Elinsiirtopotilaat. Verkkodokumentti. Päivitetty 8.6.2009. <<http://www.veripalvelu.fi/www/1097>>. Luettu 14.11.2009.
- Stenholm, Eija 2010a: Työohje, Takropooli. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Stenholm, Eija 2010b: Työohje, Siklopooli. HUSLAB: Kirurgisen sairaalan laboratorio.
- Tanner, Pirjo 2007: Näytteiden lähettäminen. Moodi 31 (1). 22.
- Tapola, Hilikka 2004: Näytteenotto. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. 24–29.

- Taylor, Paul J. – Jones, Alun – Balderson, Glenda A. – Lynch, Steve V. – Norris, Ross L.G. – Pond, Susan M. 1996: Sensitive, specific quantitative analysis of tacrolimus (FK506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem massspectrometry. *Clinical Chemistry* 42 (2). 279–285.
- The Merck index 2001: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13th edition. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co Inc.
- Tuokko, Seija – Rautajoki, Anja – Lehto, Liisa 2008: Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoa varten. Helsinki: Tammi.
- Wallemacq, P. – Goffinet, J. – O’Morchoe, S. – Rosiere, T. – Maine, G.T. – Labalette, M. – Aimo, G. – Dickson, D. – Schmidt, E. – Schmid, R.W. 2007: Analytical Multi-Site Evaluation of the Abbott ARCHITECT Tacrolimus Assay. American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting, San Diego, California, July 15–19, 2007.
- Weber, Teddy 2000: Immunokemiallisen analytiikan preanalyttiset ongelmat. *Moodi* 24 (6). 181–184.
- Ylitalo, Pauli – Neuvonen, Pertti J. 2002: Lääkeaineiden pitoisuusmittausten yleiset periaatteet, käyttömahdollisuudet ja merkitys. Teoksessa Neuvonen, Pertti J. – Himberg, Jaakko-Juhani – Huupponen, Risto – Kivistö, Kari T. – Ylitalo, Pauli (toim.): *Kliininen farmakologia ja lääkehoito*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy. 887–891.

TAKROLIMUUSINÄYTTEIDEN TULOKSET

Takrolimuusi (µg/l): huoneenlämpö (+21 °C)												
Näyte	1. tulos	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk	keskiarvo	keskihajonta	CV%
41	3,3	3,4	2,9	3,3	3,3	3,4	3,0	3,2	3,2	3,21	0,18	5,63
42	4,8	4,9	4,1	4,9	5,2	5,1	4,5	4,6	4,8	4,76	0,35	7,44
43	17,7	17,0	15,3	17,2	16,3	17,5	17,0	16,7	16,5	16,69	0,68	4,07
44	8,3	8,0	7,9	8,3	8,2	8,1	8,4	7,8	7,9	8,08	0,21	2,63
45	9,2	9,1	8,0	8,5	9,3	8,6	8,9	8,4	8,6	8,68	0,41	4,76
46	12,9	12,9	12,5	13,4	13,3	12,7	12,8	12,9	12,3	12,85	0,37	2,88
47	24,3	23,6	23,9	23,8	24,7	23,9	23,6	23,5	21,7	23,59	0,85	3,60
48	5,5	5,4	5,8	5,7	5,8	5,7	5,4	5,7	5,8	5,66	0,17	2,98
49	5,9	5,9	5,8	5,6	5,7	5,8	5,2	5,6	5,3	5,61	0,25	4,41
50	14,7	14,3	14,2	15,6	14,7	15,5	13,3	14,9	14,7	14,65	0,74	5,06
51	9,9	10,5	10,8	10,6	9,5	9,8	9,8	9,8	10,1	10,11	0,47	4,62
52	7,7	7,5	7,8	7,6	7,3	7,1	6,6	6,8	7,5	7,28	0,41	5,68
53	7,5	6,6	7,8	7,3	6,4	6,9	6,8	6,5	6,8	6,89	0,46	6,70
54	8,1	8,1	8,3	8,0	7,6	8,0	7,0	7,9	7,5	7,80	0,41	5,31
55	8,2	8,4	8,0	8,2	7,8	8,0	7,6	7,9	7,7	7,95	0,26	3,29
56	7,4	7,5	7,8	7,3	8,0	6,9	7,8	7,2	7,4	7,49	0,36	4,86
57	9,8	9,9	10,1	10,7	9,5	9,9	9,3	9,5	10,1	9,88	0,45	4,52
58	10,8	11,2	10,6	11,2	10,7	10,6	10,4	10,2	10,0	10,61	0,43	4,04
keskiarvo		9,68	9,53	9,84	9,63	9,64	9,30	9,39	9,33			4,58
59	6,8	6,6	5,8	7,0	6,1	6,3	6,5	6,5	6,4	6,40	0,35	5,54
60	9,1	8,7	7,7	8,9	9,0	8,1	8,1	8,3	8,6	8,43	0,45	5,34

Takrolimuusi (µg/l): jääkaappi (+4 °C)												
Näyte	1. tulos	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk	keskiarvo	keskihajonta	CV%
61	3,3	3,4	3,6	3,8	3,5	3,6	3,6	3,5	3,5	3,56	0,12	3,33
62	4,8	4,9	5,3	5,1	5,1	5,3	5,1	5,1	5,0	5,11	0,14	2,65
63	17,7	17,0	17,3	18,4	19,2	18,4	17,1	17,0	17,1	17,69	0,85	4,82
64	8,3	8,0	8,5	9,0	8,2	8,3	8,4	7,8	7,7	8,24	0,42	5,07
65	9,2	9,1	8,9	8,8	9,1	8,6	8,8	8,4	8,2	8,74	0,32	3,67
66	12,9	12,9	13,2	12,4	13,8	13,3	13,9	12,4	12,3	13,03	0,63	4,85
67	24,3	23,6	26,0	27,9	25,2	24,7	25,6	25,6	25,9	25,56	1,22	4,79
68	5,5	5,4	6,0	6,1	6,1	5,8	5,7	5,5	5,6	5,78	0,27	4,70
69	5,9	5,9	5,9	5,1	5,6	6,0	5,7	5,5	5,9	5,70	0,30	5,22
70	14,7	14,3	15,1	15,7	15,7	14,9	15,3	15,2	14,2	15,05	0,57	3,76
71	9,9	10,5	10,9	10,5	9,8	10,2	9,8	9,2	10,1	10,13	0,53	5,22
72	7,7	7,5	7,3	7,3	7,4	6,4	7,1	7,1	7,5	7,20	0,36	4,98
73	7,5	6,6	7,5	7,4	7,3	7,5	7,6	7,0	6,6	7,19	0,41	5,64
74	8,1	8,1	8,4	8,3	7,9	7,7	7,8	7,5	7,5	7,90	0,34	4,33
75	8,2	8,4	8,7	8,4	8,2	8,2	8,6	8,0	6,9	8,18	0,56	6,88
76	7,4	7,5	6,9	7,5	7,6	7,6	7,4	7,4	6,9	7,35	0,29	3,92
77	9,8	9,9	10,3	10,0	10,0	10,3	9,8	8,6	9,8	9,84	0,54	5,46
78	10,8	11,2	11,0	10,1	11,1	11,1	11,3	11,0	11,0	10,98	0,37	3,37
keskiarvo		9,68	10,04	10,10	10,04	9,88	9,92	9,54	9,54			4,59
79	1,8	1,8	2,1	1,7	1,9	1,6	1,7	2,1	1,9	1,85	0,19	10,01
80	7,9	7,9	7,6	6,8	7,7	7,0	7,6	7,3	7,2	7,39	0,38	5,09

SIKLOSPORIININÄYTTEIDEN TULOKSET

Siklosporiini (µg/l): huoneenlämpö (+21 °C)												
Näyte	1. tulos	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk	keskiarvo	keskihajonta	CV%
1	185	208	165	174	168	201	185	189	168	182	16,2	8,9
2	49	43	49	57	48	46	49	44	43	47	4,6	9,8
3	304	301	262	234	289	296	256	278	222	267	28,9	10,8
4	171	202	160	170	183	170	163	162	168	172	14,0	8,1
5	142	146	136	151	159	137	134	139	124	141	10,9	7,7
6	131	122	114	118	128	139	118	126	116	123	8,2	6,7
7	70	63	60	70	64	59	67	63	54	63	4,9	7,9
8	214	196	192	174	202	196	190	193	177	190	9,7	5,1
9	240	226	223	250	246	260	211	221	213	231	18,3	7,9
10	89	91	92	84	99	89	94	89	75	89	7,2	8,0
11	139	133	140	122	137	109	145	135	129	131	11,3	8,6
12	96	100	102	102	123	81	113	112	77	101	15,7	15,5
13	77	84	87	80	80	73	96	67	85	82	8,8	10,8
14	190	162	171	160	166	160	132	138	175	158	15,2	9,6
15	82	81	79	81	80	68	65	52	78	73	10,5	14,3
16	278	255	257	244	266	228	258	226	268	250	16,1	6,4
17	204	192	201	159	179	147	196	155	193	178	21,1	11,9
18	113	145	120	123	128	127	114	124	126	126	8,9	7,1
19	96	96	93	93	96	108	85	69	103	93	11,8	12,8
20	325	300	300	307	301	343	271	269	293	298	23,0	7,7
keskiarvo		157	150	148	157	152	147	143	144			9,3

Siklosporiini (µg/l): jääkaappi (+4 °C)												
Näyte	1. tulos	0 vrk	1 vrk	2 vrk	3 vrk	4 vrk	5 vrk	6 vrk	7 vrk	keskiarvo	keskihajonta	CV%
21	185	208	185	180	172	200	173	151	171	180	17,9	9,9
22	49	43	47	43	52	44	65	38	44	47	8,3	17,6
23	304	301	287	229	255	243	286	281	213	262	31,6	12,1
24	171	202	158	166	162	150	154	159	164	164	16,1	9,8
25	142	146	169	144	152	156	149	141	155	152	8,8	5,8
26	131	122	117	113	120	136	122	122	114	121	7,1	5,9
27	70	63	63	70	55	67	65	61	65	64	4,4	7,0
28	214	196	163	181	202	198	200	177	178	187	14,1	7,5
29	240	226	221	203	232	242	254	185	246	226	23,0	10,2
30	89	91	84	81	81	97	81	87	69	84	8,3	9,9
31	139	133	150	120	131	157	144	120	116	134	15,2	11,3
32	96	100	120	111	114	126	98	108	116	112	9,5	8,5
33	77	84	84	76	81	74	79	68	76	78	5,4	7,0
34	190	162	179	201	176	174	196	159	192	180	15,4	8,6
35	82	81	75	78	81	79	77	60	81	77	7,0	9,2
36	278	255	256	287	242	265	241	219	239	251	20,3	8,1
37	204	192	187	173	162	195	176	176	230	186	20,7	11,1
38	113	145	111	112	115	141	117	90	130	120	17,9	14,9
39	96	96	88	93	96	102	79	65	93	89	11,8	13,3
40	325	300	296	320	296	313	308	278	320	304	14,3	4,7
keskiarvo		157	152	149	149	158	153	137	151			9,6

Siklosporiini (µg/l): pakastus (-20 °C)									
Näyte	0 vrk	1 vko	2 vko	1 kk	3 kk	6 kk	keskiarvo	keskihajonta	CV%
1	39	36	30	30	33	30	33	3,8	11,5
2	54	52	54	43	42	38	47	7,0	14,8
3	65	62	60	47	53	52	57	6,9	12,2
4	96	95	93	100	83	88	93	6,1	6,6
5	108	113	118	114	104	93	108	9,0	8,3
6	134	106	115	118	112	77	110	18,8	17,1
7	153	132	129	145	113	113	131	16,3	12,5
8	162	151	150	153	146	121	147	13,9	9,4
9	170	163	168	159	131	116	151	22,3	14,7
10	208	209	199	198	159	170	191	20,9	11,0
11	247	224	222	200	155	171	203	34,9	17,2
12	291	249	259	237	230	214	247	26,7	10,8
13	330	309	319	323	257	270	301	30,4	10,1
14	380	318	273	327	291	290	313	38,3	12,2
15	403	354	368	342	322	331	353	29,3	8,3
16	523	486	513	579	458	425	497	53,8	10,8
17	545	529	488	558	421	450	499	55,0	11,0
18	578	519	505	534	330	397	477	93,8	19,7
19	709	521	569	599	564	452	569	85,5	15,0
keskiarvo	273	244	244	253	211	205			12,3
20	1419	1766	1727	1831	1243	*	1597	253,6	15,9

*) tulos puuttuu

ABBOTT FINLANDIN LUPA KUVAN JULKAISUUN

05/07/2010Tanja Sillanpaa
FINLAND

Dear Tanja,

Abbott Laboratories ("Abbott") hereby grants permission to you to use the following material on a non-exclusive basis:

[images attached to page 2 of this text]

Such permission shall be limited to reproduction of the images identified above ("Images") in the textbook you have written entitled Takrolimuusi- ja siklosporiiniinäytteiden säilyvyys (Textbook") to be published by Helsinki Metropolia University of Applied Sciences in 2010. You are not authorized to make any changes, deletions, additions, or modifications to the Images.

You shall have sole responsibility for the Textbook and shall indemnify and hold Abbott harmless from any liability, damage, loss, cost or expense relating to any claim arising in connection with the use of the Images by you.

Full credit to the source of the Images shall be given. You agree to include the Abbott copyright notice (© 2010 Abbott Laboratories) with the Images in the Chapter. You may indicate that the Images are reproduced with permission.

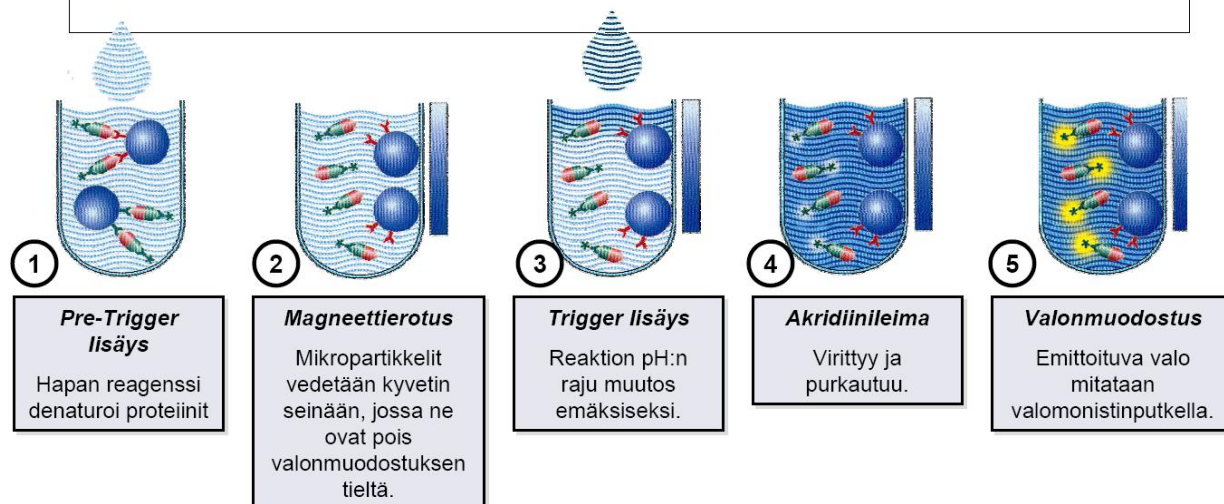
Any non-compliance with the terms and conditions hereof shall be grounds for revocation of the permission granted hereunder to you by Abbott. Unless revoked, this permission shall be effective for publication of the Textbook. The permission includes the right to include the Images in additional printings or revisions of the Textbook, but not the right to reproduce or to authorize reproduction of the Images apart from the Textbook.

Very truly yours,

Erdinc Eroglu
Abbott ADD Finland,
ESPOO, FINLAND



ARCHITECT® detektiomekaniikka



Kemiallis-mekaaninen tekniikka lisää valon saantoa detektiovaiheessa.



ARCHITECT® i2000^{SR}

ARCHITECT® ci8200

Future Automation for Today's Laboratory

ARCHITECT® e8000

