



Likvorin solujen säilyvyys

Kaisa-Mari Pokela

Janika Ranta

OPINNÄYTETYÖ
Syyskuu 2020

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

POKELA, KAISA-MARI & RANTA, JANIKA:
Likvorin solujen säilyvyys

Opinnäytetyö 28 sivua
Syyskuu 2020

Aivo-selkäydinneste, eli likvor, on kirkas ja soluton neste, joka pehmustaa ja ympäröi aivoja ja selkäydintä. Se auttaa tukemaan aivojen laskimorakenteita ja on tärkeä osa aivojen homeostaasissa ja aineenvaihdunnassa. Aivoselkäydinnestettä täydentyy jatkuvasti aivojen suonikalvon avulla ja imeytyy verenkiertoon. Likvorista voidaan diagnosoida aivojen ja selkäytimen sairauksia ja tilaa. Likvor kerätään selkäydinpunktiolla. Likvornäytteestä voidaan tutkia erilaisilla menetelmillä mm. nestepaine, proteiinit, glukoosi, erytrosyytit, leukosyytit, kemikaalit, bakteerit, virukset sekä muita invasiivisiä organismeja ja vieraita aineita.

Opinnäytetyössä keskityimme solujen, erytrosyyttien ja leukosyyttien, säilymisen vertailuun mikro-EDTA-putkessa ja tehdaspuhtaassa putkessa. Solujen esiintyminen selkäydinnesteessä on aina indikaatio sairaudesta tai vammasta, joka vaatii sairaalahoitoa. Selkäydinnesteen solut lasketaan mikroskoopilla Bürkerin kammiossa.

Opinnäytetyön tarkoitus oli verrata likvorin solujen säilyvyyttä säilöntäaineellisessä ja säilöntäaineettomassa putkessa. Opinnäytetyön tavoite oli saada lisää näytteen analysointiin. Aiheen antoi Seinäjoen keskussairaala. Opinnäytetyö oli sekä tutkimuksellinen että kvantitatiivinen, sillä siinä määritettiin likvorin solujen, erytrosyyttien ja leukosyyttien, määrä eri ajanjaksona vertaamalla kahta erilaista putkea keskenään. Opinnäytetyössä vertailtiin 10 likvornäytteen solujen säilyvyyttä laskemalla näytteen solut heti, 2h ja 4h näytteenoton jälkeen.

Opinnäytetyön haasteena oli vähäinen näytemäärä sekä pitkä välimatka Seinäjoen laboratorion ja Tampereen välillä. Tulosten pohjalta likvorin solujen säilyvyys ei muutu putkea vaihtamalla. Jatkotutkimuksen haasteena lienee aineiston kerääminen, mutta laajemmilla resursseilla toteutettu jatkotutkimus olisi varmasti tarpeen.

Asiasanat: likvor, solujen säilyvyys, erytrosyytti, leukosyytti

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

POKELA, KAISA-MARI & RANTA, JANIKA:
Preservation of Cells in Cerebrospinal Fluid Samples

Bachelor's thesis 28 pages
September 2020

Cerebrospinal fluid (CSF) is a clear fluid which surrounds the brain and the spinal cord, which acts as both a chemical and a physical buffer. Normally cerebrospinal fluid does not contain any cells such as erythrocytes or leucocytes, thereby the presence of these cells may be an indicator of an underlying issue. This thesis focuses on examining how these cells could be better preserved in clinical samples by using the preservative EDTA, which is also used to preserve peripheral blood samples. Analysing cerebrospinal fluid samples yields important data when diagnosing inflammatory and degenerative diseases affecting the nervous system, but the samples must be analysed urgently as the cells begin to deteriorate quickly. In this thesis the preservation of cells in cerebrospinal fluid was compared between two different sample tubes: the preservative-free sample tube and the EDTA sample tube. The erythrocytes and leucocytes were counted separately three times using Bürker's chamber. The results do not suggest the preservative made a difference to the cell preservation, but due to the sample size being unexpectedly scarce any credible conclusions could not be formed. However, other research suggests the preservative does not affect the preservation of the cells. Further research on this topic should consider the time needed to collect a large number of samples necessary to attain substantial results.

Key words: cerebrospinal fluid, cell preservation, erythrocytes, leucocytes

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	5
2	LIKVORIN KOOSTUMUS JA TUTKIMUSINDIKAATIOT	7
	2.1 Likvorin solut	8
	2.2 Erytrosyytit	9
	2.3 Leukosyytit	9
	2.4 Tutkimusindikaatiot	10
	2.5 Selkäydinnesteen näytteenotto	10
3	LABORATORIODIAGNOSTIIKKA	12
	3.1 Likvorin solujen kammiolaskenta.....	13
4	SOLUJEN SÄILYVYYS.....	15
5	TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS	16
6	TUTKIMUSAINIESTO JA TUTKIMUSMENETELMÄ	17
	6.1 Tutkimusaineisto	17
	6.2 Tutkimusmenetelmä.....	18
7	TULOKSET	20
	7.1 Erytrosyyttien säilyminen	20
	7.2 Leukosyyttien säilyminen	21
8	POHDINTA	23
	8.1 Tulosten tarkastelu.....	23
	8.2 Tulosten luotettavuus	23
	8.3 Eettiset asiat	24
	8.4 Johtopäätökset ja jatkotutkimukset	24
	LÄHTEET.....	26

1 JOHDANTO

Likvor eli aivo-selkäydinneste on kirkasta ja väritöntä nestettä ihmisen selkäytimessä, jota on elimistössä kerrallaan noin 150 ml, ja sitä syntyy vuorokaudessa noin puoli litraa. Normaalitilassa siinä ei ole lainkaan punasoluja, ja vain alle 4 valkosolua/ mm³, joista suurin osa on mononukleaarisia lymfosyyttejä. (Soinila 2015.) Likvorilla on useita fysiologisia tehtäviä, kuten toimia aivojen aineenvaihduntajärjestelmänä kuona-aineita poistamalla, ja se säätelee aivojen kemiallista ympäristöä. Se toimii myös keskushermoston iskunvaimentimena, ja suojaa aivoja akuuteilta painemuutoksilta. (Sand ym. 2007.)

Likvorin tutkimukset ovat olleet oleellinen osa hermostosairauksien diagnostiikkaa jo yli 100 vuotta (Atula ym. 2019). Likvorista tehtävät analyysit ovat keskeisessä asemassa silloin, kun potilaalla on keskushermostollisia oireita kuten muistihäiriöitä, sekavuutta tai tajunnantason alentumista, joiden syy ei selviä tavallisilla laboratoriotesteillä (Soinila 2015). Se tulee myös kysymykseen silloin, kun epäillään keskushermostollista tulehdusta, aivojen tai selkäytimen rappeumaa tai neoplasiaa (Atula ym. 2019). Likvorista saadaan tarkemmin määritettyä aivojen, selkäytimen ja nivelten patologiset muutokset kuin tavallisella verikokeella, sillä likvoriin suodattuu aivoissa toimivan lymfaattisen järjestelmän kautta solunulkoisia kuona-aineita (Lohela ym. 2020).

Opinnäytetyön tarkoitus on verrata likvorin solujen säilyvyyttä säilöntäaineellisessä ja säilöntäaineettomassa putkessa. Tavoitteena on saada likvorin päivystysnäytteisiin lisää analysointiaikaa. Tutkimus suoritetaan vertaamalla säilöntäaineettoman näytteen solujen määrää 1 ml mikro-EDTA-putken solujen määrään tiettyinä ajankohtina. Näytteet mikroskopoidaan Bürkerin kammiossa välittömästi, sekä kahden ja neljän tunnin jälkeen näytteenotosta. Oletimme, että EDTA-putkessa solut säilyvät pidempään.

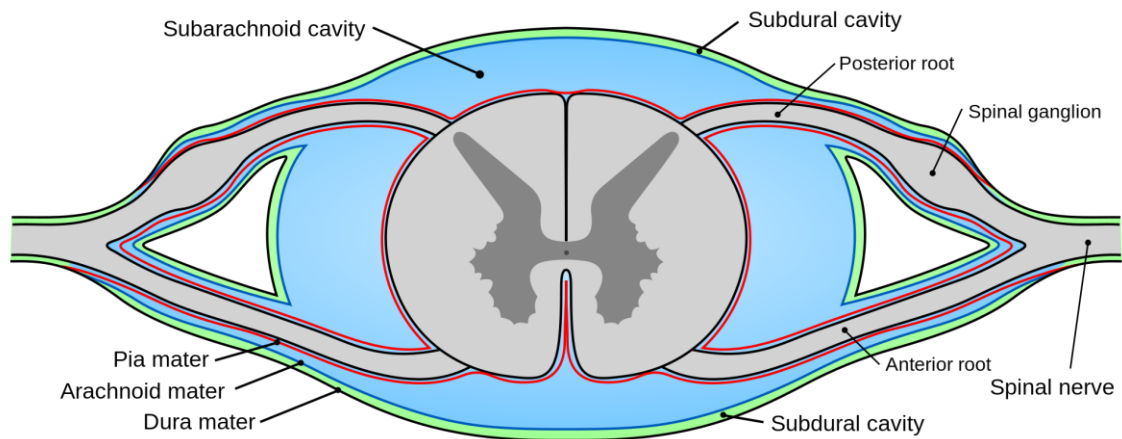
Saimme aiheen suoraan Seinäjoelta sellaisena kuin se on, emmekä muuttaneet sitä mitenkään. Aihe on valmiiksi rajattu käsittelemään likvorin soluja, emmekä huomioi likvorin muita analyyttejä kuten proteiineja. Emme myöskään huomioi

esimerkiksi säilytyslämpötilan muutoksia, vaan kaikki näytteet on säilytetty tavanomaisesti laboratoriossa.

Saamiemme tulosten perusteella putken tyyppi ei vaikuta solujen säilyvyyteen. Täytyy kuitenkin huomioida tutkimuksessa käytetty vähäinen aineiston määrä. Mielestämme aihetta tulisi tutkia lisää. Jatkotutkimuksessa kannattanee huomioida aineiston keruuseen tarvittava aika.

2 LIKVORIN KOOSTUMUS JA TUTKIMUSINDIKAATIOT

Keskushermostoa suojaa kolme selkäydinkalvoiksi kutsuttua sidekudoskalvoa, joista uloin on kovakalvo, *dura mater*, jonka tehtävä on tukea aivoja. Se ulottuu aivopuoliskojen väliseen tilaan sekä aivojen suurimpiin uurteisiin. Kovakalvo jakautuu poimuissa kahdeksi erilliseksi kalvoksi, joiden väliin jäävää tila muodostaa veriviemärin. Kovakalvon alla on lukinkalvo, *arachnoidea*, ja se muodostaa pehmeäkalvon, *pia mater*, kanssa lukinkalvonontelon, jonka täyttää selkäydinneste. Selkäydinneste täyttää myös selkäydinkanavan ja toimii keskushermoston iskunvaimentimena. (Sand, et al., 2007)



KUVA 1. Selkäydinkalvot. (Mysid, Public domain)

Luotettavaa hermosignaalien kulkua ylläpitää kolmen esteen aikaansaama ionihomeostaasi: veri-aivoeste, lukinkalvon epiteelisolut sekä selkäydinnestettä tuottava aivokammioden suonipunos (Abbott & Yusof 2010). Veri-aivoeste muodostuu keskushermostossa olevien hiussuonia ympäröivien endoteelisolujen tiivistä liitoksista, joilla on ainutlaatuisia ominaisuuksia (Leppäluoto ym. 2013). Ne pysyvät kontrolloimaan ionien, molekyylien ja solujen liikkumista veren ja aivojen välillä, ja siten ylläpitävät keskushermoston homeostaasia, suojelevat sitä patogeeneiltä sekä varmistavat hermosignaalien toiminnan (Abbott & Yusof 2010).

Likvorilla on tukitehtävänsä lisäksi myös muita fysiologisia tehtäviä. Se toimii aivojen aineenvaihduntajärjestelmänä poistamalla kuona-aineita ja se säätelee keskushermoston kemiallista ympäristöä. Likvor myös suojelee aivoja keskusslas-kimopaineen akuuteilta muutoksilta. (Hühmer ym. 2006.)

Likvorin kulkeutuminen verenkiertoon alkaa aivokammioiden suonipunoksista, josta se siirtyy selkäytimen ympärille, subaraknoidaalitilaan. Subaraknoidaalitilasta selkäydinneste pääsee poistumaan lukinkalvojuvästen avulla kovakalvon lehtien välissä sijaitseviin veriviemäreihin ja sieltä verenkiertoon. (Strasinger & Di Lorenzo 2014.)

Likvor on väritöntä ja läpinäkyvää nestettä, jota muodostuu aivokammioiden epi-teelipoimujen hiussuonten suodattaessa verta (Sand ym. 2007). Sitä muodostuu päivittäin noin 500 ml, mutta kerrallaan sitä on ihmisessä vain 90 – 150 ml (Fischbach & Dunning 2009).

2.1 Likvorin solut

Terveessä likvorissa ei ole normaalitilassa soluja tai proteiineja (Sand ym. 2007). Sinne voi kuitenkin päätyä soluja sairauksien, infektioiden tai vammojen takia, kuten verisuonten hajotessa tai aivokalvontulehduksen seurauksena. (Fischbach & Dunning 2009).

Useimmin likvorissa esiintyviä valkosoluja ovat lymfosyytit ja monosyytit (Rodak ym. 2012). Neutrofiilejä ei likvorissa yleensä esiinny, ja suuret neutrofiilimäärät voivat viitata bakteereihin (Rodak ym. 2012). Eosinofiilejä ja basofiilejä voi esiintyä vierasobjektien läsnäollessa kuten suntit (hydrokefaluksen hoidossa käytettävä ihon alle asennettava letku), sekä parasiitti-infektioissa ja allergisissa reaktioissa (Rodak ym. 2012).

2.2 Erytrosyytit

Erytrosyytit eli punasolut muodostuvat ihmisen luuytimessä. Tapahtumaketjua, jossa pronormoblastit kypsyvät lopulta erytrosyyteiksi, kutsutaan erytropoieesiksi (Hoffbrand & Moss 2011). Mikäli näytteestä löytyy myös näitä erytrosyyttien varhaisia muotoja, tulee huomioida luuydinkontaminaation mahdollisuus. Tällöin näytteessä saattaa esiintyä kuitenkin myös megakaryosyyttejä. (Rodak ym. 2012.)

Erytrosyyttien pääsääntöinen tehtävä on kuljettaa happea elimistön kudoksiin, sekä poistaa soluhengityksestä muodostunutta hiilidioksidia kudoksista (Hoffbrand & Moss 2011). Erytrosyyttien esiintyminen likvorissa, tasaisesti näytteeseen levittyneenä, on merkki aivoverenvuodosta. Hyytymät ja veriviirut ovat puolestaan artefakteja. Vanha verenvuoto tai suuri proteiinikonsentraatio voi värjätä näytteen kellertäväksi. (Atula ym. 2019.)

2.3 Leukosyytit

Leukosyytit eli valkosolut voidaan jakaa niiden rakenteen ja toiminnan perusteella eri ryhmiin, granulositytteihin, monosyytteihin ja lymfosyytteihin. Granulositytit voidaan edelleen jakaa basofiilisiin, neutrofiilisiin ja eosinofiilisiin granulositytteihin. Valkosolujen pääsääntöinen tehtävä on suojella elimistöä patogeeneilta. (Nienstedt ym. 2009.)

Leukosyyttejä esiintyy likvorissa normaalisti alle 4×10^6 solua/l, joista suurin osa on mononukleaarisia lymfosyyttejä. Bakteerien aiheuttamissa infektioissa ja alkavassa virusinfektiossa esiintyy eniten liuskatumaisia granulosityttejä. Laboratoriossa suoritetaan aina likvorin valkosolujen erittelylaskenta, jos valkosolut ylittävät $20 \times 10^6/l$. Artefaktiveri puolestaan lisää valkosolujen määrää yhdellä tuhalla erytrosyyttiä kohden. (Soinila 2015.)

2.4 Tutkimusindikaatiot

Likvorin tutkimukset ovat pääasiallinen diagnostinen väline hermostosairauksien selvittämisessä. Tutkimusindikaatiot voidaan jakaa neljään eri kategoriaan: aivokalvontulehdus, subaraknoidaalinen verenvuoto, keskushermoston karsinomat ja metastaasit, sekä autoimmuunisairaudet ja multipple skleroosi. (Fischbach & Dunning 2009.)

Aivokalvontulehduksessa selkäydinnestetutkimuksella saadaan viitteitä sen aiheuttajasta. Bakteerien aiheuttamassa aivokalvotulehduksessa selkäydinnesteessä on paljon valkosoluja (yli 1000 solua/mm³) ja on koostumukseltaan purulentti eli märkäinen. Virusten aiheuttamassa tulehduksessa likvor on kirkkaampaa (valkosoluja 10 – 100 solua/mm³) ja vuotojen yhteydessä neste on punaista ja sisältää paljon punasoluja. (Leppäluoto ym. 2013.) Myös sieni tai ameba voi aiheuttaa aivokalvotulehduksen (Strasinger & Di Lorenzo 2014).

Subaraknoidaalinen verenvuoto eli lukinkalvon alainen verenvuoto, SAV. Verenvuoto on harvinainen sairaus, joka johtuu aivovaltimon synnynnäisestä heikosta kohdasta ja sen pullistumasta, aneurysmasta. (Mustajoki 2020.) Traumaattista lukinkalvon alaista vuotoa tarkoitetaan, kun aneurysmasta johtuva verenvuoto kulkeutuu selkäydinnesteen joukkoon. Verinen likvor voi aiheuttaa tulehdusreaktioita aivokalvoilla ja aivokudoksessa. (Terveyskylä 2019.) Likvorin tutkimuksia voidaan myös tehdä, jos potilaalla on pitkään jatkuva päänsärky, hallusinaatioita, sekavuutta, dementiaa, kohtauksia, heikotusta, tajunnantason hämärtymistä, puhevaikeuksia tai tuntoaistimuutoksia (Healthline 2018).

2.5 Selkäydinnesteen näytteenotto

Likvor kerätään selkäydinpunktiolla (Fischbach & Dunning 2009). Punktiossa neula viedään 3. ja 4. lannenikaman välistä selkäytimen subaraknoidaalitilaan, josta selkäydinneste saadaan tiputettua vapaasti näytteenottoputkeen (Leppäluoto ym. 2013). Tutkimuksen aikana potilaan tulee maata paikoillaan kylkiasennossa jalat koukistettuna rintakehää vasten, jotta lanneranka pysyy pyöristettynä

ja nikamien välit avautuneena. Aikuisen ihmisen selkäydin loppuu 2. lannenikaman tasolla, joten punktiosta ei aiheudu vaaraa potilaalle. Pistokohta puhdistetaan vahvoilla puhdistusaineilla sekä pistokohta puudutetaan. (Healthline 2018.) Paineen nouseminen kallon sisällä voi kuitenkin tehdä toimenpiteestä vaarallisen, sillä aivot pyrkivät tasaamaan punktiossa poistetun nesteen jättämää alipainetta, joka voi johtaa basilaarivaltimon puristumiseen ja iskeemiseen lamaan. (Soinila 2015). Kallon sisäistä painetta tarkkaillaan manometrillä koko operaation ajan (Healthline 2018).

Likvorin keruu kestää kokonaisuudessaan noin 30 minuuttia. Keruun suorittaa selkäydinnesteen keräämiseen erikoistunut lääkäri. Keruun aikana potilaan on erittäin tärkeää pysyä täysin paikallaan, jotta neula osuu oikeaan kohtaan eikä aiheuta vammaa selkärankaan. Päänsärky on yleinen sivuoire toimenpiteen jälkeen. (Healthline 2018.)

3 LABORATORIODIAGNOSTIIKKA

Yleisimpiin selkäydinnesteen tutkimuksiin kuuluvat erilaiset seulontatutkimukset, leukosyyttien ja erytrosyyttien määrä ja proteiinifraktiot. Seulontatutkimuksia otetaan pääsääntöisesti päivystysaikana sekä röntgentutkimusten yhteydessä. Infektioepäilyssä pyritään tutkimaan likvorin solut, bakteerit, laktaatti, proteiinit ja glukoosi. Bakteeri- tai sieni-infektion metabolia kuluttaa glukoosia, ja anaerobisen aineenvaihdunnan johdosta likvorin laktaattipitoisuus nousee samalla kun glukoosipitoisuus laskee. Likvorin glukoosipitoisuus voi kuitenkin nousta myös esimerkiksi diabeteksen seurauksena. (Soinila 2015.)

Verrattuna veren plasmaan likvorissa kalsium-, kalium- sokeri- ja laktaattipitoisuudet ovat jonkin verran matalammat, mutta kloridipitoisuus on suurempi. (Lepäluoto ym. 2013). Likvorin proteiinipitoisuus on myös huomattavasti seerumin proteiinipitoisuutta alhaisempi (Soinila 2015). Proteiineista suurin osa (noin 80%) on suodattunut verestä ja loput (20%) likvorista on aivojen alueella syntynyttä. (Strasinger & Di Lorenzo 2014).

Likvorissa ei normaalitilanteessa ole lainkaan soluja (Rodak ym. 2012). Punasolut voivat kertoa traumaattisesta punktiosta tai vaihtoehtoisesti patologisesta verenvuodosta, joten punasolujen alkuperä näytteessä tulee aina selvittää (Rodak ym. 2012). Koska likvoria kerätään lävistämällä neulalla useita eri kudoksia, voi näytteessä esiintyä myös erilaisia artefaktoja, kuten rasva- ja sidekudosta. Myös selkärangan ruston sekä luun palaset voivat päätyä näytteeseen neulan kulkeutuessa selkäydinnestetilään. (Torzewski ym. 2008.)

Normaalisti selkäydinneste on väritöntä ja läpinäkyvää. Samea näyte voi johtua suuresta valko- tai punasolujen määrästä näytteessä. Verinen näyte voi johtua traumaattisesta punktiosta (näytteenotto ei ole sujunut ongelmitta) tai keskushermoston verenvuodosta, mikä on patologinen löydös. Verinen näyte tulee aina sentrifugoida ja supernatantin väri analysoida: väritön supernatantti kertoo kyseessä olevan traumaattinen punktio, kun taas kellertävä/pinkki tai hemolysoitu-

nut supernatantti viittaa keskushermoston verenvuotoon. Seuraavassa taulukossa (taulukko 1) esitellään näytteen verisyyden syyn erittelyä. (Rodak ym. 2012.)

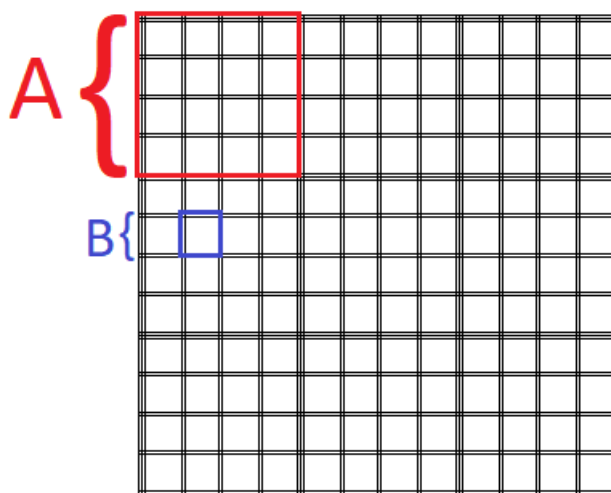
TAULUKKO 1. Selkäydinnesteen verisyyden syyn erottelua. (Rodak ym. 2012, 229)

Traumaattinen punktio	Patologinen verenvuoto
Väritön supernatantti	Värillinen tai hemolysoitunut supernatantti
Selkeytyminen putkien välillä	Sama ulkonäkö kaikissa putkissa
Luuydinkontaminaatio	Erytrofagit
Rustosolut	Siderofagit

3.1 Likvorin solujen kammiolaskenta

Likvorin erytrosyyttejä ja leukosyyttejä lasketaan Bürkerin laskukammiolla (LO Laboroptik Ltd 2013). Bürkerin laskukammiossa on usein kaksi ruudukolla osiin jaettua kammiota, joissa kummassakin on 9 kappaletta 1 mm² kokoista A-ruutua, jotka koostuvat edelleen pienemmistä B-ruuduista (Labnet 2019). Leukosyytit lasketaan viidestä eri A-ruudusta (kuva 2). Solut lasketaan mikroskoopilla 40 x objektiivilla ja kymmenkertaisella okulaarilla.

Kammiolaskentaa käytetään yleisesti eri punktionesteiden solujen laskennassa, sillä punktionesteiden solujen määrä on usein liian pieni koneiden analysoitavaksi. (EPSHP 2020.)



KUVA 2. Bürkerin laskukammio, A- ja B-ruudut.

Likvorin erittelylaskenta suoritetaan silloin, kun näytteessä on leukosyyttejä yli $20 \times 10^6/l$. Solulaskenta tehdään yleensä näytteenottojärjestyksen kolmannesta putkesta, jolloin näytteessä on pienin mahdollisuus selkädinkanavan ulkopuolelta tulleeseen verikontaminaatioon. Normaalisti selkäydinnesteessä on valkosoluja $0 - 5/mm^3$, ja punasoluja $0/mm^3$. (Rodak ym. 2012.) Selkäydinkanavan ulkopuolisen kontaminaation mahdollisuutta voidaan arvioida tarkastelemalla valkosolujen määrän suhdetta punasolujen määrään: 1 valkosolu per 500 – 900 punasolu. Mikäli potilaasta on tiedossa verenkuvaa, saatua lukemaa voidaan verrata siihen. (Rodak ym. 2012.)

4 SOLUJEN SÄILYVYYS

Likvornäytteiden analyyttimääritykset suositellaan tehtävän mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen, sillä solujen ja analyyttien säilyvyysaika on suhteellisen lyhyt (Kupiainen & Viik 2010). EDTA-putkessa oleva kuiva antikoagulantti eli etyleenidiamiinitetraetikkahappo on sumutettuna putken seinille (Pamark 2018). Antikoagulantti sitoo veren hyytymistekijöitä aktivoivia kalsiumioneita ja siten estää hyytymisreaktion käynnistymisen (Havukainen 2010). EDTA -putken pH on hieman hapan. Happamuudella estetään EDTA-suolojen aiheuttamaa solujen osmoottista kutistumista. Antikoagulantti on aina suhteutettava likvorin määrään, sillä suhteessa liiallinen määrä EDTA:ta voi vaikuttaa solujen morfologiaan kutistavasti. (Banfi ym. 2007.)

Lisäaineetonta putkea pidetään kuitenkin likvorin analytiikassa yleisempänä tutkimusputkena, sillä EDTA:n antikoagulantti voi vääristää proteiinien konsentraatiota, ja antaa vääristyneitä tuloksia (Koch ym. 2019). Säilöntäaineiden käytöstä huolimatta näyte kannattaa analysoida mahdollisimman nopeasti. Solut alkavat turvota osmoottisen paineen seurauksena jo ensimmäisten tuntien aikana, ja ne alkavat hajota. (Porkka, et al., 2015)

Likvorin puskuriominaisuudet ovat rajoitetut erityisesti happialtistuksessa, ja sillä on matala proteiinipitoisuus. Nämä tekijät muodostavat siitä epäsuotuisan elinympäristön eläville soluille. Korkea pH sekä matala paine saa solut turpoamaan, kuolemaan tai muuttumaan tunnistamattomiksi. (Torzewski 2008.)

5 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Seinäjoen kliinisen kemian laboratoriossa toteutettiin vertailu, jonka tarkoituksena oli selvittää likvorin erytrosyyttien ja leukosyyttien säilyvyyttä säilöntäaineellisessä ja säilöntäaineettomassa putkessa. Tavoitteena oli saada päivystysvuorossa tuleville likvornäytteille lisää analysointiaikaa. Vertailun oli tarkoitus lopettaa kun 30 näytettä olisi analysoitu. Tarkoituksemme oli vertailla likvorin solujen säilyvyyttä 1 ml mikro-EDTA -putkessa verrattuna nykyisin käytössä olevaan lisääaineettomaan putkeen mikroskopoimalla näyte välittömästi, 2h ja 4h jälkeen näytteenotosta.

Opinnäytetyöllämme on kaksi tutkimuskysymystä.

1. Miten likvorin erytrosyytit säilyvät säilöntäaineellisessä ja säilöntäaineettomassa putkessa?
2. Miten likvorin leukosyytit säilyvät säilöntäaineellisessä ja säilöntäaineettomassa putkessa?

6 TUTKIMUSAINEISTO JA TUTKIMUSMENETELMÄ

Tutkimus suoritettiin Seinäjoen keskussairaalassa. Likvor-näytteen otti lääkäri, jota oli ohjeistettu ottamaan tutkimuksen Li-Solut yhteydessä steriilin näyteputken lisäksi myös 1 ml EDTA putki, mikäli likvoria saadaan riittävästi. Näytteenotossa noudatettiin tavanomaista putkijärjestystä, ja opinnäytetyömme vertailuun kuuluva EDTA-putki kerättiin lopuksi.

Steriiliin putkeen merkittiin normaalisti tutkimustarralla ja EDTA-putki käsinkirjoitetulla tarralla, jossa on Li-Solut -tutkimuksen tutkimusnumero. Molemmat putket toimitettiin normaalisti laboratorioon, jossa steriilistä putkesta annettiin vastaus hoitavaan yksikköön. EDTA-putkea käytettiin ainoastaan vertailuun, eikä siitä annettu potilasvastauksia. Näytteitä pyrittiin keräämään 30 paria, mutta niitä saatiin kerättyä 10. Näissä putkissa olevien solujen määrät laskettiin tietyin väliajoin, ja verrattiin lopuksi solumäärien muutoksia ajan ja putken suhteen.

6.1 Tutkimusaineisto

Näytteitä kerättiin tutkimusta varten 10 kappaletta. Näytteet kerättiin Seinäjoen sairaalassa tavanomaisen selkäydinnesteenäytteen keräämisen yhteydessä. Näytteitä oli aluksi tarkoitus kerätä vähintään 30 paria, mutta näytteiden keruu oli odotettua hitaampaa ja se pysähtyi helmikuussa 2020 täysin Covid-19 -pandemian takia. Vertailuputkien keruu päätettiin lopettaa kesäkuussa 2020.

Näytteet kerättiin lääkärin arvion ja potilaan suullisen suostumuksen mukaan. Lääkäri arvioi tapauskohtaisesti, voiko potilaalta ottaa ylimääräistä likvoria tutkimusta varten.

6.2 Tutkimusmenetelmä

Näytteenottotilanteessa likvoria kerättiin säilöntäaineettomien, steriilien näytteenottoputkien lisäksi 1 ml EDTA-putkeen. Natiivisolut laskettiin kolmannelta näytteenottoputkesta, ja EDTA-putki otettiin lopuksi, mikäli näytettä oli saatavilla tarpeeksi. EDTA-putki merkittiin pelkällä näytenumeroilla. Putket toimitettiin laboratorioon samanaikaisesti.

Laboratoriossa solut laskettiin kolmannelta hyvin sekoitetusta putkesta manuaalisesti mikroskoopin avulla heti, 2h ja 4h päästä. Solujen määrä merkittiin laboratorion tekemään kaavakkeeseen, jossa oli eriteltyinä valkosolujen määrä sekä punasolujen määrä. Sen lisäksi laskettiin EDTA-säilöntäainetta sisältävän vertailuputken solumäärät samaan aikaan ja listattiin saadut solumäärät natiiviputkien tulosten kanssa samaan kaavakkeeseen (kuva 3). Kaavakkeessa on käytetty vain kohtia Li-Eryt sekä Li-Leuk. Näytteistä laskettiin solumäärien erotukset vähentämällä 4. tunnin solumäärä välittömästi lasketusta solumäärästä.

Näytenumero _____

	saapuessa	2 h	4 h
Natiiviputki			
Li-Eryt			
Li-Leuk			
Li-Neut			
Li-Ly+Mono			
Li-Eos			
EDTA			
Li-Eryt			
Li-Leuk			
Li-Neut			
Li-Ly+Mono			
Li-Eos			

KUVA 3. Kammiolaskennassa käytetty kaavake.

Kammiolaskenta suoritetaan erilaisten kammioiden ja mikroskoopin avulla. Seinänojen laboratorioissa käytettiin solujen laskemiseen kertakäyttöistä laskukammiota pipetoimalla 25 µl näytettä laskentakammioon. Solujen laskenta tulee suo-

rittaa nopeasti, etteivät solut pääse kuivumaan kammiassa. Erytrosyyttien ja leukosyyttien määrä laskettiin käsilaskijalla siten, että kummastakin kammiosta laskettiin 5 A-ruutua, eli yhteensä 10 A-ruutua. Solujen määrä on silloin ilmoitettuna $\text{kpl} \times 10^6 / \text{l}$. Veriset näytteet laimennettiin 0.9 % NaCl:lla ja saatu solumäärä kerrottiin laimennoskertoimella. (EPSHP 2020.)

7 TULOKSET

7.1 Erytrosoyttien säilyminen

Erytrosoyttimäärät on listattu taulukkoon 2. Saman näytteen natiiviputki ja EDTA-putki on listattu taulukossa vierekkäin samalle riville. Putkissa tapahtunut solumäärän muutos on laskettu molempien näytteiden osalta sarakkeessa ”muutos” vähentämällä ensimmäisenä lasketusta solumäärästä neljännen tunnin solumäärä. Muutos on ilmoitettu kappalemääränä. Kerätyistä näytteistä neljässä oli erytrosoyttejä. Eniten erytrosoyttejä oli näytteessä 9, jossa niitä oli enimmillään 1374 kappaletta EDTA-putkessa.

TAULUKKO 2. Erytrosoyttien määrät rinnakkaisissa putkissa.

Putket	Natiiviputki				EDTA			
	Heti	2h	4h	Muutos	Heti	2h	4h	Muutos
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	245	245	232	-13	22	19	16	-6
3	0	0	1	+1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	308	294	237	-71	1374	1106	1327	-47
10	41	40	42	+1	1	1	0	-1

Taulukossa 3 olemme listanneet erytrosoyttien määrien muutokset prosenttiosuuksina. Prosenttimuutoksista on suoraan nähtävissä, että kahdessa neljästä soluja sisältävästä näytteestä (putket 2 ja 10) solumäärä vähenee enemmän EDTA-putkessa kuin säilöntäaineettomassa putkessa. Putkessa 9 sen sijaan solumäärä näyttää vähenevän reilusti enemmän säilöntäaineettomassa putkessa EDTA-putkeen verrattuna. Natiiviputkessa 3 ei puolestaan näy solujen vähene mistä, eikä sen EDTA-verrokiputkessa nähty soluja lainkaan.

Kahdessa säilöntäaineettomassa putkessa (putket 3 ja 10) solujen määrä näyttäisi lisääntyvän. Olemme kuitenkin tulkinneet tämän niin, että solujen määrä ei

tällöin ole muuttunut, sillä solut eivät voi lisääntyä putkessa, ja pieni otoskoko aiheuttaa sen, että peräkkäisillä laskukerroilla on mahdollista saada toisistaan poikkeavia tuloksia.

TAULUKKO 3. Erytrosyyttien määrien muutos prosenttiosuuksina.

Putket	Natiiviputki			EDTA		
	Heti	4h	Muutos, %	Heti	4h	Muutos, %
1	0	0	0%	0	0	0%
2	245	232	-5%	22	16	-27%
3	0	1	+100%	0	0	0%
4	0	0	0%	0	0	0%
5	0	0	0%	0	0	0%
6	0	0	0%	0	0	0%
7	0	0	0%	0	0	0%
8	0	0	0%	0	0	0%
9	308	237	-23%	1374	1327	-3%
10	41	42	+2%	1	0	-100%

7.2 Leukosyyttien säilyminen

Taulukossa 4 listaamme leukosyyttien absoluuttiset solumäärät samaan tapaan kuin erytrosyytit. Leukosyyttejä näytteistä löytyi erytrosyyttejä useammin: jokaisessa näytteessä oli vähintään yksi leukosyytti. Eniten leukosyyttejä oli näytteessä 2, jossa niitä oli enimmillään 15. Vähiten leukosyyttejä oli näytteessä 6, jossa niitä oli enimmillään 1.

TAULUKKO 4. Leukosyyttien määrät rinnakkaisissa putkissa.

Putket	Natiiviputki				EDTA			
	Heti	2h	4h	Erotus	Heti	2h	4h	Erotus
1	1	1	2	+1	2	0	0	-2
2	10	15	4	-6	5	6	12	+7
3	3	0	4	+1	3	1	3	0
4	1	2	0	-1	1	1	1	0
5	3	1	1	-2	1	2	0	-1
6	0	1	1	+1	1	1	1	0
7	1	1	1	0	2	1	1	-1
8	3	2	2	-1	3	2	4	+1
9	2	1	0	-2	2	3	0	-2
10	2	0	4	+2	2	0	3	+1

Tarkastellessamme taulukkoa 5 leukosyyttimäärien suhteellisista muutoksista näyttää siltä, että kolmessa näytteessä (putket 2, 4, 8) solumäärä vähenee EDTA-putkessa vähemmän kuin säilöntäaineettomassa putkessa. Vastaavasti kolmessa putkessa (putket 1, 5 ja 7) solumäärä näyttäisi pienenevän EDTA-putkessa enemmän kuin natiiviputkessa. Putkissa 3 ja 6 natiivinäytteen solumäärä näyttää kasvavan, kun taas EDTA-putken solumäärä ei muutu. Putkessa 9 molempien putkien solumäärä vähenee yhtä paljon. Putkessa 10 natiivinäytteen solumäärä nousee EDTA-putkea enemmän, mutta tulkitsimme tämän erytrosyyttien tavoin niin, ettei solumäärä ole muuttunut kummassakaan. Tuloksista ei voida vetää varmoja johtopäätöksiä.

TAULUKKO 5. Leukosyyttien määrien muutokset prosenttiosuuksina.

Putket	Natiiviputki			EDTA		
	Heti	4h	Muutos, %	Heti	4h	Muutos, %
1	1	2	+100%	2	0	-100%
2	10	4	-60%	5	12	+140%
3	3	4	+33%	3	3	0%
4	1	0	-100%	1	1	0%
5	3	1	-66%	1	0	-100%
6	0	1	+100%	1	1	0%
7	1	1	0%	2	1	-50%
8	3	2	-33%	3	4	+33%
9	2	0	-100%	2	0	-100%
10	2	4	+100%	2	3	+50%

8 POHDINTA

8.1 Tulosten tarkastelu

Näyteaineisto jäi vähäiseksi, mikä johti siihen, että soluja näytteistä löytyi harvoin. Leukosyyttejä näytteistä löytyi erytrosyyttejä paremmin. Aineiston koon takia emme kuitenkaan voi vetää tutkimuksesta varsinaisia johtopäätöksiä.

Aloimme tutkimuksen aikana ja tuloksia lukiessa pohtimaan useita asioita EDTA-putken tarpeellisuudesta likvornäytteenotossa. Kochin (Koch ym. 2019) vastavassa tutkimuksessa koirien likvorin soluilla EDTA ei lisää solujen säilyvyyttä ja vääristää proteiinituloksia, ja aloimme pohtia, sekoittaisiko putken valinta näytteenottotilannetta tarpeettomasti. Lisäksi mietimme, onko tarpeellista lisätä näytteenoton välineistöön uudenlainen putki, mikäli likvor on joka tapauksessa kiireellinen näyte. Näytemäärän ollessa vähäinen olisi myös varmasti helpompi ottaa näyte samanlaisiin putkiin, jotta saadaan ajettua useampia analyyseja mikäli EDTA vääristää likvorin proteiinipitoisuuksia. Säilöntäaineellisen putken käyttö ei siis lähtökohtaisesti vaikuta tuovan lisäarvoa tutkimuksen analysointivaiheeseen, mutta laajempi jatkotutkimus lienee tarpeellista.

8.2 Tulosten luotettavuus

Tulosten luotettavuutta heikentää otoksen koko että otoksessa käytettyjen näytteiden vähäinen solumäärä. Näytteet käsiteltiin kuitenkin selkeiden ohjeiden mukaisesti ammattihenkilökunnan toimesta, joten luotamme analyysiprosessin onnistuneen. Tuloksissa näkyy joidenkin näytteiden kohdalla solumäärien näennäistä kasvua. Pistoartefakat pyrittiin kuitenkin minimoimaan putkijärjestyksen avulla. Näytteissä ei näy putkesta johtuvia, merkittäviä säännöllisyyksiä solumäärien vähentymisestä tai säilymisestä, vaan tulokset ovat kokonaisuudessaan suhteellisen samankaltaisia keskenään putkesta riippumatta.

Tutkimuksen luotettavuutta lisää erityisesti se, että solulaskennan suorittivat koulutetut laboratoriohoitajat, ja että he ovat tottuneet laskemaan solumääriä päivittäisessä työssään Bürkerin kammiolla.

8.3 Eettiset asiat

Näyteaineisto kerättiin niin, ettei tulosta voi yhdistää potilaaseen, ja se julkaistaan identifioimalla putket juoksevalla numerolla. Tutkimuksen aikana emme olleet suorassa potilaskontaktissa, vaan saimme tietää näytteistä vain solumäärät, näytenumeron sekä analysointipäivämäärän. Näytteet kerättiin niiltä potilailta, joilta tarvitsi muutenkin ottaa selkäydinnestenäyte, eikä tutkimusaineistoa kerätty erikseen potilailta, joilta ei selkäydinnestenäytteitä tarvittu. Näytteenoton suorittava lääkäri katsoi näytteenottotilanteessa tapauskohtaisesti, pystyykö potilaalta keräämään ylimääräistä likvoria. Potilaalle kerrottiin lisänäytteenoton tarkoitus, merkitys sekä ylimääräisestä putkesta tehtävistä tutkimuksista.

Tutkimus pohjasi lakiin ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä, jossa määritetään elinten, kudosten ja solujen talteen otto ja varastointi lääketieteellistä käyttöä varten. Lain mukaan soluja, jotka ovat kerätty potilaasta hoidon tai taudinmäärityksen yhteydessä, voidaan kerätä ja varastoida lääketieteellistä käyttöä varten. (Finlex 547/2007.)

8.4 Johtopäätökset ja jatkotutkimukset

Aiheesta tehtyjen aiempien opinnäytetöiden huomioiden perusteella varasimme aiheen tutkimiseen enemmän aikaa kuin aiemmin oli varattu. Kävi kuitenkin ilmi, että tämän aiheen tutkimiseen ja aineistonkeräämiseen tarvitsee jatkossa varata vieläkin enemmän aikaa.

Tutkimuskysymys sen sijaan on mielenkiintoinen ja solujen säilyvyyden parantamisesta olisi hyötyä, mikäli näytteitä jouduttaisiin oikeasti seisottamaan pitempiä-

kin aikoja ennen analysointia, mutta aiempi tutkimus antaa ymmärtää, ettei putken vaihdosta ole merkittävää etua. Joissain tapauksissa alueelta tulevien näytteiden analysoinnissa solujen parempi säilyminen tietysti olisi merkittävä etu, mutta toisaalta likvorin solut voidaan nykyiselläänkin laskea paikan päällä.

Aiemmin samaa tutkimusongelmaa on lähestynyt TAMK:ssa Katajamäen ja Pellisen tekemä opinnäytetyö Likvorin solujen säilyvyys. Heidän opinnäytetyönsä tuotti samansuuntaisia tuloksia omamme kanssa: säilöntäaineen lisääminen ei vaikuttanut solujen säilymiseen suuntaan taikka toiseen. (Katajamäki & Pellinen 2015.) Lisäksi erään laajemman kansainvälisen tutkimuksen mukaan EDTA-säilöntäaine ei vaikuta koirien likvorin solujen säilymiseen merkittävästi (Koch ym. 2019).

Aineiston koon vuoksi tutkimuksesta ei voida tehdä varsinaisia johtopäätöksiä. Tutkimus on tällaisenaan ehkä liian laaja opinnäytetyönä tehtäväksi, ja se saattaisi soveltua paremmin ylemmän tutkinnon tutkielman aiheeksi, jolloin tutkimukseen olisi saatavilla enemmän resursseja. Aihe on joka tapauksessa mielenkiintoinen minkä takia mekin siihen alun perin tartuimme, ja se ansainnee lisää tutkimusta.

LÄHTEET

Abbott, N. & Yusof, S. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. Brussels, King's College London.

Atula, S., Pesonen, A. & Färkkilä, M. 2019. Aivo-selkäydinnesteenäytteen ottaminen ja siihen liittyvät komplikaatiot. Aikakauskirja Duodecim (135), 772–780.

Banfi, G., Luca Salvagno, G. & Lippi, G. 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 45(5), 565–76.

EPSHP. 2020. Työohje laboratorioon: likvorin solujen säilyvyys.

Finlex. 2001. Laki ihmisen elimien, kudoksien ja solujen lääketieteellisestä käytöstä 11.5.2007/547. Luettu 10.07.2020. <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2001/20010101>

Fischbach, F. & Dunning, M. 2009. A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. 8. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Havukainen, A. 2010. Sitraatin ja etyleenidiamiinitetraetikkahapon (EDTA) yhteisvaikutus laskotulokseen sekä laskonäytteen säilyvyyden tutkiminen. Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma. Pohjois-Karjalan Ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Healthline. 2018. How CSF samples are taken. Luettu 10.07.2020. <https://www.healthline.com/health/csf-analysis#lumbar-puncture>

Hoffbrand, A. & Moss, P. 2011. Essential Haematology. Wiley-Blackwell.

Hühmer, A. ym. 2006. Protein Analysis in Human Cerebrospinal Fluid: Physiological Aspects, Current Progress and Future Challenges. Disease Markers 22(1-2) 3–26.

Koch, B. ym. 2019. Collection of cerebrospinal fluid into EDTA versus plain tubes does not affect the standard analysis in dogs. Kööpenhamina: Acta Veterinaria Scandinavica.

Kupiainen, S. & Viik, T. 2010. Punktionesteiden kemiallisten analyyttien säilyvyys. Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma. Tampereen ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Labnet. 2019. Counting Chamber, Improved Neubauer. Luettu 15.05.2020. <https://www.labnet.fi/fi/tuote/v100808/100808/counting-chamber-improved-neubauer/537435/1>

Leppäluoto, J. ym. 2013. Anatomia ja fysiologia rakenteesta toimintaan. 3. -4. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

LO Laboroptik Ltd. 2013. Information About Counting Chamber. Luettu 15.05.2019. <http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info.html>

Lohela, T., Kiviniemi, V. & Lilius, T. 2020. Glymfaattinen järjestelmä avaa aivojen padot. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim, Volume 2020.

Mustajoki, P. 2020. Aivokalvon alainen verenvuoto (SAV). Lääkärikirja Duodecim.

Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A. & Björkqvist, S.-E. 2009. Ihmisen fysiologia ja anatomia. SanomaPro Oy.

Pamark, 2018. Vacuette EDTA-putket. Luettu 05.08.2019. <https://www.pamark.fi/terveydenhuolto/laboratorio/verinaytteenotto/vacuette-edta-putket>

Pirttilä, T. & Oksi, J. 2001. Tarvitaanko selkäydinnestetutkimuksia 2000-luvulla? Lääkärilehti 6/4 1621–1627.

Porkka, K., Lassila, R., Remes, K. & Savolainen, E.-R. 2015. Veritaudit. Helsinki: Duodecim.

Rodak, B., Fritsma, G. & Keohane, E. 2012. Hematology: Clinical Principles and Applications. 4. painos. Missouri: Elsevier Saunders.

Sand, O., Sjaastad, Ø., Haug, E. & Bjåle, J. 2007. Ihminen, Fysiologia ja anatomia. Helsinki: WSOYpro.

Soinila, S. 2015. Neurologia. Helsinki: Duodecim.

Strasinger, S. & Di Lorenzo, M. 2014. Urinalysis and body fluids. 6. painos. F.A. Davis Company.

Terveyskylä. 2019. Aivokudoksen ulkopuoliset aivoverenvuodot. Luettu 10.04.2020. <https://www.terveyskyla.fi/aivotalo/sairaudet/aiovammat/vakavat-aiovammat/aivokudoksen-ulkopuoliset-aivoverenvuodot>

Torzewski, M., Lackner, K., Bohl, J. & Sommer, C. 2008. Integrated Cytology of Cerebrospinal Fluid. 1. painos. Berlin: Heidelberg.