

# **KUIVAVEREN VALKOISUUS JA KLIINISET VERIMUUTTUJAT**

Aarni Kimmo

Liikuntafysiologian pro gradu -tutkielma

Syksy 2014

Liikuntabiologian laitos

Jyväskylän yliopisto

## TIIVISTELMÄ

Aarni Kimmo (2014). Kuivaveren valkoisuus ja kliiniset verimuuttujat. Liikuntabiologian laitos, Jyväskylän yliopisto, liikuntafysiologian pro gradu -tutkielma, 79 s., 3 liitettä.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kuivaverianalyysin yhteyksiä kliinisiin verimuuttujiin, erityisesti laskoon. Lisäksi menetelmän luotettavuutta arvioitiin vertailemalla samalta koehenkilöltä kerättyjä A- ja B-näytteitä. Kuivaverianalyysissä sormenpääverinäytteestä kerätään näytelasille useita veripisaroita, joiden annetaan kuivua. Pisaroiden kuivuessa niihin muodostuu digitoiduissa näytteissä valkoisina erottuvia alueita. Droppi Veripalvelun Oy:n vuonna 2012 kehittämät algoritmit laskevat valkoisten alueiden prosentuaalisen osuuden näytteissä. Goldbergerin (1939) tutkimuksen perusteella laskon ja kuivaveren valkoisuuden välillä on yhteys. Kirjallisuuden perusteella on oletettavissa, että fibrinogeenillä, albumiinilla ja immunoglobuliineilla on yhteys laskoon, joten myös näitä muuttujia valittiin tarkasteluun.

Tutkimusjoukko koostui 50 vapaaehtoisesta (24 miestä ja 26 naista), joiden ikä vaihteli 22–99 vuoden välillä. Koehenkilöiltä kerättiin yhden tutkimuskäynnin aikana laskimoverinäyte neljään koeputkeen ja sormenpääverinäyte. Sormenpääverinäyte kerättiin näytelasille ja sen annettiin kuivua, minkä jälkeen näyte digitoitiin ja se ladattiin Dropperkuivaveripalvelun pilvipalvelimelle anonyyminä valkoisuusprosentin määrittämistä varten. Laskimoverinäytteistä määritettiin kliiniset verimuuttujat.

Tutkimuksessa kerättyjen A- ja B-näytteiden välinen tyypillinen virhe valkoisuusprosentissa oli 2,21 mittayksikköä. Näytesarjojen välinen korrelaatio oli 0,729 merkitsevyystasolla  $p \leq 0,001$ . Kuivaveren valkoisuuden ja laskon välinen korrelaatio oli 0,470 merkitsevyystasolla  $p \leq 0,001$ . Valkoisuuden ja laskon yhteyttä kuvaavan polynomisen mallin selitysasteeksi tuli 83,3 %. Yhteyden kuvaamiseksi sovitettiin myös kaksivaiheinen lineaarinen malli. Kuivaveren valkoisuuden havaittiin korreloivan fibrinogeenin (*P-FIBR*), neutrofiilien määrän (*NEUT#*), valkosolujen määrän, immunoglobuliini A:n (*S-IgA*) ja hemoglobiinin (*HGB*) sekä punasolujen kokojakauman (*RDW\_CV*) ja herkän CRP:n kanssa. Tulosten pohjalta rakennettiin valkoisuuden määrää kuvaava malli:  $KV\% = 0,285*NEUT\# + 0,179*P-FIBR + 0,163*RDW\_CV + 0,096*S-IgA - 0,103*HGB$ , jonka selitysasteeksi tuli 54,3 %.

Tutkimustulokset vahvistavat Goldbergerin (1939) saamat tulokset siitä, että kuivaveren valkoisuuden määrän ja laskon välillä on yhteys. Lisäksi tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että kuivaveren valkoisuusprosentti on tulehdusmarkkeri. Menetelmän toistettavuus vaikuttaa riittävältä, jotta sitä voidaan käyttää valkoisuusprosentin vaihtelun mittaamiseen.

Avainsanat: kuivaverianalyysi, lasko, veri, fibrinogeeni, albumiini, immunoglobuliini

## ABSTRACT

Aarni Kimmo (2014). Dry Blood Analysis and Clinical Blood Variables. Department of Biology of Physical Activity, University of Jyväskylä, Master's thesis in Exercise Physiology, 79 pp.. 3 appendices.

The purpose of the study was to determine if there are associations between dry blood analysis and clinical blood variables, in particular, the erythrocyte sedimentation rate. Reliability of the method was assessed by comparing A- and B-samples collected from the same subject. In the dry blood analysis multiple blood drops are collected on a glass slide and they are allowed to dry. As the dried blood samples are digitized, some areas in the samples appear white in colour. Algorithms developed by Droppi Veripalvelu Oy in 2012 calculate the percentage of white areas in the samples. According to a study made by Goldberger (1939), there is an association between the erythrocyte sedimentation rate and the white areas in the dry blood samples. Based on literature, fibrinogen, albumin and immunoglobulins may be associated with the erythrocyte sedimentation rate, thus they were also examined.

The study group consisted of 50 volunteers (24 men and 26 women), aged between 22 and 99. During one laboratory visit, venous blood samples were collected into four vials for analysis of clinical blood variables. A dry blood test was taken from a finger prick collection and was allowed to dry. Once dry, the sample was digitized and downloaded on the Dropper-kuivaveripalvelu cloud server for the determination of the percentage of white areas. Typical error between the A- and B-samples collected in the study was 2.21 measurement units. The correlation between A- and B-samples was 0.729 at a significance level of  $p \leq 0.001$ . The correlation between the percentage of white areas and the erythrocyte sedimentation rate was 0.470 at a significance level of  $p \leq 0.001$ . The coefficient of determination for a polynomial model of the percentage of white areas and erythrocyte sedimentation rate was 83.3 %. A bi-phase model was also utilized to describe the connection between white areas and erythrocyte sedimentation rate. The percentage of white areas in the dry blood samples correlates with the amount of fibrinogen (*P-FIBR*), number of neutrophils (*NEUT#*), number of white blood cells, immunoglobulin A (*S-IgA*) and haemoglobin (*HGB*) as well as red blood cell distribution width (*RDW\_CV*) and high sensitivity CRP. A model to describe the whiteness of dry blood samples was created:  $KV\% = 0.285*NEUT\# + 0.179*P-FIBR + 0.163*RDW\_CV + 0.096*S-IgA - 0.103*HGB$ . The coefficient of determination for the model was 54.3 %.

The results confirm Goldberger's (1939) original discovery that there is a connection between the amount of white areas in dry blood samples and the erythrocyte sedimentation rate. The results also point out that the percentage of white areas in dry blood samples is likely to be an inflammation marker. The method used seems to be reliable enough to be used to determine changes in the whiteness of dry blood samples.

Key words: dry blood analysis, erythrocyte sedimentation rate, fibrinogen, albumin, immunoglobulin

## KÄYTETYT LYHENTEET

BMI	body mass index, kehon massaindeksi
HCT	verinäytteen hematokriitti, punasolujen prosentuaalinen tilavuusosuus
HGB	hemoglobiinin määrä verinäytteessä
LNNEUT%	neutrofiilien suhteellinen osuus valkosoluista verinäytteessä, logaritmi muunnos
LNNEUT#	neutrofiilien määrä verinäytteessä, logaritmimuunnos
LNlasko	Manleyn taulukon mukaan muunnettu lasko, logaritmimuunnos
LNhsCRP	high-sensitivity C-reactive protein, C-reaktiivisen proteiinin määrä verinäytteessä, logaritmimuunnos
LNRDW_CV	punasolujen kokojakauma, logaritmimuunnos
LNS-IgM	immunoglobuliini M:n määrä seerumissa, logaritmimuunnos
LYMFOS%	lymfosyyttien suhteellinen osuus valkosoluista verinäytteessä
LYMFOS#	lymfosyyttien määrä verinäytteessä
MCH	punasolujen keskimääräinen hemoglobiinin määrä
MCV	verinäytteen punasolujen keskimääräinen koko
MXD%	välisolujen suhteellinen osuus valkosoluista verinäytteessä
MXD#	välisolujen määrä verinäytteessä
P-FIBR	fibrinogeenin määrä plasmassa
PLT	verihiutaleiden määrä verinäytteessä
RBC	punasolujen määrä verinäytteessä
RDW_SD	punasolujen kokojakauma verinäytteessä (keskihajontaan perustuva)
S-ALB	albumiinin määrä seerumissa
S-IgA	immunoglobuliini A:n määrä seerumissa
S-IgG	immunoglobuliini G:n määrä seerumissa
WBC	valkosolujen määrä verinäytteessä

# SISÄLTÖ

## TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO .....	4
2 VERI .....	5
2.1 Tehtävät ja koostumus.....	5
2.2 Verisolut.....	7
2.2.1 Punasolut.....	8
2.2.2 Valkosolut .....	9
2.2.3 Verihiutaleet .....	11
2.3 Plasman proteiinit .....	12
2.3.1 Fibrinogeeni .....	12
2.3.2 Albumiini .....	13
2.3.3 Globuliinit ja immunoglobuliinit .....	14
2.4 Veren hyytyminen.....	16
2.5 Veri ja immuunijärjestelmä.....	18
3 VERI TERVEYDEN MITTARINA.....	23
3.1 Lasko.....	23
3.2 Perusverenkuva .....	29
3.3 CRP.....	32
4 KUIVAVERIMENETELMÄ .....	34
4.1 Yleistä .....	34

4.2	Historia.....	37
4.3	Dropper-kuivaverimenetelmä .....	41
4.4	Muut veripisaran kuivumiseen liittyvät menetelmät.....	43
4.5	Pisaran kuivumisen fysiikkaa.....	47
5	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT .....	53
6	TUTKIMUSMENETELMÄT.....	54
6.1	Koehenkilöt.....	54
6.2	Tutkimusasetelma, aineiston kerääminen ja analysointi.....	55
6.3	Tilastollinen analyysi .....	57
7	TULOKSET .....	59
7.1	Dropper-kuivaverimenetelmän toistettavuus .....	59
7.2	Kuivaveren valkoisuusprosentin ja laskon välinen riippuvuus.....	60
7.3	Kuivaveren valkoisuuden määrää selittävät muuttujat .....	62
8	POHDINTA .....	66
	LÄHTEET.....	74
	LIITTEET	

# 1 JOHDANTO

Veren analysoiminen on kliinisen laboratoriotutkimuksen ydinaluetta (Mustajoki & Kaukua 2008, 16). Tämä johtuu siitä, että veri on elimistön pääkuljetusjärjestelmä ja siten kosketuksissa kaikkien elinten kanssa (Seeley ym. 1998, 577). Veressä kulkee erittäin suuri määrä erilaisia aineita, joiden pitoisuuksia tarkkailemalla saadaan tietoa elimistön tilasta. Veren tutkimus perustuu yleensä nestemäisen veren analysointiin. Tämä tutkimus keskittyy kuivaverianalyysiin, joka perustuu kuivatettujen verinäytteiden tarkasteluun.

Kuivaverianalyysin kehitti vuonna 1939 Emanuel Goldberger. Goldbergerin tavoitteena oli luoda nopea tapa määrittää lasko, edelleen käytössä oleva tulehdusmarkkeri. Laskon määrittäminen nyky menetelmillä vie noin puolitoista tuntia, mutta kuivaverianalyysi voidaan tehdä kymmenessä minuutissa. Goldberger havaitsi yhteyden kuivaveren valkoisuuden ja korkean laskon välillä. Laskon ollessa hyvin matala, verinäytteet kuivuivat lähes kokonaan punaisiksi. (Goldberger 1939.) Leonard Bolen (1942, 1952) tutki Goldbergerin menetelmää syövän tunnistuksessa ja sai positiivisia tuloksia. Tämän jälkeen Goldbergerin menetelmää on tutkittu runsaasti ja sen on havaittu olevan pätevä menetelmä laajoihin tulehdistiloihin liittyvien sairauksien havaitsemisessa (Nickel ym. 1951; Avitable ym. 1968; Norman & Slicher 1950; Pinskaya & Sergeeva 1973; Sergel ym. 1976). Vuonna 2012 Droppi Veripalvelu kehitti kuivaverinäytteiden digitoimiseen ja algoritmien hyödyntämiseen perustuvan kuivaverianalyysimenetelmän (Huttunen 2013).

Droppi Veripalvelun kehittämällä menetelmällä voidaan määrittää kuivaverinäytteen punaisuuden aste prosenttilukuna (Huttunen 2013). Algoritmien määrittämästä punaisuusprosentista voidaan laskea valkoisten alueiden prosentuaalinen osuus, mikä mahdollistaa menetelmän numeerisen vertailun kliinisten verimuuttujien kanssa. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, onko kuivaverinäytteiden valkoisuuden määrällä yhteys laskoon. Tavoitteena oli myös tutkia kliinisten verimuuttujien yhteyksiä valkoisuuden määrään.

## 2 VERI

Veri koostuu verisoluista ja solujen nestemäisestä väliaineesta, plasmasta. Plasma sisältää veriproteiineja ja suuren määrän erilaisia liuenneita aineita. Tässä luvussa esitellään veren pääkomponentit, sekä niiden tehtävät. Erityistä huomiota kiinnitetään veren hyytymiseen ja veren toimintaan osana immuunipuolustusta.

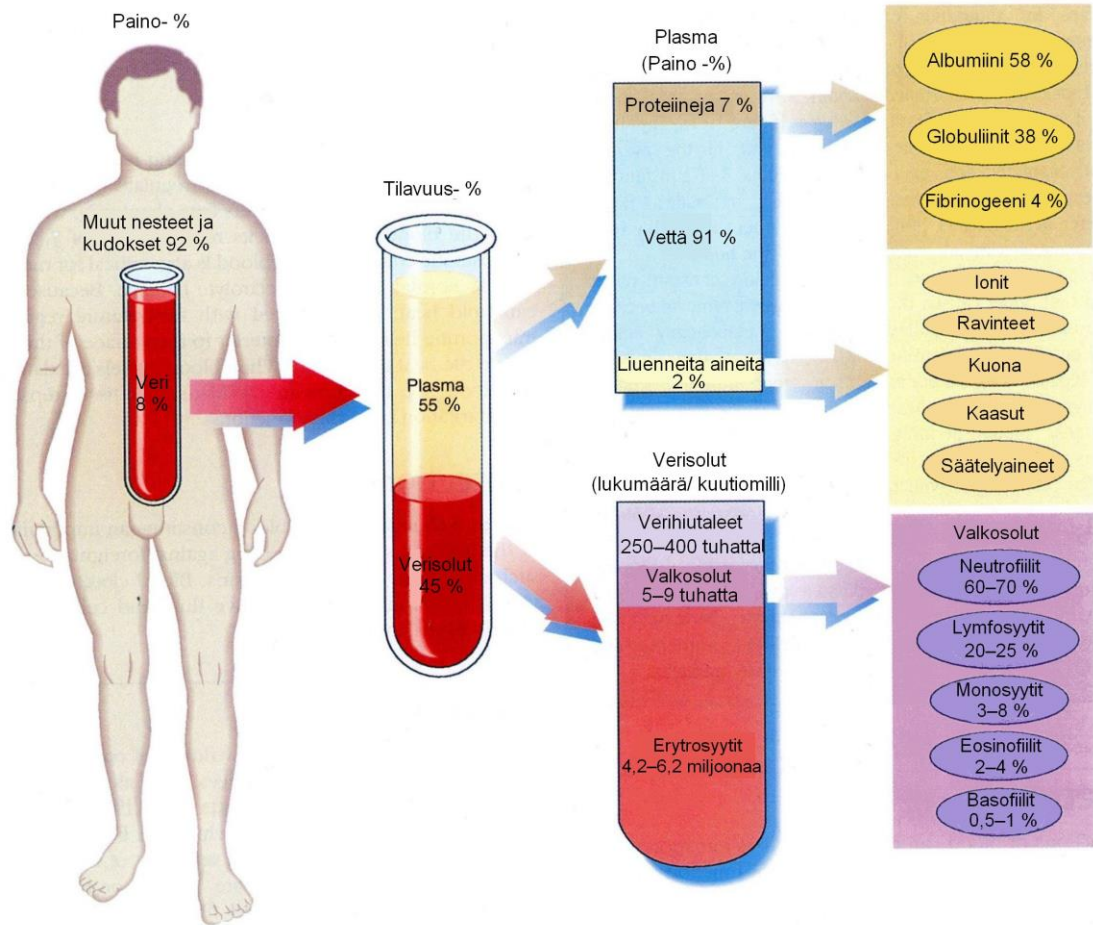
### 2.1 Tehtävät ja koostumus

Veri on elimistön pääkuljetusjärjestelmä (Seeley ym. 1998, 577). Veri kuljettaa soluille happea ja ravinteita, sekä poistaa solujen erittämiä kuona-aineita kuten hiilidioksidia ja muita palamistuotteita (Mustajoki & Kaukua 2008, 16; Seeley ym. 1998, 577; Penttilä 2003, 263). Ravinteet pääsevät siirtymään mikroskooppisen pienistä hiussuonista soluvälinesteseen, josta solut ottavat ravinteita käyttöönsä solukalvon läpi, samoin solut erittävät kuona-aineensa soluvälinesteseen. Ravintoaineita ovat sokerit, rasvat, vitamiinit, hivenaineet, mineraalit ja valkuaisaineet. (Mustajoki & Kaukua 2008, 16.) Veri kuljettaa myös muista elimistä, esimerkiksi maksasta, munuaisista, ruuansulatusjärjestelmästä, immuunijärjestelmästä ja sisäeritysrauhasista peräisin olevia kiinteitä ja liuenneita aineita sekä hormoneita ja entsyymeitä (Seeley ym. 1998, 577).

Kuljetustehtävän ohella veri huolehtii osaltaan kehon tasapainotilan ylläpidosta, tähän kuuluu pH:n tasapainottaminen, lämmönsäätely ja immuunipuolustus. Tasapainotilaan vaikuttavat olennaisesti veren kuljettamat hormonit ja entsyymit. Veri sisältää puskuriaineita, jotka pitävät veren pH:n 7,35–7,45 sisällä. Veri kuljettaa myös lämpöenergiaa ja huolehtii siten osaltaan elimistön lämmönsäätelystä. (Seeley ym. 1998, 577.) Veressä kulkevat valkosolut sekä erilaiset kemikaalit huolehtivat elimistön immuunipuolustuksesta. Hyytymisreaktio puolestaan suojaa kehoa nesteen- ja solujen menetykseltä. (Seeley ym. 1998, 577.)



Veri muodostuu verisoluista, joita ympäröi nestemäinen soluväliaine, plasma. Aikuisilla verta on keskimäärin 70 ml painokiloa kohti. Tästä määrästä on verisoluja noin 40 % ja plasmaa noin 60 %. Verisoluja ovat punasolut, valkosolut ja verihiutaleet. (Penttilä 2003, 263.) Aikuisilla verisolut syntyvät luuytimessä monikykyisistä hematopoieettisista kantasoluista. Hematopoieettiset kantasolut ovat verisolujen esiasteita, joista verisolut kehittyvät. (Penttilä 2003, 264.) Plasma on kellertävää nestettä, jonka tilavuudesta noin 91 % on vettä ja 9 % muita aineita (Seeley ym. 1998, 577; Penttilä 2003, 263.). Plasma sisältää muun muassa proteiineja, ioneita, solujen tuottamia jätteitä ja kaasuja. Suurin osa plasman sisältämistä aineista on proteiineja, joihin kuuluvat albumiini, fibrinogeeni ja globuliinit. (Silverthorn 2007, 536; Seeley ym. 1998, 577; Penttilä 2003, 263.) Myöhemmin käsiteltävät immunoglobuliinit eli vasta-aineet ovat yksi globuliinien alaluokka (Penttilä 2003, 398). Plasma on kolloidiliuos, mikä tarkoittaa, että sen sisältämät kiinteät partikkelit ovat hyvin hienojakoisia, eivätkä vajoa alaspäin liuoksen seisoessa. (Seeley ym. 1998, 577.) Veren koostumus on esitetty kuvassa 1.



KUVA 1. Veren koostumus (suomennettu, Seeley ym. 1998, 578).

## 2.2 Verisolut

Veren soluja ovat punasolut, valkosolut ja verihiutaaleet. Näistä täysin toimintakykyisiä soluja ovat ainoastaan valkosolut, sillä sekä punasoluilta että verihiutaleilta puuttuu tuma. Punasolujen päätehtävä on hapen kuljettaminen. Verihiutaaleet osallistuvat veren hyytymiseen. Immuunijärjestelmä puolestaan perustuu pääosin valkosolujen toimintaan. Kaikki verisolut muodostuvat luuytimen kantasoluista. (Silverthorn 2007, 538.)

### 2.2.1 Punasolut

Punasolujen päätehtävä on kuljettaa happea keuhkoista solujen käyttöön (Penttilä 2003, 266). Veressä kulkevasta hapesta noin 98,5 % on sitoutuneena punasolujen hemoglobiiniin, 1,5 % hapesta kulkee liuenneena plasmaan. Hemoglobiini on punasolujen proteiini, joka antaa verelle sen punaisen värin (Seeley ym. 1998, 580.)

Hemoglobiini koostuu neljästä proteiiniketjusta ja neljästä hemi-ryhmästä. Hemi-ryhmät sisältävät kukin yhden rauta-atomin. (Silverthorn 2007, 543; Seeley ym. 1998, 758.) Jokainen hemi-ryhmä voi sitoa yhden happimolekyylin. Veren pH:n laskiessa hemoglobiinin kyky sitoa happea vähenee, ja veren happipitoisuus laskee (Silverthorn 2007, 595; Seeley ym. 1998, 758.). Punasolut auttavat myös hiilidioksidin kuljettamisessa soluista keuhkoihin poistettavaksi (Silverthorn 2007, 599; Seeley ym. 1998, 582). Noin 70 % hiilidioksidista kulkee veressä bikarbonaatti-ioneina, 23 % veriproteiineihin sitoutuneena ja 7 % liuenneena plasmaan (Guyton & Hall 2006, 419).

Valtaosa proteiineihin sitoutuneesta hiilidioksidista on sitoutuneena punasoluihin. Lisäksi punasolujen karboanhydraasiensyymi katalysoi reaktion hiilidioksidin ja punasolujen sisältämän veden kanssa. Reaktion lopputuotteena syntyy hiilihappoa, joka hajoaa bikarbonaatti- ja vetyioneiksi. Veren hiilidioksidikonsentraation kasvaessa myös vetyionikonsentraatio kasvaa, jolloin veren pH putoaa. (Seeley ym. 1998, 760–762.) Siten sekä hengityselimistöllä että punasoluilla on tärkeä tehtävä veren pH:n säätelyssä (Guyton & Hall 2006, 419; Penttilä 2003, 266; Seeley ym. 1998, 762).

Punasolut ovat muodoltaan kaksoiskoveria, mikä lisää niiden pinta-alaa (Seeley ym. 1998, 580) ja auttaa niitä mukautumaan osmoottisen paineen muutoksiin (Silverthorn 2007, 542). Punasolut joutuvat muuttamaan muotoaan kulkiessaan ohuiden hiusverisuonien läpi. Niiden solukalvo onkin normaalia väljempi, mikä mahdollistaa suuret muodonmuutokset solun säilyessä ehjänä (Guyton & Hall 2006, 419). Punasolujen muodostus alkaa luuytimen monikykyisistä hematopoieettisista soluista, joista kehittyy proerythroblasteja, punasolujen esi-

muotoja. Punasolujen muodostusta säätelee ensisijaisesti munuaisten erittämä erythropoietiini, jota munuaiset erittävät veren happipitoisuuden laskiessa. (Guyton & Hall 2006, 421–422.) Proerythroblastista kehittyy kypsä punasolu noin seitsemässä vuorokaudessa. Punasolujen keskimääräinen elinikä on noin 120 vuorokautta. Ensisijaisesti perna tuhoaa vanhat punasolut. Elimistö ottaa raudan talteen ja pilkkoo proteiinin aminohapoiksi. Hemi hajoaa bilirubiiniksi ja poistuu sappinesteen mukana. (Penttilä 2003, 266.)

### **2.2.2 Valkosolut**

Valkosolut ovat vaaleita tai läpinäkyviä tumallisia verisoluja. Valkosolut suojaavat kehoa infektioilta sekä poistavat jätteitä ja kuolleita soluja. Ne voivat siirtyä verenkierrosta soluvälinesteseen (Silverthorn 2007, 782; Seeley ym. 1998, 587). Valkosolut kerääntyvät tulehdusalueille puhdistamaan kudosta ja tappamaan bakteereita. Valkosoluja ovat neutrofiilit, eosinofiilit, basofiilit ja samankaltaiset syöttösolut, lymfosyytit sekä monosyytit ja niistä kehittyneet makrofagit. Näistä neutrofiilit, monosyytit, makrofagit ja eosinofiilit ovat fago-sytoivia valkosoluja (Silverthorn 2007, 782), mikä tarkoittaa että ne pystyvät siirtämään puhdistettavia aineita ja taudinaiheuttajia solukalvonsa sisään ja sulattamaan ne (Seeley ym. 1998, 587). Kaikki valkosolut syntyvät luuytimessä (Penttilä 2003, 266–267). Valkosolujen suhteelliset määrät veressä on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Valkosolutyypien suhteelliset määrät veressä (Guyton & Hall 2006, 430). Huom. jotkin arvot eroavat Seeley ym. (1998) kuvassa 1 esittämistä arvoista. Tämä on luonnollista, koska valkosolujen suhteelliset osuudet veressä vaihtelevat melko paljon. Esimerkiksi laboratoriotulosten tulkinnassa käytetyt valkosolujen viitearvot vaihtelevat alueittain.

Valkosolutyyppi	Suhteellinen määrä veressä
neutrofiilit	62,0 %
eosinofiilit	2,3 %
basofiilit	0,4 %
monosyytit	5,3 %
lymfosyytit	30,0 %

Neutrofiilien tärkein tehtävä on suojata elimistöä bakteereita ja viruksia vastaan (Penttilä 2003, 267; Guyton & Hall 2006, 431). Ne liikkuvat aktiivisesti tulehdusalueille kemotaktisten aineiden houkuttelemisena, missä ne fagosytoivat ja tappavat bakteereja (Penttilä 2003, 267). Fagosytoidessaan bakteerin neutrofiili ympäröi sen ensin solukalvolla, minkä jälkeen solukalvosta irtoaa kalvorakkula, joka ympäröi neutrofiilin solukalvon sisälle siirtynyttä bakteeria. Neutrofiili vapauttaa rakkulan sisään entsyymejä, joiden toiminta perustuu pääosin hapettavien entsyymien toimintaan. Entsyymit sulattavat kuplan sisään vangitun bakteerin. (Guyton & Hall 2006, 432; Penttilä 2003, 395.) Verenkierrrossa olevista neutrofiileista vain puolet kiertää veren mukana, puolet on kiinnittyneenä verisuonten seinämiin. Tarvittaessa nämä neutrofiilit voivat siirtyä verenkiertoon lisäten nopeasti aktiivisten neutrofiilien määrää. (Penttilä 2003, 267.) Neutrofiilit pystyvät puristautumaan verisuonten läpi ympäröiviin kudoksiin (Guyton & Hall 2006, 431).

Eosinofiilit siirtyvät erityisesti antigeeni-vasta-ainekompleksien luokse fagosytoimaan näitä. Lisäksi ne osallistuvat allergiareaktioihin ja tappavat loisia. (Penttilä 2003, 267; Guyton & Hall 2006, 436.) Eosinofiileja syntyy runsain määrin ihmisillä, joilla on loisia (Guyton & Hall 2006, 436). Valtaosa eosinofiileista on luuytimessä ja muissa elimistön kudoksissa, vain muutama prosentti on verenkierrossa (Penttilä 2003, 267). Basofiilit ovat osallisia allergia- ja tulehdusreaktioissa. Ne voivat vapauttaa veren hyytymistä vähentävää hepariinia ja allergiareaktioihin osallistuvaa histamiinia. (Seeley ym. 1998, 587; Guyton & Hall 2006, 436.) Basofiilien kudoksissa toimivia muotoja kutsutaan syöttösoluiksi (Silverthorn 2007, 782).

Valkosoluista pienimpiä ovat lymfosyytit, jotka ovat keskimäärin hiukan punasoluja suurempia (Seeley ym. 1998, 587). Veressä ja imukudoksessa kiertävät lymfosyytit huolehtivat hankitusta immunitetista (katso luku 1.5) (Penttilä 2003, 396). Lymfosyytteihin kuuluvat B- ja T-lymfosyytit. B-lymfosyytit voivat jakautumisen kautta muodostaa vasta-aineita tuottavia soluja, ne huolehtivat vasta-ainevälitteisestä immunitetistä. (Seeley ym. 1998, 587–589; Penttilä 2003, 396.) T-lymfosyyttejä on kaksi alatyyppeä: tappaja-T-solu ja auttaja-T-solu. Tappaja-T-solut tappavat virusten valtaamia soluja ja syöpäsoluja. Ne voivat myös osallistua immuunivasteen säätelyyn. Antigeenin aktivoima auttaja-T-solu ohjaa ja aktivoi immuunipuolustukseen osallistuvien solujen toimintaa. (Penttilä 2003, 396.) Monosyytit ovat tyypillisesti valkosoluista suurikokoisimpia. Monosyytit pysyvät veressä vain noin kolme päivää, minkä jälkeen ne siirtyvät kudoksiin ja kasvavat makrofageiksi. (Seeley ym. 1998, 588.) Monosyyteillä ja makrofageilla on kyky fagosytoida suuria määriä bakteereita, viruksia, kuollutta kudosta ja kuona-aineita (Guyton & Hall, 432).

### **2.2.3 Verihiutaleet**

Verihiutaleet ovat pieniä solulimakappaleita, joita ympäröi solukalvo. Verihiutaleilla on tärkeä rooli verenhukan ehkäisyssä. Ne muodostavat tulppia, jotka korjaavat pieniä verisuoniin syntyneitä vaurioita. Lisäksi ne osallistuvat suurempia vaurioita korjaavien hyytymien syntyyn (katso luku 1.4). (Seeley ym. 1998, 588.) Verihiutaleiden solukalvon pinnalla on

glykoproteiineja, jotka hylkivät ehjää verisuonen sisäpintaa, mutta tarttuvat vauriokohtiin ja erityisesti syvemmältä verisuonen rakenteista paljastuneeseen kollageeniin (Guyton & Hall 2006, 458). Verihiutaleet syntyvät luuytimessä suurikokoisista esiasteistaan, megakaryosyyteistä. Megakaryosyyteistä irtoaa pieniä kappaleita, jotka siirtyvät verenkiertoon verihiutaleina. (Seeley ym. 1998, 588.) Verihiutaleilla ei ole tumaa, eivätkä ne voi lisääntyä. Niillä on kuitenkin kyky tuottaa ja erittää aineita, jotka vaikuttavat ympäröiviin kudoksiin ja verisuoniin kudosvaurioiden korjaantumista edistävillä tavoilla. (Guyton & Hall 2006, 457.)

## **2.3 Plasman proteiinit**

Plasmassa on monia erityyppisiä proteiineja (Silverthorn 2007, 536). Tässä luvussa käsitellään tutkimuksen kannalta olennaisimmat proteiinit, joita ovat albumiini, fibrinogeeni ja globuliinit. Albumiini muodostaa 60 % plasman proteiineista (Geckle 2005). Albumiini ei ole elämälle välttämätön proteiini, mutta sillä on monia tärkeitä tehtäviä (Nicholson ym. 2000). Fibrinogeeni osallistuu veren hyytymiseen (Davalos & Akassoglou 2012). Noin neljä painoprosenttia plasman proteiineista on fibrinogeeniä (Seeley ym. 1998, 578). Globuliinit muodostavat 38 % plasman proteiineista (Seeley ym. 1998, 577). Niillä on monia tehtäviä, kuten hormonien kuljettaminen veressä (Silverthorn 2007, 31). Erityishuomiota tässä luvussa kiinnitetään immunoglobuliineihin, eli vasta-aineisiin.

### **2.3.1 Fibrinogeeni**

Fibrinogeeni on maksassa syntyvä proteiini, joka osallistuu veren hyytymiseen (Davalos & Akassoglou 2012). Suuren kokonsa vuoksi fibrinogeenia ei juuri siirry verestä kudospainostukseen (Guyton & Hall 2006, 460). Fibrinogeeni koostuu kahdesta symmetrisestä molekyylin puolikkaasta. Fibrinogeenimolekyylit eivät ole samanlaisia ja onkin arveltu, että ihmisillä on veressään yli miljoona toisistaan eroavaa muotoa fibrinogeenimolekyylistä. (Herrick ym. 1999.) Plasman proteiineista noin neljä painoprosenttia on fibrinogeeniä (Seeley ym. 1998,

578). Kudosvaurioissa ja tulehdustiloissa fibrinogeenin määrä veressä kasvaa monikertaiseksi (Davalos & Akassoglou 2012).

Vauriopaikoilla fibrinogeeni muuttuu fibriiniksi. Fibriini polymerisoituu ja muodostaa hyytymän. Hyytymän muodostamisen lisäksi fibrinogeeni toimii tartuntapintana verihiutaleille, jotka myös osallistuvat veren hyytymiseen. (Davalos & Akassoglou 2012.) Fibriinin muodostama hyytymä luo tukirakenteen solujen kiinnittymistä, lisääntymistä ja liikkumista varten (Herrick ym. 1999).

Kasvava määrä tutkimusaineistoa viittaa siihen, että fibrinogeenillä ja sen hajoamistuotteilla on merkittävä rooli tulehdusreaktioiden säätelyssä. Kasvanutta fibrinogeenin pitoisuutta veressä pidetäänkin tulehdustilan merkkinä, ja se liitetään verisuonitautien korkeaan riskiin. Useimmissa tapauksissa fibrinogeenin ja sen hajoamistuotteiden tulehdustilaa lisäävät vaikutukset yhdistetään niiden kykyyn aktivoida erilaisia immuunijärjestelmän soluja. (Davalos & Akassoglou 2012.)

Veren fibrinogeenin määrän on todettu vaikuttavan laskoon (Baskurt ym. 2012; Fernandes ym. 2011; Assayag ym. 2005). Assayag ym. (2005) tutkivat punasolukeräymien syntymistä ihmisillä, jotka sairastivat tukkeavaa valtimotautia. He havaitsivat, että 30 % punasolukeräymien syntymistä selittävästä mallista riippui veren fibrinogeenin määrästä. Muiden tulehdustiloihin liittyvien proteiinien vaikutus oli huomattavasti vähäisempi.

### **2.3.2 Albumiini**

Albumiini on plasmaproteiineista runsaslukuisin muodostaen noin 60 % niiden kokonaismäärästä (Geckle 2005). Kaikki albumiini tuotetaan maksassa. Albumiini ei ole elämälle välttämätön proteiini, mutta sillä on useita tärkeitä toimintoja elimistössä kuten kolloidiosmoottisen paineen ylläpito, veren tilavuuden säätely, sekä happo-emäspuskurina ja antioksidanttina toimiminen (Nicholson ym. 2000). Albumiini myös sitoo ja kuljettaa erilaisia



aineita (Birn & Christensen 2006). Albumiinin kolloidi-osmoottista painetta säätelevästä vaikutuksesta 60 % perustuu suoraan osmoottiseen vaikutukseen. Jäljelle jäävä 40 % syntyy negatiivisesti varautuneen albumiinin kyvystä vetää puoleensa positiivisesti varautuneita plasmaan liuenneita partikkeleita. (Nicholson ym. 2000.)

Noin 42 % elimistön albumiinista on plasmassa. Albumiinia siirtyy verestä kudoksiin jatkuvasti, mutta suurin osa palaa lymfaattisen järjestelmän kautta takaisin vereen. Albumiinin tuotanto riippuu muista veriproteiineista voimakkaammin ravitsemuksesta. Paaston aikana ja erityisesti nautitun proteiinin määrän vähentyessä albumiinin tuotanto vähenee. Seerumin albumiinin määrän on todettu vähenevän voimakkaasti myös kriittisissä sairaustiloissa ja laskeutunut plasman albumiinkonsentraatio on yhdistetty kohonneeseen kuolinriskiin. (Nicholson ym. 2000.)

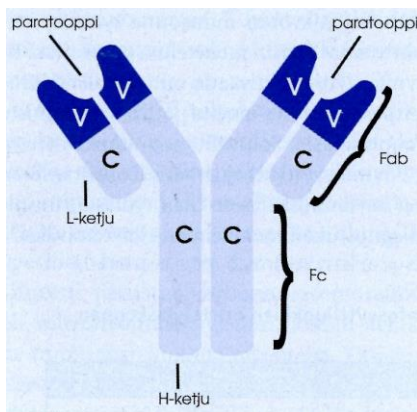
Albumiinin määrällä veressä on vaikutusta laskoon. Reinhartin ja Nagyn (1995) tutkimuksessa havaittiin, että albumiinin lisääminen normaaliin plasmaan laskee laskoa. Erilaisia yhdistelmiä kokeiltaessa havaittiin, että fibrinogeenin ja immunoglobuliinien yhteydessä albumiini nostaa laskoa, ja että laskon kohoaminen perustui näiden kolmen proteiinin vuorovaikutukseen.

### **2.3.3 Globuliinit ja immunoglobuliinit**

Globuliinit muodostavat 38 % plasman proteiineista (Seeley ym. 1998, 577). Globulaariset proteiinit rakentuvat aminohappoketjuista, jotka taittuvat pallomaisiksi rakenteiksi. Niiden rakenne on monimutkainen, sisältäen taskuja, kanavia ja ulokkeenomaisia rakenteita. (Silverthorn 2007, 31.) Maksa valmistaa 50–80 % globuliineista. Loppuosa valmistuu lähes kokonaan imukudoksessa (Guyton & Hall 2006, 855). Globulaariset proteiinit ovat vesiliukoisia. Globuliinit toimivat veressä muun muassa rasvojen kuljettajina, solujen välisten viestien välittäjinä (hormonit) ja osana immuunijärjestelmää (immunoglobuliinit). (Silverthorn 2007, 31.)

Immunoglobuliinit ovat vasta-aineita (Penttilä 2003, 398). Valtaosa vasta-aineista on veressä, ja ne muodostavat normaalisti noin 20 % plasman proteiineista. Veren vasta-aineet ovat tehokkaimpia solun ulkoisia taudinaiheuttajia vastaan. Vasta-aineilla on monia tehtäviä. Ne päällystävät antigeeneja (opsonisaatio), jolloin immuunijärjestelmän solut tunnistavat antigeenit helpommin (Silverthorn 2007, 790; Penttilä 2003, 398). Yksi immunoglobuliinimolekyyli voi kiinnittyä kahteen antigeeniin, näin vasta-aineet pystyvät sitomaan antigeenejä sisältäviä soluja rykelmiksi. Vasta-aineet voivat neutraloida bakteerien erittämiä haitallisia aineita kiinnittymällä niihin. (Silverthorn 2007, 790; Penttilä 2003, 398.) Lisäksi ne aktivoivat tulehdusreaktiota ja immuunijärjestelmän soluja erilaisten mekanismien kautta (kts. luku 1.5) (Silverthorn 2007, 790).

Vasta-ainemolekyylien perusyksikkö on Y-kirjaimen muotoinen (kts. kuva 2). Rakenteessa on kaksi vasta-aineeseen sitoutuvaa osaa ja häntäosa. Vasta-aineeseen sitoutuvia osia nimitetään paratoopeiksi, ja niiden rakenne vaihtelee. Paratoopin rakenne ratkaisee, minkä antigeenin immunoglobuliini tunnistaa. (Penttilä 2003, 398.)



KUVA 2. Immunoglobuliinien perusyksikön rakenne. Paratooppi tunnistaa antigeenin. Häntäosa (Fc) on samanlainen eri immunoglobuliiniluokkien sisällä. Muuttuva osa (V) sisältää antigeenin tunnistavan alueen (antigen binding site). Rakenne koostuu kahdesta raskaasta (H-keiju) ja kevyestä (L-keiju) polypeptidiketjusta. (Penttilä 2003, 398.) Häntäosa (C) on samanlainen eri immunoglobuliiniluokkien sisällä (Penttilä 2003, 399).

Immunoglobuliiniluokkia on viisi: IgM, IgG, IgA, IgD ja IgE (Guyton & Hall 2006, 444; Penttilä 2003, 399). Luokat jakautuvat alaluokkiinsa, esimerkiksi IgA jakautuu alaluokkiin IgA1 ja IgA2 (Penttilä 2003, 399). IgM ja IgA immunoglobuliinit eroavat muista luokista siinä, että ne koostuvat useasta Y:n muotoisesta perusyksiköstä. IgM sisältää viisi ja IgA yhdestä neljään perusyksikköä (Silverthorn 2007, 790).

IgG-immunoglobuliinit muodostavat noin 75 % veren vasta-aineista (Silverthorn 2007, 789; Penttilä 2003, 400.) IgG-vasta-aineet neutraloivat viruksia ja toksineja, opsonoivat bakteereita ja aktivoivat komplementtijärjestelmän (katso luku 2.5) (Penttilä 2003, 400). Ne ovat ensisijainen tulehduksiin osallistuva immunoglobuliiniryhmä (Harmening 2001, 382). IgG-vasta-aineet säilyvät seerumissa jopa vuosikymmeniä (Penttilä 2003, 400). IgM-immunoglobuliinit ovat vasta-ainesta suurikokoisimpia, ja voivat sitoutua kymmeneen epi-tooppiin kerrallaan. IgM-vasta-aineet neutraloivat toksineja ja aktivoivat komplementin. (Penttilä 2003, 400.) IgM-vasta-aineet ilmestyvät ensimmäisinä tulehdusreaktioissa, mutta katoavat jo muutamien viikkojen kuluessa (Harmening 2001, 382). IgA-vasta-aineita on ulkoisissa eritteissä kuten syljessä, kyynelissä, rintamaidossa ja limakalvojen eritteissä. IgA-vasta-aineet suojaavat erityisesti keuhkoja ja ruuansulatuskanavaa (Harmening 2001, 382) auttaen pysäyttämään mikrobit ennen kuin ne pääsevät kudoksiin (Silverthorn 2007, 790). IgE-luokkaan kuuluvia immunoglobuliineja on vain noin 1 % veren vasta-aineista. IgE-vasta-aineilla on keskeinen rooli allergia ja yliherkkyysoireiden kehittymisessä (Harmening 2001, 382; Penttilä 2003, 400). IgE vasta-aineita syntyy erityisesti loismato- ja alkueläininfektioissa (Penttilä 2003, 400). IgD-vasta-aineiden fysiologinen rooli on epäselvä (Silverthorn 2007, 790; Penttilä 2003, 400). Niitä on veressä erittäin vähän ja niiden tiedetään toimivan ainakin pienten B-lymfosyyttien antigeenireseptoreina (Penttilä 2003, 400).

## 2.4 Veren hyytyminen

Veren hyytyminen on elintärkeä prosessi, koska ilman sitä pienetkin haavaumat voisivat johtaa kuolemaan (Seeley 1999, 588). Elimistön täytyy pyrkiä lopettamaan verenvuoto tukkimatta verisuonta kokonaan. Jos verisuoni tukkeutuisi kokonaan, se ei voisi enää kuljettaa

happea ja ravinteita soluille ja tämä johtaisi kuolioon. Verisuoneen syntyvän hyytymän täytyy myös olla niin vahva, että se kestää verenkierron aiheuttaman paineen. (Silverthorn 2007, 547.)

Verenvuodon tyrehtymiseen liittyy kolme vaihetta: *verisuonten supistuminen, verihiutale-tulpan muodostuminen ja hyytymän syntyminen*. Ensimmäisessä vaiheessa verisuoneen kohdistuva vaurio aiheuttaa verisuonen supistumisen, mikä laskee veren virtausta ja painetta. (Silverthorn 2007, 548; Guyton & Hall 2006, 457.) Toisessa vaiheessa verihiutaleet tarttuvat vaurioituneen verisuonen seinämästä paljastuneeseen kollageeniin. Kosketus kollageenin kanssa ja verisuonen sisäpinnan solujen erittämät kemikaalit aktivoivat verihiutaleita. Vauriokohtaan kiinnittyneet verihiutaleet puolestaan erittävät aineita, joiden vaikutuksesta vauriokohtaan kiinnittyy lisää verihiutaleita ja verihiutaletulppa muodostuu. (Silverthorn 2007, 549; Guyton & Hall 2006, 457.) Tulpan syntymiseen johtava reaktio pysyy paikallisena, koska verihiutaleet hylkivät ehjää verisuonen seinämää. Kolmannessa vaiheessa syntyy fibriiniä, joka vahvistaa verihiutaletulppaa ja mahdollistaa varsinaisen hyytymän muodostumisen. Hyytymän muodostuminen on monimutkainen prosessi, joka voi edetä ulko- ja sisäsyntyistä reittiä pitkin. (Silverthorn 2007, 551.) Nimet tulevat siitä, että ulkosyntyistä reittiä etenevä reaktio alkaa veren ulkopuolisten kemikaalien vaikutuksesta, sisäsyntyistä reittiä etenevät reaktiot puolestaan veren sisältämien kemikaalien vaikutuksesta (Seeley 1999, 590).

*Ulkosyntyistä reittiä* seuraava reaktio alkaa vaurioituneen kudoksen erittämästä tromboplastiinista (Seeley 1999, 591; Guyton & Hall 2006, 461). Tromboplastiini (hyytymistekijä III) koostuu lipoproteiineista ja fosfolipideistä (Seeley 1999, 590). Tromboplastiini aloittaa monivaiheisen hyytymisprosessin, johon liittyy erilaisia hyytymistekijöitä. Prosessin tuloksena syntyy protrombiinaasia, joka muuntaa protrombiinin trombiiniksi (Seeley 1999, 590). Trombiini vuorostaan muuntaa liukoisen fibrinogeenin liukenemattomaksi fibriiniksi. Fibriini muodostaa hyytymän verkkorakenteen. (Seeley 1999, 590; Silverthorn 2007, 551.) *Sisäsyntyistä reittiä* seuraavassa reaktiossa kosketus verisuonessa tapahtuneen kudonvaurion paljastamaan kollageeniin aktivoi hyytymistekijä XII:n (Seeley 1999, 591; Silverthorn

2007, 551). Hyytymistekijä XII aloittaa hyytymisprosessin, jonka lopputuotteena syntyy protrombinaasia. Tämän jälkeen hyytymisprosessi seuraa samaa reittiä kuin ulkosyntyistä reittiä seuraava prosessi. Veri sisältää hyytymistekijöiden lisäksi hyytymisen vasta-aineita, jotka rajoittavat hyytymän syntymistä ja rajaavat sen vaurioalueelle. (Seeley 1999, 591.)

Hyytymä vetäytyy kasaan verihiutaleiden vaikutuksesta. Verihiutaleet kiinnittyvät fibriniverkkoon ja niiden sisältämät aktiini ja myosiini supistuvat vetäen hyytymän kasaan. Hyytymän vetäytyminen auttaa kudsvaurion paranemisessa tuomalla vauriopinnat lähemmäs toisiaan. Kun hyytymä vetäytyy kasaan, siitä puristuu ulos seerumia, josta on poistunut fibrinogeeni ja osa hyytymistekijöistä. Kudsvaurio paranee hyytymän suojaamana ja hyytymä hajoaa muutaman päivän kuluessa plasmiini-entsyymin aiheuttaman fibrinolyysin vaikutuksesta (Seeley 1999, 592 ; Silverthorn 2007, 551).

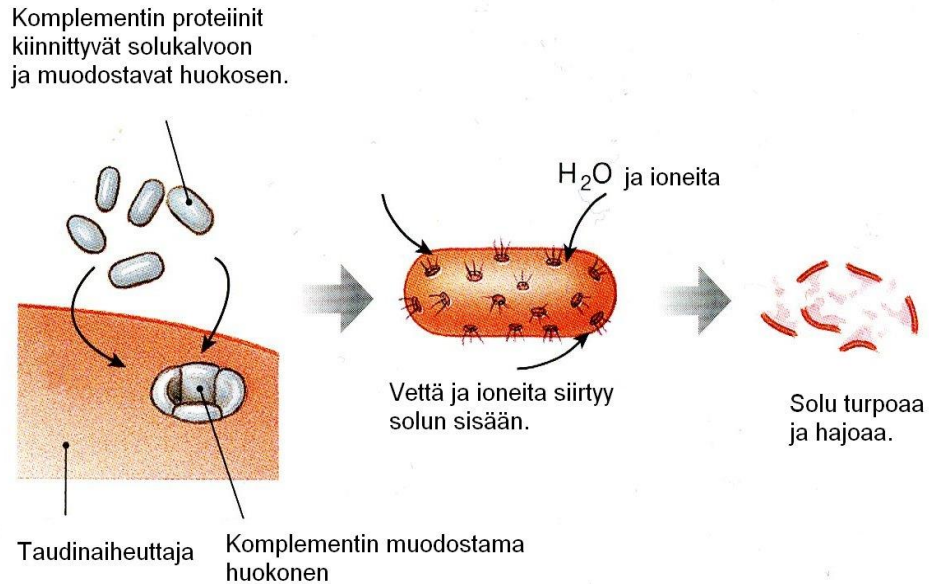
## **2.5 Veri ja immuunijärjestelmä**

Immuunijärjestelmä suojaa kehoa mikrobeilta, loisilta ja myrkyiltä (Guyton & Hall 2006, 439). Immuunijärjestelmä reagoi antigeeneihin (Silverthorn 2007, 777). Antigeenit ovat myrkyjen ja organismien sisältämiä kemiallisia yhdisteitä, jotka eroavat kaikista muista kehon kohtaamista yhdisteistä ja mahdollistavat siten molekyylien ja solujen tunnistamisen. Yleensä ne ovat suurikokoisia proteiineja tai polysakkarideja. (Guyton & Hall 2006, 440.) Periaatteessa kaikki kehon ulkopuoliset molekyylit ja solut voivat laukaista immuunireaktion (Silverthorn 2007, 777). Autoimmuunisairauksissa myös jotkin kehon omat antigeenit laukaisevat immuunireaktion (Silverthorn 2007, 799).

Immuunijärjestelmään kuuluu kaksi järjestelmää, jotka toimivat osin päällekkäin. Nopeasta ensivaiheen puolustuksesta huolehtii luonnollinen immunitetti. Se ei kohdistu tiettyyn taudinaiheuttajaan ja alkaa minuuttien tai tuntien kuluessa altistuksesta. Tulehdusreaktio on olennainen osa luonnollista immunitettiä. (Silverthorn 2007, 779.) Hankittu immunitetti kohdistuu tiettyihin taudinaiheuttajiin. Hankitun immunitetin vaste ensimmäistä kertaa kohdattuun taudinaiheuttajaan voi kestää päiviä. Toistuvissa altistuksissa vaste on kuitenkin

huomattavasti nopeampi, koska immuunijärjestelmä kehittää muistisoluja. (Silverthorn 2007, 779.) Opiteen immuniteetin tuoma suoja on erittäin tehokas taudinaiheuttajien ja myrkkujen torjunnassa (Guyton & Hall 2006, 439).

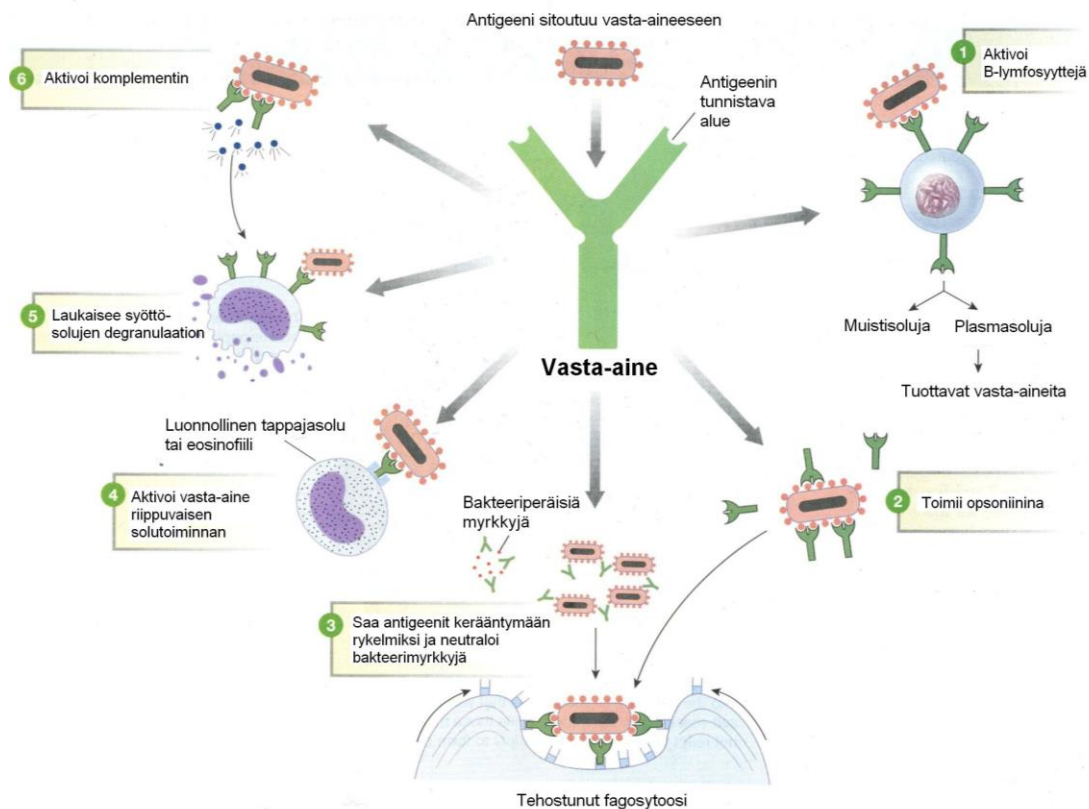
*Luonnollinen immuniteetti.* Luonnolliseen immuniteettiin kuuluu valkosolujen toiminta, erilaiset eritteet kuten vatsahappo ja lima, ihon vastustuskyky, luonnolliset tappajasolut sekä komplementti. Näiden lisäksi veressä on aineita kuten lysosyymiä ja polypeptidejä, jotka reagoivat automaattisesti tiettyihin taudinaiheuttajiin. (Guyton & Hall 2006, 439.) Valkosolut tuhoavat taudinaiheuttajia fagosytoosin avulla ja vaikuttavat elimistön tulehdusreaktioihin erittämiensä liukoisten aineiden kuten sytokiinien ja interferonin avulla (Penttilä 2003, 395). Luonnolliset tappajasolut tunnistavat ja tuhoavat mikro-organismien valtaamia soluja ja syöpäsoluja (Silverthorn 2007, 785; Penttilä 2003, 397). Komplementtiin kuuluu yli 25 plasman ja solukalvon proteiinia (Silverthorn 2007, 787). Komplementin proteiinit kiertävät normaalitilassa inaktiivisina veressä (Guyton & Hall 2006, 445). Niiden aktivaatio synnyttää ketjureaktion, jonka lopputuotteena syntyy rasvaliukoisia proteiineja. Proteiinit kiinnittyvät taudinaiheuttajien solukalvoihin muodostaen huokosia. Huokokset johtavat solun nestetasapainon häiriintymiseen ja solukuolemaan (kuva 3). (Silverthorn 2007, 787.) Luonnollinen immuniteetti on tehokas esimerkiksi märkäbakteereita, sieniä ja loisia vastaan (Penttilä 2003, 395).



KUVA 3. Komplementin toiminta (suomennettu, Silverthorn 2007, 787). Ensimmäisessä kuvassa komplementin proteiinit kiinnittyvät vieraan solun solukalvoon ja luovat siihen huokosen. Toinen kuva kuvaa veden ja ionien liikettä solun sisään komplementin proteiiniin luomien huokosten kautta. Kolmannessa kuvassa solu hajoaa täytyttyään vedellä ja ioneilla.

*Hankittu immuniteetti.* Hankitusta immuniteetistä huolehtivat lymfosyytit. Lymfosyyttejä on kaksi pääluokkaa: B- ja T-lymfosyytit. (Guyton & Hall 2006, 440.) B-lymfosyytit kypsyvät maksassa ja luuytimessä. T-lymfosyytit kypsyvät kateenkorvassa. (Penttilä 2003, 396.) Kypsymisen aikana lymfosyytit kehittävät spesifiteetin tietyille antigeeneille, mikä tarkoittaa, että ne reagoivat vain kyseiseen antigeeniin. (Guyton & Hall 2006, 441.) Solukalvoon kiinnittyneet vasta-aineet toimivat B-lymfosyyttien antigeenireseptoreina. Kun antigeeni aktivoi sille spesifit B-lymfosyytit, osa niistä erikoistuu plasmasoluiksi. Plasmasolut alkavat tuottaa aktivoitumisen aiheuttaneelle antigeenille spesifiä vasta-ainetta. Hyökkäyksen torjumisen jälkeen osa antigeenille spesifeistä lymfosyyteistä jää kehoon muistisoluna. (Silverthorn 2007, 788–789.)

Plasmasolujen vereen vapauttamat vasta-aineet vaikuttavat monella tavalla. Sitoutumalla antigeeneihin ne sitovat useita suuria kappaleita kuten bakteereita tai punasoluja kokkareiksi. (Guyton & Hall 2006, 444.) Takertumalla antigeenien pintaan ne myös helpottavat mikrobien tunnistamista ja fagosytoosia (Silverthorn 2007, 790). Kiinnittymällä liukoisiin antigeeneihin, vasta-aineet voivat kerätä ne yhteen liuksesta erottuviksi keräymiksi. Vasta-aineet neutraloivat näin esimerkiksi jäykkäkouristukseen liittyvän bakteerien erittämän myrkyä. Vasta-aineet voivat myös peittää myrkyä reagoivat osat kiinnittymällä niihin. Joissakin tapauksissa antigeenit pystyvät suoraan rikkomaan mikrobien solukalvot. (Guyton & Hall 2006, 444.) Vasta-aineiden suurin vaikutus tulee kuitenkin komplementin toiminnan tehostamisen kautta. Sitoutuessaan antigeeniin, vasta-aineen häntäpää muuttuu niin, että se aktivoi komplementin toimintaan liittyvän proteiinin ja siten laukaisee ketjureaktion. (Guyton & Hall 2006, 445.) Vasta-aineiden toimintaa on havainnollistettu kuvassa 4.



KUVA 4. Vasta-aineiden toiminta (suomennettu, Silverthorn 2007, 791).



Vasta-aineet ovat tehokkaita vain solujen ulkoisia taudinaiheuttajia vastaan. T-lymfosyytit puolestaan tuhoavat taudinaiheuttajien valtaamia soluja. T-lymfosyyttien pinnalla olevat antigeenireseptorit ovat samantapaisia kuin vasta-aineet, mutta eivät kuitenkaan samanlaisia. T-lymfosyyttien reseptorit reagoivat soluihin, joiden pinnalla on keholle vieraita antigeenikappaleita osana MHC (Major Histocompatibility Complex) -proteiinia. (Silverthorn 2007, 791.) T-lymfosyytit jakautuvat tappaja-T-lymfosyytteihin ja auttaja-T-lymfosyytteihin (Penttilä 2003, 396). Tappaja-T-lymfosyytit tuhoavat kehon omia soluja, jotka ovat tulleet mikrobien valtaamiksi (Silverthorn 2007, 793) sekä syöpäsoluja (Penttilä 2003, 396). Auttaja-T-lymfosyytit erittävät erilaisia liukoisia sytokiineja ja ohjaavat ja vaikuttavat siten muiden immuunipuolustukseen vaikuttavien solujen toimintaa (Penttilä 2003, 396). Auttaja-T-lymfosyytit myös sitoutuvat B-lymfosyytteihin edistäen niiden erikoistumista plasmamuokiksi ja muistisoluiksi. (Silverthorn 2007, 793).

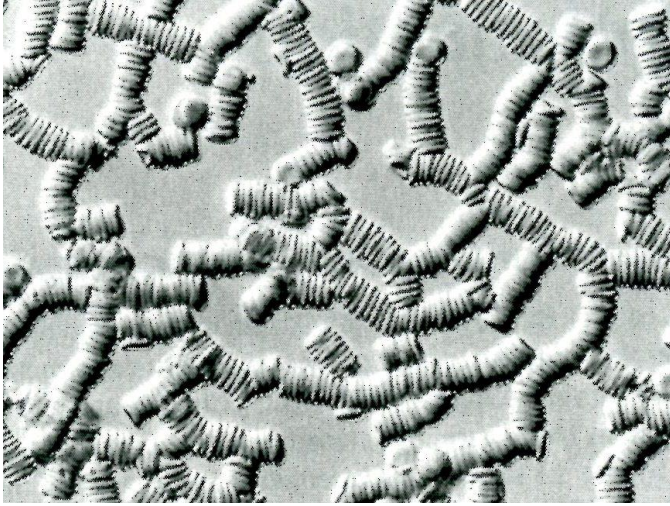
### 3 VERI TERVEYDEN MITTARINA

Veri toimii kuljetusjärjestelmänä hapelle, ravinteille sekä esimerkiksi hormoneille ja erilaisille vaikuttaville aineille. Elimistön solut saavat kaiken tarvitsemansa veren kautta (Mustajoki & Kaukua 2008, 16). Tämä tarkoittaa myös sitä, että veri pääsee vaikuttamaan kaikkien elinten kanssa. Edellä mainituista syistä verta tutkimalla voidaan saada hyvä yleiskuva elimistön tilasta. Suurin osa laboratoriokokeista tehdäänkin verestä, ja siten vereen liittyviä laboratoriokokeita on mittavasti (Mustajoki & Kaukua 2008, 16).

Tässä luvussa käsitellään laboratoriotutkimuksia, jotka ovat olennaisia tämän tutkimuksen kannalta. Lasko on tutkimuksen kannalta tärkein kliininen verimuuttuja, koska aikaisempi tutkimusaineisto (Goldberger 1939) osoittaa, että laskolla ja kuivaverianalyysillä on yhteys. CRP (C-reaktiivinen proteiini) on tulehdusmarkkeri, jolla voi olla yhteys kuivaveren valkoisuuteen. Verenkuva antaa suhteellisen laajasti tietoa verestä ja erityisesti punasolujen suhteellisella määrällä voi olla yhteys kuivaverianalyysin tuloksiin.

#### 3.1 Lasko

Laskeutumisreaktiosta lyhennetty termi ”lasko” on tutkimuksen virallinen nimitys. Laskon toinen yleisesti käytetty nimi on senkka, joka tulee ruotsinkielisestä termistä ”sänkningsreaktion”. (Mustajoki & Kaukua 2008, 42.) Nisäkkäiden verellä on taipumus muodostaa punasoluista ja veren proteiineista koostuvia keräymiä (engl. aggregate). Yhteen keräytyneet punasolut muistuttavat muodoltaan raharullia (katso kuva 5). (Baskurt ym. 2012, 1.) Raharullamuodostelmien syntyminen nopeuttaa verinäytteen punasolujen laskeutumista näytteen pohjalle (Vennapusa ym. 2011). Ilmiö luo perustan laskon käytölle kliinisenä verimuuttujana. Varsinkin korkeat lasko-arvot kertovat tulehdussairauksista. (Mustajoki & Kaukua 2008, 41.) Goldberger (1939) havaitsi, että laskon ollessa koholla kuivaverinäytteeseen syntyy enemmän mikroskoopissa valkoisina näkyviä alueita. Siten laskon kohoamista selittävät tekijät voivat selittää myös valkoisten alueiden muodostumiseen liittyviä tekijöitä.



KUVA 5. Punasolujen rauhullanomaisia yhteenkeräymiä verinäytteessä (Baskurt ym. 2012, 2).

Fåhraeus (1921, 3) tutki veren käyttäytymistä ja havaitsi, että veren koostumus ja käyttäytyminen vaihtelee huomattavasti terveiden ja sairaiden ihmisten välillä. Lasilevyille levitetty terveeseen veri tuottaa tasaisen punaisen kerroksen, mutta sairaiden veressä punasolut alkavat pian levittämisen jälkeen muodostaa keräymiä. Tämä näkyy näytteessä punaisina laikkuina kirkkaan nesteen seassa. (Fåhraeus 1921, 99.) Fåhraeus otti verta putkeen, lisäsi siihen natriumsitraattia ja määrittä tunnin päästä, kuinka suuri osa punasoluista oli vajonnut putken pohjalle (Fåhraeus 1921, 71–72). Hän havaitsi, että punasolukeräymien muodostuminen lisää vajoamisnopeutta, ja että muutokset terveydentilassa vaikuttavat nopeuteen, jolla punasolut vajoavat verinäytteen pohjalle (Fåhraeus 1921, 156 ja 92).

Baskurt ym. (2012, 5) tuovat esille historiakatsauksessaan Kniselyn ja tutkijaryhmien muiden jäsenten tutkimusten (1947, 1958 ja 1961) merkittävyyden. Tutkimuksissa havaittiin, että verenkierrossa mekaaninen rasitus vähentää punasolukeräymien muodostumista, mutta sairailta ihmisillä ja eläimillä niitä muodostuu hitaamman virtauksen paikoissa vaikeuttaen hapen kulkeutumista kudoksiin.

Mustajoen ja Kaukuan (2008) mukaan Westergren paranteli myöhemmin Fåhraeusin kehittämää menetelmää ja Westergrenin menetelmä luo pohjan laskon käytölle kliinisenä tutkimuksena. Esimerkiksi Vennapusa ym. (2011) käyttivät Westergrenin menetelmää vertailukohtana tehdessään laskoon liittyvää vertailututkimusta. Westergrenin menetelmässä lasko mitataan tunnin ajalta, mutta nykyisin mittausaikaa voidaan lyhentää 30 minuuttiin. Laskon yksikkö on silti edelleen mm/h. (Vennapusa ym. 2011.) Kokonaisajaltaan laskon mittaaminen vaatii noin 1,5 tuntia, koska laskimoverinäytteen annetaan jäähtyä huoneen lämpöön tunnin ajan ennen varsinaista mittausta (Mekalasi Oy 2010; keskustelu yliopiston laboratorion henkilökunnan kanssa).

Lasko on pitkään käytössä ollut laboratoriokoe, joka on osittain korvautunut uusilla menetelmillä. Laskon etuina ovat sen yksinkertaisuus ja matala hinta. (Bridgen 1999.) Sitä käytetään edelleen paljon monien tulehdussairauksien diagnosoinnissa ja seurannassa (Vennapusa ym. 2011). Lasko kohoaa iän myötä, tästä syystä laskon viitearvot ovat iäkkäillä korkeammat (Mustajoki & Kaukua 2008, 53). Lasko on kuitenkin menetelmänä epäspesifi (Vennapusa ym. 2011). Bridgen (1999) neuvookin toistamaan laskokokeen, mikäli saadaan korkea tulos ilman selkeää kliinistä selitystä. Laskon tiedetään nousevan esimerkiksi raskauden aikana. Hyvin korkeilla laskoarvoilla on vahva yhteys elimistön sairaustilaan, usein kyseessä on tulehdus tai syöpä. (Bridgen 1999.)

Varsinkin laskoa ja CRP:tä on vertailtu paljon menetelmien päällekkäisyyksien vuoksi. Tutkimuksissa on havaittu että CRP saattaa olla parempi työkalu tulehduksen havaitsemiseen ensimmäisten 24 tunnin aikana, tämän jälkeen lasko ja plasman viskositeetin mittaukset toimivat paremmin. (Bridgen 1999.) Kroonisessa tulehduksessa CRP saattaa olla jopa normaali, vaikka lasko on selvästi koholla (Mustajoki & Kaukua 2008, 53). CRP on laskoa kalliimpi tutkimus (Bridgen 1999).

Viime vuosikymmeninä laskon tutkimus on keskittynyt punasolukeräymien syntyyn vaikuttavien tekijöiden selvittämiseen, sekä siihen, miten keräymät vaikuttavat verenkiertoon (Baskurt ym. 2012, 6). Keräymien syntymistä estävät tekijät on voitu tunnistaa melko hel-

posti, mutta niiden syntymiseen vaikuttavista mekanismeista ei ole vielä päästy yhteisymmärrykseen (Baskurt ym. 2012, 9).

*Keräymien syntymistä estävät tekijät:*

1. Leikkausvoimat: mekaanisessa rasituksessa punasolujen välille syntyy leikkausvoimia, jotka pyrkivät erottamaan toisiinsa kiinnittyneet punasolut toisistaan (Baskurt ym. 2012, 10–11).
2. Punasolujen sähköinen varaus: punasoluilla on negatiivinen sähköinen varaus, jonka takia ne hylkivät toisiaan (Baskurt ym. 2012, 10–11). Sähköisen varauksen synnyttävät solukalvolla olevan siaalihapon karboksyyliiryhmät (Fernandes 2011).
3. Solukalvon muodonsäilyttämiskyky: punasolujen kerääntyminen edellyttää, että niiden välille syntyy tarpeeksi laaja kosketuspinta. Laajan kosketuspinnan syntyminen vastaavasti edellyttää punasolujen koveran pinnan litistymistä. (Baskurt ym. 2012, 11.)

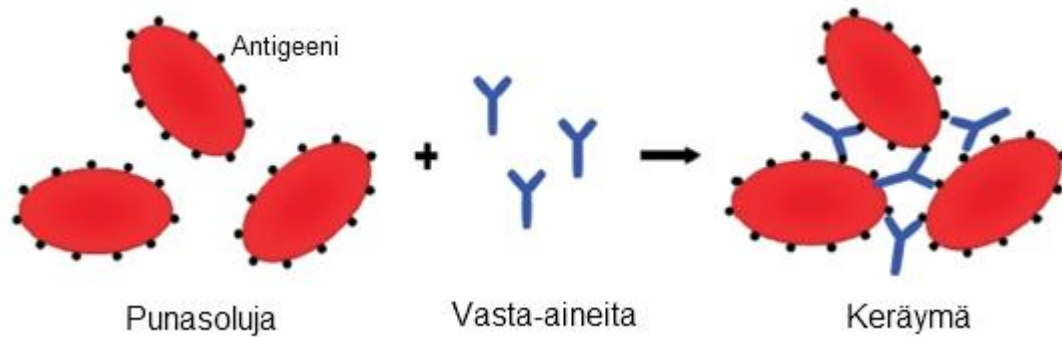
*Keräymien syntymistä edistävät tekijät:*

1. Punasolujen kaksoiskovera ympyrämäinen muoto lisää taipumusta kerääntymiseen. Osmoottisen paineen muutokset vaikuttavat punasolujen muotoon ja siten kerääntymistäipumukseen. Myös vapaiden radikaalien vaikutus muuttaa kerääntymiskäyttäytymistä. Kameleleimillä on huomattu, että niiden soikeat punasolut eivät muodosta juuri ollenkaan kerääntymiä. (Baskurt 2013, 11.)
2. Punasolujen suhteellisen määrän kasvaminen lisää kerääntymistäipumusta, ja siten alhaisen punasolumäärän on todettu vähentävän keräymien syntymistä (Baskurt 2013, 11).

3. Makromolekyyleillä on todettu olevan vaikutusta punasolujen kerääntymiseen. Vaikutukset on todettu sekä kehon omien makromolekyyliden että synteettisten makromolekyyliden kohdalla. (Baskurt 2012, 12.) Kehon proteiineista erityisesti fibrinogeenilla, immunoglobuliini G:llä ja albumiinilla on todettu olevan vaikutusta keräymien syntymistäipumukseen (Assayag ym. 2005; Fernandes ym. 2011; Baskurt ym. 2012, 12). Fibrinogeeni on yleisesti hyväksytty voimakkaaksi keräymien aiheuttajaksi. Immunoglobuliini G:n ja erityisesti albumiinin vaikutuksista on ristiriitaisia tuloksia. (Baskurt 2012, 12.) Useassa tutkimuksessa on huomattu, että fibrinogeenin, immunoglobuliinien ja albumiinin välillä on yhteisvaikutus ja ne toimivat yhdessä lisäten keräymien syntymistä (Assayag 2005; Ben-Ami ym. 2003; Talstad ym. 1983). Synteettisistä makromolekyyleistä dekstraania on käytetty tutkimuksissa paljon, koska siitä on saatavissa molekyylimassoiltaan vaihtelevia laatuja. Makromolekyyliden molekyylimassalla on myös todettu olevan vaikutusta keräymien syntymiseen (Baskurt ym. 2012, 12–13).

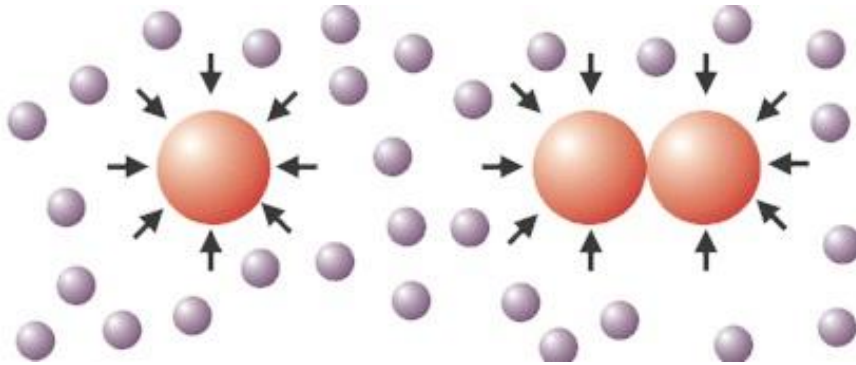
Punasolukeräymien syntymiseen liittyen on tällä hetkellä kaksi hypoteesia: silloittumis- ja köyhtymishypoteesi. **Silloittumishypoteesin** mukaan veren sisältämät makromolekyylit kiinnittyvät punasolujen pinnalle, ja kun punasolut osuvat liuoksessa toisiinsa, makromolekyylit muodostavat siltoja punasolujen välille. Mekaanisten voimien vaikutuksesta päistään kiinnittyneet punasolut pääsevät kääntymään toistensa suhteen, jolloin solujen litteät pinnat pääsevät kosketuksiin toistensa kanssa luoden laajan silloittuneen kontaktipinnan punasolujen välille. (Baskurt ym. 2012, 31–33.)

Fernandes ym. (2011) kuvaavat review-artikkelissaan silloittumishypoteesin mukaisen immunologisen reaktion, jossa vasta-aineet kiinnittyvät punasolujen pinnalla oleviin antigeeneihin. Yhteen punasoluun kiinnittynyt antigeeni voi kiinnittyä vielä toisenkin pintaan kiinnittäen solut toisiinsa. Fernandes ym. (2011) kiinnittävät erityishuomiota vasta-aineiden kokoon, koska suurempi vasta-ainemolekyylit yhdistää helpommin toisiaan negatiivisen pinta-alueensa takia hylkivät punasolut. Tästä syystä immunoglobuliini M on todennäköinen keräymien syntymistä edistävä molekyylit. Kuva 6 esittää immunologisen reaktion kautta tapahtuvaa keräymän syntymistä.



KUVA 6. Y-kirjaimen muotoiset vasta-aineet kiinnittyvät punasolujen pinnalla oleviin anti-geeneihin (mustat pisteet), yhdistäen punasoluja toisiinsa (suomennettu, Fernandes 2011).

**Köyhtymishypoteesille** loivat pohjan Asakura ja Oozawa (1958) esittäessään teorian kolloidiliuoksessa olevien kappaleiden vuorovaikutukselle. Teorian mukaan kahden kolloidiliuoksessa olevan pitkänomaisen kappaleen välille syntyy osmoottista painetta vastaava voima, mikäli kappaleet ovat niin lähellä toisiaan, että kolloidipartikkeleita ei pääse niiden väliin. Köyhtymishypoteesin mukaan punasolujen välille syntyy keräymien syntymistä ja koossapysymistä tukeva voima, kun ne joutuvat riittävän lähelle toisiaan (Baskurt ym. 2012, 33). Teorian periaate on esitetty kuvassa 7.



KUVA 7. Köyhtymishypoteesin malli punasolukeräymien muodostumiselle (muokattu, Marenduzzo, Finan & Cook 2006). Kuvan vasemmalla puolella sinisten kolloidipartikkelien paine kohdistuu yksittäiseen pallomaiseen kappaleeseen. Oikeanpuoleisessa kuvassa kaksi vastaavaa kappaletta on ajautunut toisiinsa kiinni ja kolloidiosmoottinen paine pitää ne yhdessä.

### 3.2 Perusverenkuvaa

Verenkuvan numeeriset analyysit ovat terveydenhuollon käytetyimpiä tutkimuksia (Niemelä & Pulkki 2010, 249). Perusverenkuvaa ja täydellinen verenkuvaa sisältävät molemmat useita numeerisia määrittelyjä. Perusverenkuvaa kuuluu punasolujen, valkosolujen ja verihiutaleiden määrät, hematokriitti ja punasoluvakiot sekä veren hemoglobiinipitoisuus ja punasolujen tilavuus. (Penttilä 2003, 269.) Täydellinen verenkuvaa sisältää lisäksi valkosolujen erittelylaskennan (Penttilä 2003, 273). Perusverenkuvaa käytetään paljon, koska sen avulla pystytään toteamaan monia eri sairauksia. Perusverenkuvaa tutkitaan herkästi, jos potilaalla on esimerkiksi väsymystä, mustelmataipumusta tai vatsakipuja. (Mustajoki & Kaukua 2008, 43.)

Solumäärien koneellisessa laskennassa käytetään impedanssiin tai valon sirontaan perustuvia menetelmiä. Impedanssimittauksessa veri johdetaan sähköä johtavassa liuoksessa mittauspäähän ohi, jolloin solu syrjäyttää tilavuutensa verran liuosta ja aiheuttaa mittauspäähän elektrodien välille sähköimpulssin. Impulssin koko on verrannollinen solun kokoon. Valon siron-



taan perustuvassa menetelmässä mittauskohdan läpi virtaavaan vereen kohdistetaan laser- valo. Laservalon sirontaa rekisteröimällä saadaan tietoa solujen määrästä, koosta ja sisäisistä rakenteista. (Penttilä 2003, 270.) Solulaskennassa voitaisiin käyttää myös kammiolaskentaa, mutta se on työläästä ja epätarkkana menetelmänä jäänyt pois käytöstä (Penttilä 2003, 269). Solumääriä voidaan määrittää myös sivelyvalmisteesta manuaalisesti mikroskoopin avulla. Koneelliset menetelmät eivät pysty tunnistamaan morfologialtaan poikkeavia soluja. Sivelyvalmisteen visuaalisessa tarkastelussa pystytään tunnistamaan myös morfologialtaan poikkeavat solut. (Penttilä 2003, 278.) Seuraavassa käydään läpi perusveren kuvan sisältämät muuttujat.

*Punasolujen määrä ja hematokriitti.* Punasolujen määrä kertoo, kuinka paljon punasoluja on litrassa verta, arvoa käytetään lähinnä punasoluindeksien laskemiseen (Mustajoki & Kaukua 2008, 45). Hematokriitti puolestaan kuvaa punasolujen tilavuusosuutta veressä. Hematokriitti on perinteisesti määritetty sentrifugoimalla verta, jolloin punasolut erottuvat putken pohjalle. Yleensä hematokriitti kulkee käsi kädessä hemoglobiiniarvon kanssa. Punasolujen määrä ja hematokriitti kertovat veren hapenkuljetuskapasiteetista ja nestetasapainosta. (Niemelä & Pulkki 2010, 249.)

*Hemoglobiini.* Hemoglobiini on voimakkaan punainen proteiini, joka sijaitsee punasolujen sisällä ja sitoo itseensä happea. Yleisimmin hemoglobiini määritetään spektrofotometrian avulla. (Niemelä & Pulkki 2010, 249.) Alentunut hemoglobiini on anemian merkki, jonka yleisin syy on raudanpuute. Anemia voi johtua myös esimerkiksi kroonisesta tulehduksesta, munuaissairaudesta tai B12-vitamiinin ja foolihapon puutoksesta. (Mustajoki & Kaukua 2008, 44.)

*Verihiutaleet.* Verihiutalelaskenta suoritetaan tavallisesti konelaskentana (Niemelä & Pulkki 2010, 251). Verihiutaleet osallistuvat veren hyytymistapahtumaan, ja kun niiden määrä on vähäinen, syntyy tavallista helpommin verenvuotoja. Normaalisti verihiutaleita on kuitenkin veressä paljon välttämätöntä määrää enemmän, joten määrän vähäinen lasku ei vielä aiheuta

vuotovaaraa. Trombosyyttien määrä vähenee maksasairauksissa ja jatkuvasti selvästi koholla oleva verihiutaleluku voi kertoa luuytimen sairaudesta. (Mustajoki & Kaukua 2008, 49.)

*Valkosolut ja erittelylaskenta.* Valkosolujen laskennassa ja erittelylaskennassa käytetään yleisimmin edellä kuvattuja impedanssiin tai valon sirontaan perustuvia menetelmiä. Eri laitteiden kyky tunnistaa valkosolutyypit toisistaan vaihtelee, yksinkertaisimmat laitteet erittelevät valkosolut kolmeen luokkaan. Kaikista näytteistä automaatti ei selviä, jolloin on suoritettava manuaalinen laskenta sivelynäytteestä. (Niemelä & Pulkki 2010, 250–251.) Valkosolujen kokonaismäärä kasvaa tavallisesti bakteeritulehduksissa ja pienenee joissakin virustaudeissa. Harvinaisissa luuytimen sairauksissa valkosolujen määrä voi olla hyvin pieni. (Mustajoki & Kaukua 2008, 47–48.)

Leukopenia on sairaus, jossa luuydin valmistaa hyvin vähän valkosoluja. Elimistö elää symbioosissa bakteerien kanssa, ja limakalvot altistuvat jatkuvasti erilaisille bakteereille, joista osa on haitallisia. Valkosolujen määrän pudotessa bakteerit voivat siirtyä limakalvoilta ympäröivään kudokseen. Kahden päivän kuluessa siitä, kun luuydin lakkaa valmistamasta valkosoluja, voi kehittyä vakava hengitystietulehdus sekä suun- ja paksusuolen limakalvoille voi kehittyä haavaumia. Hoitamattomana tila voi johtaa kuolemaan jo viikon sisällä. (Guyton & Hall 2006, 436–437.) Leukemiassa valkosolujen tuotanto kasvaa huomattavasti. Syöpä aiheuttaa valkosoluja tuottavien kudosten lisääntymisen ja siten kasvaneen valkosolujen määrän veressä. Usein leukemiassa syntyvät valkosolut ovat epänormaaleja. Jatkuva kiihtynyt tuotanto vaatii paljon ravintoaineita mikä vie resursseja normaaleilta prosesseilta. (Guyton & Hall 2006, 437.)

Myös eri valkosolutyyppien määrä veressä voi poiketa normaalista. Neutropeniassa neutrofiilien määrä laskee alle  $1,5 \cdot 10^9$  /litra. Sairauden oireena on lisääntynyt infektioaltuus. Syynä voi olla esimerkiksi vähentynyt neutrofiilien muodostus tai niiden lyhentynyt elinikä. Neutrofiliaassa neutrofiilien määrä kasvaa yli  $7,5 \cdot 10^9$  /litra. Syynä neutrofiliaan voi olla esimerkiksi tulehdus tai kudonvaurio. Fyysinen rasitus aiheuttaa valkosolujen siirtymistä ve-

risuonten seinämistä verenkiertoon, mikä myös voi aiheuttaa poikkeavan suuren neutrofiilimäärän veressä. Eosinofiilien kohonnut määrä viittaa esimerkiksi allergiseen sairauteen, parasiitti-infektioon tai ihotautiin ja normaalia matalampi määrä fyysiseen tai psyykkiseen stressiin. Lymfopeniassa lymfosyyttien määrä laskee alle  $1,0 \cdot 10^9$  /litra. Alhainen lymfosyyttien määrä voi johtua mm. synnynnäisestä immuunijärjestelmän vajaustilasta tai jostakin pahanlaatuisesta taudista. (Penttilä 2003, 302.) Lymfocytoosissa lymfosyyttien määrä kohoaa yli  $4,0 \cdot 10^9$  /litra. Lymfocytoosi liittyy moniin infektioihin sekä lymfoomaan ja lymfaattiseen leukemiaan. Monosytoosissa veren monosyyttien määrä on yli  $0,8 \cdot 10^9$  /litra. Monosytoosi on tyypillistä tiettyjen infektioiden paranemisvaiheessa. (Penttilä 2003, 303.) Basofiiliaa, eli veren basofiilimäärän nousua yli  $0,1 \cdot 10^9$  /litra aiheuttaa mm. preleukemia, yliherkkyysreaktiot ja altistus radioaktiiviselle säteilylle. (Penttilä 2003, 302.)

### 3.3 CRP

CRP eli C-reaktiivinen proteiini on pääosin maksan tuottama valkuaisaine, jonka määrä veressä kasvaa monenlaisissa tulehduksissa (Aguiar ym. 2012; Mustajoki & Kaukua 2008, 53). CRP reagoi nopeasti, sen määrä kasvaa jo muutaman tunnin kuluessa tulehduksen alusta (Mustajoki & Kaukua 2008, 53). CRP reagoi selvästi voimakkaammin bakteeritulehduksissa kuin virustaudeissa ja se on laskoa spesifimpi tulehdustilojen tunnistamisessa (Aguiar ym. 2012; Mustajoki & Kaukua 2008, 54). Laskon tavoin CRP ei myöskään paljasta tulehduksen aiheuttajaa (Penttilä 2003, 395).

Matala-asteiset tulehdustilat nostavat CRP-arvon välille 10–40 mg/l ja vakavammat tulehdukset välille 40–200 mg/l (Aguiar ym. 2012). CRP:tä seurataan usein antibiootihoidon yhteydessä, koska CRP:n muutosten avulla voidaan tarkkailla hoidon tehokkuutta. Laskon tapaan CRP voi nousta monissa sellaisissakin tilanteissa, joissa ei ole kyse hoitoa vaativasta sairaudesta. (Mustajoki & Kaukua 2008, 54.)

CRP:n lisäksi käytössä on hsCRP, eli herkkä CRP. Herkkä CRP on muuten samanlainen menetelmä kuin CRP, mutta se havaitsee paljon pienemmät C-reaktiivisen proteiinin tasot

veressä. hsCRP:n avulla voidaan havaita 0,3 mg/l ja korkeammat C-reaktiivisen proteiinin pitoisuudet. (Aguiar ym. 2012.) Bassuk ym. (2004) mukaan hsCRP:tä voidaan käyttää sydän- ja verisuonisairauksien riskin arvioimiseen, mutta suhteellisen uutena menetelmänä siitä ei ole vielä riittävästi kokemusta. Aguiar ym. (2012) kuitenkin kyseenalaistavat kokeen käyttökelpoisuuden sydän- ja verisuonisairauksien riskin arvioimisessa ja painottavat oikean CRP-menetelmän valintaa. CRP soveltuu parhaiten akuuttien tulehdusten havaitsemiseen, ja hsCRP käyttö vaikuttaa rajoittuvan lähinnä sepelvaltimotaudin riskin arvioimiseen (Aguiar ym. 2012). He toteavat, että ei ole olemassa yhtä testiä, jolla tulehdustilat voidaan luotettavasti havaita, vaan tarvitaan useita CRP- ja laskokokeita.

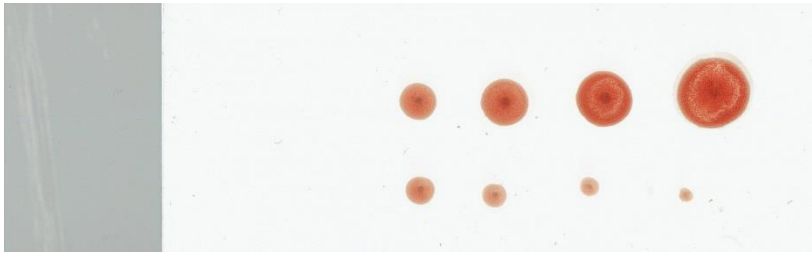
## 4 KUIVAVERIMENETELMÄ

Kuivaverimenetelmässä sormenpään päälle puristetusta pisarasta painetaan näytelasille useita näytepisaroita, joiden annetaan kuivua. Menetelmän kehitti Goldberger (1939) nopeaksi tavaksi mitata lasko. Kuivuvaan vereen syntyy sairaustiloissa valkoisia alueita, joiden määrä on liitetty tulehdustiloihin ja syöpään (Bolen 1942 ja 1952; Norman & Slicher 1950; Nickel ym. 1951; Avitable ym. 1968; Pinskaya & Sergeeva 1973; Sergel ym. 1976). Veripisaran kuivuessa sen sisältämällä biologisilla ainesosilla on taipumus järjestäytyä vyöhykkeittäin, tähän vaikuttavat erilaiset fysiologiset tekijät, kuten pisaran sisään syntyvät virtaukset (Tarasevich 2004). Droppi Veripalvelu Oy on kehittänyt digitoimiseen ja tietokonealgoritmeihin perustuvan menetelmän kuivaverinäytteiden koneelliseen analyysiin. Menetelmä tuottaa näytteen punaisuutta kuvaavan prosenttiluvun (Huttunen 2013). Kuivaverinäytteissä on nähtävissä myös erilaisia valkoisten ja mustien alueiden muodostamia profiileja. Droppi Veripalvelu Oy pyrkii tulevaisuudessa luomaan algoritmit näiden profiilien tunnistamiseksi koneellisesti ja siten jakamaan kuivaverinäytteiden punaisuutta kuvaavan prosenttiluvun eri osakomponentteihin sekä mahdollisesti yhdistämään osakomponentit fysiologisiin muuttujiin.

### 4.1 Yleistä

Kuivaverimenetelmässä sormenpäästä otetaan veripisaroita lasilevylle ja niiden annetaan kuivua (kts. kuva 8). Pisaroiden kuivuminen kestää noin 5–10 minuuttia, kuivumisaika riippuu ensisijaisesti lämpötilasta, ilmankosteudesta ja veren koostumuksesta. Veripisaran kuivuessa syntyy pisaran säteen suuntaisia nestevirtauksia, jotka vaikuttavat veren ainesosien vyöhykkeittäiseen sijoittumiseen näytteessä. (Tarasevich 2004.) Ainesosien vyöhykkeittäinen sijoittuminen tuottaa kuivaveriprofiilin, jossa erilaiset piirteet sijoittuvat niille ominaiselle etäisyydelle näytteen keskipisteestä (kts. kuva 9). Biologisista nesteistä otettujen pisaranäytteiden kuivumiseen liittyvät prosessit tuottavat hyvin toistettavissa olevia tuloksia (Tarasevich 2004).

Sormenpään puristetusta veripisarasta otetaan monta näytepisaraa lasilevyille (kuva 8), jolloin pisaroiden koko pienenee näytteenoton edetessä. Näin toimitaan, koska tietyt profiilit näkyvät vain pienissä pisaroissa ja toiset vain suurissa. Samalta henkilöltä lyhyen aikavälin sisällä otetut näytteet ovat kokonaisuudessaan hyvin samankaltaisia ja toistettavissa.



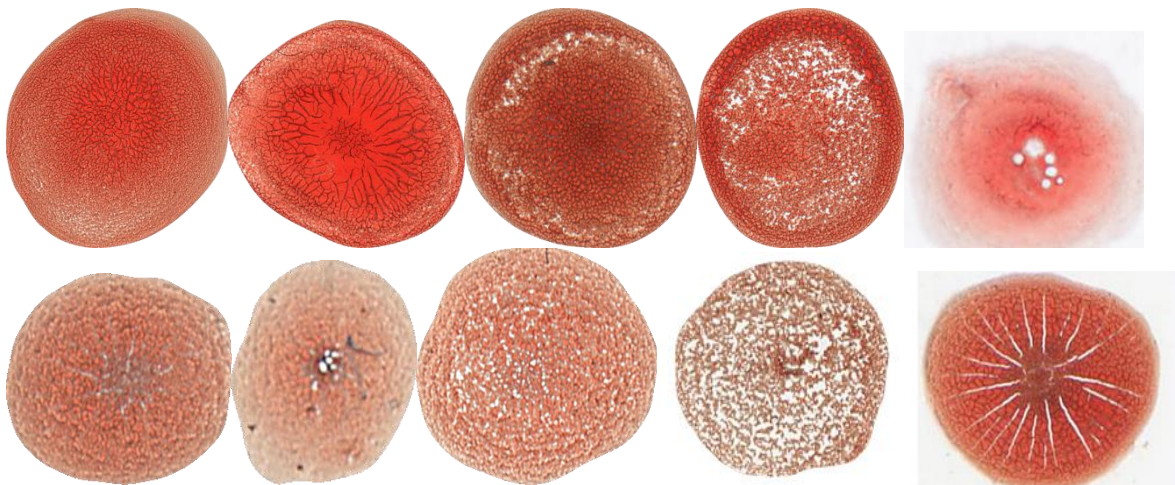
KUVA 8. Näytelasille otettu kuivaverinäyte. Yhdelle näytelasille otetaan 8 näytepisaraa samasta sormenpääverinäytteestä.



KUVA 9. Kuivaverinäytteen profiilien vyöhykkeittäisyys.

Kuivaverinäytteistä voidaan tunnistaa monta toisistaan selvästi erotettavissa olevaa visuaalista profiilia. Erilaisia profiileja on esitetty kuvassa 10. Profiilien liittämiseksi fysiologisiin muuttujiin tarvitaan lisätutkimusta. Useimmat kuivaveren profiilit ovat tulkittavissa visuaalisesti jo pienillä suurennuksilla. Terve veri näkyy kuivaverinäytteessä punaisena ja erilaiset

epätasapainotiloihin viittaavat profiilit joko valkoisena tai mustana. Visuaalisen menetelmän suurin rajoitus on sen subjektiivisuus. Droppi Veripalvelu Oy on kehittänyt tietokonealgoritmit, jotka laskevat koneellisesti valkoisten ja mustien pikseleiden suhteen punaisiin. Algoritmien antamaa prosenttiarvoa nimitetään kuivaveren puhtausprosentiksi (Huttunen 2013).



KUVA 10. Kuivaverinäytteissä esiintyviä profiileja (Droppi Veripalvelu Oy).

Kuivaverimenetelmä voi soveltua terveyden mittaamiseen, ja seulontatutkimukseen, jossa elimistön kunnosta saadaan laajasti tietoa. Saadun tiedon perusteella potilas voidaan ohjata erilaisiin jatkotutkimuksiin. Menetelmän etuja ovat sen matala hinta, nopeus, yksinkertaisuus, näytteiden säilyvyys ja se, että kemiallista erikoisvälineistöä ei tarvita (Goldberger 1939). Menetelmän täyden potentiaalin hyödyntämiseksi on tehtävä lisätutkimusta valkoisuuteen vaikuttavista osakomponenteista ja pyrittävä kehittämään tietokonepohjaiset algoritmit näiden tunnistamiseksi.

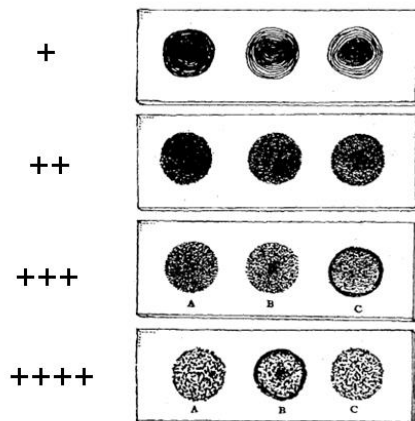
## 4.2 Historia

Kuivaverikoe sai alkunsa pyrkimyksenä luoda nopea menetelmä laskon mittaamiseen (Goldberger 1939), minkä jälkeen sen käyttöä syövän havaitsemisessa on tutkittu laajasti (Bolen 1942 ja 1952; Norman & Slicher 1950; Nickel ym. 1951; Avitable ym. 1968; Pinskaya & Sergeeva 1973; Sergel ym. 1976). Menetelmä on osoittautunut hyväksi erityisesti tulehdustilojen havaitsemisessa (Nickel ym. 1951; Avitable ym. 1968; Pinskaya & Sergeeva 1973). Droppi Veripalvelu Oy kehitti vuonna 2013 konenäköön pohjautuvan menetelmän kuivaverinäytteiden analysointiin (Huttunen 2013).

Yksinkertaisen, kolmen kuivuneen veripisaran tarkasteluun perustuvan menetelmän keksi Emanuel Goldberger (1939). Hän kehitti kuivaverimenetelmän nopeaksi ja helpoksi tavaksi mitata lasko silloin, kun perinteiseen laskon mittaukseen tarvittavia välineitä ei ole saatavilla (Goldberger 1939). Perinteisessä laskon mittauksessa veri otetaan ohueen kapillaariputkeen, jonka toinen pää on suljettu. Veren ottamisen jälkeen putken annetaan olla paikallaan pystyasennossa tunnin ajan. Laskoarvo kertoo, kuinka korkea punasolupatsas on kerrostunut putken pohjalle. Suuri laskoarvo viittaa krooniseen tulehdukseen.

Goldberger (1939) teki myös kokeen, jossa hän vertasi suurta määrää kuivaverikokeen tuloksia samalta henkilöltä saatuun laskoarvoon. Hän tarkasteli näytteitä mikroskoopilla ja luokitteli ne + -merkkejä käyttäen neljään ryhmään valkoisuuden perusteella (kts. kuva 11). Goldberger (1939) käytti laskon mittaamiseen 5 mm halkaisijaltaan olevaa putkea jossa oli merkit 6, 12 ja 18 mm kohdalla. Hän kaatoi ensin 2 millilitraa natriumsitraattia putkeen, minkä jälkeen hän lisäsi verta 10 mm kohdalle. Sitraatin ja veren sekoittamisen jälkeen Goldberger (1939) antoi putken olla paikallaan ja mittasi ajan, joka kului punasolujen vajoamiseen 18 millimetrin merkin kohdalle. Goldberger (1939) käytti yksinkertaista taulukkoa (kts. kuva 12) laskoarvojen ja kuivaverinäytteistä saatujen tulosten vertailuun.





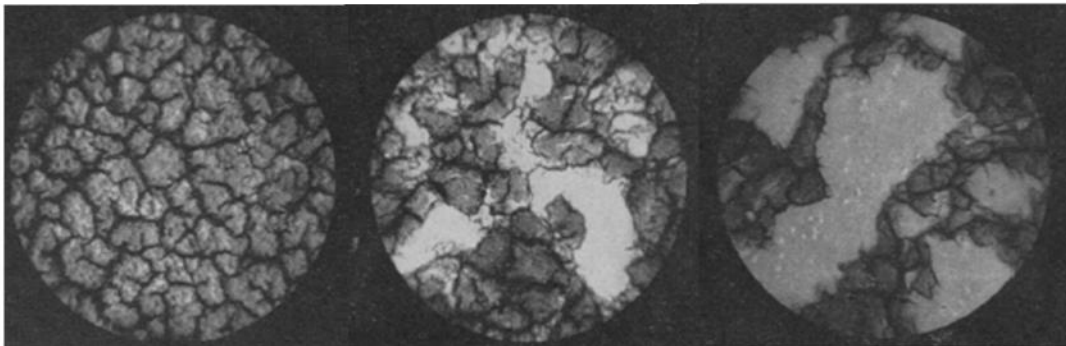
KUVA 11. Goldbergerin käyttämä neliportainen asteikko. Goldberger luokitteli kuivaveripisarot niiden valkoisuuden mukaan neljään ryhmään. Ylimmän kuvan renkaat eivät liity valkoisuuteen vaan pyrkivät havainnollistamaan tasaista siirtymää reunojen vaaleammista alueista kohti tummempaa keskustaa. Kuvat esittävät jatkumon ylimpien pisaroiden terveen ihmisen verestä alimpien kuvien hyvin sairaaseen vereen. Kahden alimman kuvan C ja B pisarat esittävät näytteenotossa syntyneitä näytteiden paksuuntuneita reunoja. Goldberger ei huomioinut paksuuntuneiden reunojen vaikutusta näytteiden luokittelussa. (Goldberger 1939.)

TABLE I

UNSPREAD BLOOD FILM	AVERAGE SEDIMENTATION RATES*
+	One and a half hours
++	45 † minutes
+++	25 † minutes
++++	18 minutes

KUVA 12. Goldbergerin havaitsema yhteys kuivaverikokeen ja laskon välillä. Verinäytteet, joiden punasolujen laskeutumisnopeus oli hitain, tuottivat myös puhtaimmat kuivaverinäytteet. Eniten valkoisia alueita sisältävien näytteiden (++++) punasolujen laskeutumisnopeus oli kaikkein nopein. Taulukon perusteella laskon ja kuivaverinäytteiden valkoisuuden välillä on lineaarinen yhteys. (Goldberger 1939.)

Aikaisempi tutkimustieto viittasi siihen, että laskoarvo kohoaa syövän vaikutuksesta (Bolen 1942). Goldbergerin (1939) kokeen innoittamana H. Leonard Bolen alkoi tutkia kuivaverimenetelmää syövän tunnistamisessa, toivoen löytävänsä helpon ja nopean tavan syövän aikaiseen havaitsemiseen. Bolen (1942) otti sormenpään tehdyistä reiästä näytelasille kolme pisaraa ja tutki pisaroita niiden kuivuttua mikroskoopilla. Yli 4000 näytettä tutkittuaan Bolen (1942) havaitsi, että paljon valkoisia alueita sisältävät kuivaverinäytteet kuuluivat syöpäpotilaille ja pernisiöösiä anemioita sairastaville. Muutamissa tapauksissa myös nivelreumaa sairastavien, sekä raskauden loppukuukausilla olevien äitien veri sisälsi runsaasti valkoisia alueita. Syöpäkasvainten onnistuneen poistamisen jälkeen valkoiset alueet katosivat kuivaverinäytteestä noin kuudessa viikossa. Bolen (1942) kokeili menetelmän luotettavuutta 140:llä henkilöllä, joilla oli todettu syöpä. Menetelmä antoi 128 positiivista tulosta, joten tarkkuus oli 91,4 %. Bolen (1942) kuitenkin totesi, että menetelmän luotettavuus riippuu voimakkaasti näytteenoton onnistumisesta. Bolenin (1952) havainnot syövän näkymisestä kuivaverinäytteissä on esitetty kuvassa 13.



KUVA 13. Syövän etenemisen näkyminen kuivaverinäytteissä Bolenin mukaan. Vasemmalta oikealle: tervettä verta, alkava syöpä ja täysin kehittynyt syöpä. (Bolen 1952.) Näytteet ovat suurennoksia, eivät kuvaa koko pisaraa.

Norman & Slicher (1950) tekivät kokeen, jossa 350 potilaan kliinistä dataa verrattiin kuivaverikokeen tuloksiin. Menetelmän tarkkuudeksi syövän tunnistamisessa saatiin 97 %. Nickel ym. (1951) pyrkivät toistamaan Normanin ja Slicherin (1950) saaman tuloksen ja

käyttivät samanlaista tutkimusasetelmaa. Kuivaverikokeen avulla tunnistettiin 48 syöpätapauksesta 46. Toisaalta menetelmä antoi myös positiivisen tuloksen 26 ihmiselle 80:stä, joilla ei ollut syöpää. Normanin ja Slicherin (1950) ja Nickelin ym. (1951) tulokset vahvistivat, että kuivaverikokeella voidaan melko luotettavasti tunnistaa syöpätapaukset, mutta myös monet muut tulehduksenomaiset sairaustilat ja raskaus tuottavat positiivisen tuloksen. Sergel ym. (1976) tutkivat kuivaverimenetelmän tarkkuutta 1862 henkilöllä. Menetelmällä tunnistettiin pahanlaatuinen syöpä, mutta positiivisia tuloksia tuli myös raskaana olevilta naisilta, ja erilaisten pitkäaikaisten ja akuuttien tulehdustilojen seurauksena.

Whiten ym. (1952) tulokset eroavat edellisistä, tutkimusryhmän saamien tulosten perusteella kuivaverikokeen tarkkuus pahanlaatuisen syövän tunnistamisessa on vain 68,4 %. White ym. (1952) vertasivat kuivaverimenetelmän antamia tuloksia koepalasta tai vaihtoehtoisesti ruumiinavauksesta saatuihin tietoihin. Kaikissa tutkimuksissa näytteenotto suoritettiin käsin ja arviointi tehtiin silmämääräisesti, mikä myös selittää eroja eri tutkijoiden saamien tulosten välillä.

Pinskayan & Sergeevan (1973) tekemä tutkimus tuotti samankaltaisia tuloksia kuin Norman & Slicherin (1950) ja Nickel ym. (1951) tutkimukset. Pinskaya & Sergeeva (1973) toteavat yhteenvedossaan, että kuivaverikoe tuottaa negatiivisen tuloksen käytännössä kaikilla terveillä potilailla, mutta myös negatiivisia ja neutraaleja tuloksia hyvänlaatuisten kasvainten tapauksissa. Koe tuottaa voimakkaimmat positiiviset tulokset pitkälle edenneessä syövässä ja voimakkaissa tulehdustiloissa. Pinskayan & Sergeeva (1973) toteavat, että kuivaverikoe ei ole riittävän spesifi syövän tunnistamiseen, mutta sitä voidaan käyttää yhdessä muiden tutkimusmetodien kanssa diagnoosin varmistamiseksi.

Avitable ym. (1968) tutkivat kuivaverimenetelmää ja laskoa kurkunpään syöpää ja nielu-  
risatulehdusta sairastavalla potilasryhmällä sekä terveillä ihmisillä. Terveiden ihmisten kuivaverinäytteet olivat tasaisesti verkottuneita eikä valkoisia alueita ollut näkyvissä. Nielu-  
risatulehduksesta kärsivien näytteissä näkyi valkoisia kasaumia, mutta kurkunpään syöpää  
sairastavilla kasaumat olivat huomattavasti suurempia. Sekä tulehdusta että syöpää sairasta-

vien laskoarvot erosivat normaalista, mutta laskoarvot ja kuivaveritestin muutokset eivät aina olleet samansuuruisia.

Edellä mainituista tutkimuksista voidaan päätellä, että kuivaverimenetelmällä voidaan havaita kehon tulehdustiloja. Tästä huolimatta menetelmän tutkimus on hiipunut viime vuosikymmeninä. Biologisten nesteiden kuivumiseen liittyvää kuvionmuodostusta ja kuivaseerumin käyttöä diagnostisena apuvälineenä on kuitenkin tutkittu edelleen (Yakhno ym. 2005; Killeen ym. 2006).

### **4.3 Dropper-kuivaverimenetelmä**

Heitan, LaGarde, Bradford ja Young ovat tutkineet kuivaveren muodostamien profiilien yhteyttä fysiologisiin muuttujiin ja sairauksiin, mutta aiheesta ei ole tieteellisiä julkaisuja. Droppi Veripalvelu Oy alkoi kehittää Youngin tekemän tutkimustyön pohjalta edullista, luotettavaa ja nopeaa menetelmää terveyden mittaamiseen sekä seulontatarkoituksiin. Vuonna 2013 Aki Huttunen teki diplomityönään Droppi Veripalvelu Oy:lle tietokonealgoritmit, jotka pilkkovat digitoidut näytteet erillisiksi pisaroiksi ja laskevat niiden ”puhtausprosentin” koneellisesti. Tämä mahdollistaa verinäytteiden punaisuuden objektiivisen tarkastelun ja analyysin. Droppi Veripalvelu Oy pyrkii tulevaisuudessa luomaan kaikkien merkittävien kuivaveren piirteiden ja valkoisuuden osakomponenttien analyysiin algoritmit ja selvittämään näiden fysiologiset yhteydet.

Droppi Veripalvelun kehittämä menetelmä pohjaa Goldbergerin (1939) ja Bolenin (1942, 1952) tutkimuksiin, joissa kuivaverinäytteeseen syntyvien värillisten muodostumien todettiin korreloivan laskoarvon kanssa sekä liittyvän syöpään ja erilaisiin kehon tulehdustiloihin. Diaskannaus- ja konenäkötekniikan kehittyminen on mahdollistanut näytteiden analysoinnin koneellistamisen.

*Näytteenotto.* Sormenpään, tai sormenpään sivun iho puhkaistaan kertakäyttöisellä, jousitoimisella lansetilla. Sormenpäätä puristetaan kevyesti, jolloin sormenpään päälle syntyy veripisara. On tärkeää, että sormenpäätä ei puristeta liian voimakkaasti, koska suuri paine saattaa muuttaa veripisaran koostumusta. Sormenpäähän puristettavat veripisarot on myös pyrittävä pitämään tasakokoisina. Ensimmäinen veripisara pyyhkäistään pois. Toisen sormenpään päälle puristetun veripisaran annetaan kuivua noin 30 sekuntia, näin ensimmäiset pisarat tarttuvat paremmin näytelasille. Näytelasi painetaan pisaraan 8 kertaa mahdollisimman kohtisuoraan pisaran pintaan ja sormenpään ihoon nähden. Pisaroiden koko riippuu sormenpäähän puristetun veripisaran tilavuudesta. Jokaisella painalluksella näytelasin tulee koskettaa hyvin kevyesti sormenpäätä. Tällä varmistetaan, että suuretkin pisarat leviävät tasaisena kalvona näytelasille sekä painallusvoiman pysyminen samansuuruisena.

Näytteenoton lopputuloksena näytelasilla on kahdeksan vaihtelevan kokoista näytepisaraa. Pisaroiden koko pienenee näytteenoton edetessä, koska sormenpäähän puristetun veren määrä vähenee. Jokaisessa näytteenotossa otetaan A- ja B-näyte menetelmän varmuuden lisäämiseksi. Kokonaisnäyte sisältää siis kaksi näytelasia, joilla on yhteensä 16 veripisaraa. Näytteiden annetaan kuivua paikallaan häiritsemättä noin 5–10 minuuttia. Kuivumisaika riippuu ensisijaisesti pisaroiden koosta, ilmankosteudesta ja veren koostumuksesta. Sisällä otettujen näytteiden kuivumisaika ei juuri vaihtele, mutta kosteassa ulkoilmassa näytteen kuivuminen saattaa kestää pitkään. Esimerkiksi kohdistamalla lämpölamppu kuivuvaan näytteeseen, saadaan kuivumisaikaa huomattavasti lyhennettyä. Hyvin nopea kuivatus tosin voi vaikuttaa näytteiden laatuun, koska kuivumisnopeus vaikuttaa pisaran kuivumismekanismiin (Tarasevich 2004).

*Näytteen analysointi.* Kuivunut näyte digitoidaan diaskannerin avulla ja digitoitu näyte ajetaan tietokonealgoritmien läpi. Tietokonealgoritmit erottelevat hyytyneet pisarat näytelevyiltä ja hylkäävät mahdolliset huonot näytepisarat. Lopuksi algoritmit laskevat kaikkien pisaroiden valkoisten ja tummien alueiden pikselimäärän suhteen pisaroiden punaisten alueiden pikselimäärään ja ilmoittavat ”verenpuhtausarvon” prosenttilukuna. (Huttunen 2013.)

Näytteissä olevien piirteiden sävyt vaihtelevat. Vaihtelu on suurinta punaisen sävyissä, koska kuivuneen veren sävy vaihtelee hieman henkilöittäin ja verikalvon paksuus vaikuttaa huomattavasti punaisen sävyn tummuuteen. Käytetyn skannerityypin ominaisuudet vaikuttavat myös jonkin verran digitoidun näytteen värisävyihin ja siten algoritmin antamaan tulokseen (Droppi Veripalvelu Oy). Punaisten, valkoisten ja tummien alueiden piirreavaruus on muodostettu näytepisaroiden värihistogrammeja käyttäen ja alueiden luokittelu tapahtuu tukivektoriregression avulla. Menetelmällä määritettyjen samalta henkilöltä samalla näytteenottokerralla otettujen näytteiden korrelaatio on varsin hyvä, Pearsonin korrelaatiokerroimen arvoksi on saatu 0,863 merkitsevyytätasolla  $p \leq 0,001$ . (Huttunen 2013.)

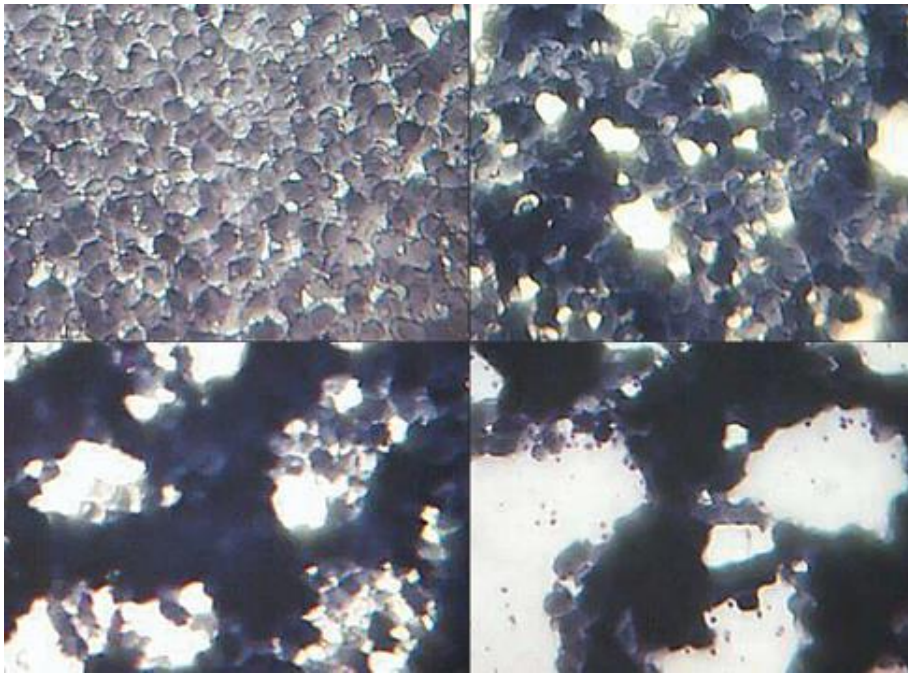
#### **4.4 Muut veripisaran kuivumiseen liittyvät menetelmät**

Veripisaroiden kuivumiseen liittyviä menetelmiä on kehitetty useita. Lähimpänä kuivaverianalyysiä voidaan ajatella olevan EAAT (Erythrocyte Aggregation/Adhesiveness Test) ja DBS (Dried Blood Spot) -menetelmien, koska molemmissa analysoidaan koko verta. EAAT-menetelmässä veri kuitenkin käsitellään sitraatilla ja DBS-menetelmässä se imeytetään suodatinpaperiin. Sekä DMC (Droplet MicroCromatography) että Seerumin AMI (Acoustic-Mechanical Impedance) -menetelmissä analysoidaan verestä erotettua seerumia. Kaikki menetelmät eroavat selvästi Droppi Veripalvelu Oy:n kehittämästä menetelmästä.

*EAAT (Erythrocyte Aggregation/Adhesiveness Test).* EAAT perustuu sitratoidun veren kuivumiseen näytelasilla ja kuivuneen näytteen tarkasteluun visuaalisesti mikroskoopilla tai konenäköön perustuvalla menetelmällä. (Lakshmi ym. 2011.) Menetelmä on sitraatin käyttöä lukuun ottamatta melko samantyyppinen Dropper-kuivaverimenetelmän kanssa.

Menetelmässä 45-asteen kulmaan asetetun näytelasin yläosaan pipetoidaan suuri natriumsitraatilla suhteessa 1:3 sitratoidusta verestä koostuva pisara, jonka annetaan valua alas painovoiman vaikutuksesta (Rotstein ym. 2002). Veripisara jättää jälkeensä ohuen kalvon, jonka annetaan kuivua vaakatasossa huoneenlämmössä. Kalvosta täytyy ottaa kuvia eri kohdista kokonaiskuvan saamiseksi. (Lakshmi ym. 2011; Rotstein ym. 2002.) Lakshmi ym. (2011)

mukaan epäsuorana menetelmänä lasko kuvaa huonosti punasolujen yhteentakertumistai-  
pumusta. Punasolujen on todettu takertuvan yhteen verinäytteessä silloin, kun elimistössä on  
tulehdustila (Fåhræus 1921). Kliininen verimuuttuja lasko perustuu tähän ilmiöön (Musta-  
joki & Kaukua 2008, 41). EAAT pyrkii tarjoamaan suoremman menetelmän punasolujen  
yhteentakertumistai-  
pumuksen määrittämiseksi. EAAT-näytteiden koneelliseen analysointiin  
on kehitetty INFLAMET (INFLAmation METer) -analyysilaitteisto, joka analysoi ohjel-  
miston avulla tyhjien alueiden ja punasolujen täyttämien alueiden suhteita näytteissä. (Lak-  
shmi ym. 2011.) Kuvassa 14 on mikroskooppikuvia EAAT-menetelmällä saaduista näyt-  
teistä.



KUVA 14. Mikroskooppikuvia EAAT-menetelmällä saaduista näytteistä. Näytteet on vär-  
jätty. Tummat alueet ovat punasoluja ja vaaleat alueet tyhjiä. Mitä enemmän vaaleita alueita  
on, ja mitä suurempia ne ovat, sitä suurempi on punasolujen yhteentakertumistai-  
pumus.  
(Lakshmi ym. 2011.)

Rotstein ym. (2002) arvelevat tutkimuksensa pohjalta EAAT-menetelmän soveltuvan matala-asteisen kroonisen tulehduksellisen ja sairaustilojen havaitsemiseen yksilöillä, joilla on valtimonrasvoittumistautiin liittyviä riskitekijöitä. Lakshmi ym. (2011) saivat tutkimukseensa samansuuntaisia tuloksia. Rotstein ym. (2002) mukaan EAAT vastaa laskoa paremmin potilaiden terveydentilaa. Menetelmä on halpa, yksinkertainen ja nopea (Lakshmi ym. 2011). Rotstein ym. (2002) toteavat kuitenkin, että korvatakseen muita biomarkkereita, menetelmän olisi oltava helppokäyttöisempi, halvempi ja tarjottava lisäinformaatiota.

*DBS (Dried Blood Spot).* DBS-menetelmässä sormenpäähän tehdään pieni reikä lansetilla, ja sormenpäähän puristetaan veripisara, joka imeytetään suodatinpaperiin. Suodatinpaperille otetun pisaran annetaan kuivua. Näyte voidaan sulkea ilmatiiviiseen pussiin säilytystä ja kuljetusta varten tai se voidaan pakastaa säilyvyyden parantamiseksi. Kuivattaminen vähentää huomattavasti veressä olevien patogeeneiden leviämistä. (Parker & Cubitt 1999.)

Näytteen analysoimiseksi siitä leikataan halkaisijaltaan 4,7 mm olevia kiekkoja. Veri liuotetaan kiekkoista pitämällä niitä yön yli neljän asteen lämpötilassa fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa, joka sisältää 0.05 % Tween 80:ntä ja 0.005 % natriumatsidia. Saatuaan nesteen voidaan lisätä erilaisia bioreaktiivisia aineita, jolloin syntyvästä reaktiosta voidaan tehdä päätelmiä veren koostumuksesta. (Parker & Cubitt 1999.) Menetelmän etuja ovat helppo näytteenotto, näytteen kuljetettavuus, säilyvyys sekä se, että verta tarvitaan vain vähän (Parker & Cubitt 1999; Ganz ym. 2011). Perinteisen DBS-analyysin varjopuolia ovat tarve erikoislaitteistolle ja koulutetulle henkilökunnalle sekä se, että näytteen valmistelu analyysiä varten on tehtävä manuaalisesti. Näytteen analysointiin on kuitenkin kehitetty myös täysin automaattinen laitteisto, joka hyödyntää ohutkerroskromatografiaa ja massaspektrometriaa. Laitteistolla voidaan koneellisesti havaita farmakologisia aineita DBS-näytteistä. (Ganz ym. 2011.)

*DMC (Droplet MicroCromatography).* DMC-analyysi perustuu kuivuvaan seerumipisaraan muodostuviin piirteisiin. Killeen ym. (2006) kuvasivat seerumin kuivumista mikroskooppiin ja tietokoneeseen liitetyn kameran avulla. Tietokoneohjelmisto määrittäi kuivuneesta seeru-



mipisarasta erilaisia visuaalisia piirteitä kuten kirkkaus, juonteiden suunta, juonteiden lukumäärä, kirkkausvaihtelu ja värihistogrammi. Tutkijat huomasivat, että immunoglobuliinin määrä vaikutti voimakkaasti näytteiden ulkonäköön ja monessa tapauksessa jo visuaalinen tarkastelu riitti näytteiden luokitteluun. Killeen ym. (2006) toteavat, että DMC-analyysi on potentiaalinen diagnostinen apuväline, mutta menetelmän käyttöönotto edellyttää immunoglobuliinipitoisuuden määrittävän tietokoneohjelmiston kehittämistä.

*Seerumin AMI (Acoustic-mechanical impedance)*. Yakhno ym. (2005) havaitsivat, että kuivuva seerumipisara voidaan profiloida määrittämällä sen akustomekaaninen impedanssi. Tutkimusryhmä käytti ohutta ultraäänitaajuudella resonoivaa kvartsilevyä ja siihen liitettyä mittalaitteistoa mitataksaan kvartsilevyn päälle asetetun pisaran akustomekaanista impedanssia sen kuivuessa. Laitteisto piirsi kuvaajan kuivumistapahtuman aikaisesta AMI:sta ajan suhteen. (Yakhno ym. 2005.)

Pienikokoisia partikkeleita sisältävien pisaroiden reunat kiinnittyvät kuivumisalustaan, mikä aiheuttaa virtauksia pisaran sisään sen kuivuessa. Virtausten seurauksena kuivuvan pisaran sisältämät kiinteät aineet kulkeutuvat eri vyöhykkeille (kts. luku 3.5). Kuivuvassa pisarassa tapahtuva aineiden kulkeutuminen aiheuttaa vyöhykkeittäisiä faasimuutoksia pisarassa. Kuivumistapahtumat riippuvat pisaran koostumuksesta ja aiheuttavat muutoksia AMI:ssa. Näin laitteiston piirtämien kuvaajien avulla voidaan tutkia biologisia aineita sisältäviä nesteitä. (Yakhno ym. 2005.)

Yakhno ym. (2005) havaitsivat, että sairaiden ihmisten seerumin AMI-kuvaajat eroavat terveiden seerumin AMI-kuvaajista. Lisäksi sairauksille tyypilliset AMI-kuvaajat eroavat toisistaan. Myös raskauteen havaittiin liittyvän muutoksia seerumin AMI-kuvaajassa. Laitteiston etuja ovat nopeus (analyysi kestää noin 30 minuuttia), laaja informaatiokapasiteetti ja vähäinen invasiivisuus. Laitteiston rakennuskustannukset eivät myöskään ole korkeat. Menetelmä kuitenkin edellyttää, että seerumi ensin erotetaan verestä. (Yakhno ym. 2005.)

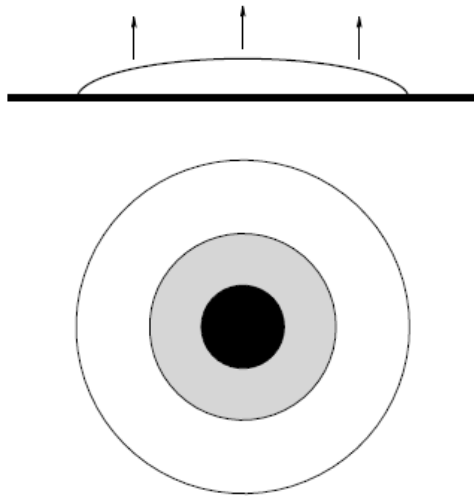
Dropper-kuivaverimenetelmä on edellä mainittuja menetelmiä yksinkertaisempi, koska siinä veri otetaan suoraan sormenpästä näytelasille ja analysoidaan sellaisenaan. Näytteenottoon tarvitaan vain lansetti ja näytelasi. Nopeuden, yksinkertaisuuden ja matalan hinnan takia Dropper-kuivaverimenetelmä saattaa tarjota vaihtoehdon punasolujen keräytymistäipumuksen ja siten elimistön tulehdustilan tarkasteluun. Menetelmän informaatiokapasiteetti voi osoittautua melko suureksi, mikäli kuivuneisiin veripisaroihin muodostuville profiileille löydetään yhteyksiä fysiologisiin muuttujiin ja pystytään luomaan ohjelmisto näiden profiilien tunnistamiseksi.

#### 4.5 Pisaran kuivumisen fysiikkaa

Tässä luvussa käsitellään biologisten nestepisaroiden kuivumiseen liittyviä ilmiöitä. Biologisilla nesteillä tarkoitetaan organismien elintoimintoihin liittyviä nesteitä, joita ovat esimerkiksi veri, seerumi, soluneste ja virtsa. Saatavilla oleva tutkimusaineisto rajoittuu kuitenkin lähinnä seerumin tutkimukseen.

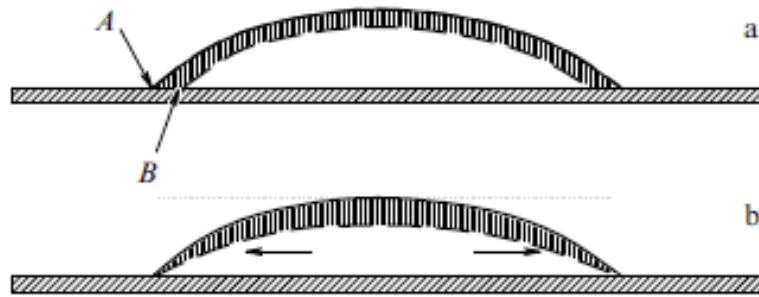
Biologiset nesteet sisältävät veden lisäksi muita aineita, joista osa on pieniä kiinteitä partikkeleita, esimerkiksi soluja. Partikkelit muodostavat kolloidin, mikä tarkoittaa, että ne ovat hienojakoisuutensa takia täysin sekoittuneet ja jakautuneet tasaisesti nesteeseen. Partikkelit kiinnittävän kuivuvan pisaran reunat alustaan, mikä vaikuttaa voimakkaasti pisaran kuivumiskäyttäytymiseen. (Tarasevich 2004.) Seuraavassa kuvatut kuivumismekanismit selittävät kuivuvassa näytepisarassa tapahtuvaa aineiden vyöhykkeittäistä järjestymistä. Lisäksi näytteiden kuivumiseen vaikuttaa todennäköisesti veren hyytyminen, joka on kuvattu luvussa 1.5.

Biologisten nesteiden kuivumiseen liittyviä biofysikaalisia, biokemiallisia ja biologisia mekanismeja on tutkittu laajalti, mutta niitä ei ole kyetty täysin selittämään. Tutkimusten perusteella tiedetään, että proteiinit kerääntyvät pääasiassa kuivuvan pisaran reuna-alueelle ja suolat kristalloituvat pisaran keskiosaan. Näiden kahden alueen välille jää siirtymäalue, joka sisältää molempia (kts. kuva 15). (Tarasevich 2004.)



KUVA 15. Ylempi kuva kuvaa pisaran pinnanmuotoa ja nesteen haihtumista. Alempi kuva havainnollistaa aineiden vyöhykkeittäistä sijoittumista pisarassa. Mustalle alueelle kristalloituu suoloja ja valkoiselle proteiineja. Harmaalla alueella on molempia. (Tarasevich 2004.)

Biologisen pisaran sisältämät kolloidipartikkelit kiinnittävät sen reunat kuivumisalustaan. Tarasevich (2004) esittää biologisten pisaroiden kuivumista käsittelevässä review-artikkelissaan, että pisaran reunojen kiinnittyminen alustaan ja yhtäaikainen nesteen haihtuminen pisaran pinnasta aiheuttavat nestevirtauksen, joka kuljettaa partikkeleita kohti pisaran reunoja (kts. kuva 16). Reunojen kiinnittymistä on tutkittu erilaisilla hyvin sileillä ja liukkailla alustoilla. Biologisilla pisaroilla on taipumus kiinnittyä myös hyvin sileisiin alustoihin. Teflonpinnalla kiinnittymistä ei kuitenkaan tapahtunut ja pisaran pinta-ala kutistui sen kuivuessa. Kolloidipisaran kuivumiseen liittyviä ilmiöitä on tutkittu myös käyttäen erilaisia liuottimia. Tutkimusten perusteella havaittiin, että tässä luvussa esitetyt mekanismit säilyivät hyvin samanlaisina vaihtelevissa olosuhteissa ja tutkimusasetelmissä. (Tarasevich 2004.)

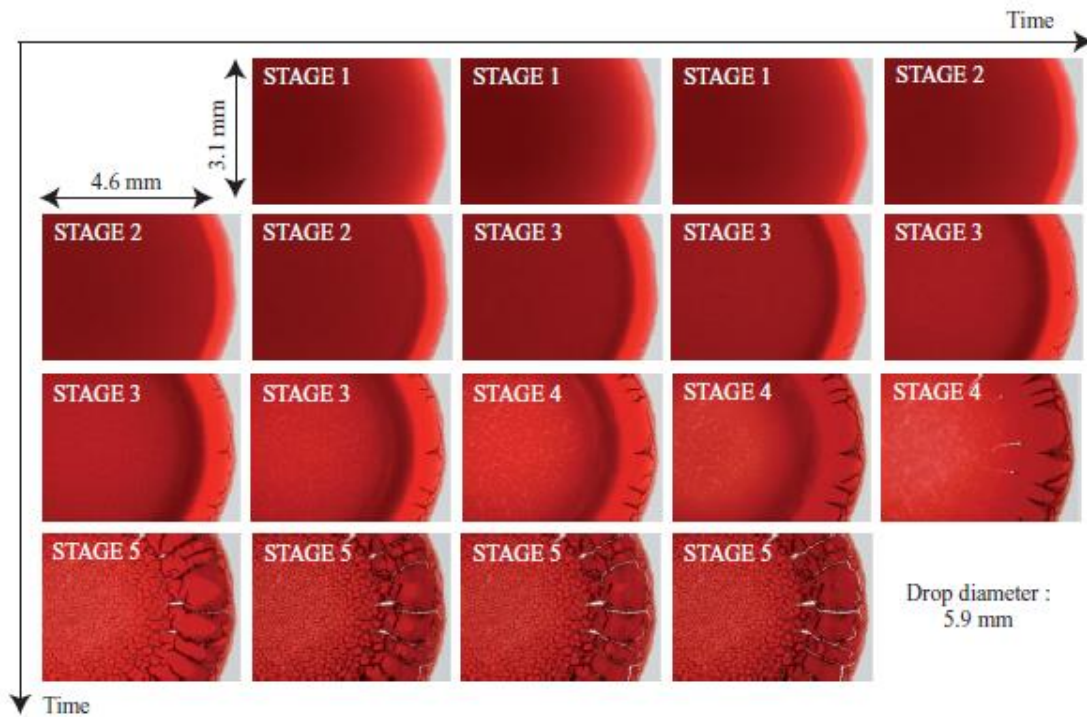


KUVA 16. Reunoiltaan alustaan kiinnittyneen pisaran kuivumiskäyttäytyminen. Ylempi kuva kuvaa pisaraa, jonka reunat voivat liikkua vapaasti. Alemman pisaran reunat ovat kiinni alustassa, ja nestevirtaus pisaran keskeltä estää pisaran reunojen vetäytymisen pisteestä A pisteeseen B. (Tarasevich 2004.)

Kuivuvan nestepisaran pintaan syntyy pisaran keskipistettä kohti eteneviä virtauksia Marangoni-vaikutuksen takia (Tarasevich 2004). Pisaran kuivuminen edellyttää haihtumista, mikä puolestaan vaatii paljon energiaa. Pisaran sisäosien täytyy tarjota lämpöenergia pisaran pintaosille, missä haihtuminen tapahtuu. Lämmön siirtyminen aiheuttaa nestevirtausta kohti pisaran pintaa. Lämpötilan muutokset pisaran sisällä voivat johtaa epävakauteen, koska pintajännitys riippuu lämpötilasta. Nesteellä on taipumus siirtyä kohti suuremman pintajännityksen alueita, mikä aiheuttaa nestevirtauksia pisaran pinnassa. Nesteen taipumusta siirtyä kohti suuremman pintajännityksen alueita kutsutaan Marangoni-ilmiöksi. (Hegseth ym. 1996.) Biologisten pisaroiden tapauksessa pisaran sisällä syntyvien konsentraatioerojen voidaan kuitenkin olettaa vaikuttavan nestevirtausten syntymiseen Marangoni-vaikutusta enemmän. Edellä mainitut fysikaaliset mekanismit aiheuttavat konsentraatioeroja pisaran sisällä, ja kuivumisen edelleen jatkuessa aineiden konsentraatiot edelleen kasvavat, mikä aiheuttaa muun muassa kristallirakenteiden syntymisen pisaran keskiosaan. (Tarasevich 2004.)

Kuten edellä on todettu, laajasta tutkimusaineistosta huolimatta biologisten pisaroiden sisältämien aineiden vyöhykkeittäiseen järjestymiseen liittyviä ilmiöitä ei osata täysin selittää. Tarasevich (2004) toteaa, että biologisten pisaroiden kuivumiseen liittyvät ilmiöt ovat luonteeltaan fysikaalisia ja fysikaalis-kemiallisia ja paljastavat organismin toimintaan liittyviä epätasapainoja.

Brutin ym. (2011) tutkivat veripisaran kuivumista lasilevyllä. Kokeissa käytetystä verestä oli poistettu fibrinogeeni. Erityisen merkittävää Brutin ym. (2011) esittämässä kuvassa on kuivuneelle verelle tyypillisten valkoisten alueiden puuttuminen. Tämä viittaa fibrinogeenin tärkeyteen valkoisten alueiden synnyttäjänä. Brutin ym. (2011) esittämät vaiheet verinäytteen kuivumisessa on esitetty kuvassa 17.



KUVA 17. Veripisaran kuivumisen vaiheet Brutin ym. mukaan. Fibrinogeeni on poistettu verestä. Vaihe 1: Punasolut siirtyvät kohti pisaran reunaa, joka alkaa kuivua ensimmäisenä. Vaihe 2: Kuivumisen jatkuessa kohti keskiosaa, näytteen reunoilla alkaa tapahtua kiteyty-

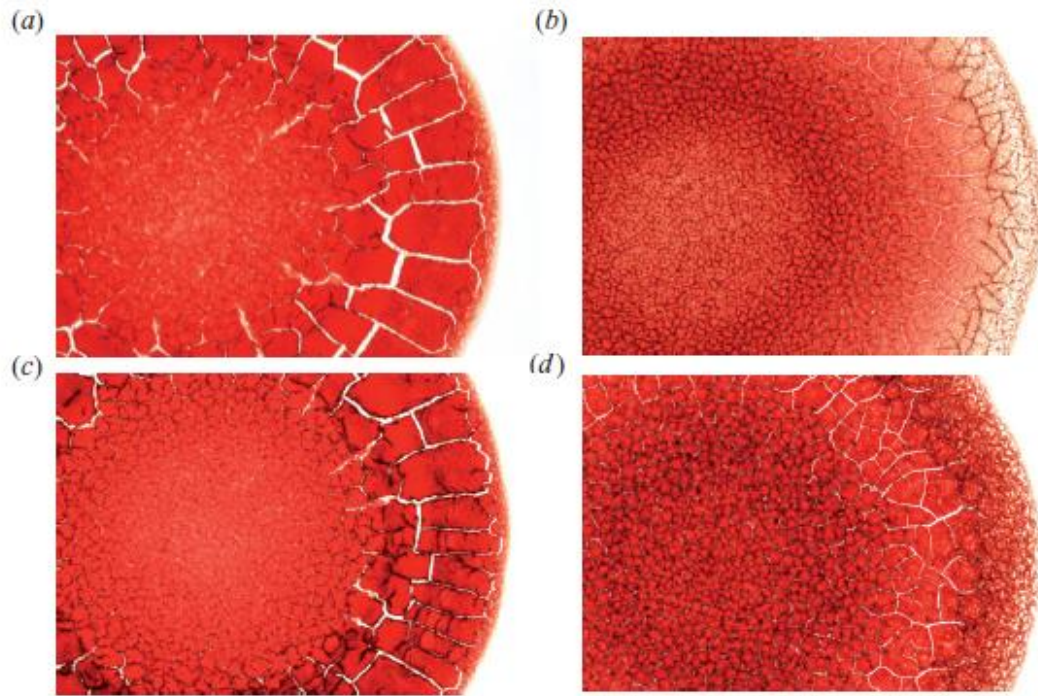
mistä. Ulkoreunalle on syntynyt toruksen muotoinen koostumukseltaan erilainen alue. Punasolujen siirtyminen kohti reuna-alueita on nyt selvästi havaittavissa. Vaihe 3: Ulkoreunalle syntynyt torus kuivuu nopeasti ja siihen syntyy halkeamia. Ulkoreunalle syntyneet massakuviot ovat suuria kasaumia. Näytteen keskiosien väri muuttuu vaaleammaksi. Vaihe 4: Näytteen keskiosa kuivuu muodostaen pienikokoisia kasaumia. Vaihe 5: Näyte kuivuu kokonaan ja kasaumien rakenteessa tapahtuu pieniä muutoksia. (Brutin ym. 2011.)

Brutin ym. (2011) havaitsivat tutkimuksessaan, että veripisaran kuivumiseen vaikuttaa ensisijaisesti Marangonin-virtaus, joka kuljettaa punasoluja kohti pisaran reunoja. Punasoluilla on luontainen taipumus hylkiä pintoja, ja tästä syystä ne voivat liikkua kuivuvan pisaran virtausten mukana. Ulkoisen nesteen haihduttua punasolujen solukalvo repeää ja niiden sisällä oleva neste pääsee myös haihtumaan. (Brutin ym. 2011.) Kuvassa 18 on esitetty kuivuvan veripisaran halkileikkausprofiilit.



KUVA 18. Kuivuvan pisaran ulkonäkö ja halkileikkausprofiili. Kuvat esittävät vasemmalta oikealle jatkumon tuoreesta veripisarasta kuivuneeseen veripisaraan. (Brutin ym. 2011.)

Brutinin (2011) tutkimusryhmä vertasi myös terveiden ihmisten verta aneemiseen vereen ja vereen, jonka rasva-arvot olivat koholla hiilihydraattien nauttimisen takia. Tulokset on esitetty kuvassa 19.



KUVA 19. Terveystila ja kuivunut veri. Kuvat a ja c esittävät terveen naisen ja miehen verta. Kuvan b veri on aneemista, eli henkilön veren punasolujen määrä on normaalia alempi. Tämä näkyy normaalia pienempänä kasautumien kokona sekä näytteen keskellä että reunoilla. Kuvan d veri on aneemista ja lisäksi rasva-arvot ovat koholla. Näytteessä näkyy pieniä tummia kasaumia. (Brutin ym. 2011.)

## 5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT

Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia, onko kuivaverianalyysistä saatavan valkoisuusprosentin ja Manleyn taulukon mukaan korjatun laskon välillä riippuvuussuhde, sekä selvittää, mitkä kliiniset verimuuttujat ovat yhteydessä valkoisuuden määrään kuivaverinäytteissä. Tutkimustiedon pohjalta tutkimukseen valittiin muuttujiksi fibrinogeeni, albumiini ja immunoglobuliinit G ja M. Lisäksi määritettiin immunoglobuliini A. Laboratoriohenkilökunnan jäsenen kanssa käytyjen keskustelujen pohjalta tutkimuksen muuttujiin lisättiin herkkä CRP. Laajan verenkuvan muuttujat sisällytettiin tutkimukseen niiden yleisyyden ja kattavuuden vuoksi. Lisäksi selvitettiin Dropper-kuivaverimenetelmän toistettavuutta vertailemalla kahden samalta koehenkilöltä otetun näytteen valkoisuusprosenttia.

### **Tutkimusongelmat:**

1. Onko laskon ja kuivaveren valkoisuusprosentin välillä riippuvuussuhdetta ja jos on, millainen se on?
2. Onko muilla tutkimukseen valituilla kliinisillä verimuuttujilla yhteyttä valkoisuuden määrään kuivaverinäytteissä?

### **Hypoteesit:**

1. Laskon ja kuivaveren valkoisuusprosentin välillä on yhteys.
2. Teorian mukaisesti plasman fibrinogeeni-, albumiini- ja immunoglobuliinipitoisuudet korreloivat valkoisuusprosentin kanssa (Assayag ym. 2005; Fernandes ym. 2011; Baskurt ym. 2012, 12).



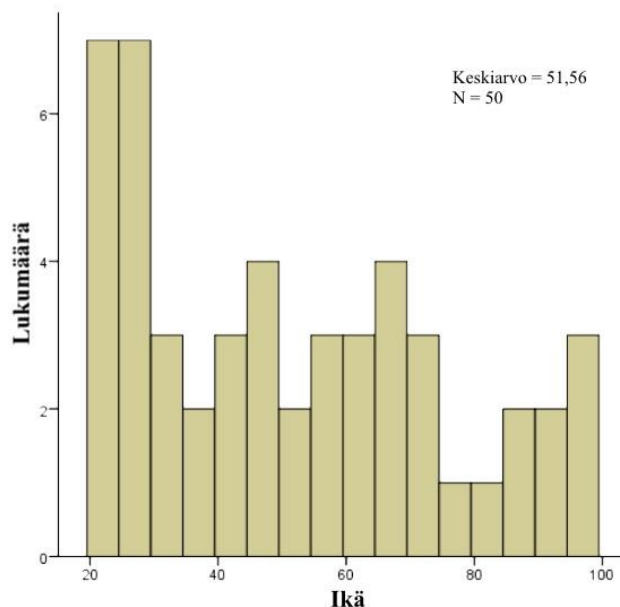
## 6 TUTKIMUSMENETELMÄT

### 6.1 Koehenkilöt

Tutkimukseen rekrytoitiin 50 täysi-ikäistä koehenkilöä vapaaehtoisuuteen perustuen. Koehenkilöitä pyrittiin saamaan tasaisesti eri ikäryhmistä ja miehistä (24) sekä naisista (26). Taulukossa 2 on esitetty koehenkilöiden ikäjakauma. Raskauden (Bolen 1944) voitiin olettaa lisäävän ja verenohennuslääkityksen (Burke 2013) vähentävän kuivaverinäytteen valkaisuutta. Verenohennuslääkitystä käyttävien sulkeminen pois tutkimuksesta ei ollut käytännössä mahdollista, joten raskaus oli tutkimuksen ainoa poissulkukriteeri.

Koehenkilöille selvitettiin kirjallisesti ja suullisesti tutkimuksen kulku sekä siihen liittyvät toimenpiteet, minkä jälkeen koehenkilöt allekirjoittivat suostumuslomakkeen. Tutkimus ja siihen liittyvät materiaalit oli hyväksytty Jyväskylän yliopiston eettisessä toimikunnassa.

TAULUKKO 2. Koehenkilöiden ikäjakauma.



## 6.2 Tutkimusasetelma, aineiston kerääminen ja analysointi

Koehenkilöiltä otettiin yhden tutkimuskäynnin aikana sormenpääverinäyte sekä laskimoverinäyte neljään koeputkeen. Lisäksi kyselylomakkeella selvitettiin koehenkilöiden lääkitys ja fyysiset perustiedot. Hyväkuntoiset koehenkilöt tulivat tutkimuskäynnille yliopiston laboratorioon. Vanhojen ja huonokuntoisten näytteet käytiin keräämässä rekrytointipaikoissa. Näytteitä kerättiin pitkin päivää, näytteenottoaika ei siis vakioitu syömisen tai liikunnan suhteen. Droppi Veripalvelu Oy:n mukaan lyhyen aikavälin muutokset eivät näy kuivaverinäytteiden valkoisuudessa, joten vakiointia ei koettu tarpeelliseksi.

Sormenpääverinäytteestä otettiin kuivaverinäyte, joka myöhemmin digitoitiin Epson V600 diaskannerin avulla ja lähetettiin anonyminä Dropper-kuivaveripalvelun pilvipalvelimelle valkoisuusprosentin määrittämiseksi. Diaskannerin asetuksista valittiin Professional-tila ja seuraavat säädöt: positive film, 2400 dpi, unsharp mask ja speed scan. Lisäksi Compression Level -kohdasta (File Save Settings > Image Format Options > Compression Level) valittiin lukuarvo 16. Valkoisuusprosentin määrittäminen tapahtui Droppi Veripalvelu Oy:n kehittämien tietokonealgoritmien avulla. Kuivaverinäytteen ottaminen on kuvattu tarkasti luvussa 4.3 ja kuvassa kahdeksan on esitetty näytelasille otettu kuivaverinäyte. Pääpiirteissään näytteenotto tapahtui siten, että sormenpääverinäytteestä kerättiin varsinainen näyte näytelasille painamalla sormenpäähän puristettu veripisara näytelasin eri kohtiin kahdeksan kertaa. Droppi Veripalvelu Oy:n ohjeellinen aika veripisaran kuivumiselle sormenpäässä ennen sen keräämistä näytelasille on 20–30 sekuntia. Kuivumisaikaa ei vakioitu kellon avulla, mutta se pyrittiin arvioimaan noin 25 sekunnin pituiseksi. Jokaiselta koehenkilöltä kerättiin A- ja B-näyte edellä kuvatulla tavalla.

Diaskannerin asetuksia jouduttiin muuttamaan ensimmäisten 22 kuivaverinäytteen keräämisen jälkeen, koska asetukset eivät vastanneet Droppi Veripalvelu Oy:n käyttämiä asetuksia. Veripisarakuvien tarkkuus ei ollut riittävän korkea, mikä vaikutti tietokonealgoritmien toimintaan. Näytteiden uudelleendigitointiin ei oltu varauduttu, joten niille ei ollut erityistä säilytysjärjestelmää ja ne säilytettiin pinottuna päällekkäin. Näytteiden toista digitointia

edeltävä säilytysaika vaihteli näytteenottoajan mukaan. Ensimmäisellä näytteenottokerralla kerättyjen näytteiden säilytysaika oli 24 päivää, muiden lyhyempi. Näytteen 19 B-näytteen havaittiin vahingoittuneen säilytyksessä niin, että se jouduttiin hylkäämään. Kaikki näytteet tarkastettiin suurennettuina mahdollisten muutosten varalta, mutta muiden näytteiden havaittiin säilyneen muuttumattomina.

Dropper-kuivaverimenetelmässä sormenpäää ei yleensä puhdisteta alkoholilla ennen sormenpääverinäytteen ottoa, mutta alkoholipohjaisen puhdistusliuoksen käyttö koettiin tärkeäksi vanhojen ja huonokuntoisten näytteitä kerätessä. Näytteitä 39–43 ja 46–49 kerätessä sormenpää puhdistettiin alkoholilla ennen näytteenottoa ja alkoholin annettiin haihtua. Ennen varsinaisen näytteen ottamista sormenpäähän puristettiin veripisara, joka pyyhittiin pois. Näin pyrittiin varmistamaan kaikkien näytteiden vertailtavuus keskenään.

Laskimoverinäytteestä määritettiin heti täydellinen verenkuva ja lasko. Täydelliseen verenkuvaan sisältyivät valkosolujen kokonaismäärä (*WBC*,  $\times 10^9$  /litra), punasolujen kokonaismäärä (*RBC*,  $\times 10^{12}$  /litra), hemoglobiini (*HGB*, g /litra), hematokriitti (*HCT*, %), punasolujen keskimääräinen tilavuus (*MCV*, fl), punasolujen keskimääräinen hemoglobiinin määrä (*MCH*, pg), verihiutaleiden määrä (*PLT*,  $\times 10^9$  /litra), punasolujen koon vaihtelu (*RDW\_SD*, *RDW\_CV*) ja valkosolujen erittelylaskenta, johon sisältyi lymfosyyttien, välisolujen ja neutrofiilien määrä (*LYMFOS#*,  $\times 10^9$  /litra; *MXD#*,  $\times 10^9$  /litra; *NEUT#*,  $\times 10^9$  /litra) ja prosentuaalinen osuus (*LYMFOS%*, %; *MXD%*, %; *NEUT%*, %).

Täydellisen veren kuvan määrittämisessä käytettiin XP300-analysaattoria. Laitteen solulaskenta perustuu laskentapään ohi kulkevien solujen aiheuttamiin sähköisiin signaaleihin. Mittausperiaate on kuvattu luvussa 3.2. Laitteen hemoglobiinin määrittäminen perustuu oksihemoglobiinin menetelmään. (KX-21N ohjekirja.) Lasko määritettiin manuaalisella menetelmällä. Natriumsitraattia sisältävään näyteputkeen kerättiin 60 mm korkeuteen asti verta. Näytettä sekoitettiin sitraatin ja veren sekoittumisen varmistamiseksi. Näytteen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön tunnin ajan. Tämän jälkeen putki asetettiin mittausalustalle 30 minuutin ajaksi, minkä jälkeen laskoarvo luettiin solujen ja plasman rajapinnasta. Mittauslämpötila

vaikuttaa laskoon, joten arvot normalisoitiin Manleyn taulukon avulla vastaamaan 18 °C lämpötilassa mitattuja arvoja. (Mekalasi Oy 2010.) Osa näyteputkista säilytettiin pakastimessa - 20 °C lämpötilassa, jotta loput verimuuttujat voitiin määrittää kerralla, kun näytteet oli kerätty kaikilta koehenkilöiltä.

Albumiinin (*S-ALB*, g /litra) määrä määritettiin seerumista värjäämällä näyte bromikresolivioletilla ja määrittämällä väriaineen intensiteetti aallonpituudella 600 nm (Thermo Electron Corporation 2005). Immunoglobuliinien G (*S-IgG*, g /litra), M (*S-IgM*, g /litra) ja A (*S-IgA*, g /litra) määrät näytteissä määritettiin immunoturbidimetrisellä menetelmällä. Antiseerumin lisäys aiheuttaa immunokompleksien muodostumisen. Immunokompleksien määrä saadaan selville mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 340 nm (Thermo Fisher Scientific 2010a; 2010b; 2010c). Herkän C-reaktiivisen proteiinin määrän (*hsCRP*, mg /litra) määrittämisessä käytettiin IMMULITE 1000 -laitteistoa. Määrittäminen perustuu kiinteän faasin kemiluminoivaan immunometriseen tutkimukseen (Siemens 2008a). Fibrinogeenipitoisuus (*P-FIBR*, g /litra) määritettiin muokatulla Clauss-menetelmällä. Menetelmässä sitratoituun plasmaan tuodaan runsas ylimäärä trombiinia. Trombiini aiheuttaa plasman hyytymisen ja hyytymisnopeus on suoraan verrannollinen fibrinogeenin määrään. (Siemens 2008b.)

### 6.3 Tilastollinen analyysi

Tilastollinen analyysi tehtiin käyttämällä SPSS-ohjelman versiota 20.0. Laskon ja kuivave-rianalyysin valkoisuusprosentin riippuvuutta tutkittiin korrelaation avulla ja sovittamalla aineistoon erilaisia malleja. Mallien paremmuutta ja menetelmien riippuvuutta arvioitiin selitysasteen ( $R^2$ ) avulla.

Epänormaalisti jakautuneet muuttujat ( $p$ -arvo  $\leq 0,05$ ) pyrittiin normalisoimaan käyttämällä luonnollista logaritimuunnosta. Normaalisti jakautuneita sekä normalisoituja verimuuttujia verrattiin luonnollisella logaritimuunnoksella normalisoituun valkoisuusprosenttiin

käyttäen Pearsonin korrelaatiota ( $r$ ). Muuttujia, joita ei voitu normalisoida, verrattiin normalisoimattomaan valkoisuusprosenttiin käyttäen Spearmanin korrelaatiota ( $r_s$ ).

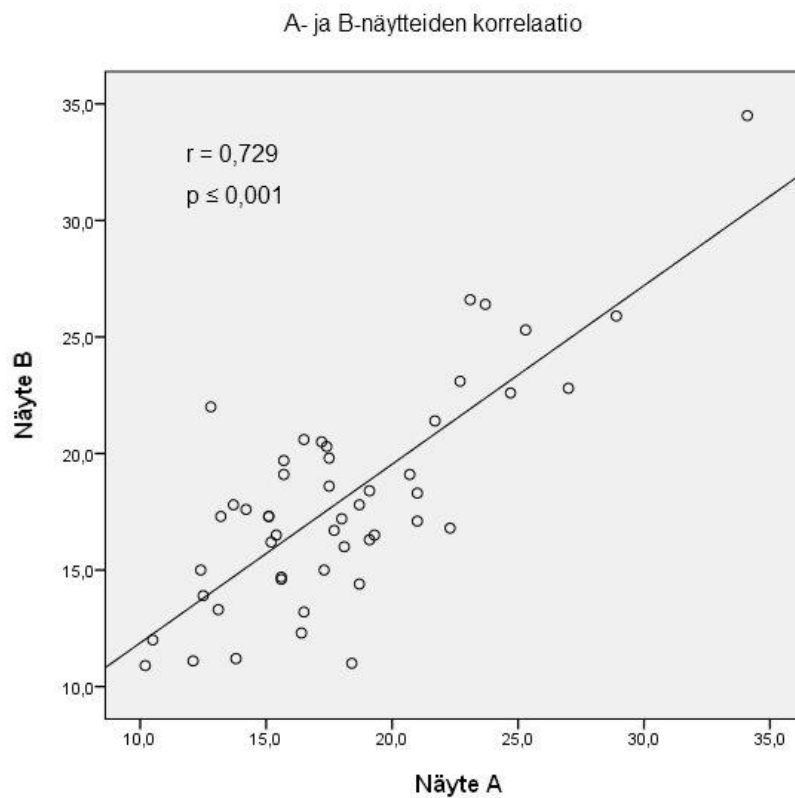
Verimuuttujien yhteyksiä kuivaverinäytteiden valkoisuuden määrään tutkittiin korrelaatioiden ja ridge-regression avulla. Ridge-regressiota käytettiin, koska merkittävät valkoisuuteen vaikuttavat tekijät olivat keskenään riippuvia. Tilastollisesti merkittävänä pidettiin korrelaatioita, joiden p-arvo oli alle 0,05. Menetelmän luotettavuutta tarkasteltiin A- ja B-näytteiden välisen keskivirheen ja korrelaation avulla.

Kuivaverianalyysiä ja laskoa ei voitu verrata Bland-Altman -mallilla, koska niiden mittayksiköt eroavat. Tästä syystä kuivaveriprocentin sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä laskon suhteen ei voitu määrittää suoraan.

## 7 TULOKSET

### 7.1 Dropper-kuivaverimenetelmän toistettavuus

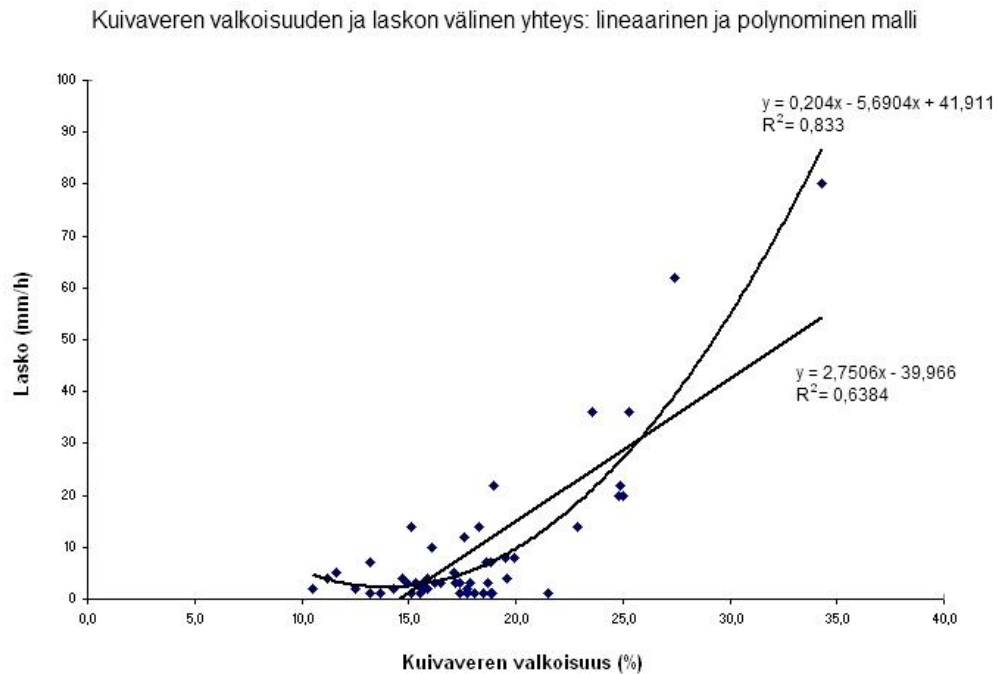
Menetelmän luotettavuutta arvioitiin vertailemalla kerättyjä A- ja B-näytteitä keskenään. Keskimäärin A- ja B-sarjojen näytteet erosivat toisistaan  $2,46 \pm 1,84$  %. Näytesarjojen keskimääräinen ero oli 0,01 %. Tyypillinen virhe näytteiden välillä oli 2,21 ja keskihajonta 3,12 mittayksikköä (%). Luonnollisen logaritmimuunnoksen avulla normalisoitujen näytesarjojen välinen korrelaatio oli 0,729 merkitsevyydellä  $p \leq 0,001$  (kts. kuva 20.).



KUVA 20. Kuivaverinäytteiden A ja B välinen korrelaatio.

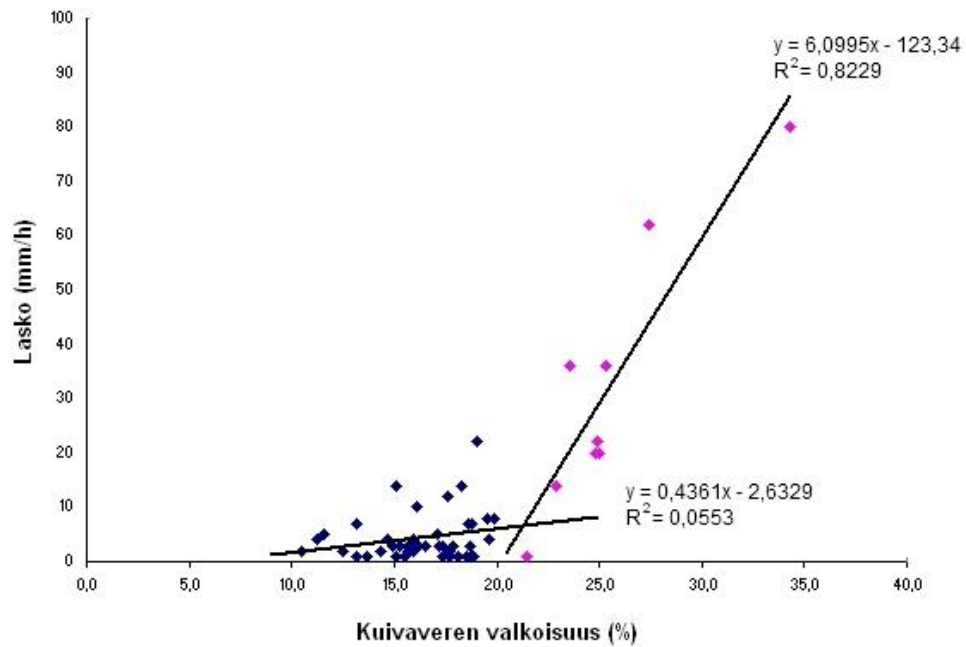
## 7.2 Kuivaveren valkoisuusprosentin ja laskon välinen riippuvuus

Kuivaveren valkoisuusprosentin ja laskon välistä yhteyttä kuvaavan lineaarisen mallin selitysteeksi saatiin 63,8 % ja polynomiselle mallille 83,3 % (kts. kuva 21). Valkoisuusprosentin ja laskon välillä on kohtalaisen voimakas korrelaatio ( $r_s = 0,470$ ,  $p \leq 0,001$ ). Kuvasta 21 nähdään myös, että kuvaajan voidaan ajatella jakautuvan kahteen vaiheeseen, joita erottaa 20 % kuivaveren valkoisuuden aste. Tästä syystä kuivaveren valkoisuuden ja laskon yhteyttä tutkittiin myös tekemällä kahdesta lineaarisesta osasta koostuva malli. Ensimmäisen osan (kuivaveren valkoisuus < 20 %) kohdalla kuivaveren valkoisuuden ja laskon välillä ei havaittu korrelaatiota ( $r_s = 0,175$ ,  $p = 0,272$ ). Toisen osan (kuivaveren valkoisuus > 20 %) kohdalla korrelaatio on voimakas ( $r = 0,916$ ,  $p \leq 0,001$ ). Kaksivaiheinen korrelaatiokuvaaja, on esitetty kuvassa 22.



KUVA 21. Kuivaverinäytteen valkoisuuden ja laskon yhteyttä kuvaava lineaarinen ja polynominen malli.

Kuivaveren valkoisuuden ja laskon välinen yhteys: kaksivaiheinen lineaarinen malli



KUVA 22. Kuivaverinäytteiden valkoisuuden ja laskon yhteyttä kuvaava kaksivaiheinen lineaarinen malli. Ensimmäisen ja toisen vaiheen raja on 20 % kohdalla.



### 7.3 Kuivaveren valkoisuuden määrää selittävät muuttujat

Kuivaveren valkoisuuden (*KV%*) ja määritettyjen kliinisten muuttujien väliset korrelaatiot on esitetty taulukossa 3. Kuivaverinäytteiden valkoisuutta selittävän mallin muodostamises-  
sa käytetyn regressioanalyysin kannalta merkittävänä pidettiin 0,300 ylittäviä Pearsonin ja Spearmanin korrelaatioita, kun muuttujien p-arvo oli samalla 0,05 tai alle. Poikkeuksena mukaan valittiin muuttuja *HGB* (hemoglobiini), jonka arvo oli -0,292. Muuttujista jätettiin pois *LYMFOS%* (lymfosyyttien suhteellinen osuus) ja *WBC* (valkosolujen määrä). Valkosolut jaoteltiin tässä tutkimuksessa neutrofiileihin, lymfosyytteihin sekä välisoluihin. Valkosolujen kokonaismäärän korrelaatio kuivaverinäytteen valkoisuuteen oli positiivinen, lymfosyyttien ja välisolujen määrän korrelaatiot puolestaan negatiivisia. Mitä pienempi prosentuaalinen osuus valkosoluista on lymfosyyttejä ja välisoluja, ja mitä suurempi valkosolujen kokonaismäärä, sitä enemmän on neutrofiilejä. Nämä muuttujat voitiin siis sulkea pois, koska ne osaltaan kertoivat neutrofiilien määrän vaikutuksesta valkoisuuden määrään. *hsCRP* jätettiin myös pois mallista, koska voidaan olettaa, että se ei vaikuta suoraan *KV%*, vaan molemmat muuttujat kertovat tulehduksesta.

TAULUKKO 3: Kuivaverinäytteen valkoisuuden ja kliinisten verimuuttujien väliset korrelaatiot. Spearmanin korrelaatio on merkitty yläindeksin s-kirjaimella. 0,300 ylittävät korrelaatioarvot on lihavoitu. Tilastollinen merkitsevyys on merkitty tähdellä ( $p \leq 0,05 = *$ ,  $p \leq 0,01 = **$  ja  $p \leq 0,001 = ***$ ).

<b>Muuttuja</b>	<b>Korrelaatio</b>	<b>Merkitsevyys</b>
P-FIBR	<b>0,622<sup>s</sup></b>	0,000 <sup>***</sup>
LNNEUT#	<b>0,557</b>	0,000 <sup>***</sup>
WBC	<b>0,521<sup>s</sup></b>	0,000 <sup>***</sup>
Lasko	<b>0,472<sup>s</sup></b>	0,001 <sup>***</sup>
Manley Lasko	<b>0,470<sup>s</sup></b>	0,001 <sup>***</sup>
LNRDW_CV	<b>0,436</b>	0,002 <sup>**</sup>
LNhsCRP	<b>0,367</b>	0,009 <sup>**</sup>
S-IgA	<b>0,333</b>	0,018 <sup>*</sup>
LYMFOS%	<b>-0,319</b>	0,026 <sup>*</sup>
HGB	-0,292	0,040 <sup>*</sup>
LNNEUT%	0,287	0,045 <sup>*</sup>
MXD#	0,252 <sup>s</sup>	0,081
RBC	-0,235	0,101
HCT	-0,234	0,102
LYMFOS#	0,219	0,131
PLT	0,205 <sup>s</sup>	0,153
S-ALB	-0,198 <sup>s</sup>	0,169
LNS-IgM	-0,197	0,170
RDW_SD	0,192 <sup>s</sup>	0,181
S-IgG	0,177 <sup>s</sup>	0,218
Ikä	0,159 <sup>s</sup>	0,270
BMI	0,124	0,395
MXD%	-0,098 <sup>s</sup>	0,502
MCV	0,093 <sup>s</sup>	0,520
MCH	0,086 <sup>s</sup>	0,551
Paino	0,080	0,586
Pituus	0,054	0,707

Ridge-regression avulla rakennettiin valkoisuuden määrää kuvaava malli:

$$KV\% = 0,285*NEUT\# + 0,179*P-FIBR + 0,163*RDW\_CV + 0,096*S-IgA - 0,103*HGB.$$

Mallin selitysaste on 54,3 %. Yhtälön kertoimet ovat standardoituja beta-kertoimia. Kertoimet on esitetty myös taulukossa 4. Yhtälön muuttujien väliset korrelaatiot on esitetty taulukossa 5.

TAULUKKO 4. Kuivaverinäytteen valkoisuuden määrää selittävän mallin muuttujien standardoidut beta-kertoimet.

<b>Muuttuja</b>	<b>Standardoitu beta-kerroin</b>
NEUT#	0,285
P-FIBR	0,179
RDW_CV	0,163
HGB	-0,103
S-IgA	0,096

TAULUKKO 5: Kuivaverinäytteen valkoisuutta selittävien muuttujien väliset korrelaatiot.

		<b>NEUT#</b>	<b>RDW_CV</b>	<b>S-IgA</b>	<b>HGB</b>
<b>P-FIBR</b>	Spearmanin korr.	0,162	0,394**	0,432**	-0,577***
	Merkitsevyys	0,265	0,005	0,002	0,000
	N	49	50	50	50
		<b>LNNEUT#</b>	<b>LNRDW_CV</b>	<b>S-IgA</b>	<b>HGB</b>
<b>LNNEUT#</b>	Pearsonin korr.	1	0,261	0,316*	-0,2
	Merkitsevyys		0,07	0,027	0,168
	N	49	49	49	49
<b>LNRDW_CV</b>	Pearsonin korr.	0,261	1	0,202	-,407**
	Merkitsevyys	0,07		0,159	0,003
	N	49	50	50	50
<b>S-IgA</b>	Pearsonin korr.	0,316*	0,202	1	-0,201
	Merkitsevyys	0,027	0,159		0,162
	N	49	50	50	50
<b>HGB</b>	Pearsonin korr.	-0,2	-,407**	-0,201	1
	Merkitsevyys	0,168	0,003	0,162	
	N	49	50	50	50

## 8 POHDINTA

A- ja B-näytteiden keskiarvojen vähäinen ero (0,1 %) kertoo, että koehenkilöiltä otettujen ensimmäisen ja toisen näytteen välillä ei käytännössä ole eroa. Tämä on loogista, koska näytteet on otettu peräjälkeen ja siten aikaa esimerkiksi fysiologisille muutoksille veressä ei ole ollut. Toisaalta ensimmäistä näytettä otettaessa sormenpää ei ole ennestään kostunut verestä, sormenpäässä voi olla epäpuhtauksia vaikka se onkin pyyhitty, ja ensimmäinen puristuskerta voi tuottaa suuremman määrän imunestettä veripisaraan. Yhdessä nämä tekijät olisivat voineet aiheuttaa systemaattista muutosta näytteiden välillä, mutta nykyinen näytteenottomenetelmä vaikuttaa tuottavan hyvän näytteen myös ensimmäisellä kerralla.

A- ja B-näytteiden välinen tyypillinen virhe (2,21 %) ja keskimääräinen ero (2,46 %) kuvaavat menetelmän toistettavuutta. Tässä tapauksessa virhettä voivat aiheuttaa erot näytteenotossa ja tietokonealgoritmien kyvyssä erottaa näytteen valkoisuus, sekä vaihtelevuus veren osatekijöiden vuorovaikutuksessa ja kuivumismekanismien toiminnassa. Tyypillinen virhe on melko pieni, joten menetelmän voidaan katsoa olevan hyvin toistettava. On kuitenkin huomioitava, että perusterveiden ihmisten välillä muutokset valkoisuuden määrässä ovat pieniä, noin 10 % luokkaa (Droppi Veripalvelu Oy). Siten perusterveiden terveydentilan keskinäinen vertailu edellyttää melko suurta mittatarkkuutta. Tyypillinen virhe muodostuu todennäköisesti pääosin tietokonealgoritmien toiminnasta, joten algoritmeja kannattaa kehittää tarkemmiksi. A- ja B-näytteiden välinen korrelaatio ( $r = 0,729$  merkitsevyystasolla  $p \leq 0,001$ ) on melko hyvä. Kuvasta 20 nähdään, että lähes kaikki virheet sijoittuvat 4 mittayksikön sisälle, joten tämän tutkimuksen perusteella neljää mittayksikköä suurempia muutoksia kuivaverinäytteen valkoisuudessa voidaan pitää todellisina muutoksina.

Hypoteesin mukaisesti kuivaverinäytteiden valkoisuusprosentin ja laskon välillä on korrelaatio ( $r_s = 0,470$ ,  $p \leq 0,001$ ). Korrelaatio on melko vahva, mutta aineistoon sovitetun polynomisen mallin selitysaste on suhteessa huomattavasti parempi ( $R^2 = 0,83$ ). Tämä johtuu siitä, että valkoisuusprosentin ja laskon välinen riippuvuus ei ole lineaarinen. Aineistoon

sovitetun lineaarisen mallin selitysaste on siten myös selvästi polynomista heikompi ( $R^2 = 0,64$ ). Aineistoon sovitettujen mallien luotettavuutta laskee jonkin verran se, että tutkimuksessa oli mukana vain muutamia koehenkilöitä, joiden lasko oli selvästi koholla. Kuivaveren valkoisuudet sijoittuvat tasaisesti 10–20 % välillä laskon ollessa useimpien koehenkilöiden kohdalla hyvin matala. Tämä viittaa siihen, että matalien arvojen puolella kuivaveren valkoisuus voi olla on laskoa parempi mittari, mikäli se muuten soveltuu tavoitellun ominaisuuden mittaamiseen. Arvojen vaihtelu voi kuitenkin johtua myös valkoisuusprosentin määrävien tietokonealgoritmien epätarkkuudesta.

Tutkimus vahvistaa Goldbergerin (1939) tutkimuksen tulokset kuivaverinäytteen valkoisuuden määrän ja laskon välisestä yhteydestä. Goldbergerin (1939) tutkimuksesta tosin saa kuvan, että riippuvuus on lineaarinen koko vaihteluvälillä. Tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että riippuvuutta voidaan parhaiten selittää polynomisella mallilla tai kaksivaiheisella lineaarisella mallilla. Kuivaveren valkoisuuden määrän ollessa alle 20 %, lasko vaihtelee melko voimakkaasti ja siten tällä osuudella laskon ja valkoisuuden välillä ei ole korrelaatiota ( $r_s = 0,175$ ,  $p = 0,272$ ), minkä lisäksi selitysaste on hyvin matala ( $R^2 = 0,06$ ). Toisen osuuden korrelaatio on voimakas ( $r = 0,916$ ,  $p \leq 0,001$ ) ja selitysaste korkea ( $R^2 = 0,82$ ), koska 20 % jälkeen kuivaveren valkoisuusprosentti ja lasko seuraavat toisiaan hyvin lineaarisesti. Kaksivaiheista mallia rakennettaessa toiseen vaiheeseen pyrittiin sisällyttämään mahdollisimman monta mittauspistettä, kuitenkin niin, että selitysaste on mahdollisimman korkea. Näin raja-arvoksi saatiin 20 %. Tulokset viittaavat siihen, että lasko ja kuivaveren valkoisuus mittaavat jotakin osittain päällekkäistä ilmiötä, mutta valkoisuuden ja laskeuman syntymiseen vaikuttavat mekanismit ovat ainakin osin erilaiset. Laskoon vaikuttaa moni tekijä (Baskurt ym. 2012, 11–13), ja niin todennäköisesti myös kuivaveren valkoisuuteen. Laskon lisäksi myös *hsCRP* korreloi positiivisesti kuivaverinäytteiden valkoisuuden kanssa. Yhdessä löydökset viittaavat siihen, että kuivaveren valkoisuusprosentti on tulehdusmarkkeri.

Hypoteesin mukaisesti fibrinogeenin määrä korreloi kuivaverinäytteiden valkoisuuden kanssa. Tämän tutkimuksen perusteella albumiini ei korreloi valkoisuuden kanssa, vaikka

joissain tutkimuksissa albumiinin on todettu lisäävän laskoa (Baskurt ym. 2012, 12). Kaikkien immunoglobuliinien ja erityisesti IgG:n odotettiin korreloivan valkoisuuden kanssa. Yllättäen vain immunoglobuliini A:n määrän ja valkoisuuden väliltä löytyi korrelaatio. Tulosten tulkintaa vaikeuttaa se, että valtaosa tutkimuksen muuttujista korreloi keskenään. Esimerkiksi immunoglobuliinit G ja M saattavat tuottaa pieniä, valkoisuutta hieman lisääviä keräymiä näytteeseen, mutta samalla vähentää joidenkin muiden valkoisuutta lisäävien muuttujien vaikutusta, jolloin kokonaisvaikutus jää neutraaliksi. Käytännössä lähes kaikilla tutkimuksen muuttujista voi olla samantyyppisiä yhteisvaikutuksia. Yksi mahdollisuus on myös, että immunoglobuliinit vaikuttavat kerääntymiskäyttäytymiseen vain hapettuneessa muodossaan, tai tietyissä olosuhteissa, esimerkiksi kun hapetus-pelkistys -potentiaali (ORP) on tarpeeksi positiivinen.

Kuivaverinäytteissä ilmenee erilaisia valkoisten alueiden muodostamia profiileita. Profiileja muodostavat valkoiset alueet ovat eri kokoisia ja sijoittuvat niille ominaisille etäisyyksille kuivaverinäytteen keskipisteestä (Droppi Veripalvelu Oy). Tämä viittaa siihen, että valkoisia alueita muodostavat aineet eroavat jollain tavalla toisistaan. Yksi mahdollinen selitys on, että eri immunoglobuliiniluokat ovat osallisina ominaisuuksiltaan vaihtelevien valkoisten alueiden syntymisessä. Asian selvittäminen vaatii lisätutkimusta, jossa näytteiden erilaiset visuaaliset profiilit huomioidaan ja luokitellaan niiden voimakkuuden mukaan. Siten eri profiilien ja kliinisten verimuuttujien esiintymisen yhteyksiä voidaan vertailla.

Neutrofiilien määrän ja kuivaverinäytteiden valkoisuuden väliltä löytyi vahva tilastollisesti merkitsevä positiivinen korrelaatio. Neutrofiilien määrän kasvu on loogista, koska niiden tiedetään lisääntyvän tulehdustiloissa (Penttilä 2003, 302). Lymfosyyttien määrällä ja välisolujen määrällä ei havaittu olevan korrelaatiota valkoisuuden kanssa. Neutrofiilien prosentuaalinen osuus korreloi lievän positiivisesti valkoisuuden kanssa, mutta lymfosyyttien prosentuaalisen osuuden korrelaatio on negatiivinen. Myös välisolujen prosentuaalinen osuus vaikuttaa laskevan valkoisuuden lisääntyessä, mutta tilastollisesti merkitsevää yhteyttä ei löytynyt. Neutrofiilien prosentuaalinen osuus kasvaa, kun lymfosyyttien ja välisolujen osuus pienenee. Tämä selittää lymfosyyttien negatiivisen korrelaation, vaikka myös nämä val-

kosolut osallistuvat tulehdusreaktioihin (Seeley 1999, 587). Kuivaverianalyysiä on myös joskus nimitetty oksidatiivisen stressin testiksi (Rubik 2002). Neutrofiilit lisäävät oksidatiivista stressiä ympäröivissä kudoksissa erilaisten mekanismien kautta: Aktivoituneet neutrofiilit vapauttavat proteolyyttisiä entsyymejä, eikosanoideja ja happiradikaaleja ympäristöönsä (Hammerschmidt ym. 2006). Neutrofiileilla saattaa siis olla suora vaikutus oksidatiivisen stressin ja siten kuivaverinäytteiden valkoisten alueiden syntymiseen. Lymfosyyttien prosentuaalisen osuuden negatiivinen korrelaatio on yllättävä myös siksi, että lymfosyytit tuottavat immunoglobuliineja (Silverthorn 2007, 788), joista ainakin IgA:lla on positiivinen korrelaatio valkoisuuden kanssa. Tämä voi selittyä sillä, että lymfosyytit pystyvät mahdollisesti tuottamaan suuria määriä immunoglobuliineja, eikä niiden tarvitse siksi lisääntyä voimakkaasti immunoglobuliinimäärän kasvattamiseksi.

Hemoglobiinin määrän ja kuivaverinäytteen valkoisuuden väliltä löytyi negatiivinen korrelaatio. Yhteys johtuu todennäköisesti siitä, että hemoglobiini antaa näytteille niiden punaisen värin, ja siten suurempi hemoglobiinipitoisuus tuottaa syvemmän punaisia näytteitä. Tällöin tietokonealgoritmit havaitsevat näytteissä enemmän punaisuutta, ja punaisuuden prosentuaalinen osuus nousee valkoisuuden kustannuksella. Hemoglobiini on punasolujen sisällä, eikä siten todennäköisesti pääse vaikuttamaan solujen välisten keräymien syntymiseen (Silverthorn 2007, 542). Hemoglobiinin määrä ei siis todennäköisesti vaikuta varsinaisten valkoisten alueiden muodostumiseen, vaan ainoastaan tietokonealgoritmien tulkintaan näytteen suhteellisesta valkoisuudesta. Hemoglobiinin määrä otettiin silti mukaan kuivaverinäytteen valkoisuutta selittävään malliin, koska tässä tutkimuksessa käsitellään juuri tietokonealgoritmien määrittämää valkoisuuden astetta.

Muuttujan *RDW\_CV* korrelaatio valkoisuuden kanssa on melko voimakas. Tämä on yllättävää, koska *RDW\_CV* saadaan ottamalla keskihajonnan laajuinen osa punasolujen kokoja-kaumasta (*RDW\_SD*) ja jakamalla se punasolujen keskitilavuudella (*MCV*) (Constantino 2013). Kuitenkin *RDW\_SD*:n ja valkoisuuden välinen korrelaatio on heikko ja *MCV*:n ja valkoisuuden välillä ei ole korrelaatiota. Yksi selitys olisi, että kaikkein pienimmät ja suurimmat punasolut eivät vaikuta valkoisuuden muodostumiseen. Tämä voisi johtua esimer-



kiksi niiden pienestä suhteellisesta määrästä. Aineistoa tutkittaessa huomattiin kuitenkin, että luonnollisella logaritmillä muunnetun *RDW\_SD*:n Pearsonin korrelaatio luonnollisella logaritmillä muunnetun valkoisuusprosentin kanssa on melko korkea (0,344) ja tilastollisesti merkitsevä ( $p \leq 0,05$ ). *RDW\_SD*:n korrelaation määrittämisessä jouduttiin käyttämään Spearmanin korrelaatiota, koska sen normaalijakautuneisuutta kuvaava Shapiro-Wilk korrelaatio oli hieman alle 0,05. *RDW\_CV*:n vastaava arvo taas ylitti jonkin verran arvon 0,05, jolloin Pearsonin korrelaatiota voitiin käyttää. Spearmanin korrelaatiota käyttäen *RDW\_CV*:n korrelaatio on paljon matalampi, eikä se ole tilastollisesti merkitsevä. Tämä viittaa siihen, että sekä *RDW\_CV* että *RDW\_SD* arvot ovat merkittäviä, ja siten varsinainen merkittävä muuttuja valkoisuuden kannalta on punasolujen kokojakauma. Punasolujen keskitilavuuden ja valkoisuuden välillä ei löydetty merkitsevää yhteyttä kummallakaan menetelmällä. Keräymien syntyminen edellyttää punasolujen läheistä kontaktia toistensa kanssa (Baskurt ym. 2012, 11). Voidaan ajatella, että punasolujen vaihteleva koko näytteessä lisää niiden kosketuspinta-alaa toisiinsa lisäten näin keräymien syntymistodennäköisyyttä ja keräymiä yhdessä pitävää voimaa. Tämän tutkimuksen aineisto tukee ajatusta siitä, että kokojakauman kasvu lisää keräymien syntymistä: *RDW\_CV*:n ja laskon välinen Spearmanin korrelaatio on 0,676 ja merkitsevyys  $p \leq 0,001$ . *RDW\_SD*:llä vastaava korrelaatio on 0,521 samalla merkitsevyystasolla. Laskon ja *RDW*-arvojen välillä on siis selvä yhteys.

Valkoisuutta selittävään malliin valittiin valkoisuuden kanssa parhaiten korreloivat muuttujat, pois lukien lasko ja *hsCRP*. Lasko jätettiin pois, koska se ei ole yksittäinen veressä oleva muuttuja, vaan osin samat muuttujat aiheuttavat sekä punasolulaskeuman syntymisen että valkoisuuden kuivaverinäytteissä. C-reaktiivisen proteiinin määrän arveltiin olevan samantapainen muuttuja siinä mielessä, että sekin nousee tulehduksen vaikutuksesta, eikä sillä siten välttämättä ole suoraa yhteyttä kuivaverinäytteiden valkoisuuden kanssa. Lopullinen päätös *hsCRP*:n poissulkemisesta tehtiin, kun sen sisällyttämisen huomattiin laskevan mallin selitysasetta hieman. Samoin edellä merkitykselliseksi todettu *RDW\_SD* jätettiin mallista, koska sen lisääminen *RDW\_CV*:n rinnalle laskee mallin selitysasetta. Mikäli *RDW\_CV*:tä ei olisi sisällytetty, *RDW\_SD*:n lisääminen olisi lisännyt selitysasetta. Onkin loogista, että muuttujien keskinäinen korrelaatio johtaa siihen, että toisen sisällyttäminen riittää. *S-IgG*:n

huomattiin lisäävän mallin selitystasetta 1,7 %. *S-IgG*:tä ei kuitenkaan sisällytetty malliin, koska sen ja valkoisuuden välillä ei havaittu korrelaatiota. Malli haluttiin myös pitää mahdollisimman yksinkertaisena, joten pientä selitystasteen lisäystä ei pidetty riittävänä perusteena muuttujien määrän lisäämiselle. Lopulliseen malliin sisällytettiin fibrinogeenin, neutrofiilien, immunoglobuliini A:n ja hemoglobiinin määrä sekä punasolujen kokojakauma. Mallin selitystase (53,4 %) on melko hyvä. Tästä voidaan päätellä, että moni valkoisuuteen vaikuttavista päätekijöistä löydettiin, mutta lisätutkimus on tarpeen mahdollisten muiden valkoisuuden määrään vaikuttavien muuttujien löytämiseksi ja selitystasteen parantamiseksi.

Taulukossa 4 on esitetty mallin muuttujien standardoidut beta-kertoimet. Kertoimista nähdään, että selvästi voimakkain valkoisuuden määrään vaikuttava tekijä on neutrofiilien lukumäärä. Seuraavaksi eniten vaikuttavat fibrinogeenin määrä veressä ja punasolujen koon vaihtelu (*RDW\_CV*). Jonkin verran vaikuttavat myös hemoglobiinin ja immunoglobuliini A:n määrä. Vapaiden radikaalien (Baskurt ym. 2012, 11) ja zeta-potentiaalin (Fernandes ym. 2011) on todettu vaikuttavan laskoon, joten jatkotutkimus näiden vaikutuksen selvittämiseksi olisi aiheellinen. Näistä ainakin vapaiden radikaalien määrällä on yhteys veren hapetus-pelkistyspotentiaaliin (ORP), joten myös tämän muuttujan lisääminen koeasetelmaan olisi aiheellista (Rao ym. 1997). Vielä ei tiedetä myöskään, mistä valkoiset alueet näytteissä koostuvat. Aiemmin käytetty mikroskooppitarkastelu sekä digitointi diaskannerilla hyödynsivät valkoista taustavaloa. Tästä johtuen sekä pienet läpinäkyvät partikkelit, että tyhjät alueet voivat näkyä valkoisina. Olisikin oleellista selvittää, ovatko valkoisina näyttäytyvät alueet tyhjiä, jonkinlaisen biologisen massan täyttämiä tai mahdollisesti osin molempia.

Tutkimuksen suurimpia mahdollisia virhelähteitä on koehenkilöiden käyttämä lääkitys. Vanhimman ikäryhmän ihmisillä tyypillisesti oli pitkä lääkityslista ja lääkkeiden vaikutusta näytteiden valkoisuuden määrään on vaikea arvioida. Verenohennuslääkityksen voitiin olettaa vähentävän valkoisuutta (Burke 2013), joten verenohennuslääkitystä käyttävät pyrittiin sulkemaan tutkimuksesta pois. Käytettävissä olevat resurssit eivät kuitenkaan mahdollistaneet tätä ja vanhojen ikäryhmästä tutkimukseen jouduttiin hyväksymään myös verenohen-

nuslääkitystä käyttäviä koehenkilöitä. Vanhojen ikäryhmästä kahdeksalla koehenkilöllä oli jonkinlainen verenohennuslääkitys.

Osa näytteistä jouduttiin digitoimaan uudelleen, ja on mahdollista että näytteissä on tapahtunut muutoksia, joita ei paljain silmin voida erottaa edes suurennetuista näytteistä, mutta jotka kuitenkin vaikuttavat valkoisuuden prosentuaalista osuutta määrittävien tietokonealgoritmien toimintaan. Pidentynyt säilytys on saattanut hieman tummentaa näytteitä vähentäen niiden valkoisuutta ja toisaalta näytteissä on voinut tapahtua silmille näkymätöntä kulumista. Molemmat tekijät ovat saattaneet aiheuttaa pientä, silmämääräiseen arvioon perustuen suurimmillaan noin 2 % suuruusluokkaa olevaa systemaattista muutosta näytteiden valkoisuuden määrään. Virhelähteiden vaikutus on vastakkainen, joten ne ovat myös saattaneet osittain kumota toisensa. Mahdollinen virhe koskee vain ensimmäistä 22 näytettä, jotka on kerätty pääosin nuorilta ja keski-ikäisiltä perusterveiltä ihmisiltä.

Näytteenoton kannalta suurimmat virhelähteet liittyvät veren keräämiseen näytelasille ja näytteen keräämistä edeltävän kuivumisajan vakioimattomuuteen. Näytteiden keräämisessä sekä lasille kerättyjen pisaroiden koko että kalvon paksuus vaihtelevat jonkin verran ja molemmat vaikuttavat algoritmien antamaan valkoisuusprosenttiin. Näytteiden ottaminen onnistui kaikkiaan hyvin ja kaikilta koehenkilöiltä otetut näytteet ovat tasalaatuisia. Ohjeellinen näytteenottoon liittyvä kuivumisaika on 20–30 sekuntia. Kuivumisajalla on todettu olevan jonkin verran vaikutusta valkoisten alueiden syntymiseen ja siten se olisi kannattanut vakioida tutkimussuunnitelmassa. Noin 20 sekunnin jälkeen kuivumisaika ei enää juuri vaikuta näytteiden valkoisuuden muodostumiseen, mutta tämä virhelähde olisi voitu välttää kokonaan vakioimalla aika 30 sekuntiin ja katsomalla aika kellosta. Näiden virhelähteiden lisäksi se, että joidenkin koehenkilöiden kohdalla sormenpää puhdistettiin alkoholilla ennen näytteenottoa on voinut vaikuttaa tuloksiin. Alkoholien poistuminen sormenpäältä ennen näytteenottoa pyrittiin varmistamaan pyyhkimällä sormenpää hyvin ja varaamalla runsaasti aikaa alkoholin haihtumiselle.

Tutkimuksen virhelähteet liittyvät koehenkilöiden käyttämään lääkitykseen, tietokonealgoritmien toimintaan, näytteenottoon, näytteiden säilytykseen ja kliinisten verimuuttujien määrittämiseen. Tulosten tulkintaa vaikeuttavat muuttujien keskinäiset riippuvuussuhteet. Merkittävimpien muuttujien suhteen tutkimus tuotti tilastollisesti merkitsevää tietoa, joten 50 koehenkilön otoskoko oli riittävä ja koehenkilöjoukon valinta onnistunut. Virhelähteistä huolimatta tutkimuksen tuloksia voidaan pitää melko luotettavina. Merkittävimpinä tuloksina kuivaverinäytteen valkoisuusprosentin ja laskon väliltä löydettiin korrelaatio. Lisäksi selvä korrelaatio löytyi fibrinogeenin, neutrofiilien, punasolujen kokojakauman, immunoglobuliini A:n, hemoglobiinin ja valkoisuuden väliltä ja näiden muuttujien pohjalta rakennettiin valkoisuuden määrää kuvaava malli. Lisätutkimusta tarvitaan erityisesti valkoisten alueiden luonteen ja syntymekanismien selvittämiseksi. Luotettavien kuivaveren valkoisuuden ja laskon yhteyttä kuvaavien mallien rakentamiseksi tulisi myös toteuttaa tutkimus, jossa on mukana enemmän koehenkilöitä, joiden lasko on selvästi koholla.

## LÄHTEET

- Aguiar, F. J., Ferreira-Junior, M., Sales, M. M., Cruz-Neto, L. M., Fonseca, L. A., Sumita, N. M., Duarte, N. J., Lichtenstein, A., Duarte, A. J. 2012. C-reactive protein: clinical applications and proposals for a rational use. *Revista da Associação Médica Brasileira* 59 (1), 85–92.
- Asakura S. & Oosawa F. 1958. Interaction between Particles Suspended in Solutions of Macromolecules. *Journal of Polymer Science* 33, 183–192.
- Assayag, E. B., Borstein, N., Shapira, I., Mardi, T., Goldin, Y., Tolshinski, T., Vered, Y. Zakuth, V., Burke, M., Berliner, S., Bonet, D. S. 2005. Inflammation sensitive proteins and erythrocyte aggregation in atherothrombosis. *International Journal of Cardiology* 98, 271–276.
- Avitabile, G. & Licenziati, M. 1968. Bolen's test in laryngeal carcinoma and focal tonsillopathy. *La Clinica* 3, 235–241.
- Baskurt, O., Nue, B., Meiselman, H. J. 2012. *Red Blood Cell Aggregation*. Boca Raton: CRC Press.
- Bassuk, S. S., Rifai, N., Ridker, P. M. 2004. High-Sensitivity C-Reactive Protein: Clinical Importance. *Current Problems in Cardiology* 29 (8), 439–93.
- Ben-Ami, R., Barshtein, G., Mardi, T., Deutch, V., Elkayam, O., Yedgar, S., Berliner, S. 2003. A synergistic effect of albumin and fibrinogen on immunoglobulin-induced red blood cell aggregation. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 285, H2663–H2669.
- Birn, H. & Christensen, E. I. 2006. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney International* 69, 440–449.
- Bolen, H. L. 1942. The blood pattern as a clue to the diagnosis of malignant disease. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 27, 1522.
- Bolen, H. L. 1952. The blood pattern in pre-symptomatic malignancy of the gastrointestinal tract. *The American Journal of Digestive Diseases* 19, 127–130.

- Bridgen, M. L. 1999. Clinical Utility of the Erythrocyte Sedimentation Rate. *American Family Physician* 60 (5), 1443–1450.
- Brutin, D., Sobac, B., Loquet, B. & Sampol, J. 2011. Pattern formation in drying drops of blood. *Journal of Fluid Mechanics* 667, 85–95.
- Burke, J. 2013. MSc(Hons), Director of Australian Biologics. 23.8.2013. Sähköpostikirjeen vaihto.
- Constantino, B. T. 2013. Red Cell Distribution Width, Revisited. *Labmedicine*, 44, 2.
- Davalos, D. & Akassoglou, K. 2012. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology* 34, 43–62.
- Droppi Veripalvelu Oy. Suullinen tiedonanto.
- Fernandes, H. P., Cesar, C. L, Barjas-Castro, M. 2011. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 33 (4), 297–301.
- Fåhræus, R. 1921. The suspension-stability of blood. *Acta Medica Scandinavica* 55, 1–228.
- Ganz, N., Singrasa, M., Nicolas, L., Gutierrez, M., Dingemans, J., Döbelin, W., Glinski, M. 2011. Development and validation of a fully automated online human dried blood spot analysis of bosentan and its metabolites using the Sample Card And Prep DBS System. *Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 885– 886(2012), 50–60.
- Geckle, M. 2005. Renal Tubule Albumin Transport. *Annual Review of Physiology* 67, 573–594.
- Goldberger, E. 1939. A rapid bedside test for measuring sedimentation rate. *New York State Journal of Medicine* 39, 867.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11. painos. Philadelphia: Elsevier Inc.
- Hammerschmidt, S., Gessner, C., Wirtz, H., Wahn, H. 2006. Acute Effects of Neutrophil-Derived Oxidative Stress on Pulmonary Microvasculature. *Current Respiratory Medicine Reviews* 2, 39–52.

- Harmening, D. M. 2001. *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*, fourth edition. F.A. Davis Company, Philadelphia.
- Hegseth, J. J., Rashidnia, N. & Chai, A. 1996. Natural convection in droplet evaporation. *Physical Review E* 54 (2), 1640–1644.
- Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A., Laurent, G. 1999. Molecules in focus: Fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 741–746.
- Huttunen, A. 2013. *Kuivaveren puhtauden määrittäminen konenäön avulla*. Oulun yliopisto. Informaatioverkostojen koulutusohjelma Diplomityö.
- Killeen, A. A., Ossina, N., McGlennen, R. C., Minnerath, S., Borgos, J., Alexandrov, V., Sarvazyan, A. 2006. Protein Self-Organization Patterns in Dried Serum Reveal Changes in B-cell Disorders. *Molecular Diagnosis & Therapy* 10 (6), 371–80.
- Lakshmi, A. B., Uma, P., Venkatachalam, Ch., Nageswar, Rao G. S. 2011. A simple slide test to assess erythrocyte aggregation in acute ST-elevated myocardial infarction and acute ischemic stroke: Its prognostic significance. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 54, 63–9.
- Marenduzzo, D., Finan, K. & Cook, P. R. 2006. The depletion attraction: an underappreciated force driving cellular organization. *The Journal of Cell Biology* 175, 681–686.
- Mekalasi Oy. 2010. *Laskomäärittäminen ohje, Vacuette-suljettujärjestelmä (30 min)*.
- Mustajoki, P. & Kaukua, J. 2008. *Senkka ja sata muuta tutkimusta*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Nicholson, J. P., Wolmarans, M. R. & Park, G. R. 2000. The role of albumin in critical illness. *Kidney International* 69, 440–449.
- Nickel, A.C., Berger, R., Brickley, P. 1951. The "Bolen test" in the Diagnosis of Neoplasms. *American Journal of Digestive Diseases* 18 (5), 150–1.
- Niemelä, O. & Pulkki, K. 2010. *Laboratoriolääketiede – kliininen kemia ja hematologia*. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.
- Norman, N. P. & Slicher, A. M. 1950. A practical and inexpensive "screen test" for cancer. *The American Journal of Digestive Diseases* 17 (2), 31–7.
- Parker, S. P. & Cubitt, W. D. 1999. The use of the dried blood spot sample in

- epidemiological studies. *Journal of Clinical Pathology* 52, 633–639.
- Penttilä, I. 2003. *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö.
- Pinskaya, I. Ia. & Sergeeva, T. V. 1973. Diagnostic value of studying a dried drop of blood in cancer (Bolen test). *Khirurgiia (Mosk)* 49, 24–7.
- Rao, S. K., Palazzo, R. S., Metz, H. N., Wilson, D. W., Nikolic, S. D., Graver, M., Rao, P.S. 1997. Redox Potential Measurements of Plasma in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft and Its Clinical Significance, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 38(3), 151–156.
- Reinhart, W. H. & Nagy, C. 1995. Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. *European Journal of Clinical Investigation*, 25 (7), 523–8.
- Rotstein, R., Landau, T., Twig, A., Rubinstein, A., Koffler, M., Justo, D., Constantiner, D., Zeltser, D., Shapira, I., Mardi, T., Goldin, Y., Berliner, S. 2002. The erythrocyte adhesiveness/aggregation test (EAAT). A new biomarker to reveal the presence of low grade subclinical smoldering inflammation in individuals with atherosclerotic risk factors. *Atherosclerosis* 165, 343–351.
- Rubik, B. 2002. Sympathetic Resonance Technology (SRT): Scientific Foundation and Summary of Biological and Clinical Studies. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 6, 835–842.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. 1998 *Anatomy & Physiology*. 4. painos. Von Hoffman Press Inc.
- Siemens. 2008a. IMMULITE High Sensitivity CRP, ohjekirja.
- Siemens. 2008b. Multifibren\* U, käyttöohje.
- Silverthorn, D. U. 2007. *Human Physiology: An Integrated Approach*. 4. painos. San Francisco: Pearson Education Inc.
- Sergel, O. S., Krylova, N. N. & Goncharova, Z. G. 1976. Examination of blood according to Bolen's method in ambulatory practice. *Ter Arkh* 48 (8), 132–5.
- Talstad, I., Scheie, P., Dalen, H., Röli, J. 1983. Influence of Plasma Proteins on Erythrocyte Morphology and Sedimentation. *Scandinavian Journal of Haematology* 31, 478–484.



- Tarasevich, Y. Y. 2004. Mechanisms and models of the dehydration self-organization in biological fluids. *Physics – Uspekhi* 47 (7), 717–728.
- Thermo Electron Corporation. 2005. Konelab Albumin (BCP), käyttöohje.
- Thermo Fisher Scientific. 2010a. Konelab Immunoglobulin A (IgA), käyttöohje.
- Thermo Fisher Scientific. 2010b. Konelab Immunoglobulin M (IgM), käyttöohje.
- Thermo Fisher Scientific. 2010c. Konelab Immunoglobulin G (IgG), käyttöohje.
- Vennapusa B., De La Cruz L., Shah H., Michalski V., Zhang Q. Y. 2011. Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) Measured by the Streck ESR-Auto Plus Is Higher Than With the Sediplast Westergren Method. *American Journal of Clinical Pathology* 135, 386–390.
- White, B. H., Rector, R. R., Miller, J. M., Oktavec, W. A. jr. 1952. The Bolen test for cancer. *American Journal of Surgery* 84 (3), 356–7.
- Yakhno, T. A., Yakhno, V. G., Sanin, A. G., Sanina, O. A., Pelyushenko, A. S., Egorove, N.A., Terentiev, I. G., Smetanina, S. V., Korochkina, O. V., Yashukova, E. V. 2005. The Informative Capacity Phenomenon of Drying Drops. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 24 (2), 96–104.

## LIITE 1

## Tulostaulukko, osa 1.

Koehenkilöiden ikä jaettiin anonymiteetin suojaamiseksi neljään kvartaaliin, joista 1 = 22–26, 2 = 27–46, 3 = 47–67, 4 = 68–99.

ID	Age	Sex	BMI	KV%	KV 1	KV 2	KV vaihtelu	WBC	RBC	HGB
AK01	3	2	22,99	17,9	19,3	16,5	2,8	5,7	4,62	141
AK02	3	2	26,17	15,1	15,6	14,7	0,9	5,7	4,52	140
AK03	2	2	24,22	18,3	18,7	17,8	0,9	5,4	4,04	128
AK04	2	2	30,39	18,8	17,4	20,3	-2,9	6,9	4,36	131
AK05	3	2	20,57	18,5	16,5	20,6	-4,1	5,9	5,06	149
AK06	2	2	20,76	15,9	15,4	16,5	-1,1	5,8	4,43	132
AK07	3	2	31,24	25,0	23,7	26,4	-2,7	6,2	4,61	125
AK08	2	1	26,06	19,6	21	18,3	2,7	5,5	5,12	154
AK09	1	1	26,29	11,2	10,5	12	-1,5	4,3	4,59	137
AK10	2	1	22,64	15,7	13,7	17,8	-4,1	2,92	4,59	139
AK11	1	1	22,84	18,8	17,2	20,5	-3,3	6,3	5,13	161
AK12	2	1	26,85	17,7	19,1	16,3	2,8	5,5	5,3	153
AK13	3	1	35,02	15,7	15,2	16,2	-1	7	5,23	164
AK14	2	1	29,64	19,9	20,7	19,1	1,6	5,9	5,21	146
AK15	2	2	22,83	14,3	16,4	12,3	4,1	4,9	4,4	128
AK16	2	2	22,06	17,1	18,1	16	2,1	4,1	4,69	143
AK17	3	1	25,01	14,7	18,4	11	7,4	8	4,85	145
AK18	2	1	21,21	17,4	12,8	22	-9,2	8,1	5,45	155
AK19	1	2	20,15	15,5	15,5			3,8	4,83	144
AK20	1	2	23,78	19,5	22,3	16,8	5,5	7,1	4,79	139
AK21	2	2	21,14	15,3	13,2	17,3	-4,1	4,6	4,6	137
AK22	3	1	25,65	17,7	15,7	19,7	-4	5,4	5,14	155
AK23	1	1	23,08	18,1	17,5	18,6	-1,1	3,4	5,51	160
AK24	3	2	30,09	18,6	17,5	19,8	-2,3	6,1	4,43	136

AK25	3	1	28,73	13,7	12,4	15	-2,6	4,4	5,23	159
AK26	1	2	21,67	10,5	10,2	10,9	-0,7	4,8	4,33	131
AK27	3	2	25,06	17,4	15,7	19,1	-3,4	5,3	4,64	141
AK28	1	2	21,05	15,9	14,2	17,6	-3,4	5,0	4,45	133
AK29	2	1	24,62	21,5	21,7	21,4	0,3	5,3	5,06	155
AK30	1	1	24,49	15,1	15,6	14,6	1	5,2	5,11	164
AK31	1	2	25,73	17,2	17,7	16,7	1	6,1	4,58	134
AK32	1	1	25,00	18,7	19,1	18,4	0,7	7,4	5,17	155
AK33	3	1	27,34	12,5	13,8	11,2	2,6	3,5	4,8	152
AK34	2	1	24,44	18,9	15,1	17,3	-2,2	4,9	4,98	155
AK35	4	2	22,60	16,2	15,1	17,3	-2,2	5,6	4,83	151
AK36	4	1	26,79	24,9	27	22,8	4,2	8,7	3,11	106
AK37	4	1		25,3	25,3	25,3	0	8,6	3,87	123
AK38	4	1	33,51	22,9	22,7	23,1	-0,4	7,3	3,96	125
AK39	4	1	27,68	17,6	18	17,2	0,8	5,7	4,35	137
AK40	4	2	32,18	11,6	12,1	11,1	1	4,9	4,34	124
AK41	4	2	27,73	23,6	24,7	22,6	2,1	4,9	4,28	135
AK42	4	1	24,21	27,4	28,9	25,9	3	5,4	3,91	124
AK43	4	2	28,72	19,0	21	17,1	3,9	6,1	3,91	131
AK44	3	2	23,24	24,8	23,1	26,6	-3,5	5	4,02	115
AK45	2	1	28,07	34,3	34,1	34,5	-0,4	16,4	4,54	121
AK46	4	2	16,02	16,5	18,7	14,4	4,3	4,8	4,03	122
AK47	4	1	29,38	14,9	16,5	13,2	3,3	4,6	4,3	127
AK48	4	2	37,92	13,2	12,5	13,9	-1,4	6	4,89	145
AK49	4	2	18,18	16,1	17,3	15	2,3	4,1	3,64	122
AK50	3	2	26,36	13,2	13,1	13,3	-0,2	4,3	4,56	137

## LIITE 2

## Tulostaulukko, osa 2.

ID	HCT	MCV	MCH	PLT	LYMPH %	MXD %	NEUT %	LYMFOS#	MXD #	NEUT #
AK01	43	93	31	206	37,5	7,8	54,7	2,1	0,4	3,2
AK02	42	92	31	226	47,9	11,8	40,3	2,7	0,7	2,3
AK03	36	90	32	228	41,2	7,3	51,5	2,2	0,4	2,8
AK04	39	89	30	259	39,5	9,6	50,9	2,7	0,7	3,5
AK05	44	88	29	239	35,6	7,4	57	2,1	0,4	3,4
AK06	39	89	30	224	53,4	5,1	41,5	3,1	0,3	2,4
AK07	39	84	27	416	19,9	7,3	72,8	1,2	0,5	4,5
AK08	46	90	30	290	34,5	13,8	51,7	1,9	0,8	2,8
AK09	39	86	30	223	46,1	6,6	47,3	2	0,3	2
AK10	42	91	30	289	41,4	17	41,6	1,2	0,5	1,2
AK11	46	90	31	244	17,8	13,6	68,6	1,1	0,9	4,3
AK12	46	86	29	286	51,2	11,1	37,7	2,8	0,6	2,1
AK13	47	90	31	238	33,8	9,7	56,5	2,4	0,7	3,9
AK14	44	84	28	229	28,8	8,9	62,3	1,7	0,5	3,7
AK15	39	88	29	282	38,4	11,4	50,2	1,9	0,6	2,4
AK16	42	89	31	257	45	10,5	44,5	1,8	0,4	1,9
AK17	40	83	30	395	31	10,3	58,7	2,5	0,8	4,7
AK18	46	84	28	295	33,8	16,3	49,9	2,7	1,3	4,1
AK19	44	91	30	190	33,5	10,6	55,9	1,3	0,4	2,1
AK20	42	88	29	234	30,6	9,7	59,7	2,2	0,7	4,2
AK21	40	87	30	220	32,7	8,6	58,7	1,5	0,4	2,7
AK22	46	89	30	224	35,2	11	53,8	1,9	0,6	2,9
AK23	47	86	29	192	45,4	11,2	43,4	1,5	0,4	1,5
AK24	40	91	31	264	50,3	6,3	43,4	3,1	0,4	2,6
AK25	45	87	30	177	18,2	11,7	70,1	0,8	0,5	3,1
AK26	39	91	30	211	37,0	16,1	46,9	1,8	0,8	2,2
AK27	41	88	30	287	36,9	5,6	57,5	2,0	0,3	3,0

AK28	41	91	30	227	28,3	7,2	64,5	1,4	0,4	3,2
AK29	44	87	31	237	38,3	9,9	51,8	2,0	0,5	2,8
AK30	48	94	32	210	32,6	13,3	54,1	1,7	0,7	2,8
AK31	40	88	29	288	36,7	15,2	48,1	2,2	0,9	3
AK32	46	88	30	186	27,1	6,4	66,5	2	0,5	4,9
AK33	44	92	32	252	41	10,3	48,7	1,4	0,4	1,7
AK34	45	90	31	220	43,6	10,2	46,2	2,1	0,5	2,3
AK35	45	93	31	236	38,8	7,5	53,7	2,2	0,4	3
AK36	32	102	34	250	25,8	17,9	56,3	2,2	1,6	4,9
AK37	36	92	32	181	14	6,2	79,8	1,2	0,5	6,9
AK38	38	96	32	252	22,2	9,7	68,1	1,6	0,7	5
AK39	41	94	32	182	26,8	13,8	59,4	1,5	0,8	3,4
AK40	37	86	29	196						
AK41	40	93	32	220	37,5	9,9	52,6	1,8	0,5	2,6
AK42	38	97	32	195	45,9	14,1	40	2,5	0,8	2,1
AK43	39	101	34	240	32,8	13,2	54	2	0,8	3,3
AK44	35	88	29	434	33,1	15,4	51,5	1,7	0,8	2,5
AK45	37	82,2	26,7	520	24,7	12,9	62,4	4,1	2,1	10,2
AK46	37	92	30	292	33,7	11,3	55	1,6	0,5	2,7
AK47	37	85	30	197	27,2	10,8	62	1,3	0,5	2,8
AK48	44	91	30	160	53	12	35	3,2	0,7	2,1
AK49	37	101	34	251	25,1	12,8	62,1	1	0,5	2,6
AK50	40	88	30	257	35,9	131	51	1,5	0,6	2,2

## LIITE 3

## Tulostaulukko, osa 3.

ID	RDW_SD	RDW_CV	Manley Lasko	RaakaLasko	S-ALB	S-IgG	S-IgA	S-IgM	S-hsCRP	P-FIBR
AK01	48,1	13,2	3	4	39,5	9,6	3,45	0,88	0,406	2,6
AK02	49,5	14	14	16	24,8	12,3	2,05	0,5	0,62	2,8
AK03	43	12,3	14	16	20,8	13,8	1,36	0,39	0,409	2,1
AK04	44,1	12,5	7	9	20,1	10,8	0,86	0,41	0,841	2,1
AK05	42,4	12	1	1	32,8	13,1	1,58	1,46	0,269	1,2
AK06	41,1	11,4	4	5	38,8	8,8	1,34	1,66	0,278	2,6
AK07	43,5	14	20	25	21,1	27,9	0,13	0,34	0,714	2,2
AK08	44,2	12,5	4	5	28,9	10,9	2,5	0,7	0,884	1,5
AK09	43,1	12,8	4	5	27,5	12,9	1,5	0,84	0,83	1,5
AK10	46,6	13,1	2	2	42,1	11,6	1,08	1,21	0,037	1,5
AK11	41,7	12,3	1	1	41,3	12	1,07	0,79	0,425	1,5
AK12	46,6	14,1	2	2	43,4	11,4	0,72	0,92	0,588	1,4
AK13	44,8	13	3	4	42,9	13,6	2,74	1,73	0,866	1,3
AK14	44,8	14	8	10	38,5	19,8	0,02	1,77	5,83	1,4
AK15	40,7	11,9	2	2	37,5	8	1,42	1,07	3,74	1,1
AK16	42,2	12,2	5	6	37,7	9,5	1,36	2,39	1,95	1,5
AK17	35,3	10,7	4	5	40,1	7,4	2,49	0,23	0,185	1,5
AK18	40,3	12,5	1	1	41,1	17,7	1,24	1,61	0,767	1,5
AK19	44	12,5	1	1	40,1	11,2	1,68	1,03	0,088	1,8
AK20	42,2	12	8	10	36,9	14,4	3,19	1,95	0,287	1,8
AK21	47,2	13,4	3	3	26,3	9,1	1,3	2,74	0,303	1,4
AK22	45,2	13,1	1	1	40,6	7,7	2,46	0,91	0,501	1,9
AK23	42,7	12,7	1	1	34,8	10,1	1,78	1,33	0,453	1,2
AK24	44,1	12,1	7	10	41,5	10,1	2,99	0,91	1,23	1,6
AK25	44,0	13,5	1	1	42,5	11,6	1,3	1,62	0,317	1,7
AK26	46,3	13,2	2	3	36,6	11,1	1,06	1,77	0,405	1,6
AK27	41,2	11,9	3	5	39,6	12,2	0,64	0,77	0,33	1,9

AK28	45,3	12,9	2	3	41,1	9,4	3,3	1,67	0,211	1,8
AK29	39,0	11,8	1	1	41,5	10,4	3,07	0,64	0,073	1,7
AK30	48,1	13,4	1	1	39,4	10,5	2,4	0,26	2,23	1,7
AK31	45,6	13,3	3	5	33,8	9,9	1,63	0,68	3,71	2,6
AK32	42,1	12,3	3	5	41,1	9,3	1,87	1,49	4,64	3,2
AK33	44,7	12,8	2	2	38,7	9,2	1,69	1,13	0,419	2,2
AK34	44,6	13	1	1	41,2	8,6	3,24	0,32	1,56	1,6
AK35	46,3	12,7	3	5	37,7	8,8	3,49	0,51	0,258	2,4
AK36	59,1	15,6	22	30	40,1	9,6	2,26	0,4	1,58	2,7
AK37	48,8	14	36	50	30,6	16,7	5	0,31	4,31	2,4
AK38	51,1	13,9	14	20	36,5	9,6	3	0,26	2,78	2,5
AK39	50,2	14,4	12	15	34,8	14,2	3,67	1,18	4,06	2,6
AK40	42,2	12,7	5	7	36	8,9	2,67	0,4	1,15	1,8
AK41	44,3	12,2	36	50	32,4	12,5	3,8	0,75	5,03	3,8
AK42	55,1	15,6	62	80	35,8	12,5	3,33	0,24	0,987	4,2
AK43	59,3	15,7	22	30	37	9	1,41	0,56	3,16	2,9
AK44	47	13,8	20	27	35,8	7,3	2,47	1,13	1,09	3,4
AK45	51,7	17	80	100	23,4	16,4	4,65	2,3	93,1	9,0
AK46	47,3	13,6	3	5	30,5	9,5	4,11	0,71	0,27	2,8
AK47	42,3	13,1	3	5	41,4	13,8	1,64	1,18	5	3,4
AK48	46,3	13,1	1	1	39,1	15,1	0,97	0,91	1,01	1,6
AK49	51,8	13,6	10	15	34,2	11	2,22	0,28	10,5	4,2
AK50	45	13	7	10	37,6	12	3,76	1,38	0,936	2,6