



**PIRKANMAAN
AMMATTIKORKEAKOULU**

**ADIPOKIINIEN JA INTERLEUKIINI-6:N PITOISUUS
PLASSMASSA AKUUTIN EPILEPSIAKOHTAUKSEN
YHTEYDESSÄ**

Petra Miikkulainen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2009
Laboratorioalan koulutusohjelma
Pirkanmaan ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

MIKKULAINEN, PETRA:

Adipokiinien ja interleukiini-6:n pitoisuus plasmassa akuutin epilepsia-kohtauksen yhteydessä.

Opinnäytetyö 53 s., liitteet 2 s.
Joulukuu 2009

Epilepsia-kohtaukset ovat poikkeavan purkauksellisen aivosähkötoiminnan seurauksena ilmeneviä aivotoiminnan häiriöitä. Sairautta kutsutaan epilepsiaksi, kun henkilöllä on taipumus saada kohtauksia toistuvasti. Vaikeahoitoisella epilepsialla tarkoitetaan sairautta, johon lääkehoito ei tehoa toivotulla tavalla. Vaikeahoitoisiin epilepsioihin yritetään löytää ratkaisuja tutkimustyöllä, joka tähtää sairauden mekanismien tuntemiseen.

Rasvakudoksen solut tuottavat tulehduksen välittäjäaineita, tiettyjä sytokiineja, sekä sytokiinien kaltaisia hormoneja, adipokiineja, jotka muun muassa säätelevät immuunijärjestelmän toimintaa. Myös tietyt muut solutyypit tuottavat adipokiineja. Monilla adipokiineilla on tulehdusta edistäviä tai vaimentavia vaikutuksia ja ne toimivat yhdessä sytokiinien kanssa tulehdusreaktion säätelyssä. Uusimpien tutkimusten mukaan myös epilepsia-kohtausten yhteydessä on havaittu elimistön tulehdustekijöiden aktivoitumista.

Opinnäytetyössä tutkittiin kolmen adipokiinin, leptiinin, adiponektiinin ja adipsiinin, sekä tulehdussytokiini interleukiini-6:n tuottoa akuutin epilepsia-kohtauksen yhteydessä vaikeahoitoista epilepsiaa sairastavilla potilailla. Potilaista oli otettu verinäytteet ennen epilepsia-kohtausta sekä tietyn väliajoin kohtauksen jälkeen. Plasmanäytteiden adipokiini- ja interleukiini-6-pitoisuudet määritettiin sandwich-ELISA-menetelmällä.

Plasman leptiinipitoisuuden havaittiin nousevan epilepsia-kohtauksen jälkeen koko potilasaineistossa ja selvemmin ohimolohkoepilepsiaa sairastavilla potilailla. Epilepsia-kohtauksen lateralisaatioista vasemmanpuoleinen aiheutti tilastollisesti merkitsevän nousun veren leptiinipitoisuudessa. Muiden tutkittujen adipokiinien ja interleukiini-6:n pitoisuuksissa ei havaittu merkittäviä muutoksia epilepsia-kohtauksen yhteydessä.

Koe-eläin tutkimuksissa leptiini on todettu olevan kohtauksia ehkäisevä ja hermosoluja suojeleva tekijä. Plasman leptiinipitoisuuden nousu voisi olla elimistön suojareaktio kohtauksen aiheuttamille muutoksille aivojen hermosoluissa. Aivojen anatomia voisi selittää pitoisuserot eri epilepsiatyyppien tai lateralisaatioiden välillä. Leptiinivälittimen mekanismi voisi olla yksi tulevaisuuden lääkekehityksen suunnista epilepsian hoidossa, mutta lisätutkimuksia leptiinin roolista epilepsian yhteydessä tarvitaan.

Avainsanat: Epilepsia, rasvakudos, adipokiinit, leptiini, adiponektiini, adipsiini, interleukiini-6.

ABSTRACT

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu
Pirkanmaa University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

MIKKULAINEN, PETRA:

Adipokine and interleukin-6 plasma concentrations in acute epileptic seizure.

Bachelor's Thesis 53 pages, appendices 2 pages.
December 2009

Epileptic seizures are brain disorders resulting from abnormal electric burst in the brain. When a patient has a disposition to have recurrent seizures, the condition is recognized as epilepsy. Refractory epilepsy means epilepsy that does not respond to the medication as a desired manner. Basic and translational research on the pathophysiological mechanisms and mediators of epilepsy is needed to develop novel improved treatments for refractory epilepsy.

White adipose tissue cells produce proinflammatory cytokines and cytokine-like hormones called adipokines. Recent studies show that the production of adipokines is not restricted to adipose tissue, but also many other cells produce and response to adipokines. In addition to their other functions, adipokines also regulate the immune system. Many adipokines have pro-inflammatory or anti-inflammatory effects and they co-operate with cytokines in regulation of inflammatory reaction. It has recently been reported that many inflammatory factors are activated in association with epileptic seizure.

In the present study, the production of three adipokines i.e. leptin, adiponectin and adipsin and that of a proinflammatory cytokine interleukin-6 were studied before and after acute epileptic seizure in patients with refractory epilepsy. Blood samples were collected from patients before and after the index seizure. Plasma adipokine levels and interleukin-6 concentrations were measured with sandwich ELISA.

Plasma concentrations of leptin were found to increase after epileptic seizure in the whole patient group and more distinctively in patients with temporal lobe epilepsy. Interestingly, left-sided but not right-sided lateralization of the seizure caused statistically significant increase in plasma leptin levels. Epileptic seizure did not cause any significant changes in adiponectin, adipsin or interleukin-6 levels in plasma.

Experimental data support leptin as an anticonvulsant and a neuroprotective factor. Increase in leptin plasma concentrations might reflect an endogenous attempt to protect nerve cells from damaging effects of the convulsion. Brain anatomy could explain the differences in concentrations between epilepsy syndromes and lateralizations. A leptin-mediated mechanism may be a valuable therapeutic option for future treatment of epilepsy, but further research is needed to explore the possibility.

Keywords: Epilepsy, adipose tissue, adipokines, leptin, adiponectin, adipsin, interleukin-6

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1 Epilepsia	7
2.1.1 Epilepsiatyypit	7
2.1.2 Epilepsiakohtausten luokittelu	9
2.2 Rasvakudos ja tulehdus	10
2.2.1 Liikalihavuus	12
2.3 Rasvakudoksen tuottamat adipokiinit ja sytokiinit	14
2.3.1 Leptiini	14
2.3.2 Adiponektiini	15
2.3.3 Adipsiini	16
2.3.4 Sytokiinit	17
2.4 Adipokiinit, sytokiinit ja epilepsia	18
2.5 ELISA-menetelmä	21
2.5.1 Suora ja epäsuora menetelmä	22
2.5.2 Sandwich-ELISA	22
2.5.3 Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät	24
2.5.4 Verinäytteen käsittely ELISA-määrittystä varten	25
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	26
4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	27
4.1 Tutkittavat näytteet	27
4.2 Interleukiini-6-pitoisuuden määrittäminen	28
4.3 Adipokiinipitoisuuksien määrittäminen	30
4.4 Tilastollinen analyysi	31
5 TULOKSET	32
5.1 Adipokiinien ja interleukiini-6:n plasmapitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä	32
5.2 Epilepsiatyyppin vaikutus adipokiinien ja interleukiini-6:n pitoisuuteen plasmassa	34
5.3 Sähköisen purkauksen lateralisaation vaikutus adipokiinien ja interleukiini-6:n pitoisuuteen plasmassa	37
6 MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELU	42
6.1 Menetelmät	42
6.2 Tulokset	43
LÄHTEET	47
LIITE 1: SANASTO	
LIITE 2: LYHENTEET	

1 JOHDANTO

Epilepsia on neurologinen sairaus, jossa potilas saa toistuvasti äkillisiä aivojen sähkötoiminnan häiriöistä johtuvia kohtauksia. Kohtausten vakavuusaste vaihtelee potilaiden sekä eri epilepsiatyyppien välillä. Epilepsiaa kutsutaan vaikeahoitoiseksi, jos lääkehoidolla ei saavuteta riittävää hoitovastetta kohtauksien esiintymistiheydessä tai voimakkuudessa. Tällainen sairaus häiritsee potilaan normaalia elämää suuresti. Joissakin tapauksissa potilaan aivoja voidaan operoida kirurgisesti, mutta aina tähän ei ole mahdollisuutta esimerkiksi kohtauspesäkkeen tuntemattoman tai vaikean sijainnin vuoksi.

Adipokiinit ovat rasvakudoksen rasvasolujen tuottamia sytokiinien kaltaisia välittäjäaineita, joiden on havaittu liittyvän moniin elimistön toimintoihin. Niillä on keskeinen rooli paitsi liikalihavuudessa, myös muun muassa immuunijärjestelmän sekä tulehdusreaktioiden säätelyssä. Monilla adipokiineilla on havaittu olevan joko tulehdusta edistäviä tai ehkäiseviä vaikutuksia. Uusimpien tutkimusten mukaan myös epilepsiakohtausten yhteydessä on havaittu tulehdustekijöiden aktivoitumista.

Opinnäytetyö toteutettiin kesän ja syksyn 2009 aikana Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen immunofarmakologian tutkimusryhmässä osana tutkimusyhteistyöprojektiä Tampereen yliopistollisen sairaalan neurologian klinikan kanssa. Tutkimuksen tarkoituksena on tutkia immunologisia muutoksia epilepsiakohtausten yhteydessä vaikeahoitoista epilepsiaa sairastavilla potilailla. Opinnäytetyöhön kuuluvassa osassa tutkittiin tiettyjen adipokiinien sekä tulehdussytokiini interleukiini-6:n ilmentymistä akuutin epilepsiakohtausten yhteydessä. Työn tuloksia voidaan tulevaisuudessa hyödyntää uusien, tehokkaiden hoitojen kehitystyössä.

Opinnäytetyön ohjaajina toimivat FT Riina Nieminen ja professori Eeva Moilanen (Tampereen yliopisto) sekä FT Tuuli Välineva (Pirkanmaan ammattikorkeakoulu). Lisäksi opinnäytetyöhön osallistuivat asiantuntijoina erikoislääkäri Tiina Alapirtti ja dosentti Jukka Peltola (Tampereen yliopistollinen sairaala) sekä LT Katriina Vuolteenaho (Tampereen yliopisto).

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Epilepsia

Epilepsiat ovat etiologialtaan, oireiltaan ja alkamisiältään monimuotoisia neurologisia sairauksia, joissa potilaalla on taipumus saada toistuvasti epileptisiä kohtauksia ilman poikkeuksellisia altistavia tekijöitä. Epileptinen kohtaus on äkillinen ohimenevä aivo-toiminnan häiriö, joka johtuu hermosolujen liiallisesta tai poikkeavasta sähköisestä toiminnasta. (Fisher ym. 2005.) Epilepsiakohtaukset ovat muutamasta sekunnista minuutteihin kestäviä kohtauksia, joiden oireet vaihtelevat hetkellisistä poissaolokohtauksista vakaviin tajuttomuuskouristuskohtauksiin sekä pahimmillaan hengenvaaralliseen pitkityneeseen kohtaukseen eli *status epilepticus*-tilaan (St. Louis & Granner 2008).

Hermosolujen toiminnan häiriö tapahtuu laajuudeltaan vaihtelevalla alueella aivokuorella (St. Louis & Granner 2008). Epileptinen purkaus voi tapahtua vain paikallisella alkamiskohdallaan tai levitä laajemmalle alueelle aivoissa. Kohtaus voi myös suoraan yleistyä yli koko aivojen kuorikerroksen. (Kälviäinen 2009, 5.)

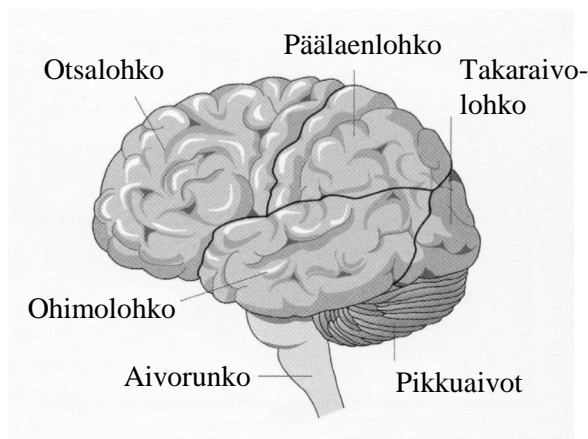
2.1.1 Epilepsiatyypit

Epilepsiatyypit luokitellaan etiologian sekä aivojen kuvantamislöydösten eli aivosähkökäyrän (EEG) ja magneettikuvausten perusteella. Tavallisesti epilepsiatyypit jaetaan etiologian perusteella kahdella tavalla; idiopaattisiin ja symptomaattisiin epilepsioihin. Näiden lisäksi tunnistetaan myös niin kutsuttu kryptogeeninen eli todennäköisesti symptomaattinen epilepsia, jossa taudin etiologiaa ei ole pystytty selvittämään. (Engel & International League Against Epilepsy (ILAE) 2001.)

Idiopaattisella epilepsialla tarkoitetaan epilepsioita, jotka syntyvät ilman ulkopuolista tai aivojen rakenteellista tekijää (Engel & International League Against Epilepsy (ILAE) 2001). Symptomaattisella epilepsialla puolestaan tarkoitetaan epilepsiaa, joka aiheutuu aivojen anatomisista muutoksista tai aivosairaudesta. Tällaisia muutoksia voivat olla esimerkiksi synnynnäiset kehitys- ja aineenvaihduntahäiriöt, aivovaurion, aivotulehduk-

sen tai aivoverenkiertohäiriön jälkeiset muutokset sekä aivokasvaimet. (St. Louis & Granner 2008; Kälviäinen 2009, 11.)

Epilepsia voidaan jaotella myös kohtauksia aiheuttavan aivoalueen mukaan ohimolohkoepilepsiaan (temporal lobe epilepsy, TLE), otsalohkoepilepsiaan (frontal lobe epilepsy, FLE), päälaenlohkoepilepsiaan (parietal lobe epilepsy, PLE) ja takaraivolohkoepilepsiaan (occipital lobe epilepsy, OLE) (kuvio 1). Ohimolohko sekä otsalohkon liikeaivokuori ovat yleisimpiä epilepsia-kohtauksia aiheuttavia aivoalueita. Kohtauspesäkkeen alue vaikuttaa myös siihen, millaisia oireita kohtauksen aikana ilmenee. Vaikeahoitoisissa epilepsioissa tarkan alueen paikantaminen on tärkeää, sillä sen avulla voidaan selvittää kirurgisen hoidon mahdollisuuksia. (Kälviäinen 2009, 16–17.)



KUVIO 1. Aivojen rakenne (Kälviäinen 2009, 11)

Potilaalla voi olla toistuvia ulkoisista tai sisäisistä tekijöistä johtuvia kohtauksia ilman, että ne välttämättä ovat epileptisiä. Kun kohtaukset saadaan loppumaan poistamalla välitön altistava tekijä, puhutaan akuutista symptomaattisesta kohtauksesta, eikä sitä käsitellä varsinaisena epilepsiana. Tällaisia altistavia tekijöitä voivat olla muun muassa alkoholin tai lääkkeiden (väärin)käyttö, aineenvaihdunnan häiriöt (esimerkiksi hypertai hypoglykemia) tai infektiot. (St. Louis & Granner 2008.)

2.1.2 Epilepsiakohtausten luokittelu

Epilepsiakohtaukset jaotellaan niiden yleistyneisyyden asteen mukaan paikallisalkuisiin sekä yleistyneisiin kohtauksiin. Yleistyneissä epilepsioissa kohtaus tapahtuu samanaikaisesti molemmilla aivopuoliskoilla. Paikallisalkuiset kohtaukset alkavat tietyltä aivoalueelta, joko oikealta tai vasemmalta aivopuoliskolta. Kohtauspesäkkeen aivopuoliskon mukaan määritetään myös sähköisen purkauksen lateralisaatio, joka voi olla vasen, oikea, molemmat tai tuntematon. Kaikissa tapauksissa kohtauksen tyyppiä ei pystytä luokittelemaan riittämättömien tietojen vuoksi. (Kälviäinen 2009, 14–15.)

Yleistyneet kohtaukset voivat olla lyhyitä poissaolokohtauksia, äkillisiä lihasnykäyksiä kasvoissa ja raajoissa aiheuttavia kloonisia- tai myokloonisia kohtauksia, lihasten jäykistymistä aiheuttavia toonisia kohtauksia tai äkillisestä lihasjänteiden menetyksestä johtuvia lyyhistymiskohtauksia. Rajuimmillaan yleistynyt epilepsiakohtaus aiheuttaa voimakkaan tajuttomuuskouristuskohtauksen, joissa vuorottelevat vartalon jäykistyminen (toonisuus) ja kouristukset (kloonisuus). (Kälviäinen 2009, 15.)

Paikallisalkuiset kohtaukset jaotellaan yleensä kolmeen tyyppiin kohtauksen oireiden perusteella. Nämä tyypit ovat yksinkertainen paikallisalkuinen kohtaus (simple partial seizure, SPS), monimuotoinen paikallisalkuinen kohtaus (complex partial seizure, CPS) sekä toissijainen yleistynyt kohtaus (secondary generalized tonic clonic seizure, SGTCs). Yksinkertaisissa kohtauksissa ei esiinny tajunnanhäiriöitä, ja motoriset oireet ovat yleensä lieviä. Yksinkertaisiin kohtauksiin liittyy yleensä myös aistioireita kuten maku-, haju- ja kuuloaistimuksia sekä psyykkisiä oireita, esimerkiksi muistihäiriöt, ymmärryksen häiriöt ja harhat. (St. Louis & Granner 2008; Kälviäinen 2009, 14–15.)

Monimuotoisiin kohtauksiin liittyy tajunnan hämärtyminen sekä automatismit, eli raajojen ja suun epätarkoituksenomaiset liikkeet, jotka saattavat olla tahdosta riippumattomia tai osittain koordinoituja. Sekä yksinkertaiset että monimuotoiset kohtaukset voivat yleistyä rajuksi tajuttomuuskouristuskohtaukseksi sähköpurkauksen levitessä kauttaaltaan molempiin aivopuoliskoihin, jolloin kohtauksia kutsutaan toissijaiseksi yleistyneeksi kohtaukseksi. (St. Louis & Granner 2008; Kälviäinen 2009, 14–15.)

Epilepsiaa voidaan nykyään tehokkaasti hoitaa lääkityksellä. Yli puolella paikallisalkuiseen epilepsiaan sairastuneista sairaus saadaan rauhoitettua yhdellä lääkkeellä. Kahden

tai kolmen lääkkeen yhdistelmähoito auttaa noin 15 % jäljelle jääneistä potilaista. Ongelmina epilepsialääkkeissä sekä yhdistelmähoidoissa ovat niiden monet haittavaikutukset. Ihanteellinen epilepsialääke perustuisi epilepsian mekanismien tunnistamiseen sekä lääkeaineen tarkkojen vaikutusmekanismien tuntemiseen. Tällainen lääke estäisi vain poikkeavan purkauksellisen sähkötoiminnan syntymisen ja etenemisen, mutta ei vaikuttaisi hermosolujen normaaliin toimintaan. (Kälviäinen 2009, 18.)

Joissakin tapauksissa edes lääkkeiden yhdistelmät eivät hillitse kohtausten ilmenemistä, jolloin puhutaan vaikeahoitoisesta epilepsiasta. Osaa vaikeahoitoista epilepsiaa sairastavista voidaan mahdollisesti hoitaa kirurgisin menetelmin. Paikallisalkuisissa kohtauksissa kirurginen toimenpide voidaan tehdä kohtauspesäkkeen alueelle, mutta myös esimerkiksi aivokurkiaisien halkaisu vähentää merkittävästi yleistyneitä vakavia tajuttomuuskouristuskohtauksia. (Kälviäinen 2009, 25–26.) Myös ketogeenisellä ruokavaliolla (vähähiilihydraattinen, runsaasti rasvoja ja proteiineja sisältävä ruokavalio) on todettu olevan epilepsiakohtauksia ehkäisevä vaikutus, ja sitä käytetään joskus hoitokeinona vaikeahoitoisessa epilepsiassa. (Stern 2009, 273.)

2.2 Rasvakudos ja tulehdus

Rasvakudosta esiintyy nisäkkäillä kahdessa muodossa, joista toista kutsutaan valkoiseksi ja toista ruskeaksi rasvakudokseksi. Valkoinen rasvakudos on päätyyppi ja se on elimistön tärkeä energiavarasto. Ruskeaa rasvakudosta esiintyy lähes yksinomaan vastasyntyneillä ja sen tarkoitus on huolehtia elimistön lämmönsäätelystä syntymän jälkeisinä viikkoina. Rasvakudos sisältää rasvasolujen eli adiposyyttien sekä preadiposyyttien, fibroblastien ja endoteelisolujen lisäksi myös runsaasti immuunijärjestelmään kuuluvia soluja, kuten lymfosyyttejä ja makrofageja. Rasvakudoksen makrofagit ovat luuytimeistä peräisin ja niiden määrä kudoksessa on suoraan verrannollinen lihavuuteen. (Tilg & Moschen 2006, 772.)

Valkoista rasvakudosta ei enää nykyään pidetä vain energiavarastona, vaan myös tärkeänä tekijänä elimistön monissa muissa toiminnoissa. Uusimpien tutkimusten mukaan rasvakudoksen on todettu olevan tärkeä komponentti myös esimerkiksi sisäeritys- sekä immuunijärjestelmässä. Rasvakudoksen solut tuottavat välittäjäaineita, muun muassa

sytokiineja, joista osa toimii tulehduksen välittäjäaineina, sekä sytokiinien kaltaisia liukoisia tekijöitä, joita kutsutaan adipokiineiksi. Adipokiinit ovat signaalimolekyylejä, jotka toimivat vuorovaikutuksessa rasvakudoksen ja immuunijärjestelmän välillä. Uusien tutkimustulosten mukaan adipokiineja tuottavat paitsi rasvakudoksen solut, myös monet muut elimistön solut. Adipokiineilla on yhdessä sytokiinien kanssa keskeinen rooli rasvakudoksen tulehdusvasteessa. (Tilg & Moschen 2006, 772–773.)

Tulehdus on elimistön suojareaktio ulkoisia tai sisäisiä ärsyksiä vastaan, ja sen tarkoituksena on eliminoida reaktion aiheuttaja, signaloida soluja uhasta sekä käynnistää paraneminen. Tulehduksen voivat aiheuttaa mikrobit tai jokin niiden rakenneosia, elimistölle vieraat aineet ja kemikaalit, fysikaaliset tekijät tai elimistön omat rakenteet, joita ei joko tunnista tai jotka ovat käyneet haitalliseksi. (Seppälä & Meri 2003, 756.) Tulehduksen klassiset kliiniset oireet ovat kuumotus, turvotus, punoitus ja kipu sekä toiminnan häiriintyminen. Kuumotus ja punoitus johtuvat lisääntyneestä verenvirtauksesta tulehdusalueelle, turvotus verisuonten lisääntyneestä läpäisevyydestä sekä tulehdussolujen kertymisestä tulehduspesäkkeeseen. Kipua aiheuttaa erilaisten ärsyttävien välittäjäaineiden vapautuminen tulehdusalueella. (Moilanen 2002, 70.)

Tulehdusreaktion kulku on hyvin samankaltainen aiheuttajasta riippumatta, johtuen elimistössä syntyvistä tulehduksen välittäjäaineista. Tulehduksen välittäjäaineita vapautuu tai muodostuu plasmassa olevista esiasteista tai niitä syntetisoidaan tulehdus- ja kudossoluissa vasteena tulehduksen aiheuttajalle. Tulehduksen välittäjäaineet muodostavat toistensa toimintoja säätelevän, täydentävän ja muuntelevan verkoston. (Moilanen 2002, 71.)

Sytokiinit ovat proteiini- ja glykoproteiinirakenteisia signaalimolekyylejä, jotka toimivan muun muassa tulehduksen välittäjäaineina. Tulehdusreaktiossa sytokiinit ovat aktivoituneiden tulehdussolujen (muun muassa makrofagit, monosyytit, lymfosyytit) tai tulehtuneen kudoksen solujen tuottamia proteiineja ja ne säätelevät immuunivastetta ja tulehdusreaktion kulkua vaikuttaen erityisesti leukosyyttien toimintaan. Sytokiinit vaikuttavat pääasiassa paikallisesti, mutta levitessään elimistössä verenkierron mukana niillä voi olla myös systeemisiä vaikutuksia. Osa niistä toimii tulehdusta voimistavina eli proinflammatorisina tekijöinä ja osa tulehdusta rauhoittavina tai ehkäisevinä eli antiinflammatorisina tekijöinä sekä paranemisprosessin käynnistäjinä. Tärkeimpiä sytokiineja ovat suuri joukko interleukiineja, tuumorinekroositekijä- α (TNF- α), interferonit

α , β ja γ (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) sekä transformoiva kasvutekijä β (TGF- β). (Moilanen 2002, 81–83.) Sytokiineihin kuuluvat myös kemokiinit, jotka houkuttelevat tulehdusalueelle leukosyyttejä sekä tulehdusta voimistavia ja ehkäiseviä sytokiineja (Julkunen ym. 2005, 734).

Sytokiinit vaikuttavat kohdesoluun sitoutumalla sen pinnalla oleviin spesifisiin reseptoreihin. Sytokiinireseptorit ovat rakentuneet yleensä kahdesta osasta, joista solun ulkoinen osa sitoo sytokiinin ja solunsisäinen osa toimii signaalinvälityksessä. Sytokiinin signaali voi olla joko kohdesolua aktivoiva tai inaktivoiva. (Julkunen ym. 2005, 734, 740.) Sytokiinit säätelevät monia solun toimintoja, mutta niiden tärkeimmät vaikutukset välittyvät geenien säätelyn kautta, esimerkiksi transkriptiotekijöiden aktivaation seurauksena (Moilanen 2002, 83).

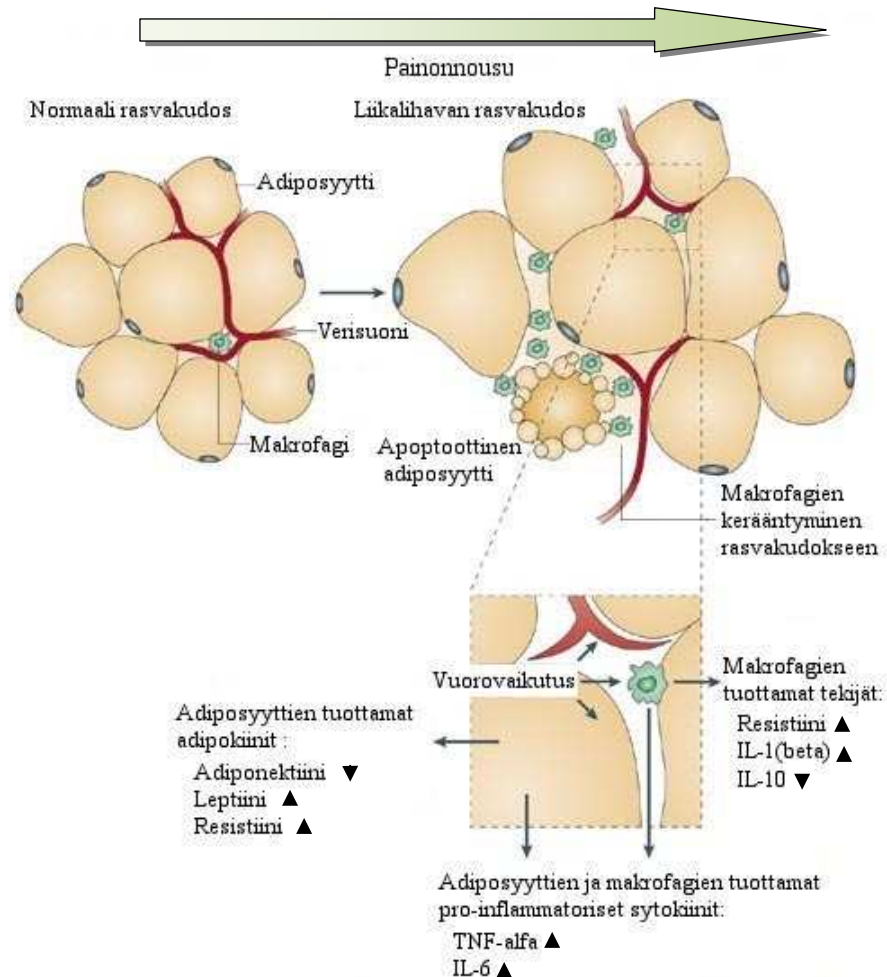
2.2.1 Liikalihavuus

Painoindeksi (Body mass index, BMI) on mittaluku, jolla lihavuutta arvioidaan pituuden ja painon suhteena. Painoindeksi voidaan laskea jakamalla paino (kg) pituuden (m) neliöllä. Normaalipainoisen ihmisen painoindeksi on välillä 18,5–25. Kun henkilön painoindeksi on yli 30, puhutaan merkittävästä lihavuudesta tai liikalihavuudesta. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos)

Liikalihavuus liitetään nykyään krooniseen tulehdusvasteeseen, jolle on tyypillistä lisääntynyt tulehdustekijöiden tuotanto rasvakudoksessa sekä niiden kohonnut pitoisuus verenkierrossa (O'Rourke 2009, 255). Painonnoususta johtuen adiposyytit paisuvat sekä makrofageja kerääntyy rasvakudokseen ja erityisesti apoptoottisten rasvasolujen ympärille (Tilg & Moschen 2006, 773). Makrofagien kertymistä kudokseen pidetään yhtenä merkinä kroonisesta tulehduksesta rasvakudoksessa (Weisberg ym. 2003).

Liikalihavuudessa rasvakudoksen adiposyyttien ja makrofagien on todettu tuottavan enemmän proinflammatorisia sytokiineja ja adipokiineja, kuten leptiiniä, tuumorinkroositekijä- α :a (TNF- α), interleukiini-6:a (IL-6), interleukiini-1:ä (IL-1) ja resistiiniä (kuvio 2). Toisaalta taas rasvakudoksen solujen tuottamat pitoisuudet antiinflammatorisia tekijöitä kuten adiponektiiniä, IL-1 Ra:a (interleukiini-1 reseptorin antagonisti) ja IL-10:a ovat vähentyneet. (O'Rourke 2009, 256.) Rasvakudoksen makrofa-

git ja lymfosyytit tuottavat pääosan tulehdukselle tyypillisistä sytokiineista TNF- α :sta, IL-1:sta ja IL-6:sta. Liikalihavien adiposyytit tuottavat kuitenkin lähes kolmanneksen esimerkiksi verenkiertoon päätyvästä IL-6:sta. (Tilg & Moschen 2006, 773.)



KUVIO 2. Painonnoususta johtuvat muutokset rasvakudoksessa. Liikalihavan yksilön rasvakudoksen makrofagit ja adiposyytit tuottavat enemmän proinflammatorisia eli tulehdusta voimistavia sytokiineja ja adipokiineja. Anti-inflammatoristen adiponektiinin ja IL-10:n tuotto rasvakudoksessa on vähentynyt. (Tilg & Moschen 2006 kuvaa mukailen Miikkulainen 2009)

Liikalihavuuteen liittyy yleensä insuliiniresistenssi, joka tarkoittaa insuliinin heikentynyttä vaikutusta kudoksissa. Erityisesti rasvan kertyminen insuliiniherkkiin kudoksiin, kuten lihakseen ja maksaan, heikentää näiden kudosten insuliiniherkkyyttä. (Westerbacka 2004.) Insuliinin tehtävä elimistössä on tehostaa sokerin ottoa verenkierrosta kudoksiin sekä säädellä sokerin vapautumista verenkiertoon maksasta ja kudoksista. Insuliiniresistenssin kehittyessä insuliinia tarvitaan elimistössä normaalia enemmän, jotta verensokeri pysyisi sopivalla tasolla. (Kangas & Virkamäki 2009).

Rasvakudoksen kroonisen tulehdusvasteen ajatellaan olevan keskeinen tekijä myös insuliiniresistenssin muodostumisessa. Tyypillisten tulehdustekijöiden kuten TNF- α :n, IL-6:n sekä C-reaktiivisen proteiinin (C-reactive protein, CRP) pitoisuudet ovat korkeat yksilöillä, jotka ovat liikalihavia ja joille on kehittynyt insuliiniresistenssiä. (Tilg & Moschen 2006, 773.) Erityisesti TNF- α :n korkean pitoisuuden on todettu olevan yhteydessä insuliiniresistenssin kehittymiseen sekä liikalihavuuteen (Kern ym. 1995).

Liikalihavuuteen liittyvän kroonisen tulehdusvasteen syntymistä ja syytä on yritetty selittää monessa tutkimuksessa. Tiedetään, että esimerkiksi vapaiden rasvahappojen määrä verenkierrossa ja makrofagien aktivoima adiposyyttien kuolema ovat lisääntyneet liikalihavuuden yhteydessä. Näihin toimintoihin liittyviä solun signalointireittejä on tutkittu, mutta yhdistävää tekijää niiden ja liikalihavuuden välillä ei ole löydetty. (Ye 2009, 54.) Uusimpien tutkimusten mukaan rasvakudoksen vähentyneestä hapensaannista, hypoksiasta, voisi löytyä vastaus rasvakudoksen krooniseen tulehdusvasteeseen liikalihavuuden ja insuliiniresistenssin yhteydessä (Ye ym. 2007; Hosogai ym. 2007).

2.3 Rasvakudoksen tuottamat adipokiinit ja sytokiinit

Rasvakudoksen adiposyyttien tuottamia adipokiineja ovat muun muassa leptiini, adiponektiini, adipsiini, resistiini ja visfatiini. Myös rasvakudoksen lymfosyytit ja makrofagit tuottavat vähäisessä määrin joitain adipokiineja, esimerkiksi resistiiniä ja adiponektiiniä. Adipokiinit toimivat hormonien tavoin ja säätelevät muun muassa energia-aineenvaihduntaa ja neuroendokriinijärjestelmää. Ne toimivat myös sytokiinien tavoin säätelijänä monissa immuunijärjestelmän toiminnoissa sekä elimistön tulehdusreaktioissa. (Tilg & Moschen 2006, 772–773.)

2.3.1 Leptiini

Leptiini on pääasiassa valkoisen rasvakudoksen tuottama, ylipainogeenin (obesity gene, *ob*) koodaama, 16 kDa:n kokoinen peptidihormoni. Leptiini löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 1994, jolloin sen todettiin olevan keskushermostoon vaikuttava signaalimolekyyli, joka säätelee energiatasapainoa. Se antaa energian kuluttamista edistävän

signaalin ja toimii negatiivisena signaalina keskushermostossa estäen ruokahalua. (Zhang ym. 1994, 425–432.) Seerumin leptiinillä on myös todettu olevan vahva korrelaatio elimistön rasvakudoksen määrään sekä painoindeksiin (BMI). Liikalihavien ihmisten seerumissa leptiinipitoisuudet ovat korkeammat kuin normaalipainoisilla. (Cossentino ym. 1996, 295.) Korkeammat leptiinitasot liikalihavuudessa johtuvat tavallisemmin leptiiniresistenssistä kuin leptiinin puutteesta elimistössä (Banks 2004, 331).

Leptiiniin on havaittu säätelevän myös muun muassa lipidiaineenvaihduntaa, insuliinin eritystä, lisääntymistä, verisuonten muodostumista eli angiogeneesiä sekä luun muodostumista. Näiden fysiologisten tehtävien lisäksi leptiini on mukana immuunivasteen säätelyssä toimien proinflammatorisen sytokiinin tavoin, ja sen on osoitettu liittyvän myös liikalihavuuden yhteydessä esiintyvään insuliiniresistenssiin. (Lam & Lu 2007, 1.) Leptiini pystyy myös aktivoimaan monosyyttejä, dendriittisoluja ja makrofageja ja stimuloimaan niitä tuottamaan tiettyjä sytokiineja (Mattioli ym. 2005, 6825). Leptiinin tuottoa aktivoivat nopeasti bakteerien soluseinän komponentti lipopolysakkaridi (LPS), IL-1 ja TNF- α tulehduksen akuutin vaiheen aikana. Tämä osoittaa leptiinin toimivan välittäjäaineena tulehduksessa (Loffreda ym. 1998, 63).

2.3.2 Adiponektiini

Adiponektiinia tuottavat pääsääntöisesti adiposyytit, mutta hieman myös lihassolut, sydänlihassolut ja endoteelisolut. Adiponektiini esiintyy elimistössä kokonaisena proteiinina sekä myös globulaarisena adiponektiinina, joka on proteolyttisen katkaisun seurauksena syntynyt tuote. Seerumin adiponektiinipitoisuus on huomattavasti matalampi liikalihavilla yksilöillä, joilla rasvaa on erityisesti kertynyt sisäelinten ympärille, ja joille on kehittynyt insuliiniresistenssi. Adiponektiinin pitoisuus seerumissa korreloi siis negatiivisesti insuliiniresistenssin kanssa. (Tilg & Moschen 2006, 774.)

TNF- α vähentää adiponektiinin transkriptiota adiposyyttisolulinjoissa, joka voi selittää seerumin matalampia adiponektiinitasoja liikalihavilla yksilöillä (Maeda ym. 2002, 731). Adiponektiinin ilmentymistä säätelevät myös muut pro-inflammatoriset välittäjäaineet, kuten IL-6 vähentämällä adiponektiinin transkriptiota ja translaatiota adiposyyttisolulinjoissa (Fasshauer ym. 2003, 1048). Adiponektiinin on todettu lisäävän tiettyjen anti-inflammatoristen sytokiinien, kuten IL-10:n ja IL-1 Ra:n tuotantoa ihmisen mono-

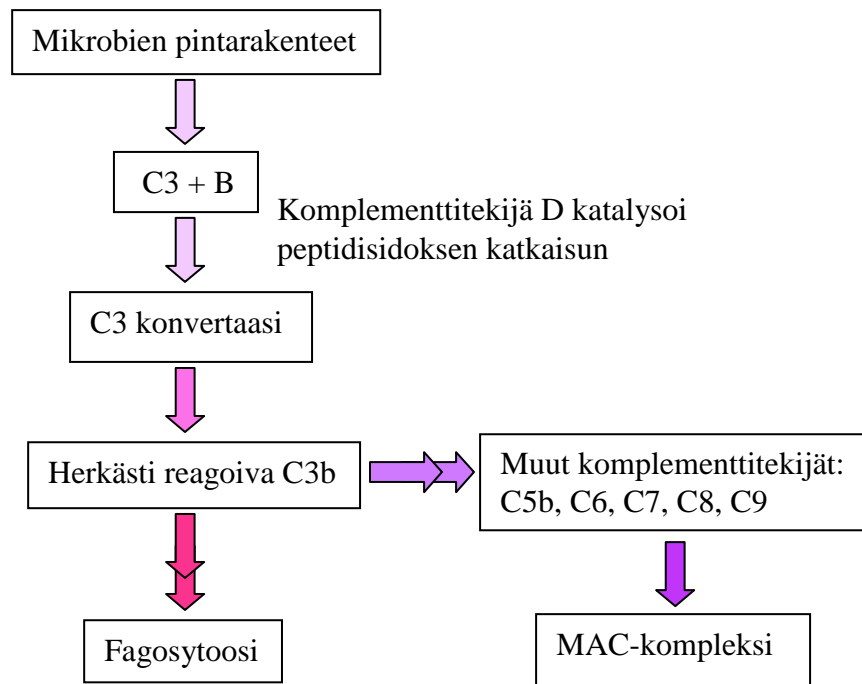
syyteissä, makrofageissa ja dendriittisoluissa (Wolf ym. 2004, 633). Päinvastoin kuin leptiini, adiponektiini toimii pääasiallisesti anti-inflammatorisena tekijänä elimistön tulehdusreaktioissa. Joissakin tapauksissa adiponektiinilla on kuitenkin havaittu olevan myös pro-inflammatorisia vaikutuksia. Sen on esimerkiksi osoitettu lisäävän makrofagien fagosytoosia eli solusyöntiä ja IL-8 tuotantoa ihmisen makrofageissa lipopolysakkaridin (LPS) läsnä ollessa. (Saijo ym. 2005, 1180.)

2.3.3 Adipsiini

Adipsiini (komplementtitekijä D) on komplementin aktivaation vaihtoehdoisen reitin entsyymi (White ym. 1992, 9210). Komplementti on noin 20 proteiinin muodostama reaktioketju, joka aktivoituttuaan johtaa useiden tulehdusta säätelevien välittäjäaineiden syntyyn. Komplementin reaktioketju johtaa myös muun muassa mikrobien solukalvon tuhoamista välittävän MAC-makromolekyylin (Membrane-attack complex) syntymiseen sekä lisää makrofagien ja neutrofiilien fagosytoosia (Moilanen 2002, 72.)

Komplementin vaihtoehdoisen reitti aktivoituu mikrobien vaikutuksesta komplementtitekijä C3:n ja B:n muodostaman kompleksin kautta (kuvio 3). Adipsiini (komplementtitekijä D) on seriiniproteaasi, joka spesifisesti katalysoi komplementtitekijä B:n tietyn peptidisidoksen katkaisun komplementtitekijä B:n ollessa liittyneenä komplementtitekijä C3:n aktiiviseen muotoon. Peptidisidoksen katkaisun myötä vapautuu aktiivinen C3 konvertaasi. C3 konvertaasi lohkaisee C3-proteiinista osan, jolloin jää jäljelle herkästi reagoiva C3b, joka eri vaiheiden jälkeen johtaa makrofiilien ja neutrofiilien fagosytoosin voimistumiseen tai MAC-kompleksin syntymiseen. (White ym. 1992, 9210; Kaiser, 2007.)

Hiirellä adipsiinia tuottavat adiposyytit, mutta ihmisellä adipsiinia/komplementti tekijä D:tä tuottavat sekä rasvakudoksen adiposyytit että monosyytit ja makrofagit. Suurin osa adipsiinista erittyy verenkiertoon, ja adipsiinin pitoisuus seerumissa on todettu olevan matalampi liikalihavilla hiirillä. (White ym. 1992, 9210.)



KUVIO 3. Komplementin vaihtoehdoisen reitin reaktioketju. Mikrobin pintarakenteet aktivoivat komplementin vaihtoehdoisen reitin, joka eri vaiheiden jälkeen johtaa makrofiilien ja neutrofiilien fagosytoosin voimistumiseen tai MAC-kompleksin syntymiseen.

2.3.4 Sytokiinit

Tyypillisiä rasvakudoksen tuottamia sytokiineja ovat muun muassa IL-6, IL-1 ja TNF- α . Näiden proinflammatoristen eli tulehdusta voimistavien sytokiinien tehtävät immuunijärjestelmässä tunnetaan hyvin. (Tilg & Moschen 2006, 772.) TNF- α ja IL-1 ovat tärkeimpiä pro-inflammatorisia sytokiineja ja niillä on suuri merkitys erityisesti tulehduksen alkuvaiheessa. Näiden sytokiinien lisääntynyt synteesi on suurelta osin vastuussa tulehduksen ja siihen liittyvien tyypillisten oireiden kehittymisessä. TNF- α ja IL-1 voimistavat myös IL-6 synteesiä, joka taas aktivoi kohdesolujaan tuottamaan muita tulehdusreaktioissa toimivia sytokiineja sekä akuutin vaiheen proteiineja, esimerkiksi C-reaktiivista proteiinia (CRP). (Moilanen 2002, 83, 86.)

IL-6 löydettiin alun perin B-solujen erilaistumisessa vaikuttavana tekijänä. IL-6:n tehtävä B-solujen erilaistumisessa on kypsymisen viimeisen vaiheen aikaansaaminen, jolloin B-solut muuttuvat vasta-aineita tuottaviksi plasmasoluiksi. IL-6 indusoi myös vasta-aineiden muodostumisen näissä soluissa. (Hirano ym. 1986, 73–75.) Nykyään IL-6 tunnetaan vaikutuksiltaan hyvin monimuotoisena sytokiinina, joka on tärkeä säätelytekijä

muun muassa tulehduksessa ja immuunivasteessa sekä hematopoiesissa eli verisolujen erilaistumisessa. Immuunivasteen käynnistyminen saa aikaan IL-6 synteessin lähes kaikissa kudoksissa ja solutyypeissä. Tulehdussoluista tärkeimpiä IL-6 tuottajia ovat monosyytit ja makrofagit. (Moilanen 2002, 86.)

IL-6 myös välittää tulehduksen akuutin vaiheen vastetta käynnistämällä akuutin vaiheen proteiinien, esimerkiksi CRP:n, fibrinogeenin ja komplementtitekijä C3:n synteessin maksasoluissa. Akuutin vaiheen proteiineilla on keskeinen rooli tulehdusreaktion rajoittajina. IL-6 saa myös keskushermostossa aikaan tulehdukselle tyypillisen kuumereaktion prostaglandiini-E₂ (PGE₂)-välitteisellä mekanismilla. (Moilanen 2002, 86.)

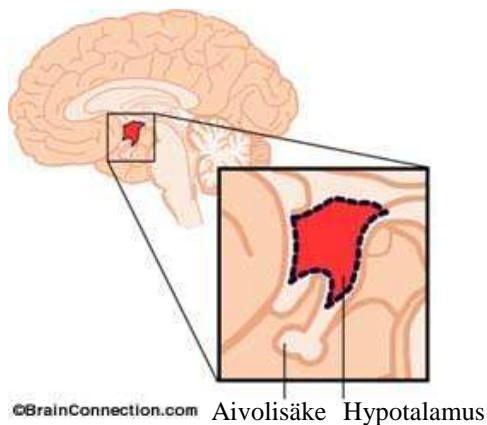
IL-6 pitoisuuksien on jatkuvasti havaittu olevan korkeampia sekä liikalihavien seerumissa että rasvakudoksessa. Korkeat IL-6 pitoisuudet liikalihavilla vastaavat myös korkeista akuutin faasin proteiinien, kuten CRP:n ilmentymisestä. (Fantuzzi ym. 2005, 914.) Korkealla rasvakudoksen IL-6 pitoisuudella on vahva suhde myös IL-6:n sekä leptiinin pitoisuuteen verenkierrrossa (Maachi ym. 2004, 993).

2.4 Adipokiinit, sytokiinit ja epilepsia

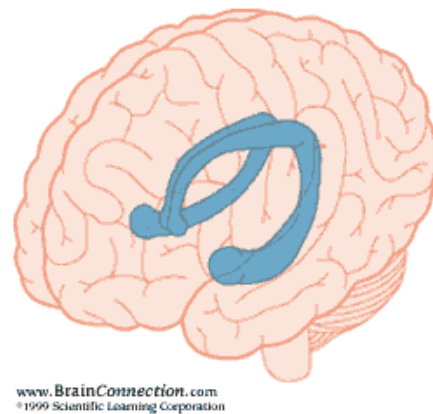
Uusimpien tutkimusten mukaan epilepsia-kohtaus aiheuttaa elimistössä tulehdustekijöiden aktivoitumista. Epilepsia-kohtausten yhteydessä on tutkittu adipokiineista leptiiniä sekä (Xu ym. 2008) sytokiineista muun muassa IL-6:a, IL-1β:a, IL-1 Ra:ta sekä TNF-α:a. (Lehtimäki ym. 2007; Bauer ym. 2009.)

Leptiini on tärkeä hormoni aivojen hypotalamuksen alueen (kuvio 4) säätelyssä (Spanswick ym. 2000, 578). Hypotalamus on väliaivojen pohjaosassa sijaitseva alue, joka säätelee aivolisäkkeen toimintaa ja näin osallistuu elimistön hormonijärjestelmän säätelyyn. Leptiini vaikuttaa muun muassa ruokahaluun sekä elimistön energiametaboliaan, ja kuten edellä on käynyt ilmi, sillä on vahva positiivinen korrelaatio elimistön rasvakudoksen määrän ja painoindeksin kanssa (Considine ym. 1996, 295). Tulehdusreaktioissa leptiinillä on pro-inflammatorisia vaikutuksia. Leptiinireseptoreita ilmentyy aivoissa sekä hypotalamuksessa että hypotalamuksen ulkopuolella, aivokuoren sekä hippokampuksen (kuvio 5) alueen hermosoluissa (Håkansson ym. 1998, 563).

Leptiini muuntelee aivojen hermosolujen herkkyyttä ärsytykselle (Shanley ym. 2001, 5; Shanley ym. 2002, 941). Tämä on tärkeä säätelytekijä hippokampuksen ja aivokuoren hermosoluissa, jos verenkierron leptiini pääsee reseptoreilleen näissä hermosoluissa. Tavallisesti aivo-veri-este estää suurimolekyylisten aineiden siirtymisen verenkierrosta aivosoluihin. Leptiinikuljettajat kaikkialla aivoissa kuitenkin mahdollistavat leptiinin pääsyn verenkierrosta reseptoreilleen aivokuoren alueen ja hippokampuksen alueen hermosoluissa. (Banks 2004, 332–333.)



KUVIO 4. Hypotalamus ja aivolisäke (BrainConnection)



KUVIO 5. Hippokampukset, ohimolohkojen sisäosien rakenteet (BrainConnection)

Leptiinin toimintaa endogeenisenä hermosolujen muuntelijana selittää myös se, että seerumin leptiinitasot ovat korkeampia rotilla, joita on ruokittu ketogeenisen ruokavali-
on (vähähiilihydraattinen, runsaasti rasvoja ja proteiineja sisältävä ruokavalio) mukaan. Ketogeenista ruokavaliota pidetään myös suhteellisen tehokkaana hoitokeinona vaikeahoitoisessa epilepsiassa. Eläinkokeiden avulla on tutkittu, että kroonisesti koholla oleva veren leptiinitaso vähentää hermosolujen herkkyyttä ärsytykselle, eli leptiini toimii kohtausta ehkäisevänä tekijänä ja krooninen leptiinin puute voi altistaa epilepsia-kohtaukselle. (Erbayat-Altay ym. 2008, 82, 85.)

Eläinkokeissa on todettu leptiinin vähentävän ja vaimentavan 4-aminopyridiinillä (4-aminopyridine, 4AP) indusoituja paikallisia, aivokuorella tapahtuvia kohtauksia rotilla. Kokeessa leptiiniä oli injisoitu suoraan aivoihin yhdessä 4AP:n kanssa. Toinen yleisesti käytetty epilepsia-kohtausmalli on pentyleenitertazolilla (pentyleenetetrazol, PTZ) indu-

soitu kohtaus, joka aiheuttaa yleistyneen tajuttomuuskouristuskohtauksen. PTZ-kokeessa nenän kautta annosteltu leptiini lisäsi aivojen leptiinitasoa sekä pideni kohtauksen latenssivaihetta. Näiden tutkimusten perusteella on oletettu, että leptiini toimisi epilepsiakohtausta ehkäisevänä eli antikonvulsiivisena tekijänä. (Xu ym. 2008, 272, 277.)

Epilepsiakohtausten yhteydessä on tutkittu proinflammatorisia sytokiineja IL-6:a ja IL-1 β :a sekä anti-inflammatorista IL-1 Ra:a, ja niiden tuoton on todettu voimistuvan nopeasti epilepsiakohtauksen jälkeen sekä jyrsijöillä (Vezzani ym. 2002, 30) että ihmisillä (Lehtimäki ym. 2007, 228–229). Kokeellisissa tutkimuksissa on havaittu IL-1 β :n olevan epilepsiakohtauksille altistava eli prokonvulsiivinen ja hermosoluja tuhoava tekijä. IL-1 Ra:n puolestaan on osoitettu olevan antikonvulsiivinen tekijä. (Vezzani ym. 2000, 11537.) TNF- α :n tuotossa ei ole havaittu muutoksia epilepsiakohtauksen yhteydessä (Bauer ym. 2009, 4).

IL-6-tuoton on tutkittu lisääntyvän erityisesti ohimolohkoepilepsian (TLE) kohtausten yhteydessä. Ohimolohkon ulkopuolisissa epilepsiatyypeissa eli ekstratemporaaliepilepsioissa (extratemporal lobe epilepsy, XLE) IL-6 tuotossa ei tapahdu merkittävää muutosta kohtauksen yhteydessä. Eräässä tuoreimmassa tutkimuksessa todettiin myös, että epilepsiakohtauksen oikeanpuoleinen lateralisaatio aiheutti korkeamman IL-6-pitoisuuden seerumiin. Ohimolohkosta lähtevillä epilepsiakohtauksilla on erilainen levinneisyys aivoissa verrattuna muualta alkaneisiin kohtauksiin. Ohimolohkon kohtaukset saattavat vaikuttaa enemmän hypotalamuksen ja aivolisäkkeen alueella, joka voisi liittyä immunologisten vasteiden ilmentymiseen TLE:n yhteydessä. (Alapirtti ym. 2009, 96; Bauer ym. 2009, 5.)

IL-6:n tarkkaa roolia epilepsiakohtausten yhteydessä ei ole saatu selville. Tutkimustulokset ovat ristiriitaisia sen suhteen, toimiiko IL-6 kohtauksia ehkäisevänä, vai niille altistavana tekijänä ja onko se hermosoluja tuhoava, vai suojeleva välittäjäaine (Bauer ym. 2009, 5-6). Joidenkin tutkimustulosten mukaan IL-6:lla olisi kuitenkin enemmän prokonvulsiivisia vaikutuksia (Kalueff ym. 2004, 35).

2.5 ELISA-menetelmä

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) on herkkä immunologinen menetelmä, joka perustuu vasta-aineiden ja niiden kohdemolekyylien (antigeenien) spesifiseen sitoutumiseen. Menetelmän perustana ovat vasta-aineiden tyypilliset ominaisuudet. Vasta-aineet ovat proteiinirakenteisia molekyyliä, ja tästä johtuen ne ovat hyvin spesifisiä tiettyä kohdemolekyyliä kohtaan, mikä mahdollistaa tutkittavan aineen havaitsemisen myös hyvin pieninä pitoisuuksina. Kohdemolekyylit voivat olla luonnollisia tai synteettisiä molekyyliä. Vasta-aineen ja kohdemolekyylin välinen sidos on myös hyvin luja ja kestää määrittelyn vaiheet. (Davies 2005, 3-4.)

ELISA on niin kutsuttu entsyymi-immunoassay. Se perustuu mitattavaan värinmuodostusreaktioon, jonka saa aikaan vasta-ainemolekyyliin liitetty entsyymileima sopivan substraatti- tai kromogeenilisäyksen jälkeen. (Davies 2005, 4.) Yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroksidase, HRP) sekä alkalinen fosfataasi. HRP:a käytetään usein vetyperoksidin kanssa, jolloin ne yhdessä reagoivat substraatin kanssa muuttaen sen mitattavaan muotoon. HRP:n kanssa yleisesti käytettävä substraatti on tetrametyylibentsidiini (tetramethylbenzidine, TMB). Tämän reaktion tuotteena syntyy sininen yhdiste. (Davies 2005, 194–195; Crowther 2009, 61–63.) Entsyymireaktiot pysäytetään lisäämällä reaktioon happoa tai emästä, jolloin pH:n muutos pysäyttää entsyymitoiminnan (Crowther 2009, 69).

ELISA-menetelmän pääperiaatteena on, että reaktion yksi komponentti sidotaan kiinteään alustaan, tavallisesti muoviselle kuoppalevyille. Kuoppiin lisätään määrittelyssä käytettäviä reagensseja, joita inkuboidaan tietyissä olosuhteissa reaktion edistämiseksi ja pesuvaiheilla erotellaan sitoutumattomat molekyylit sitoutuneista. Määrittelyn tulos mitataan näytteiden värinmuodostumisesta spektrofotometrisesti. (Crowther 2009, 9; Davies 2005, 3-4.)

ELISA-menetelmästä on useita erilaisia muunnoksia, mutta yleensä ne jaotellaan kolmeen päätyyppiin: suoraan ja epäsuoraan menetelmään sekä sandwich-ELISA:an, joista sandwich ELISA voidaan jakaa vielä suoraan ja epäsuoraan menetelmään. Kaikkia kolmea menetelmätapaa voidaan soveltaa myös kilpailevana (kompetitiivisena) tai inhiboivana menetelmänä. (Crowther 2009, 12–13, 16.)

2.5.1 Suora ja epäsuora menetelmä

Suora menetelmä on yksinkertaisin ELISA:n muoto. Siinä määritettävä antigeeni laimennetaan sopivalla puskurilla, tavallisesti PBS:lla (phosphate buffered saline) tai korkean pH:n karbonaattipuskurilla, ja inkuboinnin aikana antigeeni sitoutuu kiinteään faasiin. Kiinteä faasi on yleensä muovinen 96-kuoppalevy ja proteiinit tarttuvat siihen passiivisesti. Inkuboinnin jälkeen ylimääräinen, sitoutumaton osa näytteestä pestään pois puskuroidulla pesuliuksella. Pesun jälkeen kuoppalevylle lisätään antigeenin spesifistä vasta-ainetta, johon on liitetty entsyymileima. Vasta-aine laimennetaan puskurilla, joka sisältää blokkausyhdistettä, esimerkiksi proteiinia, jolloin estetään vasta-aineen passiivinen adsorptio kuoppalevyn pohjaan ja epäspesifinen sitoutuminen, mutta antigeenin ja vasta-aineen spesifinen sitoutuminen on silti mahdollista. Usein blokkausproteiinina käytetään esimerkiksi BSA:ta (bovine serum albumin) eli naudan seerumin albumiinia tai puskuriiin liuotettua rasvatonta maitojauhetta. (Crowther 2009, 13–14, 58–60.)

Inkuboinnin aikana entsyymileimattu vasta-aine sitoutuu spesifisesti kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Sitoutumaton vasta-aine pestään jälleen pois. Seuraavassa vaiheessa kuoppalevylle lisätään entsyymille sopivaa substraatti tai substraattikromogeeni-yhdistelmää, jolloin entsyymi katalysoi värinmuodostusreaktion. Reaktion annetaan edetä tietyn ajan, jonka jälkeen se pysäytetään sopivalla pysäytysreagenssilla. Lopuksi näytteiden antigeenipitoisuus mitataan spektrofotometrisesti sopivalla aallonpituudella. (Crowther 2009, 14.)

Epäsuoran ELISA-menetelmän erottaa suorasta menetelmästä kuoppalevylle lisättävä leimaamaton vasta-aine, joka inkuboinnin aikana tarttuu kiinteään faasiin sidottuun antigeeniin. Tämän jälkeen levylle lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine, joka sitoutuu aiemmin lisättyyn vasta-aineeseen. Tämän vaiheen jälkeen määrittystä jatketaan samalla tavoin kuin suorassa menetelmässä. (Crowther 2009, 14.)

2.5.2 Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISA-menetelmässä kiinteään faasiin eli kuoppalevyn pohjaan sidotaan vasta-aine (capture antibody), jonka jälkeen lisätään näyte. Näyte laimennetaan puskuriiin, joka sisältää sopivan pitoisuuden blokkausproteiinia. Tämä estää antigeenin epä-

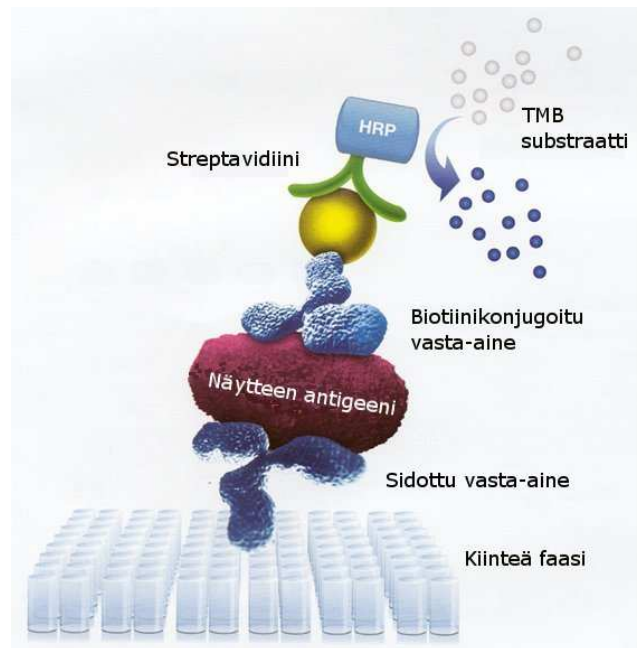
spesifisen sitoutumisen. Näytettä inkuboidaan kuoppalevyllä, jonka jälkeen sitoutumaton osa näytteestä pestään pois puskuroidulla pesuliuoksella. (Crowther 2009, 16–17.)

Pesuvaiheen jälkeen kuoppalevyille lisätään entsyymikonjugoitu antigeenille spesifinen vasta-aine (sekudäärivasta-aine), joka inkuboinnin aikana sitoutuu antigeeniin. Inkuboinnin jälkeen toistetaan pesuvaihe ja lisätään entsyymille sopivaa substraattia. Reaktio pysäytetään pysäytysreagenssilla ja näytteen antigeenipitoisuus mitataan spektrofotometrisesti sopivalla aallonpituudella. (Crowther 2009, 17.)

Edellytyksenä sandwich-menetelmälle on, että antigeenilla on vähintään kaksi epitooppia eli vasta-ainetta sitovaa kohtaa. Toisella epitoopilla se tarttuu kuoppalevyllä sidotun vasta-aineeseen ja toisella lisättyyn sekudäärivasta-aineeseen. Tämä rajoittaa menetelmän käyttöä. (Crowther 2009, 18.)

Sandwich-menetelmää voidaan soveltaa myös epäsuorana, jolloin näytteen inkuboinnin jälkeen ensimmäiseksi lisätään leimaamaton sekudäärivasta-aine. Sekudäärivasta-aineen inkuboinnin jälkeen lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine. Entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine tunnistaa leimaamattoman vasta-aineen rakenneosan, jolloin sitä voidaan käyttää laajalle määrälle eri sekudäärivasta-aineita. Sekudäärivasta-aineen ja kiinteään faasiin sidotun vasta-aineen täytyy olla peräisin eri eläinlajeista, jotta entsyymikonjugoitu vasta-aine reagoi vain sekudäärivasta-aineen, mutta ei kiinteään faasiin liitetyn vasta-aineen kanssa. (Crowther 2009, 19–21.)

Sandwich-menetelmää sovelletaan yleisesti biotiini-avidini kompleksin kanssa (kuvio 6). Avidiini on tetrameerinen kananmunasta eristetty proteiini, joka sitoutuu voimakkaasti biotiinimolekyylisiin jokaisella alayksiköllään. (Crowther 2009, 547.) Streptavidini on *Streptomyces avidinii* -bakteerista eristetty avidiinin analogi, jolla on lähes identtisestä sekudäärirakenteestaan johtuen yhtä suuri affiniteetti biotiinia kohtaan (Argarana 1986, 1881). Biotiinimolekyyli voidaan liittää vasta-aineeseen ja streptavidini voidaan konjugoitua käytettävään entsyymiin. Biotiini-streptavidini-ELISA toimii kuten epäsuora sandwich-ELISA-menetelmä. Biotiinikonjugoitu sekudäärivasta-aine lisätään levyllä näytteen inkuboinnin jälkeen. Tämän jälkeen suoritetaan pesut ja lisätään streptavidinikonjugoitu HRP-entsyymi. Sitoutuminen on spesifinen ja voimakas, eivätkä esimerkiksi pH tai suuret suolakonsentraatiot häiritse sitoutumista. (Crowther 2009, 547.)



KUVIO 6. Biotiini-streptavidini sandwich-ELISA. Tutkittava antigeeni sitoutuu spesifisesti kiinteään faasiin sidottuun vasta-aineeseen ja antigeenin toinen epitooppi sitoo biotiinikonjugoitua vasta-ainetta. Biotiinikonjugoitua vasta-aineeseen tarttuu streptavidini-HRP, joka reagoi TMB-substraatin kanssa muodostaen värillisen yhdisteen. (Bender MedSystems 2009 kuvaa mukailten Miikkulainen 2009)

2.5.3 Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät

Kilpailevissa ja inhiboivissa menetelmissä reaktioon on lisätty tunnettu määrä jotakin ainetta, joka häiritsee tai estää antigeenin ja vasta-aineen välistä sitoutumista. Kilpailevien ja inhiboivien menetelmien perustana voi olla joko suora, epäsuora tai kumpi tahansa sandwich-menetelmistä ja niitä voidaan käyttää sekä antigeenin että vasta-aineen määrittämiseen. (Crowther 2009, 21.)

Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät perustuvat mitattavan yhdisteen (antigeeni tai vasta-aine) kykyyn syrjäyttää tai häiritä tunnetun vasta-aineen tai antigeenin sitoutumista. Tunnettu komponentti on sidottuna kiinteään faasiin ja näytteen vastaava on liukoinen. Näytteen antigeenin tai vasta-aineen kyetessä sitoutumaan lisättävään entsyymileimatun komponenttiin, antigeeni-vasta-aine-kompleksi ei sitoudu kuoppalevyille vaan pesyyty pesuvaiheessa pois. Näytteen antigeenin tai vasta-aineen sitoutuessa muodostuu siis vähemmän väriä kuin kontrolliin, johon ei ole lisätty näytettä. (Crowther 2009, 21–28.)

2.5.4 Verinäytteen käsittely ELISA-määritystä varten

Tutkittaessa verestä jotakin sen komponenttia, voidaan määrittelyssä käyttää kokoverta, seerumia tai plasmaa. Kokoveri sisältää veren nestemäisen soluväliaineen eli plasman sekä verisolut, kun taas seerumista ja plasmasta verisolut on erotettu pois sentrifugoinnilla. Kokoverta tai plasmaa käytettäessä verinäyte käsitellään näytteenoton yhteydessä sopivalla antikoagulantilla eli hyytymistä estävällä aineella, kuten EDTA:lla tai hepariinilla. Putkea käännellään tavallisesti 5-8 kertaa välittömästi näytteenoton jälkeen, jotta antikoagulantti sekoittuu tasaisesti koko näytteeseen. Plasmanäytettä valmistettaessa lyhyen huoneenlämmössä tai jäähauteessa inkuboimisen jälkeen näyte sentrifugoidaan, jolloin punasolut painuvat alimmaiseksi kerrokseksi putken pohjalle. Valkosolut erottuvat ohueksi kerrokseksi punasolufraktion päälle ja päällimmäiseksi jää plasma, joka pipetoidaan puhtaaseen putkeen. Plasma sisältää kaikki veren liuenneet proteiinit sekä suolat ja orgaaniset aineet. (Tapola 2003, 25; Hänninen 2003, 263.)

Seerumia käytettäessä näytteen annetaan hyytyä, jonka jälkeen fibrinihiyymä ja verisolut sentrifugoidaan putken pohjalle kuten plasmanäytettä valmistettaessa. Täydellinen veren hyytyminen kestää noin 30 minuuttia, ja verinäyte on sentrifugoitava viimeistään 1,5 tunnin kuluttua näytteenotosta. Sentrifugoinnin jälkeen seerumi siirretään puhtaaseen putkeen. (Makkonen & Tuokko 1996, 105.)

Plasman ja seerumin erona on, että seerumista on poistettu fibrinogeeni ja muut veren hyytymiseen osallistuvat tekijät. Myös muita veren liukoisia proteiineja kiinnittyy seerumista erotettavaan fibrinihiyymään, joten proteiinipitoisuus seerumissa on matalampi kuin plasmassa. (Lundblad, 2004.) Toisaalta taas veren hyytymisen aikana voi myös syntetisoitua tai hajota yhdisteitä, joten veren koostumus voi muuttua näytteenototuksesta. Aiemmin monissa tutkimuksissa käytettiin lähinnä seerumia, mutta nykyään ajatellaan tutkittavien aineiden pitoisuuksien olevan plasmassa lähempänä elimistön *in vivo* -tilaa kuin seerumissa. Kokoverinäytteestä saadaan erotettua noin 15–20% enemmän plasmaa kuin seerumia, mikä on selkeä etu pienissä näytemäärissä. Plasmassa käytetyt antikoagulantit taas saattavat häiritä joitakin määrittelyksiä. ELISA määrittely voidaan tehdä joko plasmasta tai seerumista. (Tapola 2003, 25–26.)

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Opinnäytetyö on toteutettu osana laajempaa tutkimusprojektia, jossa selvitetään adipokiinien merkitystä tulehduksessa ja tulehdustaudeissa. Tässä tutkimuksessa tutkittiin immunologisia muutoksia akuutissa epilepsiakohtauksessa vaikeahoitoisilla potilailla eri epilepsiatyypeissä. Opinnäytetyön aihe rajattiin käsittämään adipokiinien; leptiini, adiponektiini ja adipsiini sekä tulehdussytokiini interleukiini-6:n pitoisuutta plasmassa epilepsiakohtauksen yhteydessä.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää

1. Lisääntykö adipokiinien ja IL-6:n pitoisuus plasmassa epilepsiakohtauksen yhteydessä?
2. Vaikuttaako epilepsiatyyppi adipokiinien ja IL-6:n pitoisuuteen plasmassa ennen ja jälkeen epilepsiakohtauksen?
3. Vaikuttaako sähköisen purkauksen lateralisaatio adipokiinien ja IL-6:n pitoisuuteen plasmassa ennen ja jälkeen epilepsiakohtauksen?

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Tutkittavat näytteet

Määritykset tehtiin näytteistä, jotka on kerätty vaikeahoitoista epilepsiaa sairastavilta potilailta kliinisissä tutkimuksissa vuosien 2004–2007 aikana. Taulukossa 1 on havainnollistettu potilasaineistoa tiettyjen parametrien osalta, ja aineistoon on myös tehty jako epilepsiatyyppien TLE (ohimolohkoepilepsia) ja XLE (ekstratemporaaliepilepsia eli ohimolohkon ulkopuoliset epilepsiatyypit) mukaan.

Aineisto koostui yhteensä 47 vaikeahoitoista epilepsiaa sairastavasta potilaasta, jotka olivat käyneet neljän vuorokauden video-EEG rekisteröinnissä tavoitteena epilepsian luokittelu ja kohtaustyyppien määrittäminen pääsääntöisesti osana epilepsiakirurgista arviota. Potilailta kerättiin verinäytteet seuraavasti: sairaalaan saapuessa, aamuisin niin kauan, kunnes sai epileptisen kohtauksen eli niin sanotun indeksikohtauksen, sekä indeksikohtauksen jälkeen 3, 6, 12 ja 24 tunnin kuluttua. Verinäytteistä erotettiin plasma määrityksiä varten ja näytteet pakastettiin –70 asteeseen.

Potilaista 23:lla diagnoosi oli TLE ja 24:llä XLE. Naisten ja miesten osuudet olivat lähes yhtä suuria molemmissa ryhmissä (51 % ja 49 %). Potilaiden keski-ikä TLE-ryhmässä oli 40 vuotta ja epilepsian kesto keskimäärin 24 vuotta. XLE-ryhmässä keski-ikä oli 30 vuotta ja epilepsian kesto keskimäärin 19 vuotta. Keskiarvo kohtauksien lukumäärässä kuukautta kohden edellisenä vuonna oli TLE-ryhmässä 8,5 ja XLE-ryhmässä 56,4. Myös indeksikohtauksen kestossa oli suuri ero ryhmien välillä, TLE-ryhmässä kohtauksen kesto oli keskimäärin 405,2 sekuntia ja XLE-ryhmässä 57,5 sekuntia.

TAULUKKO 1: Potilasaineiston karakterisointi

	Koko aineisto 47 (100 %)	TLE 23 (100 %)	XLE 24 (100 %)
Sukupuoli:			
Naisia	24 (51 %)	11 (48 %)	13 (46 %)
Miehiä	23 (49 %)	12 (52 %)	11 (54 %)
Keski-ikä	35	40	30
Epilepsian kesto (keskiarvo vuosina)	21,6	24	19
Kohtauksia kuukaudessa edellisenä vuonna (keskiarvo)	33	8,5	56,4
Lateralisaatio:			
Oikea	14 (30 %)	6 (26 %)	8 (33 %)
Vasen	22 (47 %)	15 (65 %)	7 (29 %)
Ei tiedossa tai molemmat	11 (23 %)	2 (9 %)	9 (38 %)
Indeksikohtauksen tyyppi:			
CPS	36 (76,6 %)	19 (83 %)	17 (71 %)
SPS	5 (10,6 %)	1 (4 %)	4 (16,5 %)
SGTCS	6 (12,8 %)	3 (13 %)	3 (12,5 %)
Indeksikohtauksen kesto (keskiarvo sekunteina)	227,6	405,2	57,5

TLE = ohimolohkoepilepsia, XLE= ekstratemporaaliepilepsia, CPS= monimuotoinen paikallisalkuinen kohtaus, SPS= yksinkertainen paikallisalkuinen kohtaus, SGTCS= toissijainen yleistynyt kohtaus.

4.2 Interleukiini-6-pitoisuuden määrittäminen

Interleukiini-6 (IL-6) määrittämiseen käytettiin Sanquin'n ELISA reagent set -kittiä (PeliPair ELISA, Sanquin). Kitti on tarkoitettu IL-6 määrittämiseen soluviljelymediumista tai plasmanäytteistä. Kitti sisältää kaikki sytokiinin määrittämisessä tarvittavat reagenssit ja perustuu sandwich-ELISA-menetelmään. Taulukossa 2 on esitetty käytettyjen ELISA-määrittämisen reagenssit, herkkyysrajat sekä näytteiden laimennokset.

Määrittelyssä käytettiin 96-kuoppalevyjä (Nunc Maxisorp), jotka esikäsiteltiin inkuboimalla niitä yön yli +4 °C:ssa karbonaatti/bikarbonaatti-puskurilla (pH 9.6) laimennetulla IL-6 primäärivasta-aineella (PeliPair ELISA, Sanquin). Inkuboinnin jälkeen kuoppalevyt pestiin viisi kertaa PBS:lla (10mM fosfaattisuolaliuos, pH 7.3) ELISA-pesurilla (1296-026 Delfia[®] Platewash, Wallac). Pesun jälkeen kuoppalevy kuivattiin lyömällä levyä voimakkaasti puhtaita käsipapereita vasten.

Primäärivasta-aineessa inkuboimisen jälkeen levyt blokattiin proteiinien epäspesifisen sitoutumisen ehkäisemiseksi. Kuoppalevyille pipetoitiin blokkauspuskuri (PBS, jossa 1% BSA) ja inkuboitiin huoneenlämmössä tunnin ajan. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevyt pestiin viisi kertaa pesuliuksella (PBS, jossa 0,01 % Tween 20) ja kuivattiin käsipapereita vasten.

Plasmanäytteitä säilytettiin -80 °C:ssa, ja näytteet nostettiin huoneenlämpöön sulamaan ennen levyille pipetointia. Standardisuora ja tasokontrolli valmistettiin 1xHPE-puskuriin (High Performance ELISA-puskuri, Sanquin) laimentamalla. HPE-puskuria käytettiin määrittelyksen kaikkiin laimennuksiin. Kuoppalevyillä käytettiin tasokontrolleja varmistamaan, että pitoisuustasot pysyvät samoina sekä levyn sisällä että levystä toiseen. Näytteet, standardisuoran näytteet sekä tasokontrollit pipetoitiin kahtena rinnakkaisena kuoppalevyille ja levyjä inkuboitiin huoneenlämmössä tunnin ajan.

Näytteiden inkuboinnin jälkeen levyt pestiin pesuliuksella ja kuivattiin. Kuoppiin pipetoitiin laimennettu biotiinikonjugaatti ja levyjä inkuboitiin huoneenlämmössä 35 minuutin ajan, jonka jälkeen levyjen kuopat pestiin ja kuivattiin kuten edellä. Seuraavaksi kuoppiin pipetoitiin laimennettu streptavidini-HRP-konjugaatti, jota inkuboitiin levyillä 15 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen levyt pestiin, kuivattiin ja kuoppiin lisättiin värinmuodostusreaktion substraattiliuos TMB (3,5,3',5'-tetramethylbenzidine, TMB Conductivity 1 Component HRP Microwell Substrate, Bio FX Laboratories). Substraattiliuoksen lisäyksen jälkeen levyjä inkuboitiin pimeässä huoneenlämmössä 15 minuutin ajan, jonka jälkeen värinmuodostusreaktio pysäytettiin pipetoimalla kuoppiin 1M rikkihappoa. Näytteiden optinen tiheys mitattiin välittömästi spektrofotometrillä (Victor³ 1420 Multilabel Counter) aallonpituudella 450nm. Laitteen MultiCalc-laskentaohjelman avulla laskettiin IL-6-pitoisuus (pg/ml) kuopissa. Laitteelta saadut tulokset taulukoitiin ja taulukoinnissa otettiin huomioon näytteiden mahdolliset laimennokset.

4.3 Adipokiinipitoisuuksien määrittäminen

Adipokiinien määrittämiseen käytettiin R&D System'n kittejä (DuoSet ELISA, R&D-systems Europe Ltd). Kitit on tarkoitettu tutkimuskäyttöön määrittämään ihmisen adipokiineja soluviljelymediumista sekä seerumista, ja ne perustuvat sandwich ELISA-menetelmään.

Määrittämissä käytettävät 96-kuoppalevyt (EIA-levyt, Costar) käsiteltiin määrittämistä edeltävänä päivänä mitattavan adipokiinin vasta-aineella (DuoSet ELISA, R&D-systems Europe Ltd, Abingdon, UK). Vasta-aine laimennettiin PBS:lla (pH 7.2–7.4, 0,2µm suodatettu) ja levyjä inkuboitiin yön yli +4 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevyt pestiin kolme kertaa pesuliuksella (PBS, jossa 0,05 % Tween 20) automaattipesurilla (1296–026 Delfia® Platemash, Wallac). Kuoppalevyt kuivattiin lyömällä niitä voimakkaasti puhtaita käsipapereita vasten. Levyille pipetoitiin Reagent diluent-liuosta (PBS, jossa 1 % BSA) blokkauksuriksi, joka estää proteiinien epäspesifisen sitoutumisen kuoppiin. Blokkauksurin lisäyksen jälkeen levyjä inkuboitiin huoneenlämmössä tunnin ajan, jonka jälkeen levyt pestiin sekä kuivattiin kuten edellä.

Kuoppalevyille pipetoitiin Reagent diluent -liuksella laimennetut näytteet, standardit sekä kunkin adipokiinin määrittämissä käytettävät tasokontrollit kahtena rinnakkaisena. Reagent diluentia käytettiin määrittämisen kaikkiiin laimennoksiin. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä kahden tunnin ajan, jonka jälkeen levyt pestiin ja kuivattiin. Näyte-käsittelyn jälkeen kuoppiin pipetoitiin määrittämissä adipokiinin biotinyloitua vasta-ainetta, ja puolentoista tunnin inkuboinnin jälkeen vasta-aineliuos pestiin pois ja levyt kuivattiin.

Seuraavaksi kuoppalevyille lisättiin streptavidini-HRP, jota inkuboitiin levyillä 15 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen levyt pestiin ja kuivattiin, jonka jälkeen levyille lisättiin värinmuodostusreaktion substraattiliuos TMB. TMB:tä inkuboitiin levyillä huoneenlämmössä valolta suojattuna 15 minuuttia, jonka jälkeen värinmuodostusreaktio pysäytettiin lisäämällä kuoppiin 1M rikkihappoa. Näytteiden optinen tiheys mitattiin välittömästi spektrofotometrillä (Victor³ 1420 Multilabel Counter) aallonpituudella 450nm. Laitteen MultiCalc-laskentaohjelman avulla tulokseksi saatiin määritetyn adipokiinin pitoisuus laimennetussa näytteessä yksikkönä pg/ml. Tulokset taulukoitiin ja taulukoinnissa otettiin huomioon näytteiden laimennokset.

TAULUKKO 2. Käytettyjen ELISA-määritysten reagenssit, herkkyysrajat sekä laimennokset.

	Reagenssit	Herkkyys (pg/ml)	Näytteiden laimennos
IL-6	PeliPair™ human cytokine ELISA reagent set IL-6 (Sanquin)	0,6 - 150	-
Adiponektiini	DuoSet Development System human Adiponec-tin (R&D Systems)	15,6 - 2000	1 : 10 000
Adipsiini	DuoSet Development System human Comple-ment factor D (R&D Systems)	7,8 - 1000	1 : 10 000
Leptiini	DuoSet Development System human Leptin (R&D Systems)	15,6 - 2000	1 : 50

4.4 Tilastollinen analyysi

Tilastolliseen analyysiin käytettiin SPSS-tilasto-ohjelmaa. ELISA-määrityksistä saaduista tuloksista laskettiin keskiarvot sekä keskiarvon keskivirhe (standard error of mean, SEM) viimeisimmälle näytteelle ennen indeksikohtausta sekä kohtauksen jälkeisille näytteille. SEM saadaan jakamalla keskihajonta n-arvon eli rinnakkaisnäytteiden määrän neliöllä. Tulosten laskennassa käytettiin sekä koko aineistoa että eri epilepsiatyyppin tai sähköisen purkauksen lateralisaation suhteen jaettua aineistoa. Määritysten tilastollinen merkitsevyys laskettiin toistuvien mittausten varianssianalyysillä (ANOVA) käyttäen Bonferronin monivertailukorjausta. Tilastollisessa analyysissä jätettiin pois potilaat, joilla oli puutteellinen sarja näytteitä.

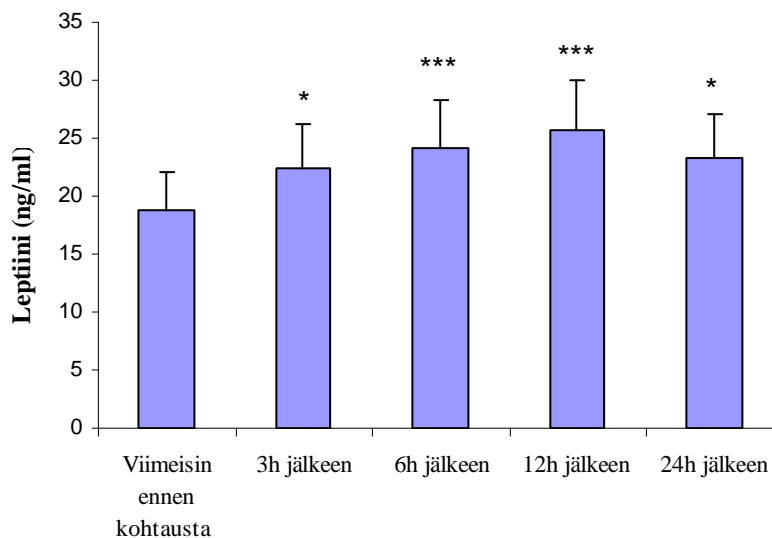
Jaetuissa aineistoissa haluttiin tutkia keskiarvojen eroa eri ryhmien välillä alkutilanteessa (ennen epilepsiakohtausta) ja tätä testattiin t-testillä. Myös mahdollista eroa leptiinin ja IL-6:n suhteessa ryhmien välillä ennen epilepsiakohtausta testattiin t-testillä. Eroa pidettiin tilastollisesti merkitsevänä, kun $p < 0,05$. P-arvoa käytetään yleisesti kokeellisten tutkimusten tulosten satunnaisvirheen tunnuslukuna.

5 TULOKSET

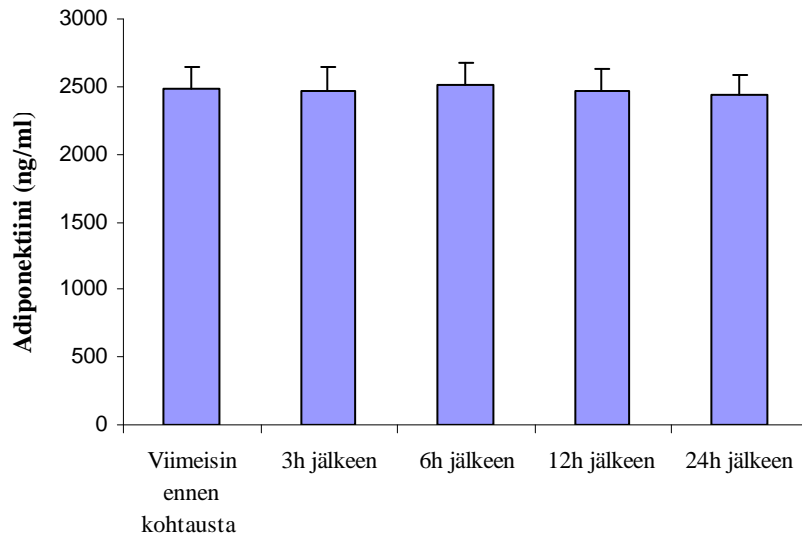
5.1 Adipokiinien ja interleukiini-6:n plasmapitoisuus epilepsiahoituksen yhteydessä

Adipokiinien ja IL-6:n tuottoa epilepsiahoituksen yhteydessä tutkittiin ELISA-menetelmällä potilaista otetuista plasmanäytteistä. Koko aineisto käsitti 37 potilasta, joilta oli kerätty kaikki tutkittavat näytteet (ennen kohtausta, 3 h, 6 h, 12 h ja 24 h kohtausten jälkeen). Tilastollista merkitsevyyttä tutkittaessa indeksikohtausten jälkeen otettuja näytteitä verrattiin viimeisimpiin ennen kohtausta otettuihin näytteisiin toistettujen mittausten varianssianalyysillä. Varianssianalyysissä saadaan tilastollisesti merkitsevä tulos, jos analysoitavien ryhmien sisäinen vaihtelu on merkitsevästi vähäisempää kuin ryhmien välinen vaihtelu (Uhari 2002, 65).

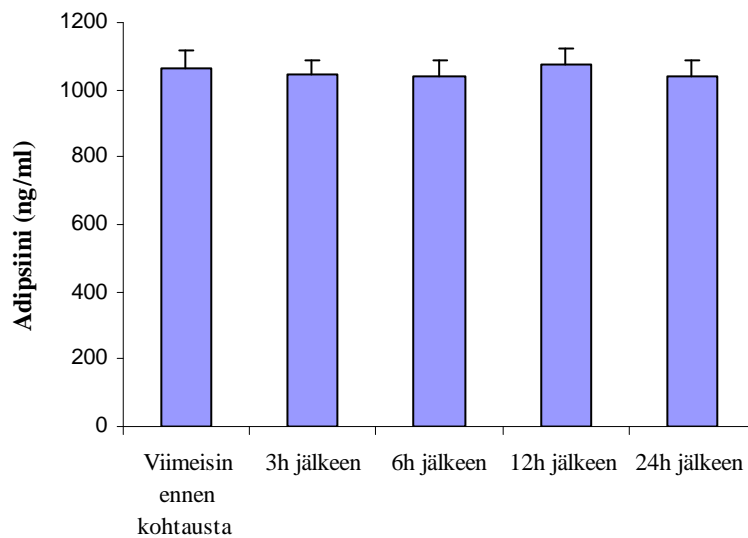
Leptiinin plasmapitoisuudet lisääntyivät tilastollisesti merkitsevästi epilepsiahoituksen jälkeen, ja sen pitoisuus plasmassa oli korkeimmillaan 12 tunnin kuluttua kohtauksesta. Kuuden ja 12 tunnin kohdalla epilepsiahoituksen jälkeen ero oli erittäin merkitsevä. 24 tunnin kuluttua kohtauksesta ero oli edelleen tilastollisesti merkitsevä, mutta leptiinin pitoisuus oli jo laskussa. (Kuvio 7.) Adiponektiinin, adiposiinin ja IL-6:n plasmapitoisuuksissa ei todettu tilastollisesti merkitseviä eroja. (kuviot 8-10).



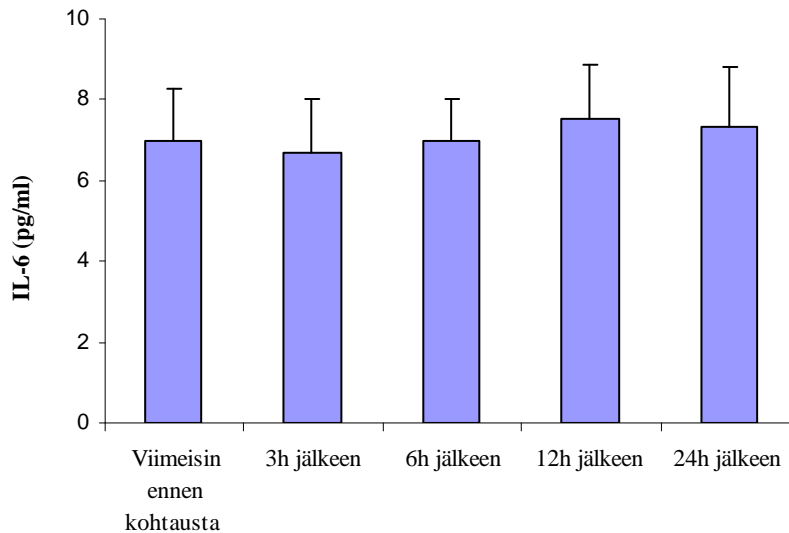
KUVIO 7. Leptiinin pitoisuus epilepsiahoituksen yhteydessä koko potilasaineistossa. Pylväiden arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, $n = 37$. Kohtausten jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. * $p < 0,05$ ja *** $p < 0,001$.



KUVIO 8. Adiponektiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä koko potilasaineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, $n = 37$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta.



KUVIO 9. Adipsiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä koko potilasaineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, $n = 37$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta.

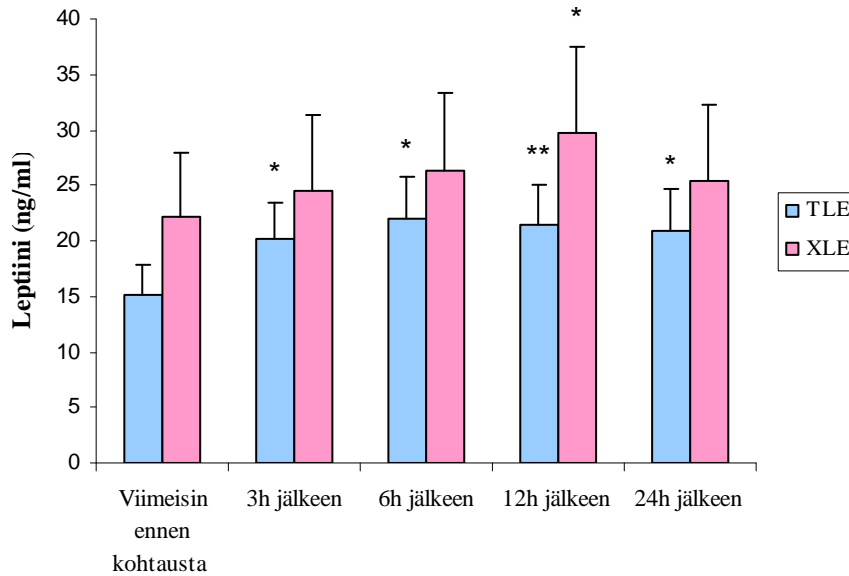


KUVIO 10. IL-6:n pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä koko potilasaineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, $n = 37$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta.

5.2 Epilepsiatyyppin vaikutus adipokiinien ja interleukiini-6:n pitoisuuteen plasmassa

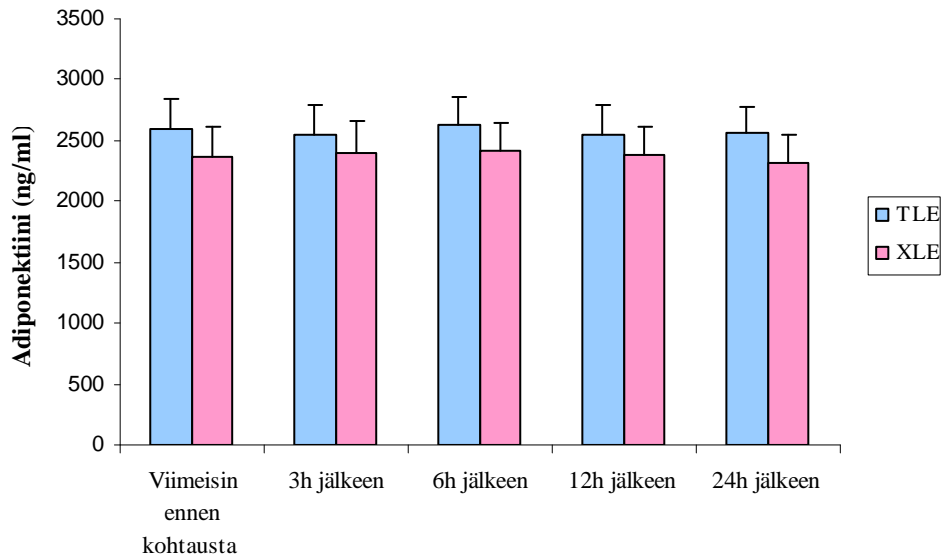
Tilastollisessa analyysissä potilasaineisto jaettiin epilepsiatyyppin mukaan kahteen ryhmään. TLE-potilasryhmään kuuluvat ohimolohkoepilepsiaa sairastavat potilaat ja XLE-ryhmä ekstratemporaaliepilepsiaa sairastavat potilaat. TLE-ryhmässä potilaiden lukumäärä oli 18 ja XLE-ryhmässä 19. Tilastollista merkitsevyyttä tutkittaessa indeksi-kohtauksen jälkeen otettuja näytteitä verrattiin viimeisimpiin ennen kohtausta otettuihin näytteisiin toistettujen mittausten varianssianalyysillä. Jaetussa aineistossa tutkittiin myös eroa ryhmien välillä alkutilanteessa, eli ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja verrattiin toisiinsa t-testillä.

TLE-potilasryhmässä leptiinin plasmapitoisuus lisääntyi epilepsiakohtauksen jälkeen ja ero oli tilastollisesti merkitsevä kaikissa aikapisteissä kohtauksen jälkeen. Myös XLE-potilasryhmässä leptiinin pitoisuus nousi, mutta ero oli tilastollisesti merkitsevä vain 12 tunnin kohdalla kohtauksen jälkeen. XLE-potilasryhmässä leptiinipitoisuudet olivat korkeampia, ja potilaiden välillä havaittiin enemmän hajontaa kuin TLE-ryhmässä. Alkutilanteessa ryhmien välillä ei leptiinitasoissa ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. (Kuvio 11.)

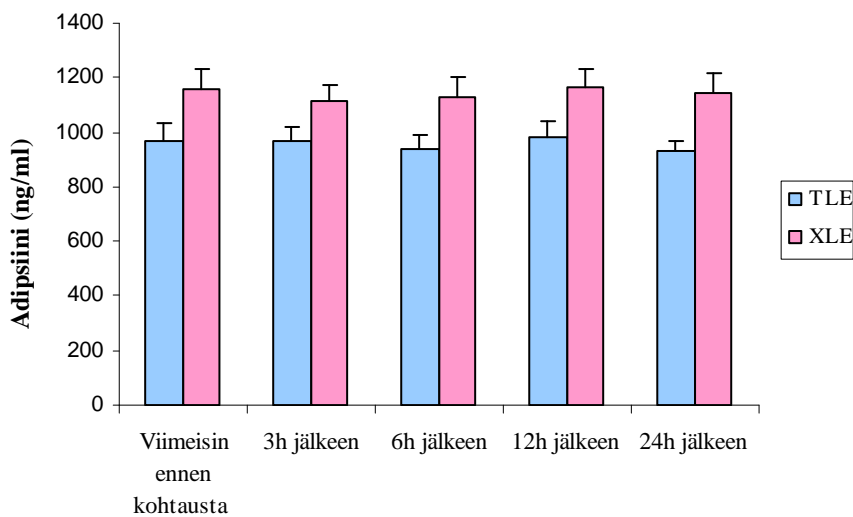


KUVIO 11. Leptiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä eri epilepsiatyyppien mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, TLE-ryhmässä $n = 18$ ja XLE-ryhmässä $n = 19$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä. * $p < 0,05$ ja ** $p < 0,01$.

Adiponektiinin plasmapitoisuudet olivat hieman korkeampia TLE-potilasryhmässä, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Kaikissa aikapisteissä ryhmien välinen ero on lähes samansuuruinen. Adiponektiinipitoisuudet pysyivät molemmissa potilasryhmissä tasaisena kaikissa aikapisteissä. (Kuvio 12.) Adipsiinin plasmapitoisuudet olivat korkeampia XLE-potilasryhmässä, mutta ryhmien välinen ero oli kaikissa aikapisteissä lähes samansuuruinen. Adipsiinin pitoisuus pysyi molemmissa potilasryhmissä tasaisena koko seurannan ajan. (Kuvio 13.) Adiponektiini- ja adipsiinipitoisuuksissa ei alkutilanteessa ilmennyt tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä

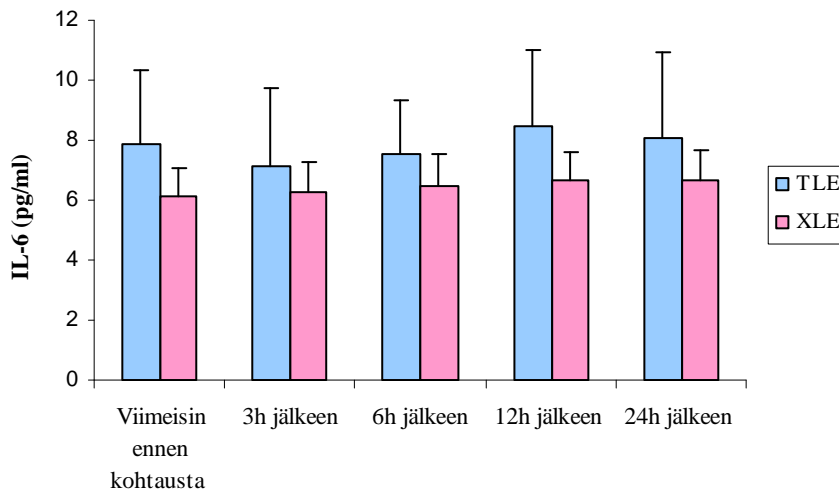


KUVIO 12. Adiponektiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä eri epilepsiatyyppien mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, TLE-ryhmässä $n = 18$ ja XLE-ryhmässä $n = 19$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä.



KUVIO 13. Adipsiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä eri epilepsiatyyppien mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, TLE-ryhmässä $n = 18$ ja XLE-ryhmässä $n = 19$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä.

TLE-potilasryhmässä havaittiin hieman IL-6-pitoisuuden nousua 12 tunnin kuluttua epilepsiakohtauksesta, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. XLE-potilasryhmässä IL-6-pitoisuus pysyi hyvin tasaisena koko seurannan ajan. TLE-ryhmässä IL-6 pitoisuus oli yleisesti korkeampi ja potilaiden väliset hajonnat suurempia kuin XLE-ryhmässä. Alkutilanteessa ryhmien välillä ei ollut tilastollista eroa. (Kuvio 14.)



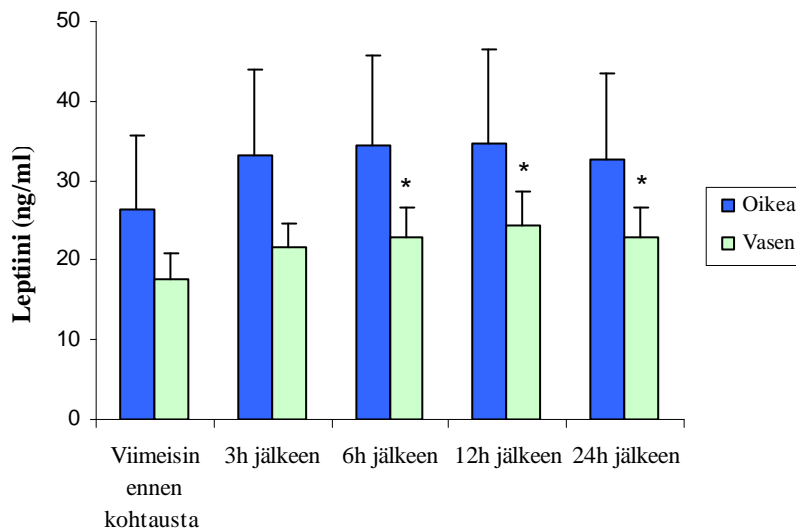
KUVIO 14. IL-6:n pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä eri epilepsiatyyppien mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, TLE-ryhmässä $n = 18$ ja XLE-ryhmässä $n = 19$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä.

5.3 Sähköisen purkauksen lateralisaation vaikutus adipokiinien ja interleukiini-6:n pitoisuuteen plasmassa

Tulosten laskennassa potilasaineisto jaettiin myös epilepsiakohtauksen sähköisen purkauksen lateralisaation mukaan kahteen ryhmään, oikean- ja vasemmanpuoleiseen kohtauksen lateralisaatioon. Epäselvät tapaukset, joissa lateralisaatio ei ollut tiedossa, tai potilaat, joilla lateralisaatiota oli mahdoton määrittää tietylle aivopuoliskolle, jätettiin pois analyysistä. Oikeanpuoleinen kohtauksen lateralisaatio oli 11:llä potilaalla ja vasemmanpuoleinen 16:lla. Tilastollista merkitsevyyttä tutkittaessa indeksikohtauksen jälkeen otettuja näytteitä verrattiin viimeisimpiin ennen kohtausta otettuihin näytteisiin toistettujen mittausten varianssianalyysillä. Jaetussa aineistossa tutkittiin myös eroa

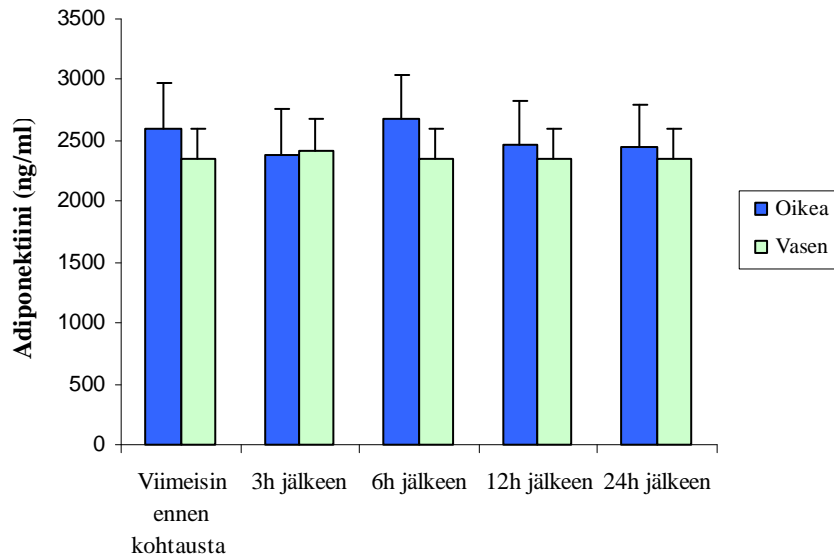
ryhmien välillä alkutilanteessa, eli ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja verrattiin toisiinsa t-testillä.

Potilailla, joilla oli oikeanpuoleinen sähköisen purkauksen lateralisaatio, leptiinipitoisuus oli kaikissa aikapisteissä korkeampi ja potilaiden välinen hajonta suurempaa kuin potilailla, joilla lateralisaatio oli vasemmanpuoleinen. Ero oli kuitenkin kaikissa aikapisteissä lähes samansuuruinen. Potilailla, joilla kohtauksen lateralisaatio oli vasen, leptiinipitoisuuksissa ilmeni tilastollisesti merkitsevä ero lähtötasoon verrattuna kuuden, 12 sekä 24 tunnin jälkeen kohtauksesta. Myös oikeanpuoleisen lateralisaation potilasryhmässä leptiinin pitoisuus verenkierrossa nousi kohtauksen jälkeen, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi. Alkutilanteessa ryhmien välillä ei ilmennyt tilastollista eroa. (Kuvio 15.)

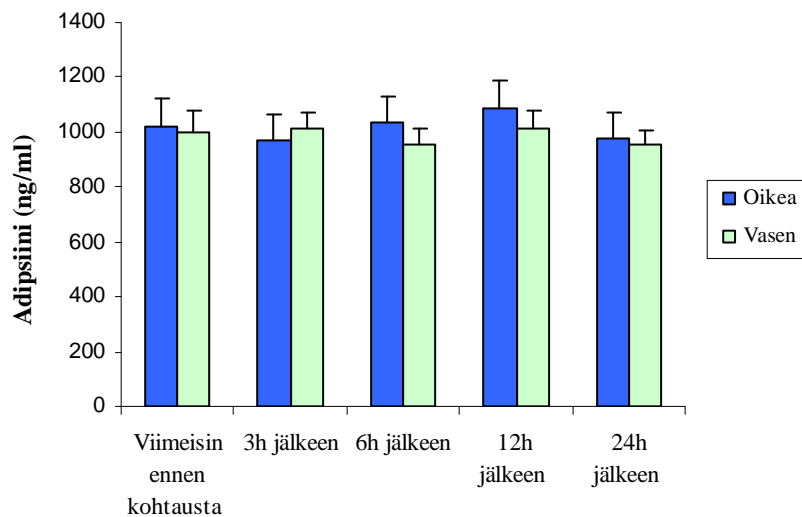


KUVIO 15. Leptiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä kohtauksen eri lateralisaation mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, Oikea-ryhmässä $n = 11$ ja Vasen-ryhmässä $n = 16$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä. * $p < 0,05$.

Adiponektiinin plasmapitoisuudet olivat korkeampia oikeanpuoleisen kohtauksen lateralisaation omaavilla potilailla lähes kaikissa aikapisteissä, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. (Kuvio 16.) Adipsiinin pitoisuus verenkierrossa epilepsiakohtauksen jälkeen oli molemmissa ryhmissä samalla tasolla (kuvio 17). Kummankaan adipokiinin kohdalla alkutilanteessa ei ilmennyt tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä.

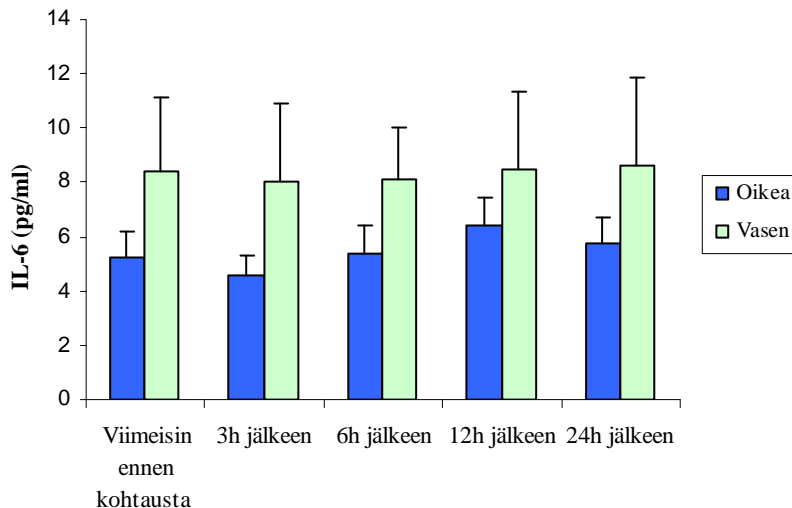


KUVIO 16. Adiponektiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä kohtauksen eri lateralisaation mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, Oikea-ryhmässä $n = 11$ ja Vasen-ryhmässä $n = 16$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä.



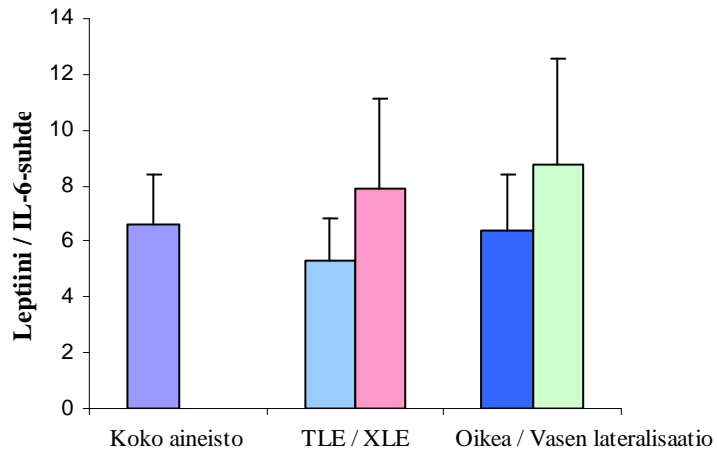
KUVIO 17. Adipsiinin pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä kohtauksen eri lateralisaation mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, Oikea-ryhmässä $n = 11$ ja Vasen-ryhmässä $n = 16$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä.

IL-6-pitoisuus oli korkeampi potilailla, joilla on vasemmanpuoleinen kohtauksen lateralisaatio, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevää. IL-6-pitoisuus pysyi samalla tasolla koko seurannan ajan. Myös hajonnat olivat huomattavasti suuremmat vasemmanpuoleisen lateralisaation omaavilla potilailla. Oikeanpuoleisen lateralisaation ryhmässä IL-6-pitoisuus oli selvästi matalampi. Alkutilanteessa ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. (Kuvio 18.)



KUVIO 18. IL-6:n pitoisuus epilepsiakohtauksen yhteydessä kohtauksen eri lateralisaation mukaan jaetussa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM, Oikea-ryhmässä $n = 11$ ja Vasen-ryhmässä $n = 16$. Kohtauksen jälkeisiä arvoja on verrattu viimeisimpään ennen kohtausta. Ennen kohtausta otettujen näytteiden keskiarvoja on verrattu toisiinsa ryhmien välillä.

Lopuksi tutkittiin leptiinin ja IL-6:n suhdetta alkutilanteessa (ennen kohtausta) koko aineistossa, sekä eri epilepsiatyyppien ja lateralisaation mukaan jaetuissa aineistossa. Koko aineistossa leptiinin ja IL-6:n suhde oli suunnilleen samalla tasolla kuin jaettujen aineistojen ryhmien väliset keskiarvot. Jaetuissa aineistoissa suhde oli pienempi TLE-ryhmässä kuin XLE-ryhmässä. Oikeanpuoleisessa lateralisaatiossa suhde oli pienempi kuin vasemmanpuoleisessa lateralisaatiossa. Tuloksissa ei kuitenkaan ilmennyt tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä. (Kuvio 19.)



KUVIO 19. Leptiinin ja IL-6:n suhde ennen kohtausta koko aineistossa ja epilepsiatyyppien sekä kohtauksen lateralisaation mukaan jaetuissa aineistossa. Arvot ovat tulosten keskiarvoja \pm SEM.

6 MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELU

Työssä tutkittiin kolmen adipokiinin ja IL-6:n pitoisuuksia plasmanäytteistä sandwich-ELISA-menetelmällä. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää aiheuttaako epilepsiakohtaus tiettyjen adipokiinien sekä tulehdussytokiini IL-6:n pitoisuuden nousua verenkierrössä ja vaikuttaako epilepsiatyyppi tai kohtauksen sähköisen purkauksen lateralisaation näiden tekijöiden pitoisuuteen plasmassa.

6.1 Menetelmät

Määritykset tehtiin sarjasta potilasplasmanäytteitä. Ennen analysointia näytteiden otto, käsittely ja säilytys ovat virheille alttiita vaiheita. Näytteenotossa ja -käsittelyssä on oleellista tietää tutkimuksen tausta, jotta näyte otetaan oikealla tavalla. Myös lämpötila on tärkeä ottaa huomioon näytteenkäsittelyssä. Veri- ja plasmanäytteissä aineenvaihdunnan reaktiot saattavat jatkua hitaasti myös elimistön ulkopuolella. Tällöin näytteen koostumus muuttuu hieman näytteenottolanteesta. Valmisteltaessa näytettä myöhemmin tapahtuvaan analyysiin, halutaan näytteessä tapahtuvat reaktiot pysäyttää ja säilyttää tutkittavat komponentit näytteessä sellaisena kuin ne olivat näytteenottohetkellä. Verinäytteiden inkubointi jäähauteessa ennen sentrifugointia sekä sentrifugointi +4 °C:ssa pysäyttävät entsyymitoiminnan ja esimerkiksi sytokiinituotannon näytteenoton jälkeen. (Tapola 2003, 29–30.)

Plasmanäytteen monet analysoitavat komponentit, esimerkiksi sytokiinit, säilyvät huonosti ajan kuluessa. Näytteen säilyvyyteen vaikuttavat esimerkiksi lämpötila, auringonvalo sekä näyteastian materiaali ja näytteiden sulatus- ja pakastuskerrat. Väärissä olosuhteissa tai lämpötilassa säilytetyistä näytteistä voi saada virheellisiä tuloksia määrittämissä. (Tapola 2003, 29.)

Plasmanäytteen hemolyysi, lipemia ja ikteerisyys voivat aiheuttaa ELISA-määrityksen tuloksiin virhettä. Hemolyysi tarkoittaa sitä, että verinäytteen punasoluja on hajonnut, jolloin niistä on vapautunut hemoglobiinia plasmaan. Näyte on tällöin väriltään haalea tai voimakas punainen riippuen hajonneiden punasolujen määrästä. Lipemia aiheuttaa

näytteeseen sameuden ja se johtuu epätavallisen suuresta määrästä lipidejä verenkierron näytteenottohetkellä. Plasmanäytteen ikteerisyys tarkoittaa, että sen bilirubiinipitoisuus on normaalia korkeampi ja näytteen väri on voimakkaasti keltainen. (Makkonen & Tuokko 1996, 106–107.) Muun muassa nämä näytteen komponentit voivat häiritä ELISA-menetelmän spesifisiä sitoutumisia tai entsyymireaktiota. Laimentamattomilla näytteillä virhemahdollisuus on suurempi, koska näytteen laimentuessa myös häiritsevien komponenttien pitoisuus pienenee.

ELISA-määrityksessä pipetointilavuudet ovat pieniä ja joidenkin määritysten kohdalla laimennokset suuria tai moninkertaisia. Näin pipetointivirheet voivat aiheuttaa hajontaa tuloksiin. Kuoppalevyn pohja täytyy pitää puhtaana, koska levyn pohjan epäpuhtaudet vaikuttavat mittauksessa valon absorptioon ja näin ollen laitteen mittaamiin absorbansseihin. Standardit ja näytteet tulee pipetoida levyille nopeasti, jotta levyn alku- ja loppuosan tulokset olisivat vertailukelpoisia. Myös reagenssien lisäykset kuoppalevyille tulee tehdä täsmällisesti inkubointiaikojen mukaan. Esimerkiksi entsyymi-substraattireaktio tulee pysäyttää oikeaan aikaan, jotta reaktion pidentyminen tai lyhentymisen ei vaikuttaisi näytteiden värin intensiteettiin.

ELISA-menetelmää käytettäessä myös analysointilämpötilan huomioiminen on tärkeää. Lämpötilan noustessa entsyymireaktion nopeus kiihtyy ja määrityksen tuloksena saadaan liian korkeita pitoisuuksia (Tapola 2003, 34). Myös pesuvaiheet ovat ELISA:ssa tärkeitä, jotta ylimääräiset, kiinnittymättömät vasta-aineet eivät häiritse näytteen sitoutuneiden vasta-aineiden detektointia. Määritysten välisten erojen seuraamiseksi kaikilla levyillä käytetään tasokontrolleja levyn alussa, keskellä ja lopussa.

6.2 Tulokset

Tutkimuksessa havaittiin plasman leptiinipitoisuuden nousevan epileptokohtauksen yhteydessä. Tulos ilmeni koko aineistossa, ja voimakkaampaa nousu oli ohimolohkoepilepsiaa (TLE) sairastavilla potilailla, vaikkakin pitoisuudet olivat yleisesti matalampia kuin ekstratemporaaliepilepsiaa (XLE) sairastavilla potilailla. Myös XLE-ryhmässä leptiinipitoisuus nousi, mutta ero oli tilastollisesti merkitsevä vain 12 tunnin kuluttua kohtauksesta otetuissa näytteissä. Leptiinipitoisuus oli huipussaan 12 tunnin kuluttua

kohtauksesta molemmissa ryhmissä. Kohtauksen sähköisen purkauksen lateralisaatioista vain vasemmanpuoleinen nosti plasman leptonipitoisuutta tilastollisesti merkitsevästi. Tuloksia sekoittavia tekijöitä voivat tässä tutkimuksessa olla erot sukupuolijakaumassa tai potilaiden painoindeksissä ryhmien välillä sekä jaetuissa aineistoissa pieni n-arvo eli potilaiden määrä. Adiponektiinin ja adipsiinin tuotossa ei havaittu merkittäviä muutoksia epilepsia-kohtauksen yhteydessä.

Leptiinillä on havaittu olevan antikonvulsivisia vaikutuksia eläinkokeissa ja sen on todettu olevan myös neuroprotektiivinen eli hermosoluja suojeleva tekijä (Erbayat-Altay ym. 2008, 82 & Xu ym. 2008, 272). Tässä tutkimuksessa havaitun plasman leptonipitoisuuden nousun voisi ajatella olevan elimistön keino suojautua kohtauksen aiheuttamilta vaurioilta aivojen hermosoluissa sekä mahdollisesti estää uusien kohtausten ilmentymistä lyhyen ajan sisällä.

Veren leptonitaso on todettu olevan korkeampi lihavilla ihmisillä. Samalla adiponektiinitasot ovat matalampia kuin normaalipainoisilla henkilöillä. (Considine ym. 1996, 295; Tilg & Moschen 2006, 774.) Tuloksissa tällainen suunta (korkeampi leptiini ja matalampi adiponektiini) oli havaittavissa ohimolohkon ulkopuolista epilepsiaa sairastavilla potilailla, jolloin potilaiden painoindeksistä voisi löytyä vastaus eroon TLE ja XLE epilepsiatyyppiä sairastavien potilasryhmien välillä. Potilaiden painoindeksistä ei kuitenkaan ollut tässä tutkimuksessa saatavilla, joten avoimeksi kysymykseksi jää, olivatko ohimolohkon ulkopuolista epilepsiaa sairastavat potilaat lihavampia kuin ohimolohkoepilepsiaa sairastavat potilaat ja voisiko se olla sekoittava tekijä tutkimuksessa.

IL-6-pitoisuuden on raportoitu nousevan ohimolohkoepilepsiaa (TLE) sairastavilla potilailla epilepsia-kohtauksen yhteydessä (Alapirtti ym. 2009, 96; Bauer 2009, 5) ja lisääntyneen tuoton liittyvän erityisesti oikeanpuoleiseen kohtauksen lateralisaatioon (Bauer ym. 2009, 5). Tässä tutkimuksessa IL-6:n tuotossa ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitsevää muutosta eri epilepsiatyypeissä tai kohtauksen lateralisaation mukaan. Tulosten mukaan ohimolohkoepilepsiassa plasman IL-6-pitoisuus oli korkeammalla kuin ohimolohkon ulkopuolisissa epilepsioissa ja kohtauksen vasemmanpuoleinen lateralisaatio aiheutti korkeamman plasman IL-6-pitoisuuden, vaikka erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Pienet n-arvot saattavat tässä vaikuttaa tulosten tilastolliseen merkitsevyyteen.

Tutkimuksessa laskettiin myös antikonvulsiivisen leptiin ja proinflammatorisen IL-6:n suhdetta koko aineistossa sekä eri epilepsiatyyppien ja lateralisaation mukaan jaetussa aineistossa. Suhteen kasvaessa vaikutus on enemmän antikonvulsiivinen eli kohtausta ehkäisevä. XLE-ryhmässä ja vasemmanpuoleisessa lateralisaatiossa suhde oli korkeampi, joten vaikutus on enemmän antikonvulsiivinen. TLE-ryhmässä ja oikeanpuoleisessa lateralisaatiossa suhde oli matalampi, eli vaikutus on enemmän kohtaukselle altistava tai kohtausta edistävä. Tuloksissa ei kuitenkaan ilmennyt tilastollisesti merkitsevää eroa.

Erot adipokiinien ja sytokiinien tasoissa eri epilepsiatyyppien sekä kohtauksen lateralisaation välillä voi selittää aivojen anatomian perusteella. Ohimolohkossa tapahtuvalla epilepsiakohtauksella ajatellaan olevan enemmän vaikutuksia aivojen hypotalamuksen ja aivolisäkkeen alueella, näin ollen se saattaa silloin vaikuttaa enemmän immunologisen vasteen muodostumiseen (Alapirtti ym. 2009, 97). Leptiini myös säätelee voimakkaasti aivojen hypotalamusta ja hypotalamuksen alueella sijaitsee paljon leptiinireseptoreita (Spanswick ym. 2000, 758). Tästä voivat johtua leptiin matalammat pitoisuudet plasmassa ohimolohkosta lähteneen epilepsiakohtauksen jälkeen.

Myös aivojen eri puoliskoilla on ajateltu olevan erilaiset vaikutukset immuunivasteeseen. Yleisesti vasemmanpuoleisten alueiden uskotaan vähentävän ja oikeanpuoleisten alueiden nostavan immuunijärjestelmään kuuluvien tekijöiden tuottoa. (Meador ym. 2004, 842.) Tutkimuksessa havaittiin korkeammat leptiinipitoisuudet oikeanpuoleisen epilepsiakohtauksen jälkeen ja korkeammat IL-6-pitoisuudet vasemmanpuoleisen kohtauksen jälkeen, mutta erot ryhmien välillä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. IL-6:n osalta tulos on ristiriidassa Meadorin tulokinnan kanssa, samoin kuin se on ristiriidassa Bauerin (2009) raportoimien tutkimusten kanssa (Meador ym. 2004; Bauer ym. 2009). Kuudella potilaalla epilepsiakohtaus yleistyi sekundääriseksi yleistyneeksi kohtaukseksi, joten tässä tilanteessa kohtauksen alkuvaiheen lateralisaatiolla ei enää ole merkitystä, koska kohtaus leviää molemmille aivopuoliskoille. Tämä saattaa myös sekoittaa tuloksia lateralisaation osalta, koska immunologiset vasteet voivat taas olla erityyppiset voimakkaan yleistyneen tajuttomuuskouristuskohtauksen yhteydessä.

Ohimolohkoepilepsia on usein aggressiivisempi ja progressiivisempi eli etenevämpi sairaus kuin muut epilepsiatyypit, ja se aiheuttaa muutoksia sekä tuhoa aivoissa molekyyli- ja solutasolla. Paikallisalkuiset kohtaukset ohimolohkon alueella aiheuttavat muun muassa hippokampuksen skleroosia eli kovettumaa aivoissa, joka johtuu glia-

solujen runsaasta lisääntymisestä alueella. Usein toistuvat kohtaukset aiheuttavat myös muutoksia hermoverkkoihin ja tätä kautta muun muassa yksilön kognitiivisiin toimintoihin. (Pitkänen & Sutula 2002, 173, 175.)

Tämän tutkimuksen tuloksista on havaittavissa, että ohimolohkoepilepsiassa antikonvulsiiivinen ja neuroprotektiivinen leptiini on pitoisuudeltaan matalampi, kun taas prokonvulsiiivinen ja proinflammatorinen IL-6 on korkeampi kuin ekstratemporaaliepilepsiaa sairastavilla potilailla. Myös leptiinin ja IL-6:n suhde ohimolohkoepilepsiaa sairastavilla potilailla on enemmän prokonvulsiiivinen kuin ekstratemporaaliepilepsiaa sairastavilla potilailla. Näiden tulosten voisi ajatella liittyvän ohimolohkoepilepsian aggressiivisempaan luonteeseen ja taipumukseen aiheuttaa muita epilepsiamuotoja enemmän muutoksia aivojen hermosoluissa. IL-6:n ajatellaan lisäävän myös muiden sytokiinien tuotantoa aivokudoksessa ja näin vahvistavan tulehdusreaktioita ja hermosolujen tuhoutumista aivoissa (Alapirtti 2009, 97). Pienen aineiston vuoksi tulos ei kuitenkaan yltänyt täyteen tilastolliseen merkitsevyyteen.

Tutkimusta jatketaan selvittämällä potilaiden painoindeksit, jotta voitaisiin arvioida lihavuuden merkitystä tuloksia sekoittavana tekijänä. Tuloksia tullaan myös vertaamaan aiempiin määrityksiin (muun muassa glutamaatti), jotta voidaan laajemmassa mittakaavassa tutkia mitkä aivojen biokemialliset toiminnot liittyvät tulehdustekijöiden aktivoitumiseen. Tutkimusta immunologisista muutoksista epilepsiakohtausten yhteydessä suunnitellaan laajennettavaksi toisella tutkimuksella, jossa muun muassa leptiinipitoisuutta määritettäisiin epilepsiapotilaiden ja terveiden henkilöiden likvorista eli aivoselkäydinnesteestä.

Tässä tutkimuksessa tehtiin alkuperäislöydös leptiinipitoisuuden noususta plasmassa epilepsiakohtauksen yhteydessä. Mikäli jatkotutkimuksissa voidaan varmistaa leptiinin antikonvulsiiivinen ja neuroprotektiivinen vaikutus epilepsiassa, tietoa voidaan mahdollisesti käyttää hyväksi lääkekehityksessä. Leptiinivälitteinen mekanismi voisi olla yksi tulevaisuuden lääkekehityksen suunnista epilepsian hoidossa.

LÄHTEET

- Alapirtti, T., Rinta, S., Hulkkonen, J., Mäkinen, R., Keränen, T. & Peltola, J. 2009. Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin 1beta production in patients with focal epilepsy: A video-EEG study. *Journal of the Neurological Sciences* 280 (1-2) 94-97.
- Argaraña, C.E, Kuntz, I., Birken, S., Axel, R. & Cantor, C.R. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic acids research* 14 (4) 1871-1882.
- Banks, WA. 2004. The many lives of leptin. *Peptides* 25 (3) 331-338.
- Bauer, S., Cepok, S., Todorova-Rudolph, A., Nowak, M., Köller, M., Lorenz, R., Oertel, WH., Rosenow, F., Hemmer, B. & Hamer, H. 2009. Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. *Epilepsy Research* 86 (1) 82-88.
- Bender MedSystems. 2009. ELISA & Instant ELISA Application Guide.
- BrainConnection. Image gallery. Brain anatomy. [online] Tallennettu 3.11.2009 <http://brainconnection.positscience.com/topics/?main=gal/cns-home>
- Considine, R., Sinha, M., Heiman, M., Kriauciunas, A., Stephens, T., Nyce, M., Ohannesian, J., Marco, C., McKee, L., Bauer, T., & Caro, J. 1996. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *The New England Journal of Medicine* 334 (5) 292-295.
- Crowther, J.R. 2009. *Methods in Molecular Biology. The ELISA guidebook*. 2.painos. New York: Humana Press.
- Davies, C. 2005. *Introduction to Immunoassay*. Teoksessa Wild, D. (toim.) *The Immunoassay Handbook*. 3. painos. Oxford: Elsevier Ltd.
- Engel, J. Jr. & International League Against Epilepsy (ILAE). 2001. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 42 (6) 796-803.
- Erbayat-Altay, E., Yamada, K., Wong, M. & Thio, L. 2008. Increased severity of pentylenetetrazol induced seizures in leptin deficient *ob/ob* mice. *Neuroscience Letters* 433 (2) 82-86.
- Fantuzzi, G. 2005. Adipose tissue, adipokines and inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (5) 911-919.
- Fasshauer, M. Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J. & Paschke, R. 2003. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 301(4) 1045-1050.
- Fisher, RS., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P. & Engel, J. Jr. 2005. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46 (4) 470-472.

- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K. & Iwamatsu, A. 1986. Complementary DNA for novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324(6092) 73-76.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M. & Shimomura, I. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56 (4) 901-911.
- Håkansson, ML., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R. & Meister, B. 1998. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *The journal of neuroscience* 18 (1) 559-572.
- Hänninen, A. 2003. Veren koostumus. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. 1. painos. Porvoo:WSOY.
- Julkunen, I., Silvennoinen, O. & Hurme, M. 2005. Sytokiinit, niiden toiminta ja kliininen merkitys. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen V. (toim.) *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Kirja I. 1. painoksen muuttamaton jatkopainos. Helsinki: Duodecim.
- Kaiser, G. 2007. The innate immune system. The alternative complement pathway. [online] Tallennettu 3.11.2009.
<http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit4/innate/alternative.html>
- Kalueff, A., Lehtimäki, K., Ylinen, A., Honkaniemi, J. & Peltola J. 2004. Intranasal administration of human IL-6 increases severity of chemically induced seizures in rats. *Neuroscience Letters* 269 (2) 35-40.
- Kangas, T. & Virkamäki, A. 2009. Insuliini ja sen tehtävät. *Terveyskirjasto*. Duodecim. [online] Tallennettu 29.9.2009.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dia01202
- Kern, P., Saghizadeh, M., Ong, J., Bosch, R., Deem, R. & Simolo, R. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss and relationship to lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation* 95 (5) 2111-2119.
- Kälviäinen, R. 2009. *Aikuinen ja epilepsia*. 6. uudistettu painos. Helsinki: Epilepsialiitto
- Lam, QL. & Lu, L. 2007. Role of leptin in immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 4 (1) 1-13.
- Lehtimäki, K., Keränen, T., Palmio, J., Mäkinen, R., Hurme, M., Honkaniemi, J. & Peltola, J. 2007. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization related epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica* 116 (4) 226-230.
- Loffreda, S., Yang, S., Lin, H., Karp, C, Brengman, M., Wang, D., Klein AS, Bulkley, G, Bao, C., Noble, P., Lane, M. & Diehl, AM. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB Journal* 12 (1) 57-65.

Lundblad, R. 2004. Considerations for the use of blood plasma and serum for proteomic analysis. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics* 1 (2).

Maachi, M., Piéroni, L., Bruckert, E., Jardel, C., Fellahi, S., Hainque, B., Capeau, J. & Bastard, J-P. 2004. Systemic low grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF α , leptin and IL-6 levels in obese women. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 28 (8) 993-997.

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T. & Matsuzawa, Y. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine* 8 (7) 731-737.

Makkonen, S. & Tuokko, S. 1996. Näytteenotto. Helsinki:Opetushallitus.

Mattioli, B., Straface, E., Quaranta, M.G., Giordani, L. & Viora, M. 2005 Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *The Journal of Immunology* 174 (11) 6820–6828.

Meador, K., Loring, D., Ray, P., Helman, S., Vazquez, B. & Neveu, P. 2004. Role of cerebral lateralization in control of immune processes in humans. *Annals of Neurology* 55 (6) 840-844.

Moilanen, E. 2002. Tulehduksen välittäjäaineet. Teoksessa Leirisalo-Repo, M., Hämäläinen, M. & Moilanen, E. (toim.) *Reumataudit*. 3. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim.

O'Rourke, R. 2009. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery* 145 (3) 255–259.

Pitkänen, A. & Sutula, T. 2002. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal lobe epilepsy. *The Lancet Neurology* 1 (3) 173-181.

Saijo, S., Nagata, K., Nakano, Y., Tobe, T. & Kobayashi, Y. 2005. Inhibition by adiponectin of IL-8 production by human macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Biochemical and biophysical research communications* 334 (4) 1180-1183.

Seppälä, I. & Meri, S. 2003. Tulehdusreaktio. Teoksessa Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen V. (toim.) *Mikrobiologia ja infektiosairaudet*. Kirja I.1. painos. Helsinki: Duodecim.

Shanley, L., Irving, A. & Harvey, J. 2001. Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *The journal of neuroscience* 21 (24) RC 186 1-6.

Shanley, L., O'Malley, D., Irving, A., Ashford, M. & Harvey, J. 2002. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurons via P1 3-kinase-driven activation of BK channels. *The journal of physiology* 545 (Pt. 3) 933-944.

Spanswick, D., Smith, M., Mirshamsi, S., Routh, V. & Ashford, M. Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nature Neuroscience* 3 (8) 757-758.

Stern, J. 2009. Overview of evaluation and treatment guidelines for epilepsy. *Current treatment options in neurology* 11 (4) 273- 284.

St. Louis, E. & Granner, M. 2008. Chapter 228 - Seizures and Epilepsy in Adolescents and Adults. Teoksessa Rakel, R. & Bope, E. (toim.) *Conn's Current Therapy*. [online-oppikirja] 60. painos. Philadelphia: Saunders Elsevier.

Tapola, H. 2003. Näytteenotto. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. 1. painos. Porvoo:WSOY.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Painon hallinta. Ylipainon mittarit. [online] Tallennettu 29.10.2009.

http://www.ktl.fi/portal/suomi/tietoa_terveydesta/elintavat/painonhallinta/#navi4

Tilg, H. & Moschen, A. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 6 (10) 772-783.

Uhari, M. 2002. *Biostatiikan taskutieto*. 2.painos. Helsinki:Duodecim.

Vezzani, A., Moneta, D., Conti, M., Richichi, C., Ravizza, T., De Luigi, A., De Simoni, M., Sperk, G., Andell-Jonsson, S., Lundkvist, J., Iverfeldt, K. & Bartfai, T. 2000. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 97 (21) 11534-11539.

Vezzani, A., Moneta, D., Richichi, C., Aliprandi, M., Burrows, SJ., Ravizza, T., Perego, C. & De Simoni, M. 2002 Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 2002 43 (suppl. 5) 30-35.

Weisberg, S., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. & Ferrante, A. Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation* 112 (12) 1796-1808.

Westerbacka, J. 2004. Rasvamaksa ja insuliiniresistenssi. [online] *Diabetesliitto*. Tallennettu 29.9.2009. http://www.diabetes.fi/sivu.php?artikkeli_id=452

White, R.T., Damm, D., Hancock, N., Rosen, B.S., Lowell, B.B., Usher, P., Flier, J.S. & Spiegelman, B.M. 1992 Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 267 (13) 9210-9213.

Wolf, A., Wolf, D., Rumbold, H., Enrich, B. & Tilg, H. 2004 Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1 RA in human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 323 (2) 630-635.

Xu, L., Rensing, N., Yang, X., Zhang, H., Thio, L., Rothman, S., Weisenfeld, A., Wong, M. & Yamada, K. 2008 Leptin inhibits 4-aminopyridine- and pentylentertazole-induced seizures and AMPAR-mediated synaptic transmission in rodents. *The Journal of Clinical Investigation* 118 (1) 272-280.

Ye, J. 2009. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *International Journal of obesity* 33 (1) 54-66.

Ye, J., Gao, Z., Yin, J. & He, H. 2007. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 293 (4) E1118-E1128

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 (6505) 425–432.

SANASTO

Adipokiinit	Rasvakudoksen tuottamia hormoneja tai välittäjäaineita.
Adiposyytti	Rasvasolu
Antigeeni	Molekyyl, joka aiheuttaa elimistössä immuunivasteen.
Anti-inflammatorinen	Tulehdusta vaimentava, ehkäisevä
Antikoagulantti	Hyytymistä estävä aine
Antikonvulsiivinen	Epilepsiakohtausta ehkäisevä
Automatismi	Epätarkoituksenmukaisia, ainakin osittain koordinoituja liikkeitä, joita potilas suorittaa tiedostamatta, esimerkiksi suun maiskuttelu, nieleskely, vaatteiden hypistely.
Epitoooppi	Antigeenin vasta-ainetta sitova kohta
Hippokampus	Aivoturso, ohimolohkojen sisäosien rakenne
Hypotalamus	Väliaivojen pohjaosassa sijaitseva alue, joka säätelee aivo-lisäkkeen toimintaa.
Idiopaattinen epilepsia	”Itsesyntyinen”, syntyy ilman ulkopuolista tai aivojen rakenteellista tekijää.
Insuliiniresistenssi	Insuliinin heikentynyt vaikutus kudoksissa
Lateralisaatio	Aivopuoliskojen jako oikeaan ja vasempaan, epilepsiakohtausten yhteydessä kohtauspesäkkeen sijainnin mukaan.
Makrofagi	Leukosyytteihin eli valkosoluihin kuuluvia syöjäsoluja, jotka toimivat etenkin elimistön tulehdusreaktioissa.
Neuroprotektiivi	Hermosoluja suojeleva tekijä
Plasma	Veren nestemäinen soluton osa, joka on antikoagulantin ja sentrifugoinnin avulla erotettu kokoverestä.
Prokonvulsiivinen	Epilepsiakohtaukselle altistava, kohtausta edistävä
Proinflammatorinen	Tulehdusta edistävä
Symptomaattinen epilepsia	Sairaus, joka aiheutuu aivojen rakenteellisesta muutoksesta tai aivosairaudesta.
Sytokiinit	Suurelta osin erilaisten leukosyyttien tuottamia proteiinirakenteisia viestimolekyylejä
Vasta-aine	Immuunijärjestelmän B-solujen tuottamia liuukoisia glykoproteiineja, joiden avulla elimistö tunnistaa vieraita organismeja tai molekyylejä eli antigeeneja.

LYHENTEET

CPS	Monimuotoinen paikallisalkuinen kohtaus (complex partial seizure)
HRP	Piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase)
IL	Interleukiini (interleukin)
SGTCS	Toissijainen yleistynyt kohtaus (secondary generalised tonic clonic seizure)
SPS	Yksinkertainen paikallisalkuinen kohtaus (simple partial seizure)
TLE	Ohimolohkoepilepsia (temporal lobe epilepsy)
TMB	Tetrametyylibentsidiini (3,5,3',5'-tetramethylbenzidine)
TNF- α	Tuumorinekrroositekijä- α (tumor necrosis factor- α)
XLE	Ekstratemporaaliepilepsia, ohimolohkon ulkopuolinen epilepsia (extra-temporal lobe epilepsy)