

Juuso Koskinen

METADHERIININ VAIKUTUKSET HAAVOJEN PARANEMISEEN HIIRILLÄ

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta

Syventävien opintojen kirjallinen työ

joulukuu 2021

TIIVISTELMÄ

Juuso Koskinen: Metadheriinin vaikutukset haavan paranemiseen hiirillä
Syventävien opintojen opinnäytetyö
Ohjaaja: professori Tero Järvinen
Tampereen yliopisto
Lääketieteen lisensiaatti.
joulukuu 2021

Akuutit haavat ovat yleisiä tapaturmien ja lääketieteellisten toimenpiteiden jälkeen. Akuuttien haavojen paraneminen kestää usein 5-10 vuorokautta riippuen useista eri tekijöistä. Haavojen hoito akuutissa vaiheessa on kirurgista, laajat haavat suturoidaan löyhästi paranemisen auttamiseksi.

Metadheriini, joka tunnetaan myös nimillä AEG-1 tai LYRIC, on erittäin vähän tutkittu proteiini. Se kloonattiin ensimmäisen kerran vuonna 2002 ja on siitä saakka ollut tutkimusten kohteena. Syöpäkasvainten on todettu ilmentävän suuria määriä metadheriinia. Metadheriini edesauttaa syöpäkasvainten nopeaa kasvua ja etäpesäkkeiden muodostusta.

Tutkimuksessa tarkoituksena oli selvittää metadheriinin vaikutuksia haavan paranemiseen. Tutkimus suoritettiin siirtämällä AAV9-virusvektorilla 12 hiiren selkään tehtyihin haavoihin metadheriini- tai LacZ-geeni. LacZ-siirtogeenieläimet muodostivat verrokkiryhmän. Tämän jälkeen haavat valokuvattiin päivittäin seuraavan 7 vuorokauden ajan. Haavojen pinta-alaa arvioitiin GIMP-kuvankäsittelyohjelman avulla sokkoutetusti.

Tutkimuksessa kaikkien eläinten haavat paranivat hyvin odotettua tahtia. Tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa haavojen paranemisnopeuksien välillä yhdenkään tutkimuspäivän kohdalla. Tutkimuksen suhteellisen pieni määrä koe-eläimiä ei mahdollista pienien erojen havaitsemista paranemisnopeuksien välillä. Jatkotutkimus on aiheellista metadheriinin vaikutusten selvittämiseksi haavojen paranemisessa. Metadheriinin vaikutukset syöpäkasvainten aggressiiviseen käyttäytymiseen tukevat hypoteesia sen vaikuttamisesta myös haavojen paranemiseen.

Avainsanat: MTDH, haava, paraneminen

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

SISÄLLYS

1. JOHDANTO	4
1.1 Metadheriini	4
1.2 LacZ-geeni	6
1.3 Akuutit haavat	6
1.4 AAV-vektori	8
1.5 Tutkimuskysymys	8
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	9
2.1 Tutkimusaineisto	9
2.2 Eläinkokeet	10
2.2.1 Koe-eläinten valmistelu	10
2.2.2 Valokuvaaminen	10
2.2.3 Koe-eläinten lopettaminen	10
2.2.4 Valokuvien käsittely ja sokkoutus	11
2.3 Tilastollinen käsittely	11
3. TULOKSET	11
4. POHDINTA	13
5. LÄHTEET	15
6. LIITTEET	18

1 JOHDANTO

1.1 Metadheriini

Metadheriini-geeni, joka tunnetaan myös nimillä AEG-1 tai LYRIC, kloonattiin ensimmäisen kerran vuonna 2002. Se on solukalvon läpäisevä proteiini, joka osallistuu solun toimintaan useilla eri tavoilla. Ihmisen MTDH-mRNA koodaa proteiinia, jonka ennustettu molekyylimassa on n. 64 kDa. Proteiini on voimakkaan emäksinen. Metadheriini osallistuu useiden eri solunsisäisten mekanismien signaalinvälitykseen ja toimintaan vuorovaikuttamalla muiden proteiinien kanssa. (Kang ym. 2005).

Metadheriinia ilmentyy kaikissa tutkituissa kudoksissa. Sen ilmentyminen on korostettua poikkijuovaisessa lihaskudoksessa, sydänlihaskudoksessa ja umpieritysrauhaisissa, kuten kilpirauhasessa ja lisämunuaiskuoren kudoksessa. (Kang ym. 2005).

Metadheriinin ilmentyminen on kaikissa tähän asti sen osalta tutkituissa syöpäkasvaimissa kohonnut. Tähän asti sen poikkeavan suuri ilmentyminen on havaittu heptosellulaarisessa karsinoomassa, ei-pienisoluisessa keuhkosityövissä, melanoomassa, glioblastoomassa, neuroblastoomassa ja oligodendroglioomassa, sekä ruokatorven-, rinta-, eturauhas-, munuais- ja suolistosyövissä. Tutkimuksissa ilmentymisen on todettu korostuneen tavanomaiseen verrokkikudokseen verrattuna. (Yoo 2012). Sen yli-ilmentyminen kaikissa tähän asti tutkituissa syövässä tekee siitä lupaavan kohteen tulevaisuuden syöpälääkkeille.

Lisäksi MTDH mahdollisesti vaikuttaa usean taudin patogeneesissä, joista esimerkkeinä migreeni ja Huntingtonin tauti, joissa sitä ilmennetään. Tämän lisäksi sillä on vaikutusta useaan makrotason normaaliin fysiologiseen prosessiin, joista esimerkkeinä sikiönkehitys ja tulehdusreaktio. (Yoo ym. 2012).

Metadheriini edistää kasvainten taipumusta muodostaa etäpesäkkeitä. Brownin ja Ruoslahden (2004) tutkimuksessa havaittiin, että metastasoituneen rintasyövän kudoksessa metadheriini ilmentyi korostetusti.

Sen korostunut ilmentyminen kasvainkudoksessa lisäsi keuhkoetäpesäkkeiden muodostumista. Metadheriiniin reagoivat vasta-aineet ja geeninpoisto heikensivät kasvaimen metastasointia. (Brown & Ruoslahti 2004).

Metadheriini vaikuttaa syöpäkasvaimien kasvutapaan ja nopeuteen. Se vaikuttaa kasvainsolujen jakaantumisen nopeuteen, etäpesäkkeiden muodostukseen eli metastasointiin, kudoksiin tunkeutumiskykyyn (invasiivinen kasvu), kasvainten uudisverisuonten (angiogeneesi) muodostukseen ja lääkeresistenssiin. (Sarkar ym. 2013) Erityisesti metadheriinin solujen jakaantumiseen välittyy PI3K/Akt- ja Wnt/ β -kateniini-signalointireittien kautta. (Johnson ym. 2002) Nämä ominaisuudet tekevät metadheriinistä mielenkiintoisen tutkimuskohteen mm. syöpälääkkeiden kohdeproteiinina (Emdad ym. 2016) Metadheriinin solujen jakautumista ja vaeltamista kiihdyttävän vaikutuksen vuoksi se on mielenkiintoinen tutkimuskohde myös haavan paranemiseen liittyen. Haavan paranemiseen liittyy sekä keratinosyyttien että fibroblastien jakautuminen ja vaellus haavassa (Velnar ym. 2009), jota metadheriini voisi kiihdyttää.

Metadheriinin ilmentymistä säätelee mm. H-ras-geeni, jonka korostunut ilmentyminen johtaa myös metadheriinin korostuneeseen ilmentymiseen. H-ras on onkogeeni I. tunnettu syövän kehittymisen aikaansaava geeni, joka vaikuttaa useilla eri tavoilla solujen jakautumiseen ja kasvainten muodostumiseen. (Hamilton & Wolfman 1998). H-Ras geenin aktivoivat mutaatiot ovat erittäin yleisiä tietyissä syöpätyypeissä ja se on yksi yleisimmin aktivoituneita onkogeenejä. H-ras lisää metadheriinin ilmentymistä PI3K/Akt-signalointireitin kautta. Metadheriinin korostunut ilmentyminen edelleen hillitsee solujen apoptoositaipumusta edelleen saman PI3K/Akt-signalointireitin kautta. Metadheriinin aiheuttama Akt:n lisääntyminen vaikuttaa edelleen solujen pitkäikäisyyteen fosforyloimalla substraatteja GSK3 β /c-Myc, p21/mda-6, MDM2/p53 ja Bad. (Lee ym. 2006) Metadheriini on siis osa H-ras:n käynnistämää syöpää aiheuttavaa ketjureaktiota. Sillä on kuitenkin myös kyky aiheuttaa syöpää itsenäisesti PI3K/Akt-signalointireittiin suoraan vaikuttamalla ilman H-ras:a.

Metadheriinin yli-ilmeneminen ennustaa kasvaimen vastustuskykyä yleisesti käytössä olevia syöpälääkkeitä vastaan. Erityisesti hepatosellulaarisen karsinooman kohdalla metadheriinin korostuneen ilmentymisen on havaittu vähentävän doksorubisiinin pitoisuutta kasvainkudoksessa ja se näin lisäsi vastustuskykyä doksorubisiinille. Metadheriinin ilmentymisen heikentäminen lisäsi doksorubisiinin tehoa kasvaimia vastaan. (Yoo ym. 2010).

Metadheriinin on todettu heikentävän solujen apoptoositaipumusta. Siirtogeenitutkimuksissa, joissa sitä on siirretty tavallisiin astrozyytteihin, se heikensi solujen taipumusta käynnistää apoptoosi PI3K/Akt-signalointireitin kautta. (Lee 2008). Sen kyky lisätä siirtogeeninä tavallisten solujen invaasiokykyä ja pitkäikäisyyttä tekee siitä mielenkiintoisen kohteen tutkimuksessa haavojen paranemiseen liittyen.

1.2 LAcZ-geeni

β -galaktosidaasi on Escherichia coli -bakteerin lac-operonin Z-geenin tuottama proteiini. Sillä on kolme erillistä tehtävää, jotka kaikki liittyvät laktoosin käsittelyyn. Ensiksi se hajottaa laktoosia galaktoosiksi ja glukoosiksi. Toiseksi se muuntaa laktoosia allolaktoosiksi. Ja kolmanneksi se hajottaa allolaktoosia galaktoosiksi ja glukoosiksi. (Juers ym. 2012)

β -galaktosidaasi on laajalti käytössä siirtogeenitutkimuksissa merkkientsyyminä. Sen tuottamalla entsyymillä ei ole juurikaan solujen kasvuun liittyviä vaikutuksia ja sen esiintyminen kudoksetissä voidaan todentaa mm. X-gal-värjäyksellä. Täten se on haavojen paranemisen kannalta täysin inaktiivinen entsyymi, jonka tunnistaminen soluista on helppoa spesifisellä entsyymi-/kudosvärjäyksellä. Tässä tutkimuksessa geeniä käytettiin aktiivisena verrokkina, eikä sen toiminnalla ollut vaikutusta kokeen tulosten kannalta. (Trifonov ym. 2016.)

1.3 Akuutit haavat

Haavan paraneminen on monien eri solutyyppeiden ja vaikutusmekanismien yhteistoiminnan lopputulos. Haavat voidaan lähtökohtaisesti jaotella kolmeen eri alatyyppeihin: akuutit haavat, krooniset haava ja komplisoituneet haavat. (Velnar ym. 2009) Tässä työssä keskitytään ainoastaan akuuttien ei-komplisoituneiden haavojen paranemismekanismiin.

Akuutiksi haavaksi luokitellaan haava, joka umpeutuu ja korjautuu ongelmitta tavanomaista tahtia. Lopputuloksena akuutin haavan parannuttua on toiminnallinen ja anatominen paraneminen. Haavan paranemistahti riippuu monista tekijöistä, mutta tyypillisesti ihoon rajoittuva haava paranee 5-10 päivässä. Mikäli haava ei parane 30 päivässä, katsotaan sen olevan krooninen. (Velnar ym. 2009)

Haavan paranemisessa voidaan erottaa 4 selkeää vaihetta. Ensiksi haavan syntymisen jälkeen tulee koagulaatio- eli veren hyytymisvaihe, jossa keho pyrkii tyrehtyttämään akuutin verenvuodon. Tätä seuraa tulehdusvaihe (inflammatorinen vaihe), jossa kehon immuunijärjestelmä aktivoituu estääkseen taudinaiheuttajien hyökkäyksen haavaan ja avoimen haavan kautta elimistöön. Seuraavaksi tulee varsinainen paranemisvaihe eli proliferatiivinen vaihe, joka alkaa n. 3 vuorokautta haavan synnystä. Tällöin fibroblastit vaeltavat haavan pinnalla ja alkavat kuroa haavaa umpeen. Viimeinen vaihe on uuden epiteelin ja arven muodostus (remodelaatiovaihe), joka voi tapauskohtaisesti jatkua jopa 2 vuoden ajan. (Velnar ym. 2009).

Heti verenvuodon tyrehtyttyä haavaan vaeltaa neutrofiilejä useiden tekijöiden, kuten interleukiini 1:n (IL-1), tuumorinekroositekijä alfan, vaikutuksen takia. Monosyytit muuntuvat makrofageiksi ja immuunivaste käynnistyy 48-96 tunnin kuluttua haavan synnystä. Makrofagit käynnistävät angiogeneesin haavan alueella. Fibroblastien, keratinosyyttien, monosyyttien ja makrofagien tuottamat metalloproteiinaasit hajottavat vaurioituneen, nekroottisen kudoksen ja mahdollistaa näin uuden solukon vaelluksen haavaan ja uuden kudoksen muodostuksen. (Broughton & Janis 2006).

Akuuttien haavojen syntymekanismina on usein trauma tai lääketieteellinen toimenpide. Muita syitä ovat mm. paine ja huono verenkierto (Lindholm ym. 2016). Tässä tutkimuksessa käsitellään ainoastaan lääketieteellisen toimenpiteen aiheuttamia haavoja. Tutkimustuloksia on mahdollista myös soveltaa kirurgisten ja tapaturmaperäisten haavojen paranemisen arviointiin.

Haavapotilaiden keski-ikä on korkea ja valtaosa potilaista on keski-ikäisiä tai vanhuksia. Yangin ym. (2020) Pekingin PLA General Hospitalin potilasaineistossa seurattiin 2997:n potilaan haavojen paranemista. Krooniset haavat olivat akuutteja useammin käynnin syynä. 29 % haavoista oli akuutteja. 60 % haavapotilaista oli miehiä. Yleisimmät kroonisten haavojen liitännäissairaudet olivat tyypin 2 diabetes, verenpainetauti, sepelvaltimotauti ja aivoinfarktin jälkitila. (Yang ym. 2020)

1.4 AAV-vektori

Adeno-assosioidut virukset (AAV) ovat yleisesti siirtogeenitutkimuksissa käytössä olevia virusvektoreita. Niiden tehtävänä on siirtää haluttu geeni tutkittavana olevan kudoksen soluihin ja saada näin aikaan geenin koodaaman proteiinin tuotanto soluissa. AAV ovat osoittautuneet eläinkokeissa turvallisiksi ja tehokkaiksi vektoreiksi. (Santiago-Ortiz ym. 2016.)

AAV on osittain ongelmallinen vektori ihmiskokeissa. AAV eri fenotyyppejä esiintyy runsaasti luonnossa ja merkittävä osa ihmisistä ovat kehittäneet vasta-aineita viruksia vastaan, jotka haittaavat merkittävästi sen toimintaa vektorina. Resistenssin yleisyys vaihtelee fenotyypistä toiseen AAV8 ollen matalin 38 % resistenssiasteella. Korkein resistenssiaste on AAV2-fenotyypin 72 %. (Kotterman ym. 2014.)

Tässä tutkimuksessa käytössä oli AAV9-fenotyypin virus. Ihmisellä resistenssiaste AAV9-fenotyyppiä vastaan on 47 %. AAV9 on yleisesti ollut käytössä syöpätutkimuksessa ja sillä on saavutettu korkeita pitoisuuksia siirtogeenin koodittamina proteiineja epiteelikudokseen liittyvissä syöpätutkimuksissa. Erityisesti sitä on käytetty vektorina haimatiehyn adenokarsinooman (Principe ym. 2015) ja kohdunkaulan syövän (Nieto ym. 2009) tutkimuksissa. (Santiago-Ortiz ym. 2016.)

1.5 Tutkimuskysymys

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää metadheriinin vaikutuksia haavojen paranemisnopeuteen. Hypoteesina on, että metadheriini nopeuttaa sekä epidermisen keratinosyyttien jakautumista, että vaeltamista haavaan ja lisäksi ihon dermisen fibroblastien proliferaatiota syvemmällä haavassa. Näin geeninsiirto edesauttaa haavan paranemista.

AAV9-virusvektori valittiin tutkimukseen geeninsiirtomenetelmäksi sen turvallisuuden ja tehokkuuden takia. AAV9-fenotyyppiä on käytetty tutkimuksissa aiemmin epiteelikudoksen geeninsiirrossa hyvällä menestyksellä (Principe 2015) (Nieto ym. 2009).

Tutkimuksessa haavan paranemisastetta arvioidaan pinta-alan kautta. Mikäli metadheriini edistää haavan paranemista, tulisi proliferaatiovaiheen tapahtua tehokkaammin. Tällöin haavojen pinta-alan tulisi pienentyä verrokkiryhmää nopeammin.

Tutkimuksessa mahdollistettiin mahdollisimman suuri määrä haavoja tekemällä useampi haava jokaiseen hiireen. Pienemmällä määrällä hiiriä saadaan näin parempi todistusvoima.

2 Aineisto ja menetelmät

Tutkimus suoritettiin eläinkokeina hiirillä. Tutkimuksen peruseriaatteena oli haavan tekeminen hiiren iholle ja virusvektorin avulla geenin siirtäminen haavan kudokseen. Haavat valokuvattiin päivittäin 7 vuorokauden ajan.

2.1 Tutkimusaineisto

Tutkimusaineisto koostui yhteensä 12:sta BALB/c-kannan 12:n viikon ikäisestä uroshiirestä, joista 6 sai metadheriinin geenisiirrolla ja 6 LacZ-geenin. LacZ-geenin saaneet hiiret toimivat verrokkiryhmänä. Hiirten selkiin tehtiin 4 haavaa kuhunkin.

2.2 Eläinkokeet

2.2.1 Koe-eläinten valmistelu

Koe-eläimet nukutettiin inhaloidulla Sevofluraanilla toimenpidettä varten. Hiirten selästä ajettiin karva pois ja iho desinfioitiin 80 % etanoliliuoksella. Toimenpiteen aikana hiirille tehtiin selän ihoon 4 tai 6 haavaa 3 mm pyöröveitsellä (biopsiastanssi). Haavojen päälle siveltiin virusvektoria sisältävää geeliä. Koe-eläinten kipua hoidettiin (painon mukaisella annoksella) buprenorfiinia ihon alle annosteltuna toimenpiteen jälkeiset 24 h. Koe-eläimet palautettiin häkkeihin, joissa niitä pidettiin tutkimuksen ajan. Häkkeihin eläimille oli varattu kuivaruokaa ja vettä.

2.2.2 Valokuvaaminen:

Koe-eläinten haavat valokuvattiin n. 50 cm etäisyydeltä kohtisuoraan ylhäältä. Valokuvaus tapahtui samassa tilassa, samalla tutkimuspöydällä ja samaa valaistusta käyttäen. Kaikki kuvat otettiin samalla kameralla samoilla asetuksilla.

Hiiret nukutettiin ennen valokuvaamista inhaloidulla Sevofluraanilla. Valokuvaan rajattiin yksittäisen hiiren kaikki haavat kerrallaan. Kuvassa hiirien molemmilla puolilla oli 1 cm sivultaan oleva neliön muotoinen paperipala mitta-asteikkona ja hiiren ja kuvauspäivän numerointi. Haavojen paranemista seurattiin valokuvaamalla ne päivittäin 7 vuorokauden ajan. Hiiret palautettiin häkkeihin valokuvaamisen jälkeen. Esimerkkikuva koeasetelmasta liite 1.

2.2.3 Koe-eläinten lopettaminen

7. kuvauspäivänä hiiret lopetettiin hiilidioksidikammiossa ennen valokuvaamista.

2.2.4 Valokuvien käsittely ja sokkoutus

Kuvista poistettiin haavojen koon arvioimisen ajaksi hiirien ja päivien numeroinnit, ja kuvat numeroitiin uusilla numeroilla analyysin ajaksi (sokkoutus). Numeroinnista vastasi tutkimuksen tekijöistä riippumaton henkilö. Sokkoutus purettiin pinta-ala-arvioinnin ja tulosten kirjaamisen jälkeen.

Haavojen pinta-ala arvioitiin käyttäen GIMP-sovelluksen pinta-alan laskuohjelmaa. Pinta-ala laskettiin rajaamalla haavan reuna mahdollisimman tarkasti, jonka jälkeen ohjelma laski rajatun alueen sisäpuolelle jäävän pinta-alan. Pinta-ala korjattiin mitta-asteikon avulla neliösenttimetreiksi.

2.3 Tilastollinen käsittely

Tutkimustulokset kirjattiin Microsoft Excel -ohjelmaan. Tuloksista laskettiin päiväkohtaiset keskiarvot, joita vertailtiin keskenään tilastollisesti merkitsevien erojen löytämiseksi. Lisäksi laskettiin keskihajonnat ja P-arvot metadheriini- ja verrokkiryhmän välisille haavojen pinta-aloille.

3 TULOKSET

Tutkimukseen osallistuneista 12 hiirestä kaikki selvisivät tutkimuksen loppuun saakka. Tutkimuksen aikana yhden verrokkiryhmän eläimistä selässä kaksi haavaa yhdistyivät niiden välissä olleen ehjän ihon rikkouduttua. Kyseiset haavat jätettiin pois tulosanalyysistä, joten lopulta tutkimukseen otettiin 50 haavaa, joista 26 oli metadheriini-ryhmän hiirillä ja 24 verrokkiryhmän hiirillä.

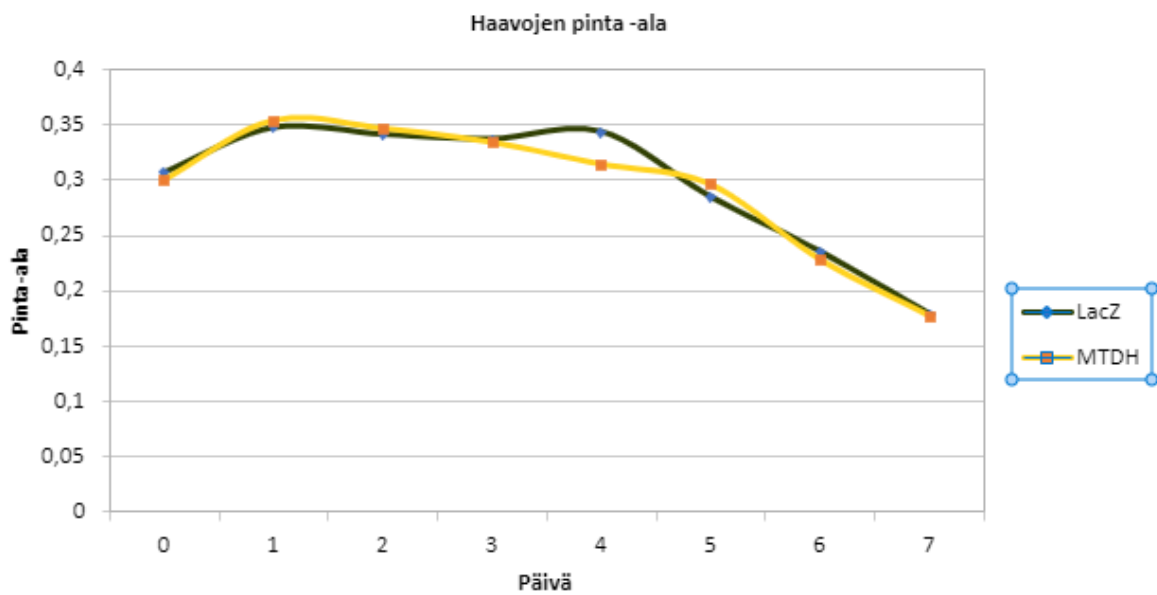
Haavojen pinta-alojen keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty Taulukossa 1. Tuloksia on edelleen havainnollistettu kuvaajassa 1. Taulukossa 1 on lisäksi laskettu päiväkohtaiset P-arvot, joissa ei ollut

tilastollisesti merkitseviä eroja yhdenkään päivän kohdalla. Jos haavojen kokoa tarkasteltiin tutkimuspäivää huomioimatta, saatiin P-arvoksi 0,254. Tilastollisesti merkitseviä eroja hiirten haavojen pinta-aloissa metadheriini- ja verrokkiryhmän välillä ei havaittu.

Taulukko 1

Päivä	0	1	2	3	4	5	6	7
MTDH	0,2991	0,3532	0,3460	0,3334	0,3137	0,2958	0,2279	0,1768
MTD σ	0,02962	0,04577	0,04449	0,05103	0,06223	0,06024	0,05097	0,04880
LacZ	0,3061	0,3470	0,3408	0,3366	0,3433	0,2845	0,2351	0,1789
LacZ σ	0,02253	0,04313	0,04070	0,07367	0,06883	0,06540	0,04001	0,02224
P-arvo	0,331	0,403	0,432	0,486	0,206	0,371	0,347	0,357

Haavojen pinta-alojen keskiarvot neliösenttimetreinä, keskihajonnat ja p-arvot päiväkohtaisesti



Kuvaaja 1. Haavojen pinta-alojen keskiarvot neliösenttimetreinä päiväkohtaisesti.

4 POHDINTA

Haavat ovat merkittävä kliininen haaste lääketieteessä. Tapaturmaisesti hankitut ja leikkausten jälkeiset haavat ovat yleisiä. Akuutissa vaiheessa haavan hoito on luonnollisen paranemismekanismin vaikutuksen odottamista ja turvaamista. Mikäli haava ei akuutissa vaiheessa parane, komplikaatioiden riski kasvaa ja haava voi kroonistua. (Velnar ym. 2009.) Haavan nopea ja ongelmaton paraneminen on potilaan kannalta paras mahdollinen lopputulos ja on akuutin haavan hoidon pääasiallinen tavoite.

Akuutit ja krooniset haavat ovat yleinen ongelma. Euroopassa jopa 1,5–2 miljoonaa ihmistä kärsii akuutista tai kroonisesta haavasta. (Lindholm ym. 2016) Haavanhoidossa kustannuksia kerryttävät lähinnä vastaanottokäynnit ja sairaalahoitopäivät ja ne muodostavat 80–85 % haavojen hoidon kuluista. Haavanhoitotuotteet eivät ole merkittävä osa kuluja. (Lindholm ym. 2016) Tehokkailla haavanhoitotuotteilla, jotka nopeuttavat paranemista on edellytyksiä tuoda merkittäviä säästöjä terveydenhuollossa hoitopäivien vähentyessä.

Geelipohjaiset tuotteet ovat laajalti käytössä haavojen hoidossa. Erityisesti fusidiinihappoa sisältävät antimikrobiaaliset voiteet ovat tehokkaita infektion ehkäisyssä ja lieväasteisen haavainfektion hoidossa. (Wilkinson ym. 1998) Haavan pinnalle levitettävät tuotteet ovat helppokäyttöisiä ja mahdollistavat potilaan osallistumisen haavan hoitoon. Geelipohjaisen haavanhoitotuotteen levittämiseen ei välttämättä tarvita edes hoitajan vastaanottoa.

Geeni siirtohoitaja ei ole tällä hetkellä käytössä haavan paranemisen avustamisessa. Kuitenkin metadheriinien kasvainsolujen jakaantumista edistävät vaikutukset (Sarkar ym. 2013) tekevät siitä mielenkiintoisen kohteen tutkimukselle. On mahdollista, että metadheriinilla olisi haavan paranemisen proliferaatiovaihetta kiihdyttävä vaikutus. Tämä voisi lyhentää haavan paranemisaikaa jopa vuorokausilla ja siten edesauttaa haavojen nopeampaa paranemista ja säästää sairaanhoitokuluissa.

Haavojen yleisiä komplikaatioita ovat kipu, hypertrofiset arvet ja keloidinmuodostus (Martin & Nunan 2015). Haavan komplikaatioiden ehkäisemiseen ei otettu tässä tutkimuksessa kantaa. Mielenkiintoinen jatkotutkimusaihe olisi siirtogeenien vaikutukset keloidin tai hypertrofisen arven muodostuksessa. On mahdollista, että metadheriinin aikaansaama kiihtynyt solujen jakaantuminen voisi aiheuttaa hypertrofisia arpia haittavaikutuksena. Tässä tutkimuksessa kaksi haavaa 54:stä saivat komplikaation, jossa haavojen reunat yhdistyivät muodostamaan yhden suuren haavan.

Metadheriinin tutkimus on paljolti painottunut sen syöpää aiheuttaviin ominaisuuksiin. Se on lupaava kohde kaikkia syöpiä vastaan suunnitelluille syöpähoidolle, sillä se on yli-ilmentynyt kaikissa tähän asti tutkituissa syöpäkasvaimissa (Yoo ym. 2012). Sillä on edellytykset vaikuttaa myös haavan paranemiseen lisäämällä solujen jakautumista, verisuonien uudismuodostusta ja fibroblastien ja keratinosyyttien vaellusta haavaan.

Tässä tutkimuksessa haavojen seuranta aika oli liian lyhyt havaitsemaan pitkäaikaiskomplikaatioita. Haavojen paraneminen eteni hyvin ja kaksi haavaa yhdistyivät ainoana haavakomplikaationa. Yhdistyneiden haavojen paraneminen eteni kuitenkin hyvin. Metadheriinin mahdolliset syöväälle altistaneet vaikutukset eivät olisi ehtineet näyttäytyä 7 vuorokauden seuranta-aikana. Ihosyövän kehittyminen on kuukausia tai vuosia kestävä prosessi (Linares ym. 2015). Mikäli syöpäriskiä haluttaisi arvioida, tulisi seurannan olla riittävän pitkä, että kasvaimia ehtisi kehittyä.

Tutkimuksessa käytetyt menetelmät olivat yleisen hyvän käytännön mukaisia. AAV-vektorin on todettu olevan eläinkokeissa turvallinen ja tehokas (Santiago-Ortiz ym. 2016). LacZ soveltuu hyvin verrokkiryhmän siirtogeeniksi, eikä se vaikuta haavojen paranemiseen (Trifonov ym. 2016). Valokuvaus suoritettiin samalta etäisyydeltä, samassa tilassa. Valaistus, kuvauslaitteisto, laiteasetukset, kuvaussuunta ja –etäisyys olivat hyvin lähellä toisiaan eri hiirten ja päivien välillä. Lisäksi käytössä oli mitta-asteikko, joka mahdollisti haavojen pinta-alan tarkan arvioinnin. Käsivaralta otettujen valokuvien haasteena ovat etäisyyden ja kulman muutokset, jotka saattavat johtaa jopa 35 % virheisiin haavan koon arvioinnissa (Queen & Hardin 2020). Valokuvat olivat hyvän haavanvalokuvauskäytännön mukaisia. Metadheriinin ilmentymistä kudoksenäytteissä ei varmennettu erikseen. Kuitenkin aiemmissa tutkimuksissa AAV9-vektori on ollut tehokas geenin siirrossa epiteelikudokseen (Santiago-Ortiz ym. 2016).

Suurimpana haasteena tutkimuksessa oli haavojen pieni määrä, jonka takia ainoastaan hyvin suuria eroja haavojen paranemisnopeudessa olisi voitu havaita. Toinen mahdollinen haavan paranemiseen vaikuttava tekijä on haavojen läheisyys toisiinsa, joka on saattanut vaikuttaa haavojen paranemisnopeuteen. Kuitenkin haavat tehtiin vastaavalla tavalla metadheriini- ja verrokkiryhmän hiirille, joten eroa ryhmien välille ei pitäisi lähekkäin olevista haavoista tulla. Seuranta-ajan puitteissa haavat ehtivät pääosin parantua. Haavat ehtivät tutkimuksessa pienentyä merkittävästi, mutta arven muodostumista ei nähty. Näin ollen mahdollisten hypertrofisten arprien muodostumista ei voitu havaita.

Tutkimuksessa ei havaittu merkitseviä eroja verrokki- ja metadheriiniiryhmän haavojen pinta-alojen välillä. Metadheriinin siirtäminen haavoihin AAV-vektorilla ei merkittävästi nopeuttanut haavojen paranemista. Tutkimukset suuremmalla otantakoolla ovat tarpeen mahdollisen tilastollisesti merkitsevän eron havaitsemiseksi.

5 LÄHTEET

Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7 Suppl):12S-34S. doi: 10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2. PMID: 16799372.

Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell.* (2004) 5:365–74. doi: 10.1016/S1535-6108(04)0079-0

Sarkar D, Fisher PB. AEG-1/MTDH/LYRIC: clinical significance. *Adv Cancer Res.* 2013;120:39-74. doi: 10.1016/B978-0-12-401676-7.00002-4. PMID: 23889987; PMCID: PMC3924591.

Emdad L, Das SK, Hu B, Kegelman T, Kang DC, Lee SG, Sarkar D, Fisher PB. AEG-1/MTDH/LYRIC: A Promiscuous Protein Partner Critical in Cancer, Obesity, and CNS Diseases. *Adv Cancer Res.* 2016;131:97-132. doi: 10.1016/bs.acr.2016.05.002. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27451125.

Gossen JA, de Leeuw WJ, Vijg J. LacZ transgenic mouse models: their application in genetic toxicology. *Mutat Res.* 1994 Jun 1;307(2):451-9. doi: 10.1016/0027-5107(94)90256-9. PMID: 7514719.

Hamilton M, Wolfman A. Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene.* 1998 Mar;16(11):1417-28. doi: 10.1038/sj.onc.1201653. PMID: 9525741.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002 Dec 6;298(5600):1911-1912.

Juers DH, Matthews BW, Huber RE. LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Sci.* 2012 Dec;21(12):1792-807. doi: 10.1002/pro.2165. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23011886; PMCID: PMC3575911.

Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, Emdad L, Volsky DJ, Fisher PB. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1. *Gene.* 2005 Jun 20;353(1):8-15. doi: 10.1016/j.gene.2005.04.006. PMID: 15927426.

Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Jul;15(7):445-51. doi: 10.1038/nrg3742. Epub 2014 May 20. PMID: 24840552; PMCID: PMC4393649.

Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol.* 1994 Apr;130(4):489-93. PMID: 8166487.

Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Sarkar D, Franke TF, Fisher PB. Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt signaling. *Oncogene.* 2008 Feb 14;27(8):1114-21. doi: 10.1038/sj.onc.1210713. Epub 2007 Aug 20. PMID: 17704808.

Linares MA, Zakaria A, Nizran P. Skin Cancer. *Prim Care.* 2015 Dec;42(4):645-59. doi: 10.1016/j.pop.2015.07.006. PMID: 26612377.

Lindholm C, Searle R. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *Int Wound J.* 2016 Jul;13 Suppl 2(Suppl 2):5-15. doi: 10.1111/iwj.12623. PMID: 27460943; PMCID: PMC7949725.

Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 2015 Aug;173(2):370-8. doi: 10.1111/bjd.13954. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26175283; PMCID: PMC4671308.

Nieto K, Kern A, Leuchs B, Gissmann L, Müller M, Kleinschmidt JA. Combined prophylactic and therapeutic intranasal vaccination against human papillomavirus type-16 using different adeno-associated virus serotype vectors. *Antivir Ther.* 2009;14(8):1125-37. doi: 10.3851/IMP1469. PMID: 20032542.

Principe M, Ceruti P, Shih NY, Chattaragada MS, Rolla S, Conti L, Bestagno M, Zentilin L, Yang SH, Migliorini P, Cappello P, Burrone O, Novelli F. Targeting of surface alpha-enolase inhibits the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget.* 2015 May 10;6(13):11098-113. doi: 10.18632/oncotarget.3572. PMID: 25860938; PMCID: PMC4484442.

Queen D, Harding K. Is wound photography becoming sloppy? *Int Wound J.* 2020 Feb;17(1):5-6. doi: 10.1111/iwj.13302. PMID: 31930710; PMCID: PMC7948905.

Santiago-Ortiz JL, Schaffer DV. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release.* 2016 Oct 28;240:287-301. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.001. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26796040; PMCID: PMC4940329.

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009 Sep-Oct;37(5):1528-42. doi: 10.1177/147323000903700531. PMID: 19930861.

Wilkinson JD. Fusidic acid in dermatology. *Br J Dermatol.* 1998 Dec;139 Suppl 53:37-40. doi: 10.1046/j.1365-2133.1998.1390s3037.x. PMID: 9990411.

Yang Y, Chu WL, Feng G, Zhang HJ, Hao DF. [Retrospective analysis of 2 997 inpatients with skin and soft tissue injuries]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2020 Sep 20;36(9):821-829. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn501120-20200202-00036. PMID: 32972067.

Yoo BK, Chen D, Su ZZ, Gredler R, Yoo J, Shah K, Fisher PB, Sarkar D. Molecular mechanism of chemoresistance by astrocyte elevated gene-1. *Cancer Res.* 2010 Apr 15;70(8):3249-58. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4009. Epub 2010 Apr 13. PMID: 20388796; PMCID: PMC2855753.

Yoo BK, Emdad L, Lee SG, Su ZZ, Santhekadur P, Chen D, Gredler R, Fisher PB, Sarkar D. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. *Pharmacol Ther.* 2011 Apr;130(1):1-8. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.008. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21256156; PMCID: PMC3043119.

6 LIITTEET

Liite 1. Esimerkkikuva hiirestä #5 päivänä 0.

