

**Kokeellinen tutkimus R-Ras-poistogeenisellä  
eläinmallilla R-Ras-geenin vaikutuksista ihohaavan  
paranemiseen**

Tekijä LK Ella Ruikka  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen Yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Professori Tero Järvisen tutkimusryhmä  
5/2015

---

Tampereen Yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Professori Tero Järvisen tutkimusryhmä

ELLA RUIKKA: KOKEELLINEN TUTKIMUS R-RAS-POISTOGEENISELLÄ  
ELÄINMALLILLA R-RAS-GEENIN VAIKUTUKSISTA IHOHAAVAN  
PARANEMISEEN

Kirjallinen työ 17-s.  
Ohjaaja: Professori Tero Järvinen  
Toukokuu 2015

---

Ras-geeniperheeseen kuuluvan R-Ras-geenin koodaama proteiini on pieniin GTPaaseihin (guanosiinitrifosfataasi) kuuluva proteiini, jolla on verisuonten uudelleen muodostusta eli angiogeneesiä estävää aktiivisuutta. Tehdyssä tutkimuksessa R-Ras-geenin osuutta ihohaavan paranemiseen tarkastellaan R-Ras-poistogeenisen (C57BL/6-hiirikanta) hiirimallin avulla käyttämällä ihohaava-mallia, joka muistuttaa ihmisen ihohaavan paranemista. Hiirille tehdyt ihohaavat valokuvattiin säännöllisin aikavälein makroskooppista arviointia varten. Haavoista kerättiin kudosnäytteet kahdella eri tarkasteluvälillä: 7. ja 14. päivänä haavoittamisen jälkeen ja näytteet värjättiin HE- ja Massonin trikromi -värjäyksellä. Parametreinä histologisessa tarkastelussa käytettiin haavan pituutta, granulaatiokudoksen pinta-alaa ja re-epitelisoituneen kudoksen pituutta.

Haavakuvien tai histologisten näytteiden analyysien perusteella haavan paranemisessa ei ole merkitsevää eroa villityypin ja R-ras-poistogeenisten hiirien välillä. R-Ras-geeni ei vaikuta ihohaavan paranemiseen ainakaan merkittävästi. Tutkimuksessa ilmeni teknisiä ongelmia, minkä takia tutkimusaineisto jäi pienikokoiseksi. Lisäksi koeolosuhteiden ongelmista johtuen tutkimusta ei onnistuttu toteuttamaan laadukkaasti eikä tuloksia voida pitää täysin luotettavina.

# SISÄLLYS

1. Tiivistelmä
2. Johdanto
3. Aineisto
4. Menetelmät
5. Tulokset
  - 5.1. Haavojen pinta-ala makroskooppisesti tarkasteltuna
  - 5.2. Histologinen tarkastelu
    - 5.2.2. Re-epitelisaatio
    - 5.2.3. Haavan pinta-ala
    - 5.2.4. Haavan pituus
6. Pohdinta
7. Viitteet

# 1. Johdanto

Ras-supergeeniperheeseen kuuluvan R-Ras-geenin koodaama proteiini on pienimolekyylinen GTPaasi (guanosiinitrifosfataasi), jolla on verisuonten uudelleenmuodostusta eli angiogeneesiä estävää aktiivisuutta. Ras-proteiiniperhe katsotaan kuuluvaksi pieniin GTPaaseihin. (3)

GTPaasit ovat suuri ryhmä GTP:tä (guanosiinitrifosfaatti) GDP:ksi (guanosiinidifosfaatti) hydrolysoivia entsyymeitä, jotka toimivat solujen sisäisessä viestinnässä. GTPaaseilla on soluissa useita tärkeitä vaikutuksia, joista merkittävimmät ovat proteiinisynteesin säätely ja solun soluvälitilasta (kasvutekijät jne.) saamien viestien välittäminen vaikuttamalla eri toisiohjaajajärjestelmiin ja ionikanavien aktiivisuuteen. (11)

Yhteistä kaikille GTPaaseille alaryhmästä riippumatta on niiden ominainen kyky toimia viestinvälittäjinä on/off-periaatteella eli vaihtelemalla aktiivisen GTP-sitoutuneen muodon ja inaktiivisen GDP-sitoutuneen muodon välillä. Aktiivista GTPaasia inaktivoivat toisen signaalivälitysreitin proteiinit GAP:t (GTPase-activating proteins) tehostamalla GTPaasin kykyä muuttaa sitoutunutta GTP:tä GDP:ksi, jolloin kompleksi inaktivoituu. GTPaasia aktiiviseen muotoon muuttavat GEF-proteiinit (Guanine nucleotide exchange factors) edistämällä sitoutuneen GDP:n vaihtamista GTP:hen. GTP:n ollessa sitoutuneena GTPaasiin on kompleksilla suuri affiniteetti sitoutua kohteena olevaan proteiiniin, aktivoiden tai inhiboiden kohdeproteiiniin. (1,2)

Yksi GTPaasien alaryhmistä on heterotrimeeriset G-proteiinit. Heterotrimeeriset G-proteiinit toimivat toisiohjaajina solukalvolle niihin liittyneen reseptorin kanssa. Heterotrimeeristen G-proteiinien rakenteessa on kolme alayksikköä ( $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alayksiköt), joiden muodostaman kompleksin GTPaasi-aktiivisuus on riippuvainen kompleksiin liittyneen reseptorin aktiivisuudesta.  $\alpha$ -alayksikkö vastaa GTP:n sitomisesta ja hydrolysaatiosta, siinä missä  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alayksiköt ovat rooliltaan toiminnallisia monomeereja. (10)

Pienet GTPaasit, joihin myös Ras-supergeeniperhe kuuluu, ovat rakenteeltaan analogisia heterotrimeeristen G-proteiinien  $\alpha$ -alayksikön kanssa. Heterotrimeerisistä

G-proteiineista poiketen pienet GTPaasit eivät kuitenkaan vaadi erillisen reseptorin aktivaatiota toimiakseen. (2)

Ras-supergeeniperhe jaotellaan 5 alaryhmään: Ras-, Rho-, Rab-, Arf-, ja Ran-proteiiniperheisiin. Ras-geenit ovat solujen proliferaatioon, erilaistumiseen ja solusykliin vaikuttavia geenejä, joita tunnetaan 36 erilaista. Ras-geeneistä merkittävimmät ovat H-, K-, N-, M- ja R-Ras-geenit. (1)

Muiden pienten GTPaasien tavoin myös Ras-geeniperheen proteiinit kykenevät toimimaan itsenäisesti ilman erillistä reseptoriaktivaatiota. R-Ras:lla on siis poikkeuksellinen kyky irrottaa inaktiivinen GDP, sitoa tämän tilalle aktiivinen GTP ja lisäksi muuttaa sitomansa GTP:n GDP:ksi ilman ulkopuolista stimulusta. (2) Tämä Ras-proteiinien itsenäinen entsyymaattinen toiminta on kuitenkin varsin hidasta, mutta sitä nopeuttavat ulkopuoliset säätelyproteiinit, mm. Ras-spesifiset GAP:t. (1)

Useat Ras-perheen geeneistä ovat tunnettuja proto-onkogenejä, eli näiden geenien (aktivoivat) mutaatiot kykenevät aiheuttamaan normaalin solun transformaation syöpäsoluksi. Solujen proliferaatioon ja erilaistumiseen vaikuttavien säätelyominaisuuksiensa takia Ras-supergeeniperheen geeneihin kohdistuvien mutaatioiden katsotaan vaikuttavan merkittävästi ihmisen syöpäkasvainten syntyyn ja muodostumiseen: Ras-geenien mutaatioiden katsotaan olevan yksi yleisimmistä mutaatioista ihmissyövässä: jopa 30 %:n ihmisten kasvaimista katsotaan sisältävän Ras-geenin pistemutaation. (1,9) ns. aktivoiva mutaatio Ras-geenissä voi johtaa siihen, ettei kyseinen Ras-geeni ole enää sitä inhiboivan GAP-proteiinin vaikutuksen alaisena vaan sen sijaan pysyy aktiivisena jatkuvasti. Tämä aiheuttaa liiallisen GTPaasi-aktiivisuuden, joka antaa soluille voimakkaan kasvustimulaation mikä näkyy solujen liiallisena proliferaationa ja riittämättömänä erilaistumisena. Lopulta solu saattaa muuttua kasvainsoluksi ja "karata" kokonaan elimistön kontrollista, jonka jälkeen ko. solusta syntyvä solukko kasvaa invasiivisesti ja lähettää metastaaseja eli etäpesäkkeitä muualle elimistöön. Ras-geeniperheestä erityisesti voimakkaasti onkogeeniset H-Ras ja K-Ras proteiinit ovat keskeisiä tekijöitä solun viestinnässä ja niiden on todettu aktivoituvan useiden integriinien ja kasvutekijöiden vaikutuksesta. Näissä kahdessa Ras-geenissä usein tapahtuvien mutaatioiden vuoksi H- ja K-Ras:t ovat merkittävät proto-onkogenejä. (3)

R-Ras on monin tavoin poikkeuksellinen geeni Ras-perheessä. Ensinnäkin, sillä ei ole todettu samankaltaista syöpää aiheuttavaa taipumusta kuin muilla Ras-perheen geeneillä. Toiseksi, R-Ras geenin aktivoivia mutaatioita ei ole löydetty ihmisen syöpäkasvaimista, vaikka muiden Ras-geenien aktivoivat mutaatiot ovat syövässä hyvin yleisiä. Rakenteellisesti erona muihin Ras-perheen geeneihin nähden R-Ras:lla on proliini-rikas SH3-sitoutumiskohta (12). Lisäksi siinä missä muut Ras-geeneistä ilmentyvät voimakkaasti jakautuvissa soluissa, sen sijaan R-Ras:n ilmentyminen on sidoksissa solun kypsymiseen: sen ilmeneminen jakautuvassa solussa on vähäistä, mutta kasvaa erilaistuvassa solussa ja ilmentyminen on huipussaan kypsässä, täysin erilaistuneessa solussa. Näitä ovat erityisesti verisuonten seinämien sileälihas- ja endoteelisolut. (4,5,7)

R-Ras toimii solussa monin tavoin H-Ras:n signaloinnin antagonistina eli vastavaikuttajana. R-Ras:n vaikutukset solumatriksin adheesiomolekyyleihin ovat H-Ras:iin verrattuna päinvastaiset: H-Ras estää integriinien aktiivisuutta, R-Ras taas lisää integriinien aktiivisuutta ja siten vahvistaa solun tarttumista ympäröivään soluvälitilaan integriini-välitteisesti. Vaikutus integriineihin on myös välttämätöntä R-Ras:n säätelemälle solujen migraatiolle, erikoistumiselle ja kehitykselle. (8,12) R- ja H-Ras vaikuttavat myös eri tavoin solun erilaistumisessa ja solusyklistä. R-Ras tehostaa myoblastien erilaistumista ja fuusiota monitumaisiksi, erilaistuneiksi, jakautumiskyvyttömiksi poikkijuovaisiksi lihassoluiksi, mikä vaatii solusyklistä poistumistalepovaiheeseen eli G0-tilaan (7). R-Ras-geeni kykenee estämään solusyklin edistymistä (ja siten proliferaatiota) ja vahvistamaan solun terminaalista erilaistumista eli solusyklistä poistumista G0-tilaan. R-Ras myös tehostaa solujen migraatiota ja säätelee solujen järjestäytymistä (6). H-Ras vuorostaan estää näitä tapahtumia ja tehostaa solusyklin edistymistä ja siten proliferaatiota ja vaskulaaristen solujen invaasiota. Nämä havainnot tukevat käsitystä siitä, että tasapaino R-Ras:n ja H-Ras:n signalointien välillä vaikuttaa siihen, erilaistuuko vai jakautuuko solu. (3,4,9)

R-Ras:n toimintaa ja merkitystä on tutkittu paljon soluviljely-olosuhteissa, mutta geenin toimintaa ja funktiota elimistössä ei tunneta kovin hyvin. (3) R-Ras geenin funktio tunnetaan parhaiten verisuonissa, joissa se toimii verisuonten kypsymisen säätelijänä: sen ilmentymisen seurauksena verisuonten seinämän rakenne on stabiili, perfuusio verisuonissa paranee ja verisuonen seinämän permeabiliteetti vähenee, eli

plasman tihkuminen verisuonista ympäröivään kudokseen on vähäisempää. Nämä vaikutukset johtuvat suonen endoteelirakenteen paremmasta organisaatiosta ja perisyöttien ja endoteelisolujen tiukemmasta yhteenliittymisestä. (5)

R-Ras-poistogeenisillä hiirillä tehdyt eläinkokeet ovatkin osoittaneet verisuonten kypsymisprosessin häiriintyvän ilman R-Ras:ia: poistogeenisillä eläimillä oli selvästi heikentyneet basaalimembraani- ja perisyöttitukirakenteet, vialliset soluliitokset ja merkittävää vuotoa syöpäkasvainten verisuonista. (5) Kun R-Ras-poistogeenisiä (KO; knock-out hiirikanta) hiiriä altistettiin verisuonivauriolle tai kasvainimplantaatiolle, seurauksena oli verisuonen neointiman paksuuntumista verisuonivaurio-kohdassa (stenoosi) ja kiihtynyttä angiogeneesiä kasvaimissa. Siten R-Ras vaikuttaa verisuonten uudelleenmuodostumiseen estäen ja korjaamalla verisuonten seinämän vaurioita. (4)

R-Ras:n merkitystä ihohaavan paranemisessa ei vielä tunneta. Alustavissa tutkimuksissamme (LK Tuomo Ketomäki, syventävät opinnot) R-Ras poistogeenisellä ja normaalilla hiirillä ei ollut eroavaisuuksia haavojen paranemisessa. R-Ras:n angiogeneettisistä vaikutuksista ja kyvystä vaikuttaa erityisesti verisuonten seinämän solujen lopulliseen erilaistumiseen johtuen geeni on aiheellinen tutkimuskohde haavan paranemisen kannalta. Voisi olettaa, että R-Ras-poistogeenisellä eläimellä haavan paranemisprosessi poikkeaisi normaalista.

Kudosvaurion paranemisprosessissa verisuonituksen korjautuminen ja uudelleenmuodostuminen ovat keskeisiä tapahtumia, jotta vaurioalueelle haavan mukana syntymä hapenpuute eli hypoksia jäisi mahdollisimman lyhyeksi, mikä vuorostaan tehostaisi kudoksen paranemista. Erityisesti kroonisissa haavoissa ympäröivän kudoksen hypoksia on ongelmallinen; se hidastaa haavojen parantamista, ja voi pitkittyessään johtaa kudoksen nekroosiin. Esimerkiksi diabeetikoilla haavojen paraneminen on heikentynyt, koska kudokset kärsivät hypoksiasta. Hypoksia saattaa johtaa laajaan kudosnekroosiin ja amputaatioon erityisesti alaraajoissa. Mikäli löytyisi keino nopeuttaa lääkkeellisesti paranemisprosessia, seuraisi siitä taloudellisia säästöjä ihohaavojen hoidossa erityisesti kroonisista haavoista kärsivillä. Uusi haavanhoitolääke olisi siten edistysaskel ihohaavan hoidossa.

Olemme aikaisemmin osoittaneet, että R-Ras poistogeenisellä ja normaalilla hiirellä ei ole eroja haavan paranemisnopeudessa. (13) Hiiren haava on kuitenkin ongelmallinen haavan hoitokokeisiin, koska hiirellä on ihon dermiksessä supistumiskykyisiä lihassoluja, joiden ansiosta haava sulkeutuu ihohaavaa kiinni supistaen. Tätä ilmiötä ei huomioitu aiemmissa tutkimuksissa, joten päätimme vielä selvittää R-Ras roolin haavan paranemisessa lopullisesti käyttämällä hiiren ihohaavamallia, joka muistuttaa paranemisprosessiltaan enemmän ihmisen ihohaavan paranemista. Kyseisessä mallissa haavan ympärille ommellaan tuki, joka ”sitoo” ihossa olevat supistumiskykyiset sileälihassolut ja haavan supistuminen estyy. Tämän jälkeen haava paranee vain solujen migraation eli vaelluskyvyn avulla aivan kuten ihmisillä. Täten käyttämässämme mallissa paraneminen hidastuu (ns. challenged phenotype) ja R-Ras geenin mahdolliset vaikutukset paranemisprosessiin tulevat paremmin esiin.

## 2. Aineisto

---

Tutkimuksessa analysoitu aineisto koostuu leikkaushetkellä täysikasvuisista 8 – 12 viikon ikäisistä uroshiiristä. Tarkastelukohteena tutkimuksessa oli hiirille tehty ihohaava, joita tehtiin kullekin hiirelle kaksi kappaletta. Kumpikin haava luettiin tutkimusaineistoon, mikäli haavat katsottiin laadukkaiksi.

Tutkimustyö suoritettiin Tampereen yliopiston lääketieteen yksikössä. Tutkimuksessa käytetyt koe-eläin menetelmät ovat kuvattu ja hyväksytty Etelä-Suomen Aluehallinto viraston ELLA:n Eläinkoelautakunnassa (päätös # ESAVI/6330/04.10.07/2013). Eläinkokeissa ja eläinten ylläpidossa noudatettiin Helsingin julistuksen yleisiä periaatteita eläinten hyvin voinnin turvaamiseksi.

Kaikki eläinkokeissa käytetyt hiiret olivat C57BL/6 –kantaa. *Rras*- poistogeeninen (KO) hiirikanta oli lahja professori Erkki Ruoslahdelta (Sanford-Burnham Medical Research Institute, Santa Barbara, CA, USA). KO-kanta luotiin (Zambrowicz ym. 1998) insertoimalla gene trap -vektori (VICTR20) R-Ras-geenin neljännen ja viidennen eksonin väliin kromosomissa seitsemän. Tällöin geenistä ei tuoteta ehjää



mRNA:ta eikä toimivaa proteiinia (Komatsu & Ruoslahti 2005, Sawada ym 2012), jolloin proteiinin puuttumisen vaikutusta voidaan tutkia *in vivo* eläinmallissa. R-Ras-geenin tuhoaminen varmistettiin mm. reaaliaikaisen PCR:n, immunohistologisen värjäyksen ja immunoblottauksen (WB) avulla (Komatsu ja Ruoslahti 2005).

Poistogeenistä hiirikantaa on takaisinristeytetty ainakin kuusi kertaa C57BL/6-kannan (Harlan Laboratories) kanssa, jolloin geenimuunnos on saatu vähintään 98 %:sti tähän vakiokantaan. R-Ras -/- -hiiri on päällisin puolin WT-hiiren kaltainen, täysin elinkelpoinen ja se lisääntyy normaalisti.

Yhteensä tutkimusta varten eläintöissä käytettiin 27 uroshiirtä: 15 R-Ras-geenin suhteen poistogeenisiä eläimiä ja 12 villityypin hiirtä vertailua varten. Lopulliseen aineistoon luettiin kuitenkin vain 10 hiiren haavat, 5 R-ras poistogeenistä ja 5 villityypin hiirtä. 16 hiirtä jouduttiin lopettamaan niiden sairastuttua silmätulehdukseen eikä näiden eläinten haavoja voitu siten lukea aineistoon. Lisäksi yksi hiiristä menehtyi liian syvään anestesiaan haavojen teon yhteydessä yhteydessä. Taulukossa 1 on esitetty eläinten jakautuminen tutkimuksessa.

**Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt eläimet**

Tarkastelupiste	R-Ras -/-	Villityyppi (R-Ras +/+)
7. päivä toimenpiteestä	3	3
14. päivä toimenpiteestä	2	2
Poissuljetut	10	7

### 3. Menetelmät

---

Haavoja tehdessä noudatettiin seuraavaa työtapaa: Toimenpidettä varten hiiret nukutettiin sevofluraani-inhalaatiolla. Riittävästä anestesiasta huolehdittiin koko toimenpiteen ajan (nipistys jalkaterään eli ns. toepinch). Haavan tekoa varten eläinten selän ihoalue ajettiin karvaleikkurilla ja desinfioitiin alkoholiliuoksella.

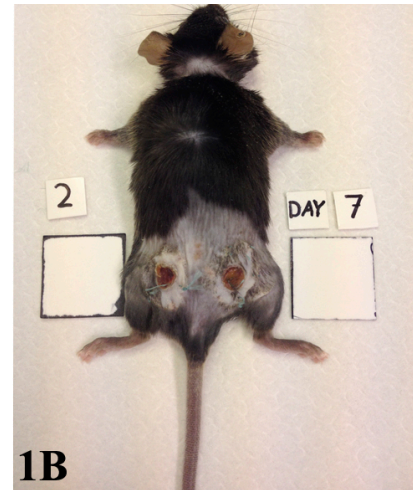
Pyöreät haavat (halkaisija 6 mm) tehtiin hiirten alaselän alueelle biopsia-stanssilla (Biopsy Punch ®), tarvittaessa kirurgisia saksia ja pinsettejä apuna käyttäen.

Anestesiassa oleva hiiri makasi vatsallaan toimenpiteen aikana ja haava pyrittiin tekemään kiristämättömään ihoon jotta haavojen koko pysyisi mahdollisimman vakiona. Biopsiainstrumentti painettiin melko voimakkaasti hiiren ihoa vasten sitä samalla pyörittäen. Voimakasta kiertävää hankausta tai edestakaisin kulkevaa liikettä vältettiin haavan tasaisten reunojen aikaansaamiseksi ja haavan koon vakioimiseksi. Lopuksi mahdolliset jäljelle jääneet ihokiinnikkeet leikattiin saksia ja pinsettejä käyttäen, jonka jälkeen pyöreän, halkaisijaltaan 6 mm kokoisen ihokudospalan saattoi nostaa irti siististi.

Onnistuneesti tehtynä haava läpäisi kaikki ihon kerrokset, muttei yltänyt alla olevaan lihaskerrokseen tai -kalvoihin saakka, säästäten näin koe-eläimen turhalta kärsimykseltä ja vammoilta. Kullekin hiirelle tehtiin kaksi haavaa alaselkään selkärangan molemmin puolin siten, että haavojen väliin jäi vähintään 8 mm tervettä ihokudosta.

Hiiren iho eroaa ihmisen ihosta siltä osin, että ihon kerrosten (epidermis, dermis ja ihonalainen rasvakudos) alta löytyy lisäksi ohut kerros poikkijuovaista lihaskudosta, *panniculus carnosus*. Koska tämä lihaskerros vaikuttaa haavojen umpeutumiseen kuromalla haavaa pienemmäksi, ommeltiin tehtyjen haavojen ympärille silikonirengas (halkaisija vastasi haavan kokoa), joka esti panniculuksen aiheuttaman haavan supistumisen. Tällöin haavan umpeenkuroutuminen tapahtui vain re-epitelialisaation (solujen migraatio eli vaeltamisen) johdosta. Ompeluun käytettiin 5-0-vahvuista PGA-lankaa, jolla silikonirengas ommeltiin kiinni kuudella yksinkertaisella tikillä.

Kaikkien aineistoon luettujen hiirten haavat valokuvattiin haavoittamisen jälkeen. Samoin hiirten haavat valokuvattiin kudoksenäytteiden keruun yhteydessä joko 7. tai 14. päivänä haavoittamisesta ennen kudoksen irrottamista. Valokuvauksessa käytettiin digikameraa tai iPhone-puhelimen kameraa, hiiren viereen asetettiin 2 cm x 2 cm kontrollineliö ja kuvausajankohdan ja hiiren tunnistetiedot (Järvinen ja Ruoslahti 2010). Valokuvia käytettiin haavan pinta-alanmuutoksen makroskooppiseen arviointiin.



**Kuva 1. A) Tutkimusaineistoon luettu hiiri haavoituspäivänä B) Tutkimusaineistoon luettu hiiri (7. päivän tarkasteluväli) kudoksenäytteiden keruun yhteydessä**

TAY:n eläinlääkärin määräyksestä hiirille annettiin anestesian aikana ja sen jälkeen silmätippoja silmien kuivumisen ehkäisemiseksi. Silmätippoina käytettiin kosteuttavaa sokeripitoista liuosta. Hiiret saivat myös subkutaanisesti opioidikipulälääkeinjektion (Vetergisic<sup>®</sup>, vaikuttava aine buprenorfiini). Kipulääkitys annettiin vasta haavoituksen jälkeen anestesian aikaisen menehtymisen välttämiseksi. Hiirille laitettiin kaulurit, joiden tarkoitus oli estää hiirtä poistamasta silikonirenkaita haavojen ympäriltä ja jokainen hiiri siirrettiin omaan häkkiinsä seuranta varten. Hiiret pidettiin yksin omissa häkeissään, jotta ne eivät jyrksisi toistensa haavoja. Hiiriä kipulääkittiin seurannan ajan tarpeen mukaan. Hoitotoimenpiteiden indikaattorina pidettiin eläimen normaalista poikkeavaa käytöstä ja nähtäviä muutoksia eläimen kunnossa (laihtuminen, hiertymät jne). Tarvittaessa seurannassa olleet hiiret nukutettiin uudestaan hoitotoimenpiteitä varten (silmätippojen laitto, kipulääkitseminen, kaulurin korjaus).

Kudosnäytteet otettiin suunnitellusti joko 7. tai 14. päivänä toimenpiteen jälkeen. Hiiret nukutettiin ja lopetettiin hiilidioksidikammiossa, minkä jälkeen haavat kuvattiin. Lopetetun hiiren vatsa- ja rintaontelo avattiin ja sydämeen ruiskutettiin suonet verestä tyhjentävää 0,9 %:sta NaCl-liuosta. Tämän jälkeen sydämeen ruiskutettiin PFA-liuosta (paraformaldehydi) kudosten fiksoimiseksi, jotta haavan irrottaminen olisi helpompaa. Silikonirenkaat irrotettiin haavoista ja haavat kuvattiin. Haavat irrotettiin selästä kudoksenäytteiksi. Haavojen mukana pyrittiin saamaan

mahdollisimman paljon ihon alla olevaa lihaskudosta, jotta haavan varsinainen granulaatiokudos ei rikkoutuisi osittain. Haavat irrotettiin yhtenä kudosplokkina ja laitettiin fiksoitumaan 4-prosenttiseen PFA-liuokseen viileäkaappiin.

Mikäli haavaan ommeltu silikonirengas oli irronnut ennen kudosplokkien keräämistä, ei kyseistä haavaa kerätty ja luettu aineistoon. Näin toimitettiin, jotta panniculosis carnosuksen aiheuttama haavakourouma ei vääristäisi tuloksia. Tästä poikkeuksen muodosti pidemmän aikavälin hiiret, joiden silikonirenkaita ei onnistuttu pitämään kiinni haavoissa tehdyssä tutkimuksessa. On kuitenkin huomioitava, että ko. näytteistä haavan sulkeutuminen on jo tapahtunut re-epitelialisoinnin avulla ja täten silikonirenkaalla ei enää ole merkitystä ihohaavan paranemiseen.

Yön yli kestäneen PFA-fiksaation jälkeen kudosplokkit puhdistettiin ja liotettiin neljä kertaa 15 minuutin ajan PBS-liuoksessa (phosphate buffered saline). Haava halkaistiin sagittaalitasossa ja laitettiin 50 % etanoliliuokseen. Kudosplokkia liotettiin 50 % etanolissa kahdesti 20 minuuttia, vaihtaen etanoli välissä. Toisen kerran jälkeen kudosplokkit laitettiin 70 % etanoliin 20 minuutiksi. Lopuksi kudosplokkit vaihdettiin vielä uuteen 70 % etanoliliuokseen ja toimitettiin eteenpäin histologisia värjäyksiä varten.

Haavapuoliskot valettiin parafiiniblokkiin ja niistä leikattiin kudosplokkit, jotka käsiteltiin HE- ja Massonin trikromi -värjäyksillä. Värjäyksen jälkeen näytteet kuvautettiin digitaaliseen muotoon. Plokkit kuvattiin digitaaliseen muotoon ScanScope XT ® näyttelasiskannerilla.

Digitaalisista kuvista haavan morfometriset määritykset tehtiin Image Scope Viewer ® -ohjelmalla (Järvinen ja Ruoslahti 2010). Digitaaliseen muotoon kuvatuista kudosplokkista pyrittiin määrittelemään seuraavat parametrit: Haavan pituus, granulaatiokudoksen pinta-ala ja haavan re-epitelisoituneen osan pituus. Parametrit määritettiin kummastakin haavapuoliskosta erikseen. Mikäli kummastakin haavapuoliskosta saatiin edustava otos, valittiin haavan parametreiksi eri puoliskoitten mittauksista saadut keskiarvot virheiden vähentämiseksi. Leikkaus-, värjäys- ja skannaustulos vaikutti kuitenkin voimakkaasti siihen, pystyikö kaikkia parametrejä kummastakin haavasta määrittämään.

Määritetyt parametrit tilastoitiin Microsoft Excel ® -taulukointiohjelmaan. Tuloksien vertailuun käytettiin SPSS-tilasto-ohjelmaa. Kudosnäytteistä määritettyjen parametrien erojen kaikki tilastollinen testaaminen tehtiin t-testillä vaikka aineisto ei ollutkaan täysin normaalijakauman mukainen.

## 4. TULOKSET

---

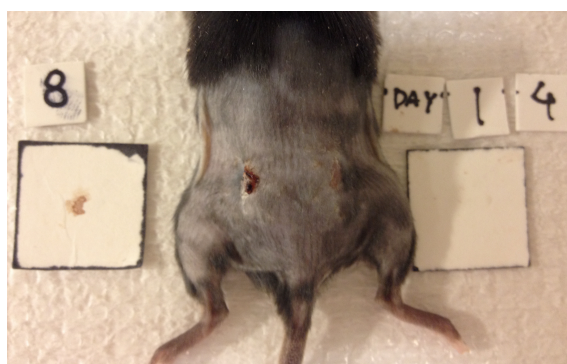
Tutkimuksessa tarkasteltiin haavan paranemista kolmen eri parametrin avulla. Tutkimuksen perusteella R-Ras-geenillä ei ole merkitsevää vaikutusta haavan paranemiseen.

Tutkimusta varten haavoitettiin 27 hiirtä, mutta tutkimuksen aikana osa eläimistä jouduttiin lopettamaan ennen kudosnäytteiden keräämistä silmäinfektioista johtuen, jolloin lopullinen aineisto koostui vain 10 hiirestä. Silmäinfektioiden taustalla oli TaY:n eläinlääkäriin pakollinen päätös käyttää silmätippoja anestesian aikana ja sen jälkeen. Haavamallissamme hiirille asetetaan kaulurin, jotka estävät hiiriä syömästä donitsi renkaita haavan ympäriltä. Sokeripitoiset donitsi renkaat aiheuttivat hiirille fulminantteja silmäinfektioita, koska kaulureiden vuoksi hiiret eivät pystyneet puhdistamaan tukkeutuneita kyynelkanaviaan ja tahmainen, sokeripitoinen liuos toimi infektioporttina silmään. Valitettavasti suurin osa koe-eläimistä kuoli silmätippojen käytöstä johtuen. Lisäksi kaikki aineistoon luetut 14. päivän tarkasteluvälin hiiret onnistuivat irrottamaan silikonirenkaansa ennen kudosnäytteiden keräämistä. Näiden eläinten (4 kpl) haavat luettiin tästä huolimatta aineistoon myöhäisen renkaan irtoamisajankohdan vuoksi, koska haavan sulkeutuminen tapahtuu ensimmäisen viikon aikana ja tämän jälkeen silikonirenkaalla ei ole enää käyttöä. Tämä on kuitenkin saattanut vaikuttaa pidemmän tarkasteluvälin hiirten kohdalla tuloksiin.

On kuitenkin huomionarvoista, että 7 päivän tarkasteluvälin hiirten haavat onnistuivat hyvin; hiirten ei onnistunut irrottaa silikonirenkaita haavoistaan, joten haavojen tarkastelua voidaan pitää luotettavana, vaikka otoskoko onkin pieni.

## 5.1 Haavojen pinta-alan tulkinta kuvista

Kunkin hiiren haavat kuvattiin kahdesti: toimenpidepäivänä ja kudosteruun yhteydessä (7. tai 14. päivänä toimenpiteen jälkeen). Tarkoituksena oli selvittää mahdollisia makroskooppisia eroja haavan paranemisessa villityypin ja R-Ras poistogeenisten eläinten välillä. Makroskooppinen tarkastelu kuitenkin valitettavasti epäonnistui: aineisto jäi pieneksi, koska tutkimusaineistosta jouduttiin rajaamaan ulos suuri joukko hiiriä. Lisäksi hiirten onnistui monessa tapauksessa irrottaa haavaan ommeltu silikonirengas ennen kudosteruupäivää. Tämä sotki mahdolliset tulokset makroskooppisessa tarkastelussa, sillä silikonirenkaansa menettäneiden hiirten haavat kuroutuvat nopeammin kuin hiirillä, joilla silikonirenkaat pysyivät haavoilla onnistuneesti.



**Kuva 2.** 14. päivänä haavoittamisen jälkeen kuvatus hiiren onnistui jo ensimmäisellä tarkasteluviikolla irrottamaan silikonirenkaan oikeasta haavasta ja jälkimmäisellä viikolla vasemmasta. Kuva havainnollistaa, kuinka oikea haava on täysin umpeutunut ja vasen hyvin kuroutunut.

## 5.2 Histologinen tarkastelu

Histologisen tarkastelun perusteella ei tutkimuksessa havaittu merkitsevää eroa haavan paranemisessa R-Ras-poistogeenisten eläinten ja villityypin hiirten välillä.

### **5.2.1 Re-epitalisaatio**

Haavojen histologisessa tarkastelussa yksi parametreista oli haavan re-epitelisoituneen osan pituus.

7 päivän tarkasteluvälillä ei saatu ryhmien välillä tilastollisesti merkitseviä eroja. Villityypin hiirten re-epitelisoituneen kudoksen pituus oli keskimäärin 2912,04  $\mu\text{m}$  ja R-Ras-poistogeenisillä hiirillä vastaava arvo oli 3061,58  $\mu\text{m}$ . Ryhmien välisen eron ollessa tällöin 5,1 % ( $P < 0,68$ ).

14 päivän tarkasteluvälin hiirten kohdalla ei onnistuttu määrittämään re-epitelisaation pituutta haavojen huonosta laadusta johtuen.

### **4.2.2 Haavan pituus**

Haavojen histologisessa tarkastelussa yksi parametreista oli haavan pituus tarkastelupäivänä. Tutkimuksessa haavan pituutta vastasi haavan terveen ihon reunojen välinen etäisyys.

7 päivän tarkasteluvälillä villityypin hiirten haavan pituus oli keskimäärin 6374,58  $\mu\text{m}$  ja R-Ras-poistogeenisillä hiirillä 6360,42  $\mu\text{m}$ . Eroa haavojen pituudessa oli siis 0,22 % ( $P < 0,98$ ).

Villityypin hiirten haavojen pituuden keskiarvoksi saatiin 14 päivän kohdalla 4551,5  $\mu\text{m}$  ja R-Ras-poistogeenisten eläinten kohdalla 4040,5  $\mu\text{m}$ . Villityypin hiirten haavojen pituus oli tämän tutkimuksen mukaan keskimäärin 12,64 % ( $P < 0,35$ ) suurempi kuin R-Ras-poistogeenisillä eläimillä. Tällä hiiriryhmällä haavoihin ommellut silikonirenkaat irtosivat jälkimmäisellä tarkasteluviikolla aiheuttaen todennäköisesti haavojen kuroutumisen.

### **4.2.3 Granulaatiokudoksen pinta-ala**

Granulaatiokudoksen pinta-ala oli kolmas tarkasteltu parametri, eikä sitä tarkasteltaessa havaittu merkitseviä eroja kummankaan tarkastelupisteen kohdalla.

7 päivän tarkasteluvälillä villityypin hiirten granulaatiokudoksen pinta-ala oli keskimäärin 928477,42  $\mu\text{m}^2$  ja R-Ras-poistogeenisillä hiirillä 1057532,42  $\mu\text{m}^2$ . Eroa granulaatiokudoksen pinta-alassa oli keskimäärin 13,90 % ( $P < 0,62$ ), eikä ero ollut merkitsevä.

14 päivän tarkastelupisteen kohdalla villityypin hiirten granulaatiokudoksen pinta-ala oli keskimäärin 1 368 865,25  $\mu\text{m}^2$  ja R-Ras-poistogeenisillä hiirillä 1 920 529,38  $\mu\text{m}^2$ . Ero granulaatiokudoksen pinta-alassa oli tällöin 40 % ( $P < 0,42$ ).

## 5. Pohdinta

---

Tutkimusta voidaan pitää epäonnistuneena koeolosuhteiden vaikeuksien takia. Tutkimuksessa otoskoko jäi pieneksi, jolloin tulosten yleistettävyys ja luotettavuus heikkenee.

Tutkimusaineisto on pieni koska suuri osa eläimiä jouduttiin sulkemaan pois tutkimuksesta aikaisemmin kuvaamiemme silmätulehdusten vuoksi. Sairaat eläimet lopetettiin ennen kudoksenäytteiden keräämistä. Tulkitsimme tilanteen siten, että eläimen infektio ja siten alentunut yleiskunto olisi voinut vaikuttaa haavan paranemisprosessiin, mikä olisi vääristänyt tutkimustulosta mikäli sairailta eläimiltä olisi kerätty kudoksenäytteet.

Aineistoa pienensi entisestään joidenkin haavaleikkeiden ja histologisten värjäyksien epäonnistuminen. Tämä on hyvin tyypillistä haavan paranemista tutkittaessa; hento haava repeää kudoksen histologisessa käsittelyssä ja kaikki kudos ei siirry luotettavasti histologiselle lasille. Jotkin kudoksenäytteet esimerkiksi eivät rajautuneet kuvauslasille kun näytteet skannattiin digitaaliseen muotoon. Muutamassa näytteessä oli kudos päässyt myös hieman repeämään. Tällöin kudospaarametrien määrittäminen värjäyksen jälkeen ei joko onnistunut tai heikensi tulkinnan laatua. Kultakin aineistoon luetulta hiireltä saatiin kuitenkin ainakin yksi haavaleike onnistumaan ja parametrit määritettyä.



14. päivän tarkasteluvälin hiirten tuloksia on syytä tarkastella kriittisesti, sillä kaikki tähän ryhmään kuuluneet hiiret irrottivat haavoihin ommellut silikonirenkaansa ennen tarkasteluajan päättymistä ja siten haavat pääsivät kuroutumaan panniculus carnosus – sileälihaskerroksen vaikutuksesta. Nämä haavat kuitenkin päätettiin sisällyttää tutkimusaineistoon renkaan irtoamisen myöhäisen ajankohdan takia. Tämä todennäköisesti kuitenkin aiheuttaa vääristymää tutkimustuloksissa. Vääristymän suuntaa on hankala arvioida, mutta on mahdollista että renkaan irtoamisen seurauksena mahdollistunut haavan kuroutuminen peittää mahdollisen biologisen eron paranemisessa poistogeenisten eläinten kohdalla.

Tutkimuksen luotettavimpana tuloksena voidaan pitää 7 päivän tarkasteluvälillä tarkasteltuja haavanäytteitä niiden onnistumisen ansiosta. Näissä haavoissa merkitsevää paranemiseroa villityypin ja R-Ras-poistogeenisten eläinten välillä ei havaittu, mikä viittaisi siihen, että R-Ras-geeni ei juurikaan vaikuta haavan paranemisnopeuteen.

Tulosta voisi mahdollisesti tarkentaa tulevissa tutkimuksissa esim. immunohistokemiallisten värjäyksien tai mahdollisten molekyylibiologisten määritysmenetelmien avulla. Näin voitaisiin saada tarkempaa tietoa siitä, millä alueilla ja missä soluissa haavan alueella R-Ras proteiinia tuotetaan eniten. Lisäksi tämä antaisi meille mahdollisuuden selvittää missä haavan paranemisen vaiheessa R-Ras-proteiinin tuotto on korkeimmillaan.

On myös mahdollista, että R-Ras-geenin vaikutus ihohaavan paranemiseen ilmenisi 7 päivää pidemmällä aikavälillä. Tätä tutkimuksessa ei kuitenkaan kyetty suorittamaan pitkän paranemisajankohdan tarkastelua hiirten terveysongelmien ja menetelmän toteutus-ongelmien takia. Täten mahdollinen ero haavan paranemisessa jäi piiloon laadullisesti huonojen haavojen takia. Asia on kuitenkin huomionarvoinen mahdollisten uusintatutkimusten valossa: Tulevissa tutkimuksissa olisi tärkeää painottaa haavojen tarkastelemista pitkällä, vähintään kahden viikon aikavälillä. Mikäli R-Ras-geenillä olisi vaikutusta haavan paranemiseen pidemmällä aikavälillä, sillä saattaa olla merkitystä hoidollisesti, sillä vasta haavan myöhäisvaiheessa ilmenevä vaikutus voi olla merkittävä kroonisten haavojen kohdalla.

Tulevissa tutkimuksissa olisi siksi tärkeää varmistaa pidemmällä tarkasteluvälillä tehtyjen ihohaavojen laatu. Tehdyssä tutkimuksessa hiirten onnistui irrottaa haavoihin kiinnitetyt silikonirenkaat huolimatta merkittävistä varotoimenpiteistä (kauluri, hiiret omista häikeissään, silikonirenkaiden uudelleen suturointi ja kudosliimaus haavojen reunaan) yleensä päivien 8–10 kohdalla. Täten muiden vastaavien varotoimenpiteiden harkitseminen saattaisi olla vaivan arvoista.

Ihoon ommellut silikonirenkaat eivät juuri aiheuta hiirille kipua, mutta renkaiden suojaamiseksi hiirille laitetut kaulurit häiritsevät eläimiä. Kauluri estää hiiriä pesemästä itseään normaalisti, ärsyttää eläintä rajoittamalla sen liikkumista ja saattaa aiheuttaa hankaumia. Tämä ilmenee stressinä ja siten myös hiirten kunnan huononemisenä. Kaulurin myös esti hiiriä hoitamasta silmiään, joten kaulurin altisti hiiret silmätulehduksille, jotka vuorostaan aiheuttivat sairastuneiden hiirten poissulkemisen tutkimusaineistosta. Jos hengittävällä, peittävällä haavataitoksella tai muulla vastaavalla menetelmällä voitaisiin välttää kaulurin aiheuttamat ongelmat, voisi tutkimus olla teknisesti selkeästi onnistuneempi. On myös pohdinnan arvoista, sopisiko tutkimus paremmin rotilla tai muilla eläinmalleilla toteutettavaksi, mikäli haavoitus ei häiritsisi näitä yhtä paljon kuin hiiriä, jotka vaativat kaulurin haavan suojaksi. Ko. koe.eläinlajien ongelma on kuitenkin, että niistä ei ole saatavilla R-Ras poistogeenistä eläintä.

Luonnollisesti on myös muistettava, että biopsiainstrumentin kiertäminen ja haavan ääriivivojen seuraaminen saksilla on voinut aiheuttaa pientä vaihtelua haavojen pinta-  
alassa ja siten vaikuttanut tuloksiin.

## 6. LÄHTEET

---

1. Ahmadian M R, Zor T ym. Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. National Acad Sciences USA 1999;96:7065-70

2. Wennerberg K, Rossman K L, Der C J. The Ras Superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 2005; 118:843-846.
3. Komatsu, M., and Ruoslahti, E. (2005). R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. *Nature Medicine* 11, 1346-1350.
4. Sawada J, Komatsu M, Urakami T, Li F, Urakami A, Zhu W, Fukuda M, Li D, Ruoslahti E. Small GTPase R-Ras regulates Integrity and Functionality of Tumor Blood Vessels. *Cancer Cell* 2012, 235-249.
5. Sawada J, Komatsu M. Normalization of tumor vasculature by R-Ras. *Cell Cycle* 12/2012, 11:23 4285-4286.
6. Ada-Nguema A., Xenias H., Hofman J., Wiggins C., Sheetz M., Keely P. The small GTPase R-Ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLC. *Journall of Cell Science* 119, 4364.
7. Suzuki J., Kaziro Y., Koide H. Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras. *Oncogene* 2000, 1138-1146.
8. Zhang Z., Vuori K., Wang H., Reed J., Ruoslahti E. Intergin Activation by R-ras. *Cell* Vol. 85, 61-69.
9. Ramocki M., Johnson S., White M., Ashendel c., konieczny S., Taparowsky E. Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho does not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 1997, 17(7):3547.
10. Hamm H., Gilchrist A., Heterotrimetic G- proteins. *Cell Biology* 1996, 8:189-196.
11. Ruusaho H., G-proteiinikytkentäiset reseptorit. *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia* 2014
12. Wang B., Zou J., Ek-Rylander B., Ruoslahti E., R-Ras Contains a proline-rich site that binds to SH3 domains and is required for integrin activation by R-Ras. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, Vol. 275, 5222-5227.
13. Ketola T., R-Ras-geenin vaikutus ihohaavan paranemiseen – tutkimus R-Ras-poistogeenisellä eläimellä. Syventävien opintojen kirjallinen työ, 11/2011, Tampereen yliopisto, lääketieteen laitos.