

**R-RAS-GEENIN VAIKUTUS IHOHAAVAN  
PARANEMISEEN — TUTKIMUS R-RAS-  
POISTOGEENISELLÄ ELÄIMELLÄ**

Tekijä LK Tuomo Ketomäki

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Dosentti Tero Järvisen tutkimusryhmä

11/2011

# TIIVISTELMÄ

---

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Dosentti Tero Järvisen tutkimusryhmä

## TUOMO KETOMÄKI: R-RAS-GEENIN VAIKUTUS IHOHAAVAN PARANEMISEEN — TUTKIMUS R-RAS-POISTOGEENISELLÄ ELÄIMELLÄ

Kirjallinen työ 20 s.  
Ohjaaja: dosentti, LT Tero Järvinen  
Marraskuu 2011

---

Avainsanat: GTPaasi, re-epitelisaatio, uudisverisuonitus, C57BL/6

R-Ras on GTPaaseihin kuuluva solujen viestinnässä toimiva proteiini, jolla on havaittu vaikutuksia uudisverisuonten muodostumiseen syöpäkudoksessa. Tässä tutkimuksessa selvitettiin R-Ras-geenin vaikutusta hiiren ihohaavan paranemiseen poistogeenisen (knock-out; KO) eläinmallin avulla. Tutkimuksessa vertailtiin ihohaavojen parantumista geeniperimältään tavallisten, niin sanottujen villityyppihiirten (wild type; WT) ja R-Ras-poistogeenisten hiirten välillä. Tutkimuksessa käytettiin C57BL/6-hiirikantaa. Makroskooppista paranemista arvioitiin valokuvaamalla haavat päivittäin ja vertailemalla haavojen sulkeutumista (pinta-alan pienentymistä) molemmilla genotyypeillä. Aineistossa oli 118 aikuista uroshiirtä, jotka oli jaettu kuuteen eri tarkasteluryhmään. Haavoista kerättiin kudospätkiä kuutena eri tarkasteluajankohtana 2. ja 22. operaation jälkeisen päivän välillä. Kudospätkät leikattiin ja värjättiin paranemisen histologista tarkastelua varten.

Haavakuvien perusteella paranemisnopeudessa tai paranemistavassa ei ole eroa R-Ras -poistogeenisen ja villityyppihiiren välillä. Tehdyissä histologisissa vertailuissa ei tullut esille selviä eroja haavojen paranemisessa (re-epitelisaatio, haavan koko). Yhteenvetona R-Ras-geenillä ei näyttäisi olevan vaikutusta hiiren ihohaavan paranemiseen tai vaikutus on melko vähäinen.

# SISÄLLYS

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2 AINEISTO</b>	<b>6</b>
<b>3 MENETELMÄT</b>	<b>8</b>
<b>4 TILASTOLLINEN VERTAILU JA TULOKSET</b>	<b>10</b>
4.1 HAAVOJEN PINTA-ALOJEN VERTAILU VALOKUVISTA	10
4.2 HISTOLOGINEN TARKASTELU	12
4.2.1 PANNICULUS CARNOSUM -LIHASTEN VÄLI	13
4.2.2 RE-EPITELISAATION VÄLI	14
4.2.3 TERVEEN IHON REUNOJEN VÄLI	15
4.2.4 HAAVAN PINTA-ALA	15
<b>5 POHDINTA</b>	<b>16</b>
<b>VIITTEET</b>	<b>20</b>

# 1 JOHDANTO

R-Ras-proteiini on Ras-perheeseen kuuluva pieni GTPaasi (guanosiinitrifosfaasi). GTPaasi sitoo ja muuttaa guanosiinitrifosfaatin (GTP) guanosiinidifosfaatiksi (GDP). Tämä on oleellinen tapahtuma solujen viestijärjestelmässä ja johtaa muun muassa erilaisten toisiolähettijärjestelmien ja solukalvon ionikanavien aktivoitumiseen. GTPaasi on aktiivinen GTP:n ollessa siihen sitoutuneena ja inaktiivinen, kun GDP on siihen sitoutuneena. Solun sisällä GTPaasien toiminta liittyy elintärkeisiin toimintoihin kuten solun ulkopuolelta tulevien viestien välittämiseen ja proteiinisynteesin säätelyyn. (Ahmadian & Zor 1999.)

Solujen biokemialliseen säätelyyn osallistuvat GTPaasit jaotellaan alaryhmiin, mutta yhtenevänä tekijänä niillä kaikilla on samanlainen mekanismi toimia viestinvälittäjänä on/off-kytkimen tavoin. Kytkimen asennosta riippuu, onko proteiiniin sitoutunut GTP vai GDP. GTPaaseihin kuuluvat heterotrimeeriset G-proteiinit toimivat viestinvälittäjinä solukalvolla yhdessä niihin liittyneiden reseptorien kanssa. Heterotrimeeriset G-proteiinit koostuvat nimensä mukaisesti kolmesta alayksiköstä ( $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ ) ja näiden muodostaman kompleksin GTPaasi-aktiivisuus on riippuvainen kompleksiin liittyneen reseptorin aktiivisuudesta.

Ras-perhe on yksi Ras-superperheen viidestä alaryhmästä. Ras-perheeseen kuuluu 36 eri geeniä, joista merkittävimpiä ovat H-, K-, N-, M- ja R-Ras. Ras-superperheen GTPaasit koostuvat yhdestä yksiköstä, joka on analoginen heterotrimeeristen G-proteiinien  $\alpha$ -yksikön kanssa. Toisin kuin heterotrimeeriset G-proteiinit, Ras-superperheen proteiinit pystyvät toimimaan itsenäisesti ilman erillisen reseptorin vaikutusta: Ras-proteiini pystyy ilman ulkopuolista stimulaatiota irrottamaan GDP:n (inaktiivinen kompleksi) ja sitomaan tilalle GTP:n (aktiivinen kompleksi) ja lisäksi muuttamaan sitoutuneen GTP:n GDP:ksi. Ras-proteiinien itsenäinen toiminta on luonteeltaan hidasta ja käytännössä solun toiminnalle melko merkityksetöntä. Merkittävin aktiivisuuden säätely tapahtuu ulkopuolisten säätelyproteiinien välityksellä. Kaksi tärkeintä säätelyproteiinien ryhmää ovat guanosiini-nukleotidi-vaihtajat (GEFs, Guanine-nucleotide-exchange factors), jotka edistävät GDP:n vaihtamista GTP:ksi (lisääntynyt aktiivisuus), ja

GTPaasia aktivoivat proteiinit (GAPs, GTPase-activating proteins), jotka kiihdyttävät GTPaasien sisäistä kykyä muuttaa GTP GDP:ksi (kompleksin inaktivoituminen). (Wennerberg, Rossman & Der 2005.) Käytännössä kahden edellä mainitun säätelytekijän vaikutuksen suhde määrää, kuinka suuren osan ajasta GTPaasi on aktiivinen. GTPaasin aktiivisuus välittyy siten, että GTP:n ollessa sitoutuneena kompleksilla on suuri herkkyys sitoutua kohdeproteiiniin ja siten saada aikaan joko kohdeproteiinin aktivoituminen tai inaktivoituminen.

Ras-perheen proteiinien toimintaa solun viestinvälitysketjussa voidaan yksinkertaistettuna kuvata seuraavalla esimerkillä, jossa viesti välittyy seuraavaan vaiheeseen aina kohdeproteiinin aktivoitumisella, vaikka käytännössä säätelyvaikutus voi yhtä lailla välittyä myös kohdeproteiinin toiminnan inaktivoitumisen kautta: esimerkiksi verenkierron mukana kulkeutuva kasvutekijä tai soluvälitilan tukiverkon rakenneproteiini kiinnittyy kohdesolun solukalvolla sijaitsevan reseptorin solun ulkopuoliseen osaan. Sitoutuminen saa aikaan muodonmuutoksen solukalv reseptorin solun sisäpuolisessa osassa, ja se edelleen aiheuttaa solunsisäisten toisiohjaajajärjestelmien aktivoitumisen.

Toisiohjaajajärjestelmän aktivoitumisen välityksellä Ras-proteiinia säätelevät tekijät aktivoituvat, minkä seurauksena Ras-proteiini on enimmäkseen aktiivisessa muodossa GTP:n ollessa siihen sitoutuneena. Aktiivinen Ras-proteiini aktivoi joko suoraan tai välivaiheiden kautta proteiinisynteesiä ohjaavien ja säätelevien proteiinien, eli niin sanottujen transkriptiotekijöiden, sitoutumisen kohdegeenien säätelyalueille, mikä käynnistää kohdegeenien aktivoitumisen ja edelleen kohdeproteiinien synteesin. Lopullisena vasteena on muuttuneen proteiinisynteesiaktiivisuuden kautta haluttu muutos solun toiminnassa.

Ras-perheen jäsenet säätelevät ennen kaikkea solujen jakaantumista (proliferaatio), mutta myös erilaistumista, selviytymistä ja liikettä (migraatio) kudoksissa (Wennerberg ym. 2005).

Ras-proteiineista H-Ras ja K-Ras ovat keskeisiä säätelijöitä solun viestintäverkostossa, ja niitä aktivoivat useimmat kasvutekijät ja myös solujen adheesiomolekyylit eli integriinit (Komatsu & Ruoslahti 2005). Kasvutekijöiden vaikutus solujen proliferaatioon välittyy merkittävältä osin juuri Ras-geenien kautta. Keskeisten säätelyominaisuuksien vuoksi Ras-geenien mutaatioilla on merkittävä vaikutus syöpäsairauksien synnyssä. Pistemutaatiot Ras-geeneissä

voivat aiheuttaa epätarkoituksenmukaisen GTPaasi-aktiivisuuden ja siten muuttaa solun käyttäytymistä, kun keskeinen Ras-proteiini menettää kyvyn vastata negatiiviseen säätelyyn. Ilman negatiivista säätelyvastetta viallinen Ras-proteiini ”syöttää” jatkuvasti kasvustimulaatiota solulle ilman normaalisti tarvittavaa kasvutekijästimulaatiota. (Ahmadian ym. 1999.) Kun kriittisissä säätelykohdissa vaste negatiiviseen säätelyyn menetetään, seurauksena voi olla solun hallitsematon jakaantuminen ja käyttäytyminen ja lopulta solun muuntuminen (transformaatio) geneettisesti epävakaaaksi syöpäsoluksi.

Syöpäalttiuden suhteen R-Ras on Ras-perheessä poikkeuksellinen: R-Ras proteiinia aktivoivien geenimutaatioiden ei ole osoitettu aiheuttavan syöpää. Arvioidaan, että noin 25–35 %:ssa syöpätapauksista takana on aktivoiva mutaatio jossakin kasvua stimuloivassa Ras-geenissä. R-Ras:n on todettu säätelevän solujen välisten liitosten muodostumista ja solun adheesiomolekyylien aktivoitumista (Zhang ym. 1996). Lisäksi se säätelee solujen migraatiota eli liikettä sidekudoksen läpi (Ada-Nguema ym. 2006) ja hermosolujen aksonien kasvua (Oinuma ym. 2006). R-Ras-geenin ilmentyminen poikkeaa muiden Ras-perheen GTPaasien ilmentymisestä: Ras-perheen GTPaasit ilmentyvät pääsääntöisesti jakaantuvissa soluissa, ja ne välittävät kasvusignaalia solujen proliferaatioon. R-Ras sen sijaan ilmentyy erilaistuvissa soluissa, ja sen ilmentyminen huipentuu solun lopullisen (ns. terminaalisen) erilaistumisen yhteydessä eli lopullisen solusyklistä vetäytymisen yhteydessä. On osoitettu, että sileälihassoluissa ja verisuonten endoteelisoluissa R-Ras:n ilmentyminen on sidoksissa solun kypsymiseen: jakautuvassa ja kehittyvässä solussa geenin ilmentyminen on vähäistä, mutta ilmentyminen lisääntyy erilaistuvassa solussa, ja kypsässä, erilaistuneessa solussa se on voimakkainta. (Komatsu & Ruoslahti 2005.) R-Ras-geenin ilmentymiseen liittyy myoblastien siirtyminen solusyklin lepovaiheeseen, mikä mahdollistaa myoblastien erilaistumisen kypsiksi lihassoluiksi (Suzuki, Kaziro & Koide 2000).

Edellä kuvattuun viitaten R-Ras-geenin funktio on erilainen muihin Ras-perheen geeneihin nähden solun erilaistumisen ja jakautumisen säätelyssä. Lisäksi Ras-perheeseen kuuluvalla H-Ras:lla on R-Ras:lle vastakkainen eli estävä vaikutus soluliitosten muodostumiselle (Hughes ym. 1997) ja myoblastien erilaistumiselle (Ramocki ym. 1997). Täten H-Ras näyttää toimivan R-Ras:n vastavaikuttajana.

Näiden havaintojen perusteella on mahdollista, että R-Ras:n ja H-Ras:n aktiivisuuden tasapaino määrää suunnan solun erilaistumisen ja jakaantumisen välillä. R-Ras:n toiminnasta ja merkityksestä on tehty useita solutason tutkimuksia (*in vitro*), mutta sen vaikutuksia kudostasolla (*in vivo*) ei juurikaan tunneta. (Komatsu & Ruoslahti 2005.)

Komatsu ja Ruoslahti (2005) ovat pyrkineet selvittämään R-Ras:n todellista merkitystä eri kudosten kehityksessä ja eri sairauksien patogeneesissä luomalla R-Ras-poistogeenisen eläinkannan. He ovat onnistuneet luomaan R-Ras-poistogeenisen hiirikannan, jolta puuttuu perimästään R-Ras-geeni, mutta joka muuten on täysin perimältään normaali. Ainoastaan yhden geenin puuttuminen mahdollistaa tutkittavan geenin kudosvaikutusten selvittämisen vertailemalla ilmiöitä tavallisen ja poistogeenisen eläimen välillä. Tutkimuksessa osoitetaan, että R-Ras-geeni ilmentyy kehityksen aikana useassa kudoksessa solujen jakaantumisaktiiviteetin hidastuessa ja solujen aloittaessa lopullisen erilaistumisensa. Verisuonissa R-Ras ilmentyy erityisesti erilaistuneissa sileälihassoluissa ja endoteelisoluissa, ja sen merkittävin vaikutus lienee verisuonten kypsyminen (maturoituminen ja stabilisoituminen). R-Ras-poistogeeninen hiiri on niin sanotusti vitaali eli pystyy kehittymään normaalisti ja on lisääntymiskykyinen. Vitaliteetti mahdollistaa poistogeenisen hiirimallin käytön erilaisissa tautitilanteissa ja selvittämään R-Ras-geenin merkitystä tutkittavissa sairauksissa. Tästä esimerkkinä on havainto, että R-Ras -poistogeenisellä eläimellä syöpäkudoksessa on runsaammin verisuonia kuin villityyppihiirellä. Runsaammalla verisuonimuodostuksella ei kuitenkaan näytä olevan vaikutusta syöpäkasvaimen kasvuun, mikä oletettavasti johtuu R-Ras-geenin puuttumisesta aiheutuvasta endoteelisolujen epätäydellisestä kypsymisestä ja verisuonten heikosta perfuusiosta. (Komatsu & Ruoslahti 2005.)

Havainnot R-Ras:n vaikutuksista angiogeenin eli verisuonten uudismuodostukseen ja solujen lopulliseen erilaistumiseen tekevät siitä kiinnostavan ihohaavan paranemisen kannalta, koska vammautuneen kudoksen verisuonitus on keskeinen tekijä vamman paranemisessa. R-Ras:n merkitystä ihohaavan paranemisessa ei kuitenkaan tunneta. Verisuonten muodostuminen on avainasemassa haavan paranemisprosessissa, ja riittämättömän verenkierron aiheuttama hapenpuute, eli hypoksia, tekee kroonisista ihohaavoista huonosti

parantuvia. Hypoksia johtaa usein kudoksen nekroosiin. Äärimmäisenä esimerkkinä ovat vaikeat krooniset haavaongelmat esimerkiksi diabeettista valtimosairautta sairastavalla potilaalla. Ne johtavat usein lopulta jalan amputaatioon. Diabeetikoiden keskeisin ongelma on hyvin perifeerisesti painottuva ns. pienten suonten tauti, jota voitaisiin todennäköisesti hoitaa tehokkaasti tehostamalla angiogeneesiä. Lisäksi huonosti verisuonitettu, ja siten huonosti paraneva haava on hankala infektioportti. Kroonisten haavojen hoitoon on kirurgisten menetelmien lisäksi käytössä suuri määrä erilaisia paikallishoitovalmisteita ja mekaanisia hoitoja. Toistaiseksi tutkimuksista ja kokeiluista huolimatta ei ole löydetty todistetusti tehokkaita lääkkeellisiä vaihtoehtoja parantaa ihohaavan fysiologista paranemisprosessia (Krooninen alaraajahaava. Käypä hoito -suositus 2010). Nykyisin kliinisessä käytössä olevat tehokkaat haavanhoitometodit vaativat paljon työtä ja erikoisosaamista, ovat kestoltaan pitkiä ja siten kalliita toteuttaa. Haavojen hyvä perushoito on ehdoton edellytys haavanhoidon onnistumiselle, mutta lääkkeellinen paranemisprosessin nopeuttaminen toisi merkittäviä kustannussäästöjä kroonisten ihohaavojen hoidossa. Toimivalle haavanhoitolääkkeelle on suuri kysyntä.

Tämän tutkimuksen motiivina on ollut etsiä potentiaalisia terapeuttisia vaikutuskohteita tulevaisuuden haavanhoidolle lääkkeellisillä menetelmillä. Tutkimuksessa tarkastellaan R-Ras-geenin vaikutusta ihohaavan paranemiseen poistogeenisen eläinmallin avulla. Olemme pyrkineet löytämään mahdolliset erot paranemistavassa ja -nopeudessa vertailemalla ihohaavan paranemista R-Ras-poistogeenisen hiiren ja geeniperimältään tavallisen, niin sanotun villityyppihiiren välillä. Tutkimuksen alussa tulosten suunnasta tai erojen suuruudesta ei ollut minkäänlaista ennakoarviota, mikä teki tarvittavan aineiston koon arvioinnista haasteellista.

R-Ras-geenin vaikutuksesta ihohaavan paranemisessa ei ole tehty aiempia tutkimuksia. Tavoitteenamme oli selvittää paranemistapa ja -nopeus valokuvaamalla haavoja päivittäin ja vertailemalla paranemista villityyppihiiren haavan paranemiseen. Lisäksi pyrimme kudostasolla löytämään mahdolliset erot vertailemalla eri-ikäisistä haavoista tehtyjä haavakudosnäytteitä. Haavakudosnäytteistä määritettiin tavallisen hematoksyliini-eosiini-värjäyksen avulla helposti määritettäviä haavan paranemisen edistymistä kuvaavia



paranemisparametreja. Paranemistavan erojen syitä voidaan arvioida tutkimalla mahdollisia eroja eri soluryhmien aktivoitumisessa ja järjestäytymisessä tai poikkeavuuksia eri geenien proteiinisynteesissä haavakudoksessa eri-ikäisissä haavoissa. Syiden arviointi on kuitenkin ollut tarkoitus jättää mahdollisiin aiheita koskeviin jatkotutkimuksiin.

## 2 AINEISTO

Tutkimusaineisto koostuu täysikasvuisista, pääsääntöisesti 8–10 viikon ikäisistä, koirashiiristä. Tutkimusmenetelmien kokeilu- ja harjoitteluvaiheessa käytettiin myös naarashiiriä, mutta ne rajattiin pois lopullisesta analysoidusta aineistosta. Tutkimusaineistossa tarkasteluyksikkönä käytetään haavaa, joita yhdelle hiirelle tehtiin osalle kaksi ja osalle kuusi: tutkimuksen alkuvaiheessa haavoja tehtiin kaksi haavaa yhdelle hiirelle, mutta eläintöiden työläyden vuoksi päädyttiin tutkimusta jatkamaan tekemällä kuusi haavaa yhdelle hiirelle.

Tutkimuksen aikana eläintöihin käytettiin yhteensä 157 hiirtä. Lopullisessa aineistossa on haavoja 118 hiireltä. Ensimmäisen erän 23 hiirtä rajattiin aineistosta pois joko naarassukupuolen tai soveltumattomaksi osoittautuneen nukutusmenetelmän vuoksi. Lisäksi osa ensimmäisen erän kudosnäytteistä valmistettiin jäädytysmenetelmällä, kun myöhemmissä erissä kaikki kudosnäytteet fiksoitiin paraformaldehydillä ja valettiin parafiiniin. Kymmenen hiirtä poistettiin aineistosta lajitoverin kanssa tappelun seurauksena uudelleen avautuneiden haavojen vuoksi. Kaksi eläintä todettiin sairaaksi ja jouduttiin lopettamaan. Viisi eläintä kuoli liian syvän, eetterillä indusoidun anestesian lamauttamana päivittäin toistuneen haavojen valokuvauksen aikana, ja myös nämä eläimet rajattiin aineiston ulkopuolelle. Aineiston ulkopuolelle rajautuneissa hiirissä olivat molemmat genotyypit edustettuina. Aineistosta ulkopuolelle rajaamiseen johtaneet asiat vaikuttivat molempien genotyyppien hiiriin samalla tavalla, minkä vuoksi voidaan olettaa, etteivät rajaamiset ole aiheuttaneet valikoitumisongelmia (valikoitumisharha) tutkimusaineistossa. Rajaamisten vaikutuksista ei ole tehty tarkempaa selvitystä.

Kaikkien hiirten haavat kuvattiin operaation jälkeen ja lopetuspäivänä ennen kudoksenäytteiden ottamista. Lisäksi suurin osa hiiristä pyrittiin valokuvaamaan päivittäin kevyen eetterinukutuksen avulla. Haavakuvista tehtyjä pinta-alamäärityksiä käytettiin aineistona paranemisen makroskooppisessa arvioinnissa.

Haavan paranemisen histologista tarkastelua varten hiiret jaettiin kuuteen ryhmään kuudessa eri aikapisteessä tehtävää tarkastelua varten: hiiret lopetettiin 2., 5., 7., 10., 14. ja 21–22. toimenpiteen jälkeisenä päivänä. Tavoitteena oli saada vähintään kuusi kuuden haavan hiirtä molemmista genotyypeistä jokaiseen tarkastelupisteeseen. Aineiston hiirimäärä olisi riittänyt tavoitteen saavuttamiseksi, mutta suurimman koe-eläinsarjan molempien genotyyppien jakaminen tasaisesti eri päiville epäonnistui: koe-eläinlaboratorion henkilökunnan kanssa tapahtuneiden väärinymmärrysten vuoksi poikueiden genotyyppitiedot menetettiin poikasten emosta vieroittamisen yhteydessä. Hiirten genotyypit saatiin selville vasta jälkikäteen hiirten hännistä eristettyjen DNA-näytteiden pohjalta tehdyn genotyypityksen avulla. Taulukossa 2 on eroteltu aineiston hiirten jakautuminen eri päiville.

**Taulukko 2** Taulukossa on eritelty R-Ras-poistogeenisten hiirten ja villityyppihiirten lukumäärät eri tarkastelupisteissä. Kaikissa tarkastelupisteissä on molemmista genotyypeistä sekä kahden että kuuden haavan hiiriä. Taulukosta käy ilmi, että eri tarkasteluryhmissä on selvät kokoerot aineiston epätasaisen jakautumisen vuoksi; esimerkiksi 10. toimenpiteen jälkeisenä päivänä lopetettuja villityypin hiiriä on yhteensä 4, kun taas R-Ras-poistogeenisiä hiiriä on yhteensä 21.

Tarkastelupiste	Villityyppi				R-Ras -/-			
	2 haavaa	6 haavaa	Hiiriä yht.	Haavojen lkm.	2 haavaa	6 haavaa	Hiiriä yht.	Haavojen lkm.
<b>2</b>	4	10	14	68	5	4	9	34
<b>5</b>	6	2	8	24	1	5	6	32
<b>7</b>	7	9	16	68	4	4	8	32
<b>10</b>	2	2	4	16	17	4	21	58
<b>14</b>	6	3	9	30	8	3	11	34
<b>21–22</b>	2	6	8	40	1	3	4	20
<b>Yhteensä</b>	27	32	59	246	36	23	59	210

### 3 MENETELMÄT

Haavatoimenpiteessä hiiret tainnutettiin dietyylieetterihöyryllä ja hiiren ollessa hetkellisesti tainnuksissa pistettiin vatsanahkaan subcutaani-injektiona Avertin® -nukutusainetta (vaikuttava aine 2, 2, 2-tribromoetanoli). Nukutuksen jälkeen hiirelle annettiin subkutaanisesti opiaattikipulääkeinjektio (L-Polamivet®, vaikuttava aine levometadonihydrokloridi) leikkauksenaikaisen ja -jälkeisen kivun hoitoon. Operaation jälkeisinä päivinä eläinlaboratorion henkilökunta jatkoi tarvittaessa kipulääkitystä. Kipuindikaattorina pidettiin koe-eläimen passiivista ja vetäytyvää käytöstä ja syömättömyyttä. Toimenpiteessä hiiren selkä ajettiin karvaleikkurilla ja iho steriloitiin 70-prosenttisellä etanoliliuoksella. Alaselän ihoon tehtiin 2–6 pyöreää ihoahaavaa. Haavat sijoiteltiin pareittain symmetrisesti alaselän iholle selkärangan molemmille puolille. Ensimmäinen haavapari sijoitettiin pakaroiden päälle. Haavojen väliin jätettiin vähintään 6 mm:n ihokannas. 6 mm halkaisijaltaan olevat pyöreät ihoreiät tehtiin käyttäen apuna terävää pyöreää 6 mm:n biopsiainstrumenttia (Biopsy Punch®) ja lisäksi pieniä saksia. Optimaalisinta olisi ollut tehdä haavat painamalla biopsiainstrumentillä reikä ihon läpi, mutta sillä tekniikalla olisi jouduttu painamaan hyvin kovalla voimalla hiiren selkää vasten ja samalla olisi väistämättä aiheutettu vammoja ihon alla oleviin lihaksiin ja lihaskalvoihin. Epätarkoituksenmukaisten vammojen aiheuttaminen olisi aiheuttanut koe-eläimille ylimääräistä kärsimystä ja olisi ollut luonnollisesti vastoin koe-eläintöiden eettisiä periaatteita.

Haavat tehtiin asettelemalla biopsiainstrumenttia pöytätasolla vatsallaan makaavan hiiren selkää vasten. Asettelen yhteydessä ihoa ei kiristetty vaan haavat pyrittiin tekemään niin sanotusti luonnollisessa tilassa olevaan ihoon. Hiiren ihon elastisuuden ja liikkuvuuden vuoksi kiristämällä fiksoituun ihoon tehdyistä haavoista olisi tullut hyvin vaihtelevan kokoisia. Biopsiainstrumenttia painettiin melko voimakkaasti hiiren selkää vasten tehden samalla pientä pyöritysliikettä. Tällä saatiin aikaan suurelta osin pinnallinen, mutta usein myös pieneltä osin koko ihon paksuinen pyöreä haava. Haava toimi ääriiviivana, kun ihopala lopulta poistettiin saksilla leikkaamalla. Saksilla leikkaamalla pienen ihopalan ääriviivojen noudattaminen oli haastavaa, mikä myös jonkin verran aiheutti

vaihtelevuutta haavojen koossa. Koon vaihtelua käsitellään tarkemmin Tilastollinen testaus ja tulokset -osiossa.

Toimenpiteen yhteydessä jokainen hiiri korvamerkittiin seurantaan varten hiirten sekoittumisen ehkäisemiseksi. Toimenpiteen jälkeen hiiret valokuvattiin. Suurin osa hiiristä valokuvattiin päivittäin dietyylieetteri-tainnutuksen avulla.

Valokuvaamiseen käytettiin tavallista digitaalikameraa. Valokuvaan kuvattavan hiiren vierelle laitettiin hiiren tunnistetiedot, tieto leikkauksen jälkeisestä päivästä ja 2 x 2 cm:n kontrollineliö. Haavojen pinta-alat määritettiin vertaamalla niitä kontrollineliöön, ja käyttämällä samaa kontrollia saatiin eri kuvista tehdyt määritykset keskenään vertailukelpoisiksi. Haavojen pinta-alamääritykset tehtiin ImageJ-ohjelmalla vapaalla kädellä piirrettävän pinta-alamääritystoiminnon avulla.

Koehiiret lopetettiin hiilidioksidikammiossa suunniteltuina toimenpiteen jälkeisinä tarkastelupäivinä. Lopetetuista hiiristä otettiin pala hännästä DNA-näytteeksi genotyypitystä varten hiiren genotyypin varmistamiseksi.

Genotyypitystulosten perusteella tunnisteet ja hiiret pysyivät eläinkokeiden ajan järjestyksessä eikä sekoittumista päässyt tapahtumaan. Yhden hiiren kaikki haavakudosnäytteet irrotettiin selästä kirurgisesti yhtenä iho- ja ihonalaiskudosblokkina. Kudosblokit laitettiin yön yli 4-asteiseen viileäkaappiin fiksoitumaan 4-prosenttiseen paraformaldehydiliuokseen (PFA). PFA-fiksaation jälkeen kudokset lioteltiin yhteensä 30 minuutin ajan 1-kertaisessa fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa (1 x PBS, phosphate buffered saline). Pesun jälkeen haavat halkaistiin keskeltä ylä-ala -suunnassa haavan keskisagittaalisen kudokset varten. Haavapuoliskot laitettiin kudokset kaseteissa 4-asteiseen viileäkaappiin 70-prosenttiseen etanoliliuokseen odottamaan valamista parafiiniblokkiin. Parafiiniblokissa haavan puolikkaat pyrittiin asettelemaan vierekkäin. Parafiiniin valetut haavanäytteet leikattiin ja lasit värjättiin hematoksyliini-eosiini -värjäyksellä.

Värjätty näytelasit kuvattiin määrittä varten digitaalikuviksi ScanScope XT® -näytelasiskannerilla (Järvinen & Ruoslahti 2010). Skannatuista laseista määritykset tehtiin kuvien käsittelyyn suunnitellulla Image Scope viewer® -ohjelmalla. Kudokset määritettiin neljä parametria paranemisen

arvioimiseksi: haavan pinta-ala, koko haavan pituus, haavan re-epitelisoitumattoman osan pituus ja hiiren ihossa olevan panniculus carnosus -lihaskerroksen päiden etäisyys. Mikäli yhden haavan molemmat puoliskot onnistuivat leikkauksessa ja värjäyksessä, niin tilastollista tarkastelua varten kirjattiin molemmista puoliskoista tehtyjen määritysten keskiarvo. Leikkaus- ja värjäystuloksen mukaan mahdollisimman monesta haavasta pyrittiin määrittämään mahdollisimman monta neljästä paranemisparametrissa.

Kaikki valokuvista ja kudospäätteistä tehdyt määritykset koottiin Excel®-taulukko-ohjelmalla. Tilastollista testaamista varten taulukot siirrettiin SPSS16®-tilasto-ohjelmaan tilastollista vertailua varten. Kuvaajien tekemisessä käytettiin molempia edellä mainittuja ohjelmia.

## **4 TILASTOLLINEN VERTAILU JA TULOKSET**

Tutkimusraportissa kaikkien tilastollisten testien tulosten arvioinnissa on käytetty 95 %:n luottamusväliä.

### **4.1 Haavojen pinta-alojen vertailu valokuvista**

Operaatiopäivinä otettujen valokuvien perusteella voidaan todeta, että lähtötilanteessa villityyppien haavat (keskiarvo 0,250 cm<sup>2</sup>) ovat keskimäärin 1,6 % suurempia kuin R-Ras-poistogeenisten hiirten haavat (keskiarvo 0,246 cm<sup>2</sup>). Ero ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevä ( $p = 0,43$ ). Molempien genotyyppien havaintojen jakaumat noudattavat normaalijakaumaa, joten operaatiopäivän tilastollinen testaus tehtiin riippumattomien otosten t-testillä. Haavojen pinta-alan hajonta on jo lähtötilanteessa suuri, mutta kuitenkin yhtä suurta molemmissa ryhmissä (kuvaaja 4.1.1). Hajonta johtuu suurelta osin kuvattavan pinnan epätasaisuudesta. Valokuvauksessa kamera on suunnattu hiiren selän keskiviivaan, minkä vuoksi käytännössä kaikki haavat ovat enemmän tai vähemmän kuvautuneet viistosta kulmasta. Kuvaustavan vuoksi valokuvasta

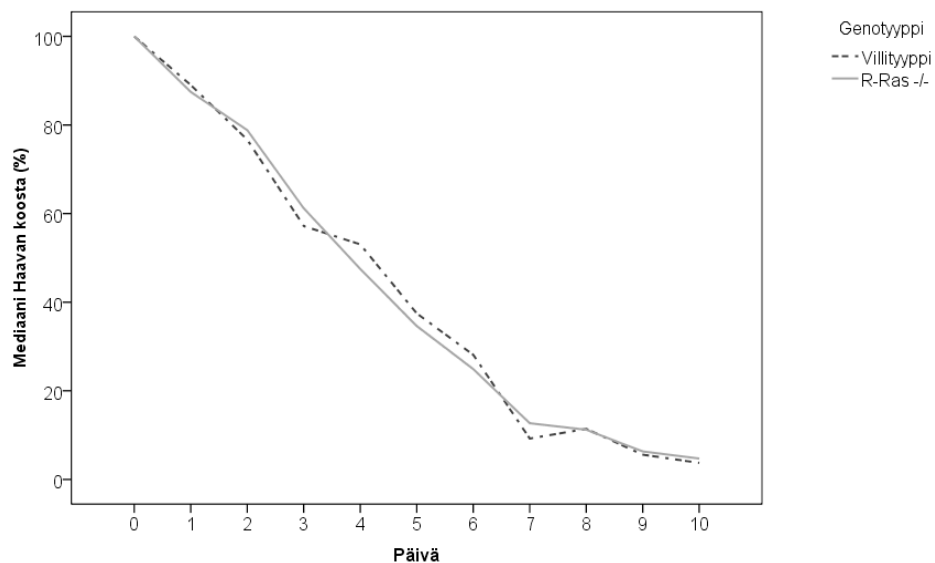
määritetty pinta-ala on jonkin verran todellista pienempi. Toinen hajontaa aiheuttanut tekijä on menetelmät-osiossa kuvatut haasteet tehdä ihohaavoista täsmälleen samankokoisia. Haavojen tekemiseen ja käytettyihin kuvausmenetelmiin liittyy heikkouksia, jotka lisäävät merkittävästi haavojen koon vaihtelua. Toisaalta heikkoudet kohtelevat molempia havaintoryhmiä samalla tavalla. Voidaan siten olettaa, etteivät nämä menetelmiin liittyvät heikkoudet vääristä tutkimuksen tuloksia. Kun haavat ovat yhtä suuria lähtötilanteessa, sekä valokuvista että kudoksenäytteistä tehtävä vertailu on mielekästä myös toimenpiteen jälkeisinä päivinä.



**Kuvaaja 4.1.1** Histogrammikuvaajat haavojen pinta-aloista leikkauspäivänä molemmilta genotyypeiltä. Histogrammin keskellä olevan laatikon sisällä oleva viiva kuvaa haavan pinta-alan mediaaniarvoa. Laatikon sisään jää 50 % havainnoista ja laatikon ylä- ja alapuolella oleville janoille asettuu kummallekin puolelle 25 % havainnoista. Haavojen pinta-alat ja pinta-alojen vaihtelu on histogrammien perusteella yhtä suurta R-Ras-poistogeenisillä hiirillä ja villityypeillä. Pinta-alojen vaihteluväli on laaja; suurimpien haavojen pinta-ala on kolminkertainen verrattuna pienimpiin haavoihin.

Havaintojen lukumäärä tarkastelupäivien edetessä vähenee, minkä vuoksi valokuvista määritettyjen pinta-alojen tarkastelu on rajattu kymmenenteen operaation jälkeiseen päivään. Toisaalta myös kymmenennen päivän jälkeen haavan pinta-alan määrittäminen valokuvista ei enää luotettavasti onnistunut tavallisen digitaalikameran tarkkuuksilla ja ilman erityisiä valokuvausolosuhteita.

Haavojen pinta-alojen jakaumat eivät kaikkina tarkastelupäivinä täytä normaalijakauman ehtoja, minkä vuoksi tilastollinen tarkastelu tehtiin kaikkina päivinä epäparametrisella Mann-Whitney U -testillä. Mann-Whitney U -testillä tarkastellaan keskiarvojen sijaan mediaaniarvojen yhtäsuuruutta. Eri päivinä tehdyssä pinta-alojen tarkastelussa ei käytetty haavan koon absoluuttisia arvoja vaan kunkin hiiren haavan kokoa verrattiin toimenpidepäivän haavan kokoon siten, että toimenpidepäivän haavan koko sai arvon 100 %. Pinta-alojen mediaanikuvaajassa (kuvaaja 4.1.2) villityyppien ja poistogeenisten hiirten käyrät osuvat hyvin päällekkäin, minkä perusteella paranemisnopeudessa ei ole merkittävää eroa tarkasteluryhmien välillä. Päällekkäiset käyrät viittaavat myös siihen, että paranemistapa on samanlaista ryhmien välillä haavan paranemisen eri vaiheissa. Myöskään tilastollisessa testauksessa ei tule tilastollisesti merkitsevää eroa minään päivänä. Haavakuvien perusteella villityyppien ja R-Ras-poistogeenisten hiirten haavojen paranemisnopeudessa tai paranemistavassa ei ole eroa.



**Kuvaaja 4.1.2** Kuvaajassa on piirrettynä haavan prosentuaalisen mediaanikoon muutos ajan funktiona. Käyrät kulkevat koko ajan lähes päällekkäin, mikä viittaa vahvasti siihen, ettei paranemistavoissa ole eroa.

## 4.2 Histologinen tarkastelu

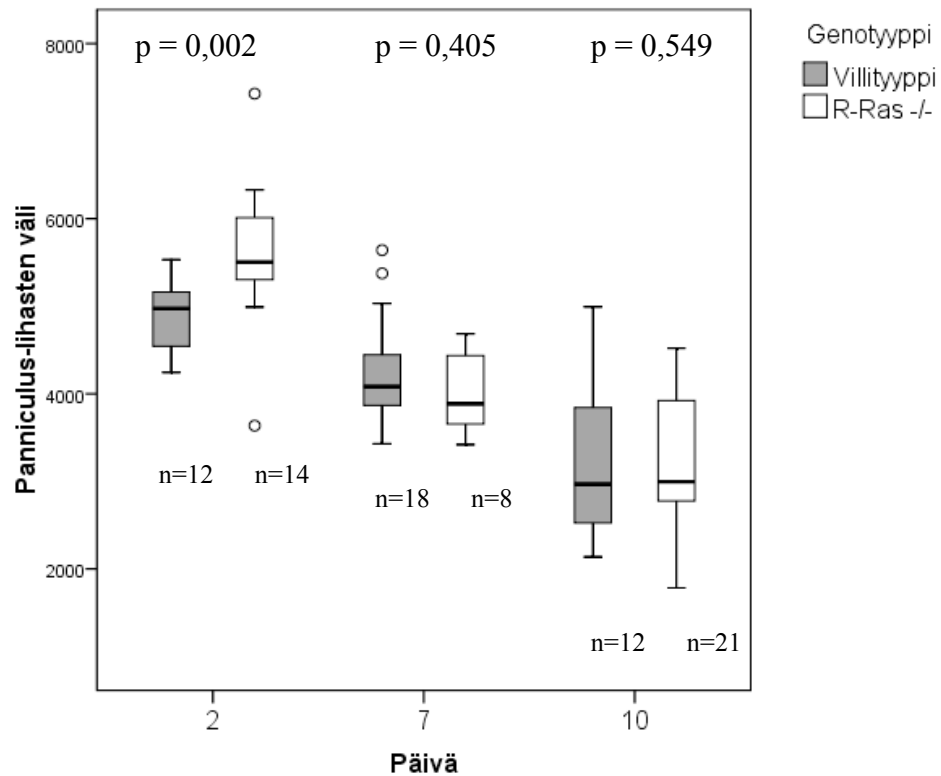
Valmiiksi saadun aineiston pienen koon vuoksi mistään paranemisparametrista ei pystytty tekemään vertailuja kaikissa tarkastelupisteissä. Tehdyissä vertailuissa

havaintojen määrä on pieni ja lisäksi määritysten hajonta on suuri, minkä vuoksi tähän raporttiin tehtyjä vertailuja täytyy pitää vain suuntaa antavina.

Kudosnäytteistä määritettyjen parametrien erojen kaikki tilastollinen testaaminen tehtiin epäparametrisella Mann-Whitney U -testillä havaintojen pienen määrän vuoksi.

#### 4.2.1 Panniculus carnosum -lihasten väli

Havaintojen riittämättömyyden ja epätasaisen jakautumisen vuoksi tilastollinen tarkastelu pystyttiin tekemään vain kolmessa tarkastelupisteessä: toisena, seitsemäntenä ja kymmenentenä toimenpiteen jälkeisenä päivänä (kuvaaja 4.2.1). Toisena päivänä villityypeillä panniculus-lihasten väli on keskimäärin 9,6 % pienempi kuin R-Ras-poistogeenisillä hiirillä, ja ero on tilastollisesti merkitsevä ( $p = 0,002$ ). Ero viittaa villityyppien panniculus-lihaksen nopeampaan aktivaatioon ja supistukseen paranemisen alkuvaiheessa. Kuitenkaan eroa ei ole havaittavissa enää seitsemäntenä ja kymmenentenä operaation jälkeisenä päivänä (kuvaaja 4.2.1).



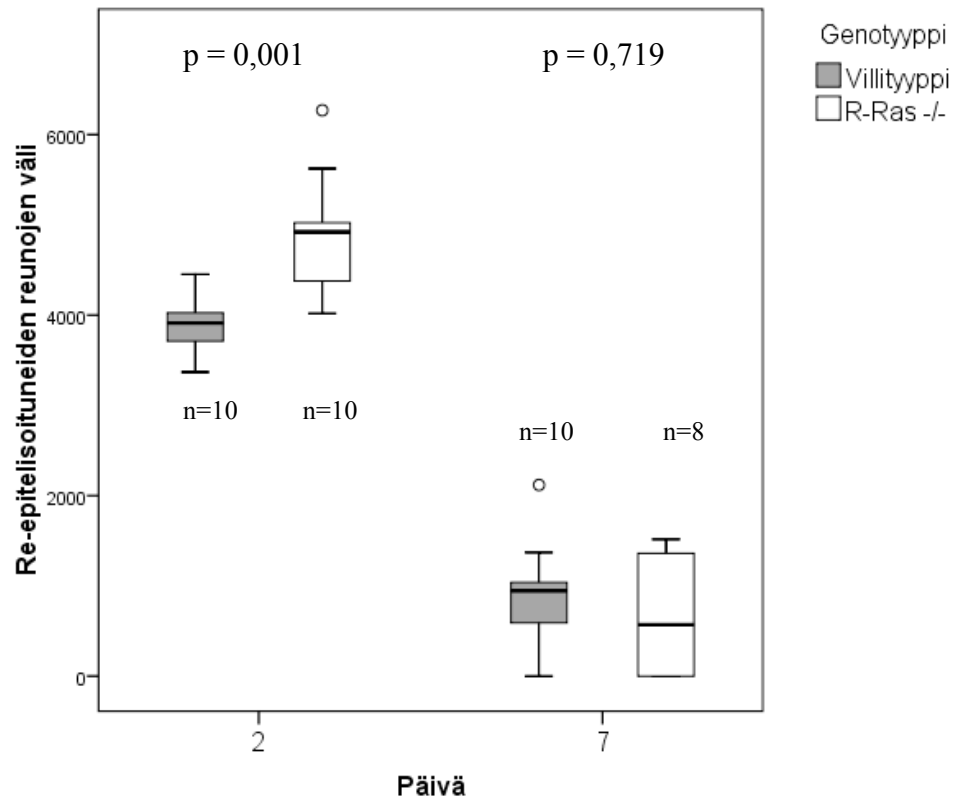
**Kuvaaja 4.2.1** Kuvaajassa on histogrammikuvaajat kummankin genotyypin panniculus-lihasten välistä eri tarkastelupäivinä. Histogrammeihin on liitetty havaintojen lukumäärät ja tarkastelupäivän tilastollisen testin p-arvo. Havaintojen määrä on pieni verrattuna siihen, että jokaiseen vertailuryhmään oli vähimmäistavoitteena saada 36 havaintoa molemmista genotyypistä. Toisena



operaation jälkeisenä päivänä saatiin esiin tilastollisesti merkitsevä ero, mutta havaintojen määrä molemmissa genotyypissä on vain kolmannes tavoitellusta määrästä.

#### 4.2.2 Re-epitelisaation väli

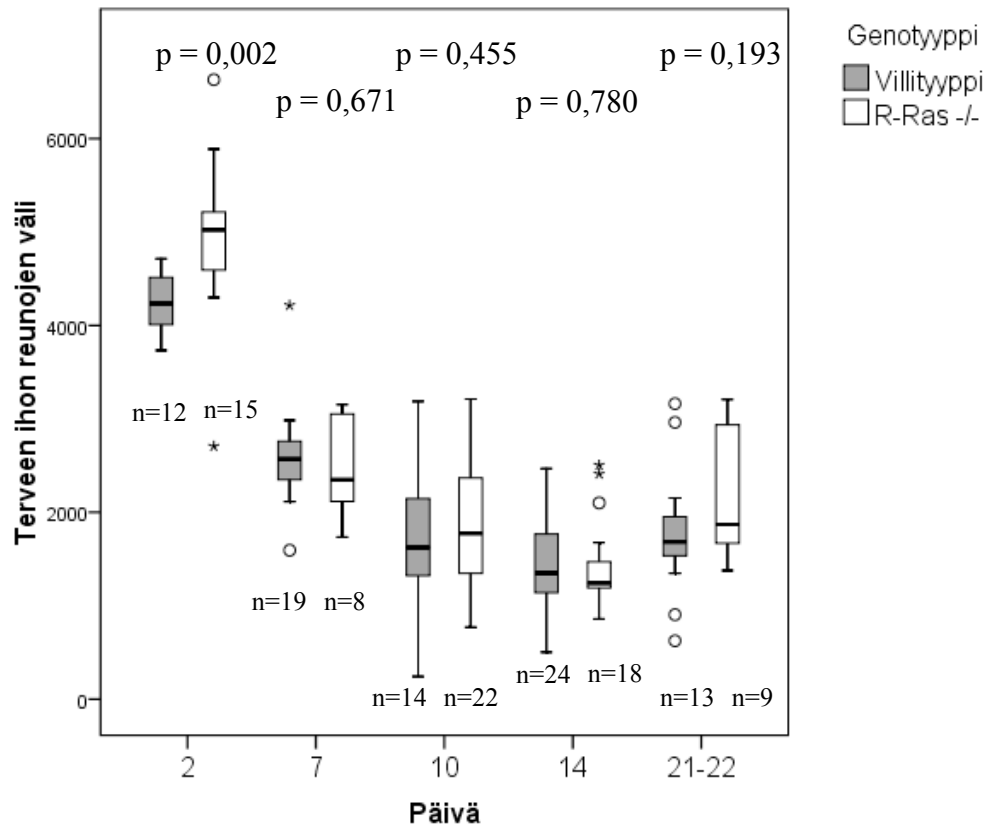
Haavan reunojen re-epitelisoituneiden reunojen välin tarkastelussa havainnot riittivät tilastollisen vertailun tekemiseen vain toisena ja seitsemäntenä toimenpiteen jälkeisenä päivänä (kuvaaja 4.2.2). Toisena operaation jälkeisenä päivänä villityyppien haavojen re-epitelisoituneiden reunojen väli on keskimäärin 20,5 % lyhyempi kuin R-Ras-poistogeenisillä hiirillä ja, ero on tilastollisesti merkitsevä ( $p = 0,001$ ). Seitsemäntenä toimenpiteen jälkeisenä päivänä ero on päinvastaiseen suuntaan 39,6 %, mutta ero ei ole tilastollisesti merkitsevä. Molemmissa tarkastelupisteissä havaintojen määrä on alle kolmannes tavoitellusta 36 havainnon vähimmäistavoitemäärästä (kuvaaja 4.2.2).



Kuvaaja 4.2.2 Kuvaajassa on histogrammikuvaajat kummankin genotyypin re-epitelisoituneiden reunojen välistä kahtena tarkastelupäivänä. Histogrammeihin on liitetty havaintojen lukumäärät ja tarkastelupäivän tilastollisen testin p-arvo. Re-epitelisoituneiden haavanreunojen väli on lyhyempi villityypeillä toisena toimenpiteen jälkeisenä päivänä, ja ero on tilastollisesti merkitsevä. Seitsemäntenä operaation jälkeisenä päivänä ero on päinvastainen, mutta ero ei ole tilastollisesti merkitsevä. Eron suunnan vaihtumisen syystä ei ole mielekästä tehdä pitkälle vieviä arvioita havaintojen pienen määrän vuoksi.

### 4.2.3 Terveen ihon reunojen väli

Terveen ihon reunojen väliä tarkasteltiin muissa tarkastelupisteissä paitsi viidentenä leikkauksen jälkeisenä päivänä. Toisena leikkauksen jälkeisenä päivänä villityyppien terveen ihon reunojen väli on keskimäärin 15,7 % lyhyempi kuin R-Ras-poistogeenisten hiirten, ja ero on tilastollisesti merkitsevä ( $p = 0,002$ ). Muissa tarkastelupisteissä erot ovat pieniä ja tilastollisesti merkitsemättömiä (kuvaaja 4.2.3). Eron suunta myös vaihtelee eri tarkastelupisteissä.

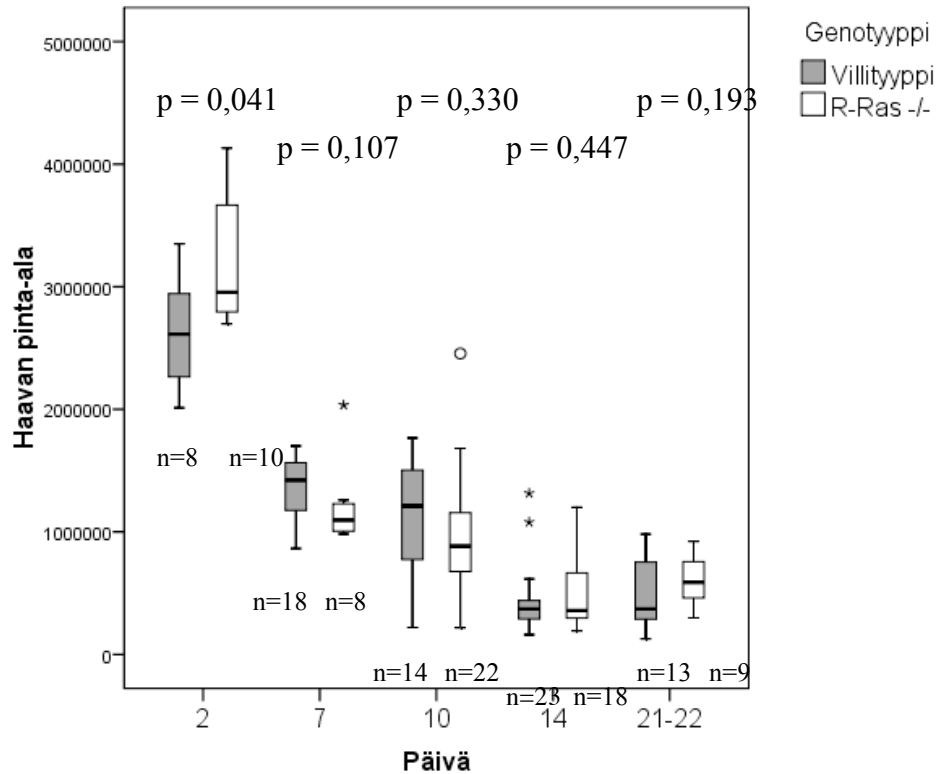


Kuvaaja 4.2.3 Kuvaajassa on histogrammikuvaajat kummankin genotyypin terveen ihon reunojen välistä eri tarkastelupäivinä. Histogrammeihin on liitetty havaintojen lukumäärät ja tarkastelupäivän tilastollisen testin p-arvo. Toisena operaation jälkeisenä päivänä villityypeillä haavan ihon reunat ovat lähempänä kuin R-Ras-poistogeenisillä hiirillä, ja ero on tilastollisesti merkitsevä. Muissa tarkastelupäivissä eroa ei kuitenkaan ole havaittavissa.

### 4.2.4 Haavan pinta-ala

Haavan pinta-aloja vertailtiin muissa tarkastelupisteissä paitsi viidentenä leikkauksen jälkeisenä päivänä. Villityyppien haavojen pinta-alat ovat keskimäärin 11,6 % pienempiä kuin R-Ras-poistogeenisten hiirten haavat toisena

leikkauksen jälkeisenä päivänä, ja ero on tilastollisesti merkitsevä ( $p = 0,041$ ). Muissa tarkastelupisteissä tilastollisesti merkitsevää eroa ei ole, ja erojen suunnat vaihtelevat (kuvaaja 4.2.4).



**Kuvaaja 4.2.4** Kuvaajassa on histogrammikuvaajat eri tarkastelupäivinä kummankin genotyypin kudოსleikkeistä määritetystä haavan pinta-alasta. Histogrammeihin on liitetty havaintojen lukumäärät ja tarkastelupäivän tilastollisen testin p-arvo. Muiden histologisten paranemisparametrien tapaan villityyppien haavojen pinta-ala on keskimäärin pienempi kuin R-Ras-poistogeenisten hiirten toisena leikkauksen jälkeisenä päivänä, ja ero on tilastollisesti merkitsevä. Muissa tarkastelupisteissä erojen suunta vaihtelee eivätkä erot ole tilastollisesti merkitseviä.

## 5 POHDINTA

Tutkimusraportin päätuloksena voidaan pitää valokuvien perusteella tehtyä haavojen pinta-alojen vertailua eri päivinä. Haavakuvista saatu aineisto on kooltaan riittävä tilastolliseen vertailuun, ja tuloksia voidaan pitää melko luotettavina. Valokuvien perusteella tehdyssä vertailussa haavat sulkeutuvat molemmassa ryhmässä samalla tavalla ja nopeudella. Tutkimusraportissa paranemisen histologinen tarkastelu jää selvästi puutteelliseksi aineiston pienen koon vuoksi. Histologisessa tarkastelussa toisena paranemisen jälkeisenä päivänä villityyppien haavat ovat pienempiä kaikilla neljällä paranemisparametrilla mitattuna, ja erot ovat myös tilastollisesti merkitseviä. Tulos on ristiriidassa

valokuvien perusteella tehdyn vertailun kanssa. Histologisessa tarkastelussa havaintojen määrä on kuitenkin niin pieni, että ilmeisesti sattuma on tuonut esiin tilastollisesti merkitsevän eron, jota todennäköisesti todellisuudessa ei ole. Muissa tarkastelupisteissä tilastollisesti merkitseviä eroja ei esiintynyt, ja erojen suunta paranemisessa ei noudattanut minkäänlaista selvää ja johdonmukaista trendiä kummankaan genotyypin eduksi. Histologisesta tarkastelusta ei aineiston rajoitteiden vuoksi ole mielekäästä tehdä kovin pitkälle vieviä johtopäätelmiä. Yhteenvedona tuloksista voidaan todeta, että tämän tutkimuksen perusteella R-Ras-geenillä ei näyttäisi olevan merkitystä hiiren ihohaavan paranemisessa.

Mikäli histologisista näytteistä saamamme alustavat tulokset kertovat todellisesta erosta haavan paranemisessa, ero viittaa siihen, että R-Ras-geenin puuttuessa sileät lihassolut eivät aktivoitu normaalisti, minkä vuoksi hiiren ihon panniculus carnosus -lihaksen supistuminen on tavallista heikompaa ja edelleen haavan supistuminen jää puutteelliseksi R-Ras-poistogeenisellä eläimellä. Tämä toisena leikkauksenjälkeisenä päivänä havaittu ero tasoittuu kuitenkin myöhemmissä aikapisteissä, mikä viittaa siihen, että R-Ras -geenin puuttuessa epidermisen keratinosyytit ja dermisen fibroblastit jakautuvat hivenen nopeammin kuin normaalit solut. Ihon solujen nopeutunut jakautuminen johtaa siihen, että toisen vuorokauden kohdalla havaittu ero korjaantuu myöhemmissä tarkastelupisteissä. Tämä tutkimustulos rohkaisee myöhempiin analyysiin, joissa pyrimme vielä selvittämään proliferaatiomerkereiden avulla solujen jakaantumisenopeutta ja soluviljely-kokeilla selvittämään solujen migraatiotaipumuksen. Kudosnäytteiden immunohistokemiallisten värjäysten avulla olisi myös mielenkiintoista selvittää, millä alueilla ja missä soluissa paranevassa haavassa R-Ras-proteiinia syntetisoidaan. R-Ras-poistogeenisen hiiren haavan paranemistaipumuksen fenotyypin selvittäminen vaatii perusteellisen tutkimisen myös solutasolla.

Tutkimusraporttia varten histologinen aineisto saatiin vain osittain valmiiksi. Merkittävä osa tehdyistä leikkeistä ja värjäyksistä epäonnistui, mikä vähensi havaintojen määrää histologisessa tarkastelussa. Haavaleikkeistä paranemisparametreja määritettiin vain ehjistä ja selkeästi tulkittavista haavoista. Joissakin näytteissä kudospalat eivät olleet kokonaan leikkautuneet näytelasille. Todennäköisesti ongelmana on ollut liian pinnallinen höyläys parafiiniblokista, johon haavanpuoliskot valettiin. Liian pinnallisessa höyläyksessä kaikki

kudospalat eivät ole täysin yltäneet höyläyspinnalle vaan ovat jääneet osittain parafiinin sisään. Osa kokonaan leikatuista haavoista hajosi osittain näytteiden valmistuksen aikana siten, että näytteistä haavan reuna-alueilta puuttui kudospaloja. Myös värjäys oli joissakin näytteissä liian tumma, minkä vuoksi määritettäviä rajoja ei pystynyt luotettavasti erottamaan. Näytteiden uudelleen tekeminen ja analysointi ei tutkimusraporttia varten ollut mahdollista aikarajoitteiden vuoksi.

Tutkimusprojektin alussa haasteita tuotti toimivien työtapojen etsiminen ja harjoittelu. Ensimmäiset hiirierät jouduttiin rajaamaan aineiston ulkopuolelle, koska työtavat muuttuivat projektin alkuvaiheessa. Alkuvaiheessa hiirille tehtiin kaksi haavaa, mutta haavamäärä kasvatettiin kuuteen tutkimuksen aikana pääosin eläintöiden työläyden vuoksi. Haavamäärän kasvattamiseen vaikutti myös se, että käytettävissä oli rajallinen määrä koe-eläimiä ja rajalliset tilat koe-eläinkantojen ylläpitoon. Osa aineistosta koostuu kahden haavan hiiristä, ja osalle tehtiin kuusi haavaa. Yhdelle hiirelle tehtyjen haavojen määrän vaikutuksesta haavan kokoon tai paranemisnopeuteen ei ole tehty tilastollista tarkastelua, joten vaikutuksen arviointi jää osittain arvailun varaan. Mahdollisia eroja tasoittaa kuitenkin se, että sekä kahden että kuuden haavan hiiriä on kaikissa tarkasteluryhmissä.

Tutkimusprojektin alussa ensimmäiset hiiret nukutettiin injektionukutuksella haavojen valokuvauksen ajaksi, mutta menetelmä osoittautui ongelmalliseksi, kun osa haavoista repesi uudelleen auki nukuttamisen yhteydessä. Lopulta kuvaamista varten hiiret päädyttiin tainnuttamaan hetkellisesti dietyylieetterihöyryllä, jolloin nukutettavaa hiirtä pystyttiin käsittelemään huomattavasti hellävaraisemmin eivätkä haavat sen jälkeen ainakaan kuvauksen yhteydessä tapahtuneen käsittelyn vuoksi avautuneet. Koesarjojen aikana havaittiin, että osa samaan häkkiin laitetuista hiiristä tappeli keskenään ja puri toistensa haavoja auki. Lopulta jokainen hiiri laitettiin omaan häkkiin operaation jälkeiseksi ajaksi. Haavakuvien perusteella kaikki hiiret, joiden haavat olivat tappelusta vaurioituneet, rajattiin aineiston ulkopuolelle.

Tutkimuksen saavutuksina voidaan pitää tutkimusryhmän työtapojen kehittämistä hiirillä tehtävää haavatutkimusta varten. Tutkimusaineiston perusteella on mahdollista myöhemmin tehdä voimalaskelmia tarvittavaa aineiston kokoa

arvioitaessa, jos tässä tutkimuksessa käytettyjä työtapoja hyödynnetään myöhemmissä tutkimuksissa. Aineiston pienen koon asettamien rajoitteiden vuoksi ei tämän tutkimuksen perusteella voida vielä lopullisesti sanoa, onko R-Ras-geenillä vaikutusta hiiren ihoahaavan paranemiseen, mutta tuloksemme viittaavat vahvasti siihen, että R-Ras-geenillä ei ole merkittävää osuutta paranemisprosessissa. Paranemisen histologinen tarkastelu on jatkossa tarkoitus tehdä uudestaan, kun riittävän suuri aineisto saadaan valmiiksi.

## LÄHTEET

1. Ada-Nguema A S, Xenias H ym. The small GTPase R-Ras regulates organization of actin and drives membrane protrusions through the activity of PLC $\epsilon$ . *Journal of Cell Science* 2006; 119: 1307–19.
2. Ahmadian M R, Zor T ym. Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7065–70.
3. Hughes P E ym. Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf- initiated MAP kinase pathway. *Cell* 1997; 88: 521–30.
4. Järvinen TA, Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 21671–6.
5. Komatsu M, Ruoslahti E. R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. *Nature Medicine* 2005; 12: 1346–50.
6. Krooninen alaraajaava (online). Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja ja Suomen Ihotautilääkäriyhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2007. (Luettu 7.11.2010). Saatavissa <http://www.terveysportti.fi/xmedia/hoi/hoi50058.pdf>
7. Oinuma I, Katoh H ja Negishi M. R-Ras controls axon specification upstream of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  through integrin-linked kinase. *Journal of biological chemistry* 2006; 282: 303–18.
8. Ramocki M B ym. Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho does not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17: 3547–55.
9. Suzuki J, Kaziro Y, Koide H. Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras. *Oncogene* 2000; 19: 1138–46.
10. Zhang Z, Vuori K, Wang H, Reed J C, Ruoslahti E. Integrin activation by R-ras. *Cell* 1996; 85: 61–69.
11. Wennerberg K, Rossman K L, Der C J. The Ras Superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 2005; 118: 843–46.