

**Ateroskleroottisen plakin angiogeneesin kuvantaminen
– $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin kohdentuvan ^{99m}Tc -leimatun peptidin prekliinisiä
tutkimuksia**

**Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Terveyden biotieteet
Lääkekehitys
Lokakuu 2013**

Mia Ståhle

**Anne Roivainen
Johanna Silvola
PET-keskus, Turku**

Ateroskleroottisen plakin angiogeneesin kuvantaminen – $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin kohdentuvan ^{99m}Tc -leimatun peptidin prekliinisiä tutkimuksia

Stähle Mia

Terveyden biotieteet, lääkekehitys

Professori Anne Roivainen ja FT Johanna Silvola, PET-keskus, TY

Sepelvaltimotautimuutoksista erityisesti ateroskleroottisten plakkien morfologialla on tärkeä merkitys taudin ennusteen ja kliinisten komplikaatioiden kehittymisen kannalta. Suurin osa sydäninfarkteista aiheutuu hauraan plakin repeytymisestä ja verihyytymän muodostumisesta, joka tukkii sepelvaltimon. Hauraan plakin tunnuspiirteitä ovat muun muassa suuri rasvaydin, ohut sidekudoskatto, tulehdus ja uudisverisuonien muodostuminen eli angiogeneesi. Tällä hetkellä kliinisessä käytössä on menetelmiä, joilla voidaan lähinnä arvioida sepelvaltimotautimuutosten aiheuttamaa suonien ahtauma-astetta. Kehitteillä on uusia molekyylikuvantamismenetelmiä, joiden avulla voitaisiin tunnistaa hauraat plakit mahdollisimman aikaisessa vaiheessa. Mahdollisia menetelmiä ovat positroniemission tomografia (PET) ja yksifotoniemission tomografia (gammakuvaus), jotka ovat kajoamattomia ja herkkiä isotooppikuvantamismenetelmiä. Tämän erikoistyön tarkoituksena oli selvittää uuden gammakuvausmerkkiaineen soveltuvuutta ateroskleroottisten plakkien angiogeneesin kuvantamiseen ja plakkien haurauden arvioimiseen ateroskleroosin hiirimallissa.

Työssä käytettävä merkkiaine oli teknetium-99m leimattu synteettinen peptidi (^{99m}Tc -Maraciclacatidi), joka tunnistaa alfa-v-beeta-3-integriiniin ($\alpha_v\beta_3$). $\alpha_v\beta_3$ -integriini on solun pinnan glykoproteiini reseptori, joka osallistuu uudisverisuonien muodostukseen myös ateroskleroottisissa plakeissa. Ateroskleroottisessa plakissa $\alpha_v\beta_3$ -integriiniä esiintyy makrofageissa ja endoteelisoluissa. Koe-eläiminä käytettiin LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-poistogeenisiä hiiriä, jotka kehittävät sekä spontaanisti että varsinkin rasvadieetillä indusoituna tulehtuneita plakkeja valtimoihin, erityisesti aortankaareen. Kontrollieläiminä käytettiin C57BL/6N-kannan terveitä hiiriä.

Nuketetun hiiren häntälaskimoon injisoitiin ^{99m}Tc -Maraciclacatidi. Tunti injektion jälkeen hiiret lopetettiin ja radioaktiivisuuskertymä eri kudoksissa (kokokehajaukauma) mitattiin gammalaskijalla. Aortta ja kudokset (lihaksen) leikattiin rinnakkaisiksi jääleikkeiksi ja merkkiaineen kertyminen plakkeihin ja terveeseen suonen seinämään tutkittiin tarkemmin aorttaan keskittyvällä *ex vivo* -autoradiografialla. Autoradiografian jälkeen jääleikkeet värjättiin histologisilla ja immunohistokemiallisilla menetelmillä, joista voitiin tarkastella plakin morfologiaa ja tulehdusmerkkiaineita (makrofagit, anti-Mac-3-vasta-aine).

Kokokehajakaumamittausten perusteella ^{99m}Tc -Maraciclacatidi-merkkiaine kertyi enemmän ateroskleroottisten hiirien aorttaan kuin terveiden kontrollihiirien aorttaan. Lisäksi tunnin kuluttua injektioista radioaktiivisuutta oli huomattavasti vähemmän verenkierron aortassa, joten merkkiaine saattaisi soveltua *in vivo* -kuvantamiseen. Tarkemman *ex vivo* -autoradiografia-analyysin perusteella merkkiaine kertyi ateroskleroottisiin plakkeihin, mutta myös suonen seinämään sekä ateroskleroottisilla hiirillä että kontrollihiirillä. Lisätutkimuksia ^{99m}Tc -Maraciclacatidin soveltuvuudesta ateroskleroosin *in vivo* -kuvantamiseen ja plakkien haurauden arvioimiseen tarvitaan vielä muilla eläinmalleilla.

Asiasanat: gammakuvaus, hauras plakki, angiogeneesi, $\alpha_v\beta_3$ -integriini

SISÄLLYS

LYHENTEET	3
1 JOHDANTO	4
2 ATEROSKLEROOSI	6
2.1 Ateroskleroosi kroonisena tulehdussairautena	6
2.2 Ateroskleroottisen plakin kehittyminen	8
3 ATEROSKLEROOSIN HIIRIMALLIT	12
3.1 ApoE ^{-/-} - ja LDLR ^{-/-} -hiirimalli.....	12
3.2 LDLR ^{-/-} -ApoB ^{100/100} - ja IGF-II/ LDLR ^{-/-} -ApoB ^{100/100} -hiirimalli.....	13
4 UUDISVERISUONITUS ELI ANGIOGENEESI.....	15
4.1 Uudisverisuonituksen mekanismit.....	15
4.2 $\alpha_v\beta_3$ -integroini	16
4.3 Uudisverisuonitus ja $\alpha_v\beta_3$ -integroini ateroskleroosissa.....	18
5 ATEROSKLEROOSIN MOLEKYYLKUVANTAMINEN	21
5.1 Gamma- ja PET-kuvantaminen	21
5.2 Kuvantamiskohteita ateroskleroosissa.....	24
5.3 Uudisverisuonituksen ja $\alpha_v\beta_3$ -integroinin kuvantaminen	28
TUTKIELMAN KOKEELLINEN OSA.....	30
6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	31
6.1 Maraciclacidi.....	31
6.2 Merkkiaineen leimaus	31
6.3 Tutkimuseläimet.....	32
6.4 Radioaktiivisuuden kokokehojakaumatutkimukset.....	33
6.5 Aortan autoradiografiatutkimukset.....	34
6.6 Immunohistokemialliset tutkimukset	35
6.7 Tilastollinen analysointi	36
7 TULOKSET	37

7.1	Radioaktiivisuuden kokokehojakauma.....	37
7.2	Aortan autoradiografia-analyysi.....	40
7.3	Immunohistokemiallinen analyysi.....	43
8	PÄÄTELMÄT JA POHDINTA.....	45
	LÄHTEET.....	52

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä.

LYHENTEET

AHA	American Heart Association
Ang 1	angiotensiini 1
ApoB100	apolipoproteiini B100
ApoE	apolipoproteiini E
BAT	ruskea rasva (engl. brown adipose tissue)
CETP	kolesteryyliesterikuljetusproteiini
ES	alkion kantasolu
FGF	fibroblastikasvutekijä
FH	familiaalinen hyperkolesterolemia
FR	folaattireseptori
HDL	engl. high density lipoprotein
HE	hematoksyliini-eosiini
HIF-1 α	engl. hypoxia-inducible transcription factor-1 α
IGF-II	insuliininkaltainen kasvutekijä-II
IL-8	interleukiini-8
IM-suhde	intima-media-suhde
LDL	engl. low density lipoprotein
LDLR	LDL-reseptori
Mac-3	makrofagien mannoosireseptori
M-CSF	makrofageja stimuloiva tekijä
MMP	soluainesta hajottava entsyymi
oxLDL	hapettunut LDL-kolesteroli
PBR	perifeerinen bentsodiatsepiinireseptori
PDGF	verihiutaleita ohjaava kasvutekijä
PEG	polyetyleeniglykoli
PET	positroniemissiotomografia
PSL/mm ²	fotostimuloitu luminesenssi / neliömillimetri
RCP	radiokemiallinen puhtaus
RGD	arginiini-glysiini-asparagiinihappo aminohapposekvenssi
ROI	mielenkiintoalue (engl. region of interest)
ROS	reaktiivinen happiradikaali
RT-PCR	engl. reverse transcription polymerase chain reaction
SA	spesifinen radioaktiivisuus
SPECT	gammakuvaus, yksifotoniemissiotomografia
SR	syöjäreseptori
SSTR ₂	somatostatiinireseptorialatyypin 2
TLC	ohutlevykromatografia
TSPO	translokaattoriproteiini
TT	tietokonetomografia
VCAM-1	verisuonen adheesiomolekyyli-1
VEGF	verisuonen endoteelin kasvutekijä
VLDL	engl. very low density lipoprotein
WAT	valkea rasva (engl. white adipose tissue)
%ID/g	injisoidun radioaktiivisuuden prosenttiosuus / kudoksen paino grammoina

1 JOHDANTO

Ateroskleroosi on krooninen suurten ja keskisuurten valtimoiden tulehdussairaus, jonka kehittyminen alkaa jo varhain lapsuudessa (Stary 2000). Ateroskleroosin tyypillisin ilmenemismuoto on sepelvaltimotauti, jossa ateroskleroottiset plakit ahtaavat sepelvaltimoita ja aiheuttavat iskeemiset oireet. Sepelvaltimotauti on maailmanlaajuisesti kasvava ongelma. Pahimmassa tapauksessa hauraan ateroskleroottisen plakin repeytymä ja verihyytymän muodostuminen, joka tukkii sepelvaltimon, aiheuttaa sydäninfarktin. Repeytymisalttiin hauraan plakin löydöksiä ovat muun muassa aktiivinen tulehdus, iso rasvaydin, ohut sidekudoskatto, hapenpuute, uudisverisuonitus eli angiogeneesi, vähän sileälihassoluja ja taipumus verihyytymän muodostumiseen. (Hansson 2005; Libby & Theroux 2005; Luscis 2000; Naghavi ym. 2003)

Ateroskleroosin kehittymisen molekylaarinen tausta tunnetaan jo melko tarkkaan, mutta uusia diagnostisia menetelmiä tarvitaan repeytymisherkkien plakkien tunnistamiseksi. Perinteisillä kuvantamismenetelmillä kuten tietokonetomografialla (TT), ultraäänitutkimuksella ja sepelvaltimoiden varjoainetutkimuksella voidaan paikantaa plakit ja arvioida sepelvaltimoiden ahtauma-astetta, mutta plakkien aktiivisuudesta ei saada tietoa. Isotooppikuvantamismenetelmillä kuten yksifotoniemissiotomografialla (gammakuvaus, engl. single photon emission computed tomography, SPECT) ja positroniemissiotomografialla (PET) voidaan kuvantaa kajoamattomasti molekyylitason muutoksia. Lupaavia kohteita tulehtuneessa ateroskleroottisessa plakissa ovat muun muassa aineenvaihdunta, makrofagien aktiivisuutta, ohjelmoitua solukuolemaa, hapenpuutetta ja uudisverisuonien muodotumista kuvantavat merkkiaineet. (Libby ym. 2010; Riou ym. 2009; Saraste ym. 2009)

Ateroskleroosissa tulehdus ja hapenpuute saattavat olla erityisesti uudisverisuonitusta edistäviä tekijöitä (Khurana ym. 2005). Potilasnäytteistä ja eläinmalleista saadut tutkimustulokset ovat osoittaneet, että pienten verisuonten määrä on lisääntynyt merkittävästi hauraisissa ja repeytyneissä plakeissa. (Moulton ym. 1999 ja 2003; Moreno ym. 2004) $\alpha_v\beta_3$ -integriini on yksi tärkeimmistä uudisverisuonitusta säätelevistä tekijöistä. $\alpha_v\beta_3$ -integriini on solun pinnan glykoproteiinireseptori, jota ilmentetään ateroskleroottisessa plakissa makrofageissa ja endoteelisoluissa. Sen ilmentymisen on

havaittu lisääntyneen potilaiden hauraisissa plakeissa. (Antonov ym. 2004; Virmani ym. 2005).

$\alpha_v\beta_3$ -integriini saattaisi olla lupaava kuvantamiskohde hauraiden plakkien tunnistamiseksi (Beer ym. 2011). Koska potilailla voidaan käyttää vain aiemmin molekyylikuvantamiseen hyväksytyjä merkkiaineita, on uudet merkkiaineet testattava ensin eläinmalleissa. Ateroskleroosin eläinmalleista käytetyimpiä ovat erilaiset hiiri- ja kanimallit (Xiangdong ym. 2011). Tarjolla on monia erilaisia ateroskleroosin hiirimalleja, joiden taudinkuva vastaa suurilta osin ihmisen ateroskleroosia (Mukhopadhyay 2013). Käytetyistä hiirimalleista LDL-reseptorin suhteen poistogeeniset hiiret, jotka ilmentävät vain apolipoproteiini B100:aa ($LDLR^{-/-}$ ApoB^{100/100}) soveltuvat hyvin ateroskleroositutkimuksiin, sillä niiden lipidiprofiili muistuttaa eniten ihmisen lipidiprofiilia. (Powell-Braxton ym. 1998).

Tämän erikoistyön tarkoituksena oli selvittää uuden $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin kohdentuvan gammakuvausmerkkiaineen soveltuvuutta ateroskleroottisten plakkien uudisverisuonituksen kuvantamiseen ja plakkien haurauden arvioimiseen ateroskleroosin $LDLR^{-/-}$ ApoB^{100/100}-hiirimallissa.

2 ATEROSKLEROOSI

2.1 Ateroskleroosi kroonisenä tulehdussairautena

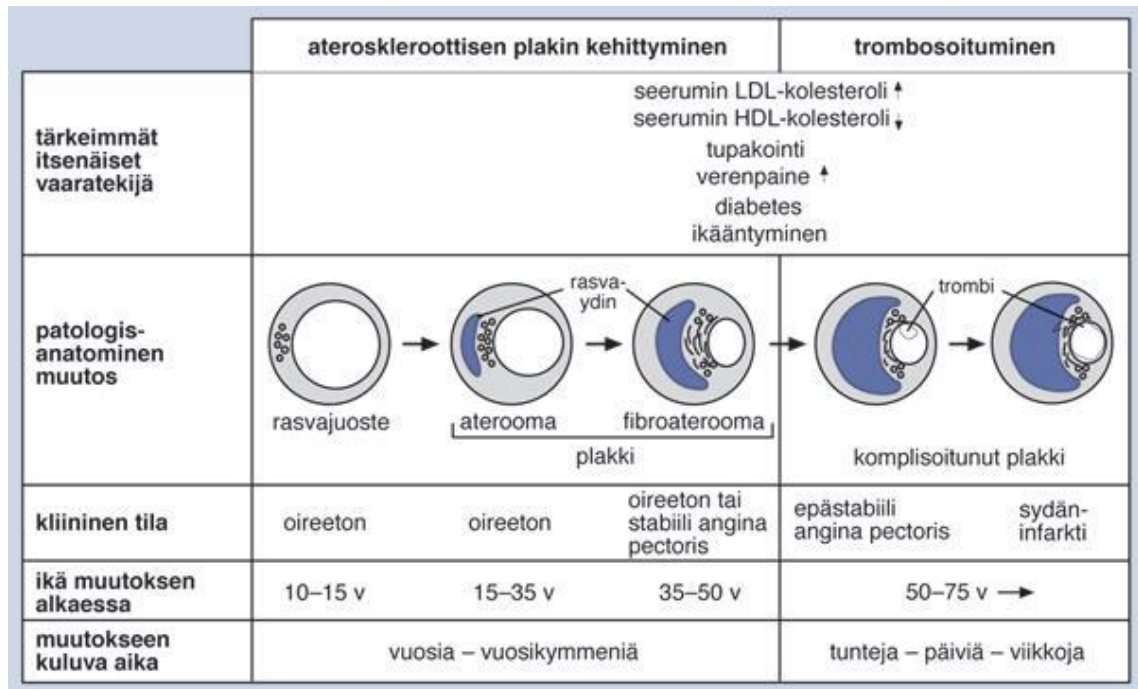
Maailmanlaajuisesti sydän- ja verisuonisairaudet ovat olleet pitkään suurin kuolinsyy kehittyneissä länsimaissa. Viime vuosikymmeninä sydän- ja verisuonitautikuolleisuus on vähentynyt länsimaissa, mutta lisääntynyt erityisesti kehittyvissä maissa. (Hansson 2005; Heikkilä ym. 2008; Naghavi ym. 2003) Sydän- ja verisuonitautikuolleisuudesta noin puolet aiheutuu sepelvaltimotaudista. Pahimpana komplikaationa ateroskleroottisen plakin repeämä ja verihyytymän muodostuminen voi tukkia koko sepelvaltimon ja aiheuttaa akuutin sydäninfarktin tai aivovaltimoissa aivohalvauksen. (Hansson & Hermansson 2011; Heikkilä ym. 2008)

Tärkeimpiä sepelvaltimotaudin riskitekijöitä ovat korkea seerumin LDL-kolesterolipitoisuus (engl. low density lipoprotein), matala HDL-kolesterolipitoisuus (engl. high density lipoprotein), kohonnut verenpaine, tupakointi, diabetes ja lihavuus (*Kuva 1*). Ensisijainen vaaratekijä ateroskleroosin kehittymisen kannalta on seerumin kohonnut LDL-kolesterolipitoisuus, sillä LDL kuljettaa kolesterolia kudoksiin ja myös valtimon seinämään. HDL:n tehtävänä taas on kuljettaa kolesterolia pois valtimon seinämästä, joten matala HDL-kolesterolipitoisuus lisää riskiä ateroskleroosille. (Dahlöf 2010; Heikkilä ym. 2008) Monissa seurantatutkimuksissa on osoitettu, että 10 prosentin alenema LDL-kolesterolipitoisuudessa laskee sydäntautikuolleisuutta 10 % ja sydäntapahtumien ilmaantumista 25 % (Libby & Theroux 2005).

Ateroskleroosin kehittyminen alkaa jo varhain lapsuudessa (*Kuva 1*) (Stary 2000). Uusien tutkimustekniikoiden ja eri eläinmallien avulla on saatu paljon uutta tietoa ateroskleroottisen plakin kehittymisen vaiheista (Lusis 2000). Aikaisemmin ajateltiin, että plakin muodostuminen aiheutuu ainoastaan kolesterolin kertymisestä verisuonen seinämään, mutta nyt ymmärretään, että esimerkiksi tulehduksella on erittäin suuri merkitys ateroskleroosin kehittymisessä (Hansson & Hermansson 2011).

Ateroskleroosi on suurten ja keskisuurten valtimoiden sairaus. Verisuonen seinämä koostuu kolmesta kerroksesta: tunica intimasta eli sisäkerroksesta, tunica mediasta eli keskikerroksesta ja tunica adventitiasta eli ulkokerroksesta. Intima muodostuu elastisista säikeistä, minkä päällä verisuonen sisäpinnalla on yksi endoteelisolukerros. Elastinen

levy (engl. internal elastic lamina) erottaa intiman mediasta. Media muodostuu sileälihassoluista, ja adventitia tukikudoksesta muun muassa fibroblastisoluista. Ateroskleroosi on erityisesti intiman sairaus, mutta valtimon muissa kerroksissa voidaan myös erottaa muutoksia ateroskleroosin kehittymisen aikana. (Heikkilä ym. 2008; Lusia 2000)



Kuva 1. Ateroskleroosin kehittyminen ja riskitekijät. (Kesäniemi & Salomaa 2009)
 Kuvassa on esitetty ateroskleroottisen plakin kehittyminen eri ikävuosina lopulta repeytymisherkäksi plakiksi.

2.2 Ateroskleroottisen plakin kehittyminen

Tämän hetkinen tieto ateroskleroosin kehittymiseen vaikuttavista tulehdusmekanismeista perustuu eläinkokeista ja potilasnäytteistä saatuihin tutkimustuloksiin. Lisäksi on saatavilla kliinistä tietoa sydäninfarktipotilaista ja epidemiologista tietoa seurannassa olevilta sepelvaltimotautipotilailta. (Hansson 2005)

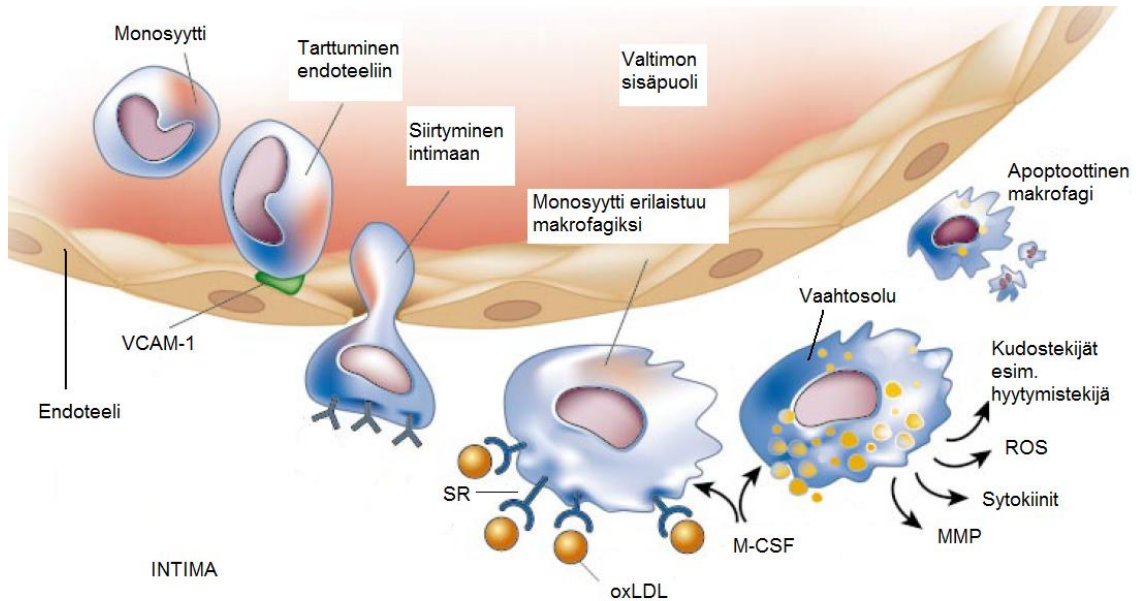
Ateroskleroosissa voidaan erottaa eri kehitysvaiheissa olevia plakkeja (*Kuva 1*). Virmani ja työtoverit (Virmani ym. 2000) ovat luokitelleet plakit morfologialtaan eri kategorioihin perustuen American Heart Association (AHA) tekemään luokitukseen. Ateroskleroosin kehittyminen alkaa tavallisesti intiman paksuuntumisella (engl. intimal thickening), jossa sileälihassoluja kertyy intiman puolelle. (Virmani ym. 2000) Samalla verenkierron kolesterolia sisältäviä LDL-partikkeleita kertyy intimaan. Valtimoiden haaraumakohdat ovat erityisen herkkiä plakin muodostumiselle, sillä endoteeli päästää lävitseen LDL-partikkeleita johtuen endoteelisolujen erilaisesta muodosta ja järjestäytymisestä. Lisäksi verenvirtauksen pyörteisyys haaraumakohdissa lisää endoteelin läpäisevyyttä. (Lusis 2000) LDL-partikkelit jäävät loukkuun (engl. trapped) intimaan, kun LDL-partikkelin pinnalla oleva apolipoproteiini B100 (ApoB100) sitoutuu intiman proteoglykaaneihin. Intimassa LDL-partikkelit ovat herkkiä hapettumisreaktioille, koska antioksidantit eivät pääse kunnolla vaikuttamaan intiman puolella. Hapettunut LDL (oxLDL) aktivoi synnynnäistä immunitteettiä. (Hansson & Hermansson 2011; Moore & Tabas 2011) HDL-kolesterolin tärkeimpiä tehtäviä ovat ylimääräisen LDL:n poiskuljettaminen intimasta perifeerisiin kudoksiin. HDL:llä saattaa olla myös antioksidanttisia vaikutuksia, joilla se pyrkii vähentämään LDL:n hapettumista. Hapettunut LDL voi vähentää typpioksidin synteesiä. Typpioksidilla on ateroskleroosilta suojaava vaikutus. (Lusis 2000)

Hapettunut LDL ja tulehdusreaktion seurauksena monet sytokiinit ja kemokiinit lisäävät adheesiomolekyylien ilmentymistä endoteelin pinnalla. Yksi tärkeimmistä adheesiomolekyyleistä on verisuonen adheesiomolekyyli-1 (VCAM-1, engl. vascular cell adhesion molecule 1). Lisääntyneen VCAM-1 ilmentymisen myötä verenkierron leukosyyteistä eli valkosoluista lähinnä monosyytit, T-solut ja dendriittisolut pääsevät intiman puolelle. Aktivoituneet endoteelisolut lisäävät myös makrofageja stimuloivan tekijän (M-CSF, engl. macrophage colony-stimulating factor) tuottoa. M-CSF stimuloi

intimassa monosyyttien erilaistumista makrofageiksi, jotka ilmentävät pinnallaan ”syöjäreseptoria” (SR, engl. scavenger receptor). SR:n välityksellä hapettunut LDL otetaan makrofagien sisään ja muodostuu vaahtosoluja. (Kuva 2) (Hansson & Hermansson 2011; Libby 2002; Lusic 2000; Moore & Tabas 2011) Vaahtosoluja sisältävää rasvajuostetta kutsutaan intiman ksantoomaksi (engl. intimal xanthomata). Intiman ksantooma on ei-ateroskleroottinen muutos, joka patologisen intiman paksuuntumisen (engl. pathological intimal thickening) myötä muuttuu rasvaytimen omaavaksi ateroomaksi. (Virmani ym. 2000) Makrofagit ovat merkki aktiivisesta tulehduksesta ja merkittävä solupopulaatio ateroskleroosin kehittyessä. Makrofagit voidaan jakaa klassisesti aktivoituihin tyyppiin M1 tai vaihtoehtoisesti aktivoituihin tyyppiin M2 makrofageihin. Aktivoituneet makrofagit ilmentävät pinnallaan erilaisia antigeenejä kuten CD68, CD36 ja CD163, joita voidaan hyödyntää plakkien makrofagien tunnistamisessa. Hiirillä voidaan hyödyntää esimerkiksi pinta-antigeeniä Mac-3 (mannosireseptori), jonka ilmentyminen lisääntyy, kun monosyytit erilaistuvat aktiivisiksi makrofageiksi. (Antonov ym. 2004; Briain ym. 2004; Johnson & Newby 2009)

Jotta aterooma jatkaa kasvuaan, makrofagit ja T-solut erittävät sytokiinejä ja erilaisia kasvutekijöitä, jotka lisäävät sileälihassolujen määrää ja siirtymistä intiman puolelle ateroskleroosin alkuvaiheissa. Sileälihassolut lisäävät kollageenin tuottoa, mikä tekee ateroomasta lujempaa. (Lusic 2000; Moore & Tabas 2011) Sileälihassolut ja kollageeni-proteoglykaaniaines muodostavat ateroomaan sidekudoskaton. Muutosta kutsutaan fibroateroomaksi (engl. fibrous cap atheromata). (Virmani ym. 2000) Aterooman muuttumista fibroateroomaksi ei tapahdu tavallisesti alle 30-vuotiailla (Heikkilä ym. 2008). Tulehduksen seurauksena makrofagit erittävät lisäksi metalloproteinaaseja (MMP, engl. matrix metalloproteinase). Metalloproteinaasit ovat entsyymejä, jotka voivat hajottaa solunulkoista ainesta (engl. extracellular matrix) ja haurastuttaa fibroateroomaa. Sileälihassolujen määrä vähenee ja sidekudoskatto ohenee metalloproteinaasien vaikutuksesta, jolloin muodostuu ohut sidekudoskattoinen fibroaterooma (engl. thin fibrous cap atheromata). (Moore & Tabas 2011; Virmani ym. 2000) Fibroateroomassa tapahtuu myös makrofagien ohjelmoitua solukuolemaa eli apoptoosia, mikä johtaa nekroottisen ytimen muodostumiseen. Fibroaterooman kasvua saattaa lisätä uudisverisuonien muodostuminen eli angiogeneesi. Makrofagien erittämät

kasvutekijät kuten VEGF (engl. vascular endothelial growth factor) lisäävät mikroverisuonten muodostumista. Uudisverisuonet tuovat fibroateroomaan ravinteita, mutta ovat hauraita ja vuotavat helposti aiheuttaen sisäistä verenvuotoa, mikä puolestaan lisää fibroaterooman repeytymisherkkyttä. Tässä yhteydessä repeytymisherkkää ohutkattoista fibroateroomaa kutsutaan yleisesti myös hauraaksi plakiksi (engl. vulnerable plaque). (Libby 2002; Virmani ym. 2000)



Kuva 2. Rasvajuosteen muodostuminen. (Muokattu: Libby 2002) Kuvassa on esitetty ateroskleroosin alkuvaiheen tapahtumat, jossa monosyytti pääsee soluadheesiomolekyylin (VCAM-1) avulla intiman puolelle ja erilaistuu makrofagin kautta lopulta vaahtosoluksi. Kuvassa nähdään myös muita aterooman kehittymiseen vaikuttavia tekijöitä: ”syöjäreseptori” (SR), hapettunut LDL (oxLDL), makrofageja stimuloiva tekijä (M-CSF), metalloproteiinaasi (MMP) ja reaktiiviset happiradikaalit (ROS).

Ateroskleroosin yleisin komplikaatio on plakin repeytyminen ja verihyytymän muodostuminen, joka voi tukkia verisuonen täysin tai osittain. Täysi tukos aiheuttaa n. 70 % vakavista akuuteista sydäninfarkteista. Korkean riskin potilailla esiintyy tavallisesti useampia hauraita plakkeja. Hauraassa plakissa on muun muassa aktiivinen tulehdus, iso rasvaydin, ohut sidekudoskatto, uudisverisuontien muodostumista, vähän sileälihassoluja ja taipumus verihyytymän muodostumiseen (*Taulukko 1*). (Naghavi ym. 2003)

On tunnistettu erilaisia mekanismeja, jotka voivat johtaa ateroskleroosin komplikaatioiden syntymiseen. Endoteelin toiminnanhäiriö ja eroosio lisäävät verihytaleiden kiinnittymistä verisuonen seinämään ja se voi olla alku verihyytymän muodostumiselle. Mikroverisuonten muodostuminen hauraaseen plakkiin ja sisäiset verenvuodot saattavat johtaa verihyytymän muodostumiseen. Yleisin mekanismi on kuitenkin aterooman sidekudoskattoon muodostuva repeämä, jolloin aterooman rasvaydin paljastuu. Rasvaydin on erittäin trombogeeninen ja ytimeistä vapautuu erilaisia kudostekijöitä, jolloin syntyy verihyytymä ja pahimmassa tapauksessa sepelvaltimo tukkeutuu. (Libby 2002; Virmani ym. 2000)

Hauras plakki ei välttämättä ahtautu suonta, mutta on altis repeytymään. Vakaa fibroottinen plakki voi ahtauttaa suonen ja aiheuttaa iskeemiset oireet (angina pectoris), mutta plakki ei repeä helposti. Plakin eroosion kautta voi kuitenkin syntyä verisuonen tukkiva verihyytymä. (Heikkilä ym. 2008; Libby & Theroux 2005) Koska hauras plakki ei välttämättä ahtautu suonta, sen havaitseminen on haastavaa perinteisin menetelmin kuten sepelvaltimoiden varjoainetutkimuksella. Plakit voidaan saada hyvin paikannettua varjoainetutkimuksella, mutta tutkimus ei anna minkäänlaista tietoa plakkien aktiivisuudesta. Gamma- ja PET-kuvantaminen ovat kajoamattomia ja erittäin herkkiä biologisten tapahtumien ja molekyylien kuvantamismenetelmiä. Hauraan plakin toiminnalliset muutokset kuten tulehdus ja uudisverisuonien muodostuminen (*Taulukko 1*) tarjoavat lupaavia kohteita uusien merkkiaineiden kehittämiseen. Uusia diagnostisia menetelmiä tarvitaan, jotta korkean riskin potilaat voidaan havaita ajoissa. (Riou ym. 2009)

Taulukko 1. Hauraan plakin tunnuspiirteitä. (Muokattu: Naghavi ym. 2003)

Rakenteelliset muutokset	Toiminnalliset muutokset
Ohut sidekudoskatto	Tulehdus (monosyytit, makrofagit, T-solut)
Suuri rasvaydin	Endoteelin toiminnanhäiriö
Enemmän rasvaa kuin kollageeniä	Oksidatiivinen stressi
Kalsifikaation aste	Apoptoosi
Keltainen väri	Uudisverisuonitus
Verisuonen ahtautuminen	Soluainesta hajottavat entsyymit (MMP)

3 ATEROSKLEEROOSIN HIIRIMALLIT

Ateroskleroosin eri vaiheiden tutkiminen ihmisellä on haastavaa, sillä ateroskleroosin kehittyminen kestää vuosia. Pieneläimillä ateroskleroosi voidaan indusoida geneettisten muutosten ja ruokinnan avulla, minkä johdosta ateroskleroosin kehittyminen vie viikoista muutamiin kuukausiin. Eläinmallilla voidaan lyhyemmässä ajassa tutkia ja kuvantaa ateroskleroosin patofysiologisia mekanismeja. (Tannock & King 2010) Hiiri on yleisimmin käytetty ateroskleroosin eläinmalli sen pienen koon, nopean lisääntymisen, pienten kustannusten ja geenien helpon muokattavuuden ansiosta. Tarjolla on monia erilaisia ateroskleroosin hiirimalleja, joiden taudinkuva vastaa suurilta osin ihmisen ateroskleroosia. (Mukhopadhyay 2013) Hiirimalleilla on myös rajoituksensa, sillä hiirillä kolesteroli kuljetetaan pääasiassa HDL-partikkeleissa, kun taas ihmisellä LDL-partikkeleissa. Lisäksi hiirillä ei ole lainkaan kolesteryyliesterikuljetusproteiinia (CETP, engl. cholesteryl ester transfer protein), millä on tärkeä merkitys ihmisen lipoproteiinimetaboliassa. Plakkien repeytyminen hiirillä on myös harvinaista. (Calara ym. 2001; Tannock & King 2010)

3.1 ApoE^{-/-}- ja LDLR^{-/-}-hiirimalli

ApoE^{-/-}-hiirimalli on yksi käytetyimmistä ja suosituimmista eläinmalleista ateroskleroositutkimuksessa. Se on ensimmäinen ateroskleroosin hiirimalli, jonka kehittivät Piedrahita ja työtoverit vuonna 1992. Malli on tehty inaktivoimalla apolipoproteiini E (ApoE) -geeni hiiren alkion kantasoluissa (ES, engl. embryonic stem cells). ES-soluja, joissa inaktivaatio on toiminut, on käytetty uuden hiirikannan perustamiseen. (Mukhopadhyay 2013; Piedrahita ym. 1992) ApoE:llä on ateroskleroosilta suojaava vaikutus, sillä se edesauttaa lipoproteiinien, muuan muassa kylomikronien ja VLDL-partikkelien (engl. very low density lipoprotein) kuljetusta maksaan. Lisäksi ApoE osallistuu LDLR-välitteiseen lipoproteiinien siirtymiseen maksaan. (Curtiss 2000) Puutteellisen lipoproteiinien puhdistumisen myötä verenkierrosta, ApoE^{-/-}-hiirille kehittyy aorttaan ja kaulavaltimoihin suuria ateroskleroottisia plakkeja. Hyperkolesterolemiaa ja plakkien kasvua voidaan lisätä runsasrasvaisella dieetillä (engl. Western-type diet). Hiirillä on havaittavissa eri kehitysvaiheissa olevia plakkeja rasvajuosteista fibroottisen sidekudoksen omaaviin plakkeihin. Rasvadieetillä olleilla ApoE^{-/-}-hiirillä on esiintynyt myös plakkien repeytymistä ja verihyytymien muodostumista. Vaikka ateroskleroosin kehittymisen

vaiheet ApoE^{-/-}-hiirillä ovat yhteneviä ihmisen vaiheiden kanssa, ApoE:n inaktivaatio ihmisellä on harvinaista. ApoE^{-/-}-hiiren lipidimetabolia ei täysin vastaa ihmisen taudinkuvaa, sillä ApoE:llä on vaikutuksia muun muassa makrofagien toimintaan. Tulehdusmekanismeissa voi tästä syystä olla merkittävästi eroa ihmisen ja hiirimallin välillä. (Calara ym. 2001; Nakashima ym. 1994)

Ishibashi ja työtoverit kehittivät vuonna 1993 LDLR^{-/-}-hiirimallin, jossa LDLR-geeni on inaktivoitu. Inaktivaation myötä erityisesti VLDL-kolesterolin ja LDL-kolesterolin puhdistuminen plasmasta on vähentynyt. Hiirimalli muistuttaa ihmisen perinnöllistä familiaalista hyperkolesterolemiaa (FH), jossa LDLR-geeni on virheellinen ja kolesterolia kertyy verenkiertoon. LDLR^{-/-}-hiiret kehittävät rasvajuosteita aorttaan normaalilla rehulla ruokittuna, mutta rasvarehulla ruokittuna plakit kehittyvät sidekuduskattoisiksi ateroomiksi. Rasvadieetillä olleilla hiirillä kolesteroliarvot voivat olla jopa 15-kertaiset verrattuna tavalliseen C57BL/6N hiirikantaan. Plakkien repeytymistä on havaittu myös LDLR^{-/-}-hiirillä. (Calara ym. 2001; Ishibashi ym. 1994)

3.2 LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}- ja IGF-II/ LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}-hiirimalli

Farese ja työtoverit kehittivät vuonna 1996 ApoB^{100/100}-hiirimallin, jolla kohtalainen hyperkolesterolemia ja ateroskleroosi voitiin indusoida rasvadieetillä. Apolipoproteiini B100:aa (ApoB100) ilmennetään VLDL- ja LDL-partikkeleissa ja ApoB100:lla on tärkeä merkitys lipidimetaboliassa. (Farese ym. 1996; Vènant ym. 1998) Vuonna 1998 Powell-Braxton ja työtoverit risteyttivät ApoB^{100/100}-hiiren ja LDLR^{-/-}-hiiren. Familiaalisessa hyperkolesterolemiassa LDLR-geenivirheen lisäksi plasman kolesteroli on pääasiassa ApoB100:n sisältävissä LDL-partikkeleissa. Lipidiprofiiltaan LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}-hiirimalli vastaa parhaiten ihmisen ateroskleroosin taudinkuvaa, sillä LDLR on inaktivoitu ja mallissa ilmennetään ainoastaan ApoB100:aa. LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}-hiiret kehittävät ateroskleroottisia plakkeja koko aortan alueelle normaalillakin ruokinnalla, mutta rasvaisella ruokinnalla saadaan aikaiseksi pidemmälle edennyt ateroskleroosi. Rasvadieetin myötä myös plasman kolesterolipitoisuudet ovat erittäin korkeat. Hiirimalleista LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}-hiiri soveltuu hyvin ateroskleroositutkimuksiin, sillä lipidiprofiili muistuttaa eniten ihmisen lipidiprofiilia. (Heinonen ym. 2007; Powell-Braxton ym. 1998)

Ihmisillä ateroskleroosiin liittyy usein myös diabeettisiä muutoksia. Heinonen ja työtoverit kehittivät vuonna 2007 IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirimallin. Transgeeninen hiiri, jolla tyypin 2 diabetes kehittyy, kun haiman β -soluissa ilmennetään ylimäärin insuliininkaltaista kasvutekijää (IGF-II, engl. insulin-like growth factor-II) risteytettiin LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiiren kanssa. LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}- ja IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä on samanlaiset rasva-arvot, mutta IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä esiintyy insuliiniresistenssiä, hyperglykemiaa ja lievää hyperinsulinemiaa. Lisäksi IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirille kehittyy enemmän kalkkeutuneita plakkeja verrattuna LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiiriin. Uusi malli saattaa soveltua hyvin tyypin 2 diabeteksen komplikaatioiden tutkimiseen. (Heinonen ym. 2007)

4 UUDISVERISUONITUS ELI ANGIOGENEESI

4.1 Uudisverisuonituksen mekanismit

Uudisverisuonien muodostuminen yhdistetään tavallisesti syövän kehittymiseen ja syövän etäpesäkkeiden muodostumiseen. J. Folkman esitti ensimmäistä kertaa vuonna 1971, että kasvaimen kasvu ja metastasointi ovat riippuvaisia uudisverisuonien muodostumisesta. Uudisverisuonitus on välttämätöntä esimerkiksi sikiönkehityksen aikana, jolloin verisuoniverkostot muovautuvat. Jotta solut saavat riittävästi happea ja ravinteita, verisuonien pitää sijaita enintään 100–200 mikrometrin etäisyydellä. Monissa sairauksissa patologinen uudisverisuonitus riippuu uudisverisuonitusta edistävien ja vastustavien tekijöiden tasapainotilasta. Kun uudisverisuonitusta edistävien molekyylien ilmentyminen lisääntyy, uudisverisuonituksen ”kytkin” käynnistyy (engl. angiogenic switch). (Folkman J. 1995; Carmeliet & Jain 2000) Tekijöitä, jotka voivat käynnistää uudisverisuonituksen ovat muun muassa kudoksen matala happiosapaine tai happamuus (pH), hypoglykemia, tulehdusvasteet ja geenimutaatiot (Carmeliet & Jain 2000).

Kudoksen hapenpuute eli hypoksia lisää uudisverisuonitusta erityisesti syöpäkasvaimissa. Hapenpuute lisää HIF-1 α molekyylin (engl. hypoxia-inducible transcription factor) ilmentymistä, joka taas lisää kasvutekijöiden kuten VEGF ja FGF (engl. fibroblast growth factor) erittymistä. Hauraan plakin nekroottisesta ytimestä johtuva hapenpuute saattaa lisätä uudisverisuonitusta aktivoivien kasvutekijöiden ilmentymistä. Hauraan plakin monosyytit, makrofagit ja sileälihassolut lisäävät monien uudisverisuonitusta edistävien tekijöiden kuten $\alpha_v\beta_3$ - ja $\alpha_v\beta_5$ -integroinien, interleukiini 8:n (IL-8), MMP-9:n, angiostatiini 1:n (Ang 1), PDGF:n (engl. platelet-derived growth factor) ja muiden sytokiinien ilmentymistä. Uudisverisuonitusta edistävien molekyylien ilmentymisen on havaittu lisääntyneen ruuminavausten yhteydessä otetuissa ateroomanäytteissä. $\alpha_v\beta_3$ -integroini on yksi tärkeimmistä uudisverisuonitusta säätelevistä tekijöistä. (Carmeliet 2000; Carmeliet & Jain 2000; Khurana ym. 2005; Virmani ym. 2005)

4.2 $\alpha_v\beta_3$ -integroini

Integroinit ovat heterodimeerisiä solukalvon läpäiseviä glykoproteiini adheesiomolekyylejä, jotka ohjaavat solujen liikkumista ja solujen välisiä vuorovaikutuksia. Integroiniiniperheen reseptorialatyyppeihin kuuluvat vitronektiinireseptorit, fibronektiinireseptorit, kollageenireseptorit, laminiinireseptorit ja osteopontiinireseptorit. Integroinit koostuvat α - ja β -alaysiköistä. Alaysiköiden määrä vaihtelee lajeittain ja tällä hetkellä nisäkkäillä on tunnistettu 18 erilaista α -alaysikköä ja 8 β -alaysikköä, jotka voivat muodostaa 24 erilaista heterodimeeriä. Heterodimeerit tunnistavat erilaisia ligandeja. Integroineilla on tärkeä merkitys syövän metastasoinnissa, jossa ne ohjaavat syöpäsolujen liikennettä. Integroinit ovat osallisina myös muissa patologisissa tiloissa kuten tulehduksellisissa sairauksissa, joissa esimerkiksi vitronektiinireseptori, $\alpha_v\beta_3$ -integroinin ilmentymisen on havaittu lisääntyneen aktivoituneissa endoteelisoluissa uudisverisuonituksen aikana. (Beer & Schwaiger 2008; Haubner 2006; Silva ym. 2008)

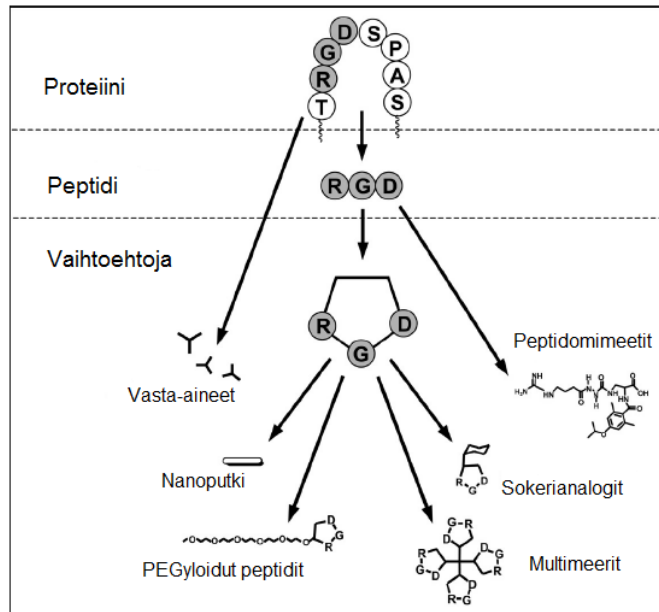
$\alpha_v\beta_3$ -integroini luokiteltiin kuuluvaksi vitronektiinireseptoreihin vuonna 1985, kun se eristettiin ensimmäisenä istukasta ja huomattiin sitoutuvan plasman proteiiniin, vitronektiiniin. $\alpha_v\beta_3$ -integroinin α -alaysikkö on kooltaan noin 160 kDa ja β -alaysikkö 85 kDa. $\alpha_v\beta_3$ -ntegroiniä ilmennetään normaalisti osteoklasteissa, verihiutaleissa, megakaryosyyteissä, munuaisissa, verisuonen sileälihassoluissa, endoteelissä ja istukassa. Normaalissa fysiologiassa $\alpha_v\beta_3$ -integroinin ilmentyminen on vähäistä, mutta ilmentymisen on osoitettu lisääntyneen erityisesti pahanlaatuisessa melanoomassa ja uudisverisuonissa. (Hood & Cheresch 2002; Horton 1997)

$\alpha_v\beta_3$ -integroini ei ole spesifinen ainoastaan vitronektiinille, vaan se sitoutuu myös muihin soluväliaineen molekyyleihin kuten fibronektiiniin, fibrinogeeniin, von Willebrand tekijään, kollageeniin ja laminiiniin (Hood & Cheresch 2002). Uudisverisuonituksen alkuvaiheissa monet solut kuten endoteelisolut, syöpäsolut ja soluväliaineen solut erittävät erilaisia kasvutekijöitä. VEGF on yksi tärkeimmistä kasvutekijöistä. Kun endoteelisolut ovat aktivoituneet, lisääntyy metalloproteinaasien erityys. Metalloproteinaasit hajottavat soluväliainesta ja tyvikalvon, jotta uudet verisuonet pääsevät muodostumaan. $\alpha_v\beta_3$ -integroinilla on tässä vaiheessa tärkeä merkitys, sillä se ohjaa endoteelisolujen siirtymistä tyvikalvon läpi. Integroinit säätelevät

lisäksi endoteelisolujen kasvua ja erilaistumista sekä hillitsevät solujen apoptoosia uudisverisuonituksen aikana. (Beer & Schwaider 2008; Hood & Cheresch 2002)

Eläinmalleilla on pystytty osoittamaan, että $\alpha_v\beta_3$ -integroini-inhibiittorit vähentävät kasvaimen uudisverisuonitusta, mutta on saatu myös päinvastaisia tuloksia. Reynolds ryhmänsä kanssa (2002) osoitti, että hiirillä, joilta puuttuu syntymästä lähtien $\alpha_v\beta_3$ -integroini, kasvaimen kasvu ja uudisverisuonitus ovat jopa lisääntyneet. Muiden integroinien lisääntymistä ei näillä hiirillä havaittu, joten kyse ei ollut kompensatorisesta mekanismista. Tutkimuksessa havaittiin kuitenkin, että VEGF-reseptori-2:n ilmentyminen oli lisääntynyt $\alpha_v\beta_3$ -integroinin puuttuessa. Tutkimus osoitti, että $\alpha_v\beta_3$ -integroini saattaa osallistua myös VEGF-signalointiin uudisverisuonituksessa, ja tilanteesta riippuen $\alpha_v\beta_3$ -integroinilla voi olla uudisverisuonitusta edistäviä tai hillitseviä vaikutuksia. (Reynolds ym. 2002)

Lääkekehitys on ollut erityisen kiinnostunut $\alpha_v\beta_3$ -integroinista, sillä se saattaisi olla hyvä terapeutinen kohde monissa sairauksissa. $\alpha_v\beta_3$ -integroinista on tunnistettu arginiini-glysiini-asparagiinihappo (RGD) aminohapposekvenssi, jonka välityksellä ligandin sitoutuminen tapahtuu. RGD-farmakoforin avulla on voitu suunnitella erilaisia uudisverisuonitusta hillitseviä lääkkeitä. Tällä hetkellä kliinisissä kokeissa on esimerkiksi kaksi $\alpha_v\beta_3$ -integroiniin kohdistuvaa uudisverisuonitusta hillitsevää syöpälääkettä, Vitaxin® ja Cilengitidi®. Lisäksi farmakoforin avulla on voitu kehittää uusia PET- ja gammakuvausmerkkiaineita, joiden avulla olisi mahdollista kuvantaa uudisverisuonien kehittymistä ja seurata lääkkeiden tehoa (*Kuva 3*) (Beer ym. 2011; Schottelius ym. 2009; Silva ym. 2008)



Kuva 3. RGD-sekvenssin tunnistavia yhdisteitä. (Muokattu: Schottelius ym. 2009) $\alpha_v\beta_3$ -integriinin RGD-sekvenssiä voidaan hyödyntää lääkekehityksessä suunnitelmalla siihen sitoutuvia eri rakenteen omaavia yhdisteitä. Sitoutumista voidaan parantaa esimerkiksi PEGyloinnilla (engl. polyethylene glycol) tai liittämällä yhdisteeseen sokerianalogi.

4.3 Uudisverisuonitus ja $\alpha_v\beta_3$ -integriini ateroskleroosissa

Ateroskleroosissa tulehdus ja hapenpuute saattavat olla erityisesti uudisverisuonitusta edistäviä tekijöitä. Vuonna 1876 Koester esitti yhteyden intiman uudisverisuonituksen ja ateroskleroosin välillä. Normaalisti pienten verisuonten verkosto eli vasa vasorum kulkee isompien verisuonten ja valtimoiden kuten aortan ja sepelvaltimoiden vieressä. Vasa vasorumin tehtävä on kuljettaa happea ja ravinteita verisuonten välillä. (Khurana ym. 2005) Potilasnäytteitä analysoitaessa on huomattu, että vasa vasorumin kaltaisten pienten verisuonten määrä on lisääntynyt kaksinkertaisesti hauraisissa plakeissa ja nelinkertaisesti repeytyneissä plakeissa verrattuna stabiileihin plakkeihin (Virmani ym. 2005). Moreno ryhmänsä kanssa (2004) osoitti ruumiinavausten yhteydessä otetuista aortan histologisista näytteistä, että uudisverisuonitus on lisääntynyt merkittävästi plakeissa, joissa on tulehdusta ja plakinsisäistä verenvuotoa sekä ohutkattoisissa fibroateroomissa. Repeytyneissä plakeissa uudisverisuonitus oli myös selkeästi lisääntynyt. (Moreno ym. 2004)

Hoshiga ja työtoverit (1995) selvittivät $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymistä ihmisellä normaalissa ja ateroskleroottisessa sepelvaltimossa. He keräsivät sepelvaltimonäytteitä potilailta, joille tehtiin sydämensiirto ja jaottelivat näytteet normaaliin ikääntymisen aiheuttamaan intiman paksuuntumiseen ja ateroskleroottisiin plakkeihin. Näytteistä määritettiin immunohistokemiallisten värjäysten ja RT-PCR:n (engl. reverse transcription polymerase chain reaction) avulla $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymistä. Molemmissa näyteryhmissä havaittiin voimakasta $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymistä endoteelissä ja matalampaa, mutta tasaista ilmentymistä mediassa. Ei-ateroskleroottisissa näytteissä ilmentymisen havaittiin olevan yhtenevää intimassa ja mediassa, johon kertyi sileälihassoluja. $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentyminen ateroskleroottisissa plakeissa oli vaihtelevaa, mutta voimakkainta värjäytymistä havaittiin adventitian vasa vasorumin ja plakin uudisverisuonien endoteelisoluissa ja sileälihassoluissa. Uudisverisuonia ei havaittu ei-ateroskleroottisissa näytteissä. Tutkimus osoitti, että ihmisellä $\alpha_v\beta_3$ -integriiniä esiintyy sekä normaalissa että ateroskleroottisessa verisuonen seinämässä ja integriinillä saattaa olla tärkeä merkitys sileälihassolujen liikkuvuuden ja uudisverisuonituksen säätelyssä plakin kehittyessä. (Hoshiga ym. 1995)

Antonov ryhmänsä kanssa (2004) tutki ateroskleroottisten plakkien makrofagien ja $\alpha_v\beta_3$ -integriinin yhteyttä. Sydän- ja aorttanäytteet otettiin ruumiinavausten yhteydessä ja näytteet jaoteltiin fibroateroomiin ja alkuvaiheen rasvajuosteisiin. Rasvajuosteissa, joihin oli kertynyt vaahtosoluja, havaittiin korkea $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymistä. Fibroateroomissa alueilla, joihin oli kertynyt CD68-positiivisia makrofageja, havaittiin myös $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymistä. Osa plakin sileälihassoluista oli $\alpha_v\beta_3$ -integriini-positiivisia, mutta $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentyminen oli selkeästi korkeampaa median sileälihassoluissa. $\alpha_v\beta_3$ -integriiniä ei ilmennetä kaikissa makrofagityypeissä, ja tutkimus osoitti ensimmäistä kertaa, että $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentyminen on lisääntynyt rasvajuosteiden ja fibroateroomien aktivoituneissa makrofageissa. (Antonov ym. 2004)

Uudisverisuonituksen vaikutusta aterooman muodostumiseen ja kasvuun on tutkittu myös monilla eläinmalleilla. Moulton työtovereineen (1999) osoitti ApoE^{-/-}-hiirillä ensimmäistä kertaa, että uudisverisuonitus liittyy plakin kasvuun. He testasivat hiirimallilla kahden endoteeliin kohdistetun uudisverisuonitusta hillitsevän lääkeaineen

endostatiinin ja TNP-470:n vaikutuksia. Ensin he osoittivat immunohistokemiallisin värjäyksin, että hiirimallille kehittyy aortan suuriin plakkeihin uudisverisuonia. Sen jälkeen he osoittivat, että lääkeaineiden pitkäaikainen annostelu vähentää plakin kasvua verrattuna kontrolliryhmään. (Moulton ym. 1999) Sama ryhmä osoitti myöhemmin, että uudisverisuonien määrä plakissa on riippuvaista tulehdussolujen määrästä eikä plakin koosta. Ainakin hiirillä tulehdus saattaa olla ensisijainen uudisverisuonitusta edistävä tekijä verrattuna hapenpuutteeseen. (Moulton ym. 2003)

Hiljattain Tanaka työtovereineen (2011) esitti ApoE^{-/-}-hiirillä, että vasa vasorumilla on tärkeä merkitys ateroskleroosin patogeneesissä. He tutkivat histologisia muutoksia vatsa-aortan adventitiassa. Lisääntynyttä uudisverisuonien muodostumista havaittiin vasta aterooman muodostumisen jälkeen. He annostelivat myös paikallisesti uudisverisuonitusta edistävää kasvutekijää, FGF:ää ja huomasivat, että hiirille kehittyy isompia plakkeja, uudisverisuonitus lisääntyi ja Mac-3-positiivisia makrofageja esiintyi enemmän verrattuna kontrolliryhmään. Uudisverisuonituksen osoitettiin olevan plakin kehitystä edistävä tekijä, mutta ei syy plakin muodostumiseen ApoE^{-/-}-hiirimallissa. (Tanaka ym. 2011) Samankaltainen tulos on osoitettu myös LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirimallilla. Viisi kuukautta rasvadieetillä olleille hiirille kehittyi plakkeja ja muodostui tiivis vasa vasorum laskevan aortan adventitiaan. Hiiret, jotka saivat normaalia rehua, eivät kehittäneet yhtä järjestäytynyttä verisuoniverkostoa. Tutkimus osoitti ensimmäistä kertaa verisuoniverkoston yksityiskohtaisen rakenteen LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä, ja FGF2:n vaikutuksia verisuonien muodostumiseen. (Mollmark ym. 2012)

Sekä ihmisten kudoksenäytteistä että eläinmalleista saadut tutkimustulokset ovat osoittaneet, että uudisverisuonitus liittyy yleensä pitkälle edenneisiin hauraisiin plakkeihin, ja tulehdus on voimakkaasti uudisverisuonitusta ohjaava tekijä. Uudisverisuonituksesta aiheutuvat plakin sisäiset verenvuodot saattavat lisätä plakin repeytymisherkkyttä. (Khurana ym. 2005; Virmani ym. 2005)

5 ATEROSKLEROOSIN MOLEKYYYLIKUVANTAMINEN

5.1 Gamma- ja PET-kuvantaminen

Perinteisin kuvantamismenetelmin kuten röntgen-, TT- ja magneettikuvantamisen avulla saadaan pääsääntöisesti tietoa rakenteellisista muutoksista. Rakenteelliset muutokset voidaan kuitenkin tavallisesti huomata vasta, kun sairaus on edennyt melko pitkälle. Kuvantamismenetelmistä gammakuvaus ja PET-kuvantaminen perustuvat lyhytikäisillä radioisotoopeilla leimattujen merkkiaineiden käyttöön, joiden avulla esimerkiksi aineenvaihdunnalliset muutokset voidaan havaita jo sairauden alkuvaiheessa. Gamma- ja PET-kuvantaminen ovat kliinisesti päivittäin käytössä muun muassa onkologiassa, kardiologiassa, neurologiassa ja endokrinologiassa. (Korpela 2009)

Gammakuvaus perustuu röntgen- tai gammasäteilevien merkkiaineiden käyttöön, jotka hajotessaan emittoivat yhden fotonin. Gammakuvantamisessa yleisesti käytettyjä radionuklideja ovat ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{201}Tl ja ^{67}Ga . Pieneläinkuvantamisessa käytetään tavallisesti radionuklideja, joiden fotonien energia on 25–511 keV. Fotonien energia tulee olla riittävän suuri, jotta ne kulkeutuvat kehon lävitse, mutta toisaalta riittävän pieni, jotta ne pysähtyvät kameran detektoriin. Perinteisessä gammakuvauksessa tutkittava kohde lähettää säteilyä kaikkiin suuntiin. Gammakamerassa kollimaattorin avulla rajataan pois vinosti detektoria kohti tuleva säteily. Detektorina toimii natriumjodidikide (NaI), joka muuttaa gammasäteilyn valoksi, fotoneiksi. Valomonistinputkissa valonvälähdykset muutetaan sähköisiksi pulsseiksi, joiden avulla muodostetaan kuva. (King ym. 2002; Korpela 2009)

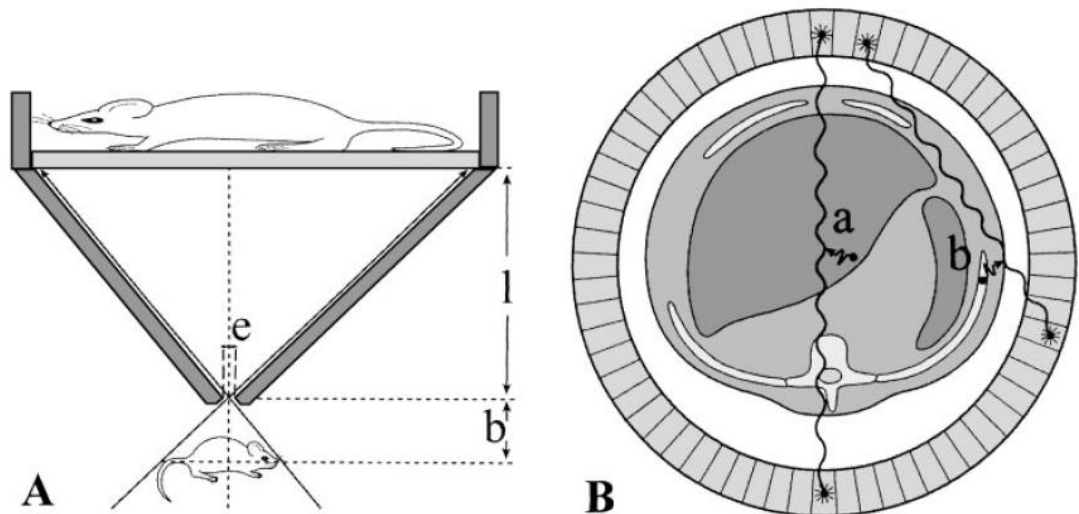
Gammakuvauksessa tarkoituksena on havaita yksittäisiä fotoneita, jotka lähtevät kuvattavasta kohteesta eri suuntiin. Fotonien alkupiste on haastavaa määrittää, joten kollimaattorin avulla rajataan pois fotonit, jotka eivät kulje tiettyyn suuntaan. Potilaskuvantamisessa pitää kuvata riittävän laajalta alueelta, jotta fotonien alkupiste voidaan määrittää, mikä taas laskee herkkyyttä. Pieneläinkuvantamisessa kohde on erittäin pieni, mikä vaatii kameran hyvää resoluutiota. Toisaalta pieni eläin saadaan lähelle kameraa, joten vinosti kulkevia fotoneita ei tarvitse rajata paljoa pois. (Kuva 4) (Chaziioannou 2005)

Pieneläimille on myös kehitetty erityisiä mikrogammakameroita (μ SPECT), joissa on erittäin hyvä resoluutio. Kamerassa on kollimaattori, jossa on fotoneja kerääviä pieniä reikiä (engl. pinholes). Kollimaattori mahdollistaa korkean resoluution mutta herkkyys voi kärsiä, kun fotoneita kerätään vain pieneltä alueelta. Mikrogammakameran avulla on päästy 0.5 millimetrin resoluutioon, kun tavallisten gammakameroiden resoluutio on noin 2-4 millimetriä. (Beekman ym. 2005) Gammakuvantamisen etuja korkean resoluution lisäksi ovat suhteellisen matala säderasitus tutkittavalle potilaalle tai eläimelle, sillä käytettävät radionuklidit ovat matalaenergisiä. Matalaenergisyys mahdollistaa myös useampien eri materiaalien käytön kameroissa. Lisäksi suurin osa radionuklideista tuotetaan generaattorilla, joka on halvempaa verrattuna syklotronin käyttöön. (Chaziioannou 2005; Korpela 2009)

PET-kuvantaminen eroaa gammakuvantamisesta sillä, että syklotronilla tai generaattorilla tuotettu radioisotooppi hajotessaan emittoi positronin. Yleisesti käytettyjä radionuklideja PET-kuvantamisessa ovat ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O ja ^{68}Ga . Positroni kulkee kudoksessa tietyn matkan riippuen kudoksen tiheydestä ja positronin kineettisestä energiasta. Kun positroni menettää energiaansa, se annihiloituu kohdatessaan elektronin. Annihilaatio tuottaa kaksi korkeaenergistä fonia, jotka emittoituvat 511 keV:n energialla vastakkaisiin suuntiin (180°). PET-kameran detektorit on yleensä aseteltu rengasmaisesti kuvattavan kohteen ympärille, jossa vastakkaisiin suuntiin lähteneet fotonit havaitaan samanaikaisesti. (Kuva 4) Sähköisen signaalin muodostettua kuvan, vaaditaan molemmissa PET- ja gammakuvausmenetelmissä vielä kuvan rekonstruktio, jossa matemaattisten kaavojen avulla lasketaan muun muassa fotonien alkupisteet. (Chaziioannou 2005; Korpela 2009)

PET-kuvantaminen on erittäin herkkä menetelmä, sillä kaksi fonia havaitaan samanaikaisesti yhden sijaan, joten alkuperäinen lähtöpiste on helpompi määrittää janelta. PET-kameroiden resoluutiota kuitenkin huonontaa se, että positronin emissiota ei havaita, vaan vasta annihilaation jälkeiset fotonit havaitaan. Gammakuvantamisessa taas havaitaan yksittäinen foni, joka emittoituu suoraan alkuperäisestä kohteesta. (King ym. 2002) Kliinisessä käytössä olevilla PET-kameroilla päästään noin 2.5 millimetrin resoluutioon ja pieneläimille tarkoitetuilla PET-kameroilla noin 1.5 millimetrin resoluutioon. (Constantinescu & Mukherjee 2009) Kliinisessä käytössä

PET-kamerat ovat resoluutioltaan parempia verrattuna gammakameroihin, mutta pieneläinkuvantamisessa gammakamerat ovat resoluutioltaan parempia. PET-kuvantamisen etuja ovat myös käytettävien isotooppien lyhyt puoliintumisaika. Esimerkiksi 18-Fluorin puoliintumisaika on 110 minuuttia, kun gammakuvantamisessa käytettävän 99m-Teknetiumin puoliintumisaika on 6 h. Toisaalta PET-kuvantamisessa käytettävien isotooppien energia on korkea, mikä lisää niiden aiheuttamaa säderasitusta. Molemmilla gamma- ja PET-kuvantamisella on etuja ja haittoja, jotka on tunnistettava. Tärkeintä kuitenkin on, että molemmat menetelmät soveltuvat biologisten prosessien ja molekyylien kuvantamiseen sekä ovat ei-invasiivisia menetelmiä. Ei-invasiivisuus on muuan muassa mahdollistanut eläintutkimuksissa sen, että samaa eläintä voidaan kuvata monessa aikapisteessä. (Chaziioannou 2005; Korpela 2009)



Kuva 4. Gammakuvaus- ja PET-menetelmän ero. (Muokattu: King ym. 2002) A: Gammakuvantamisessa kohteesta havaitaan yksittäisiä fotoneita. Resoluutioon ja herkkyyteen vaikuttavat hiiren välimatka ja kulma kollimaattorilta (b), kollimaattorin koko (e) ja kollimaattorin välimatka kameran detektorista (l). **B:** PET-kuvantamisessa havaitaan annihilaation jälkeen (a ja b) vastakkaisiin suuntiin kulkevat fotonit renkaan muotoisella detektorilla.

5.2 Kuvantamiskohteita ateroskleroosissa

Ateroskleroosin molekyylikuvantaminen on keskittynyt viime vuosina hauraan plakin tulehduksen kuvantamiseen ja monia gammakuvaus- ja PET-merkkiaineita on testattu lähinnä eläinmalleilla. Lupaavia kohteita merkkiaineiden kehitykselle ovat olleet muun muassa erilaiset solun aineenvaihduntareitit, monosyytit/makrofagit, ohjelmoitu solukuolema, uudisverisuonitus ja hapenpuute. (Taulukko 2) (Libby ym. 2010; Saraste ym. 2009)

Tutkituin merkkiaine on 18-fluorilla leimattu sokerianalogi fluorodeoksiglukoosi (^{18}F -FDG). ^{18}F -FDG kertyy soluihin, joissa on lisääntynyt glukoosiaineenvaihdunta ja sitä on hyödynnetty laajasti monien tulehduksellisten sairauksien ja syövän kuvantamisessa. (Roivainen ym. 2012) ^{18}F -FDG oli ensimmäinen merkkiaine, jolla onnistuttiin kuvantamaan potilaiden kaulavaltimoiden plakkeja. Rudd ja työtoverit osoittivat, että ^{18}F -FDG kertyi tulehtuneisiin plakkeihin alueille, joissa on paljon aineenvaihdunnallisesti aktiivisia makrofageja. (Rudd ym. 2002) Myös muut kliiniset tutkimukset ovat osoittaneet, että plakeissa ^{18}F -FDG-kertymä on yhtenevää makrofagikertymän kanssa (Menezes ym. 2011; Tawakol ym. 2006). Lisäksi erilaisissa ateroskleroosin eläinmalleissa on onnistuttu kuvantamaan plakkeja ^{18}F -FDG:n avulla. Worthley ja työtoverit (2009) pystyivät ^{18}F -FDG:llä kuvantamaan aortan tulehdusastetta kokeellisessa kanimallissa (Worthley ym. 2009). ApoE^{-/-} ja LDLR^{-/-} ApoB^{100/100}-hiirimallilla on saatu vastaavia tuloksia kliinisten tutkimusten kanssa, sillä ^{18}F -FDG kertyi plakeissa alueille, joissa oli paljon makrofageja (Laitinen ym. 2006; Silvola ym. 2011; Zhao ym. 2008). Viime aikoina ^{18}F -FDG:tä on käytetty onnistuneesti myös erilaisissa interventiotutkimuksissa. Tawakol ja työtoverit osoittivat, että ^{18}F -FDG:n avulla voitiin seurata statiini-hoidon tehoa potilailla. Potilailla, jotka saivat suuren annoksen atorvastatiinia (80 mg), ^{18}F -FDG:n kertymä väheni seurannassa, joka saattaa kertoa ateroskleroottisten plakkien tulehdusasteen muutoksista. (Tawakol ym. 2013)

Toinen lupaava solun aineenvaihduntaa kuvaava molekyyli on koliini, jonka aineenvaihdunta on lisääntynyt aktivoituneissa makrofageissa (Boggs ym. 1995). Matter ryhmänsä kanssa (2006) testasi 18-fluorilla leimattua fluorometyylikoliinia (^{18}F -FCH) ApoE^{-/-}-hiirten plakkien kuvantamiseen. He myös vertasivat ^{18}F -FCH:ta ^{18}F -FDG:hen ja ^{14}C -FDG:hen samoissa plakeissa ja osoittivat, että ^{18}F -FCH kertyi spesifisemmin

plakkeihin, sillä ^{18}F -FCH korreloi ^{18}F -FDG:tä ja ^{14}C -FDG:tä paremmin plakkien rasvavärjäyksen ja makrofagien kanssa. (Matter ym. 2006) LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirimallilla saatiin vastaavia tuloksia, kun ^{11}C -koliini kertyi tulehtuneisiin plakkeihin, joissa oli paljon makrofageja (Laitinen ym. 2010). Ensimmäiset kliiniset tutkimukset ovat osoittaneet, että ^{18}F -FCH ja ^{11}C -koliini saattaisivat olla potentiaalisia ateroskleroosin kuvantamisessa, sillä ^{18}F -FCH:llä ja ^{11}C -koliinilla pystyttiin havaitsemaan ateroskleroottisia muutoksia verisuonen seinämässä potilailla (Buccherius ym. 2008; Kato ym. 2009).

Plakin kehittymisen aikana aktiiviset makrofagit ilmentävät pinnallaan reseptoreita ja molekyyliä, joita on voitu hyödyntää merkkiaineiden kehityksessä. ^{11}C -PK11195 on perifeerisen bentsodiatsepiinireseptorin (PBR) ligandi. Nykyisin PBR-molekyyliä kutsutaan 18 kDa:n translokaattoriproteiiniksi (TSPO, engl. translocator protein 18 kDa) TSPO-reseptoria ilmenetään aktivoituneiden makrofagien pinnalla. ^{11}C -PK11195:n on osoitettu kliinisissä tutkimuksissa kertyvän tulehtuneeseen suonen seinämään ja tulehtuneisiin kaulavaltimon plakkeihin. (Gaemperli ym. 2011; Pugliese ym. 2010) LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä ^{11}C -PK11195 kertyi myös makrofageja sisältäviin plakkeihin. ^{11}C -PK11195:n kliinistä käyttöä saattaa kuitenkin rajoittaa sen kertyminen myös terveeseen suonen seinämään. (Laitinen ym. 2008). Toinen lupaava aktivoituneiden makrofagien pinnalla ilmentyvä reseptori on folaattireseptori (FR). Hiljattain Ayala-López työryhmänsä kanssa (2010) onnistui kuvantamaan folaattireseptoriin sitoutuvalla ligandilla, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 merkkiaineella ApoE^{-/-}-hiirten plakkeja. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20:n kertymä oli yhtenevää makrofagien kanssa. (Ayala-López ym. 2010) Makrofagien pinnalla ilmenetään myös somatostatiinireseptorin alatyyppejä 2 (SSTR₂). Rominger ja työtoverit (2010) testasivat sepelvaltimoiden plakkien kuvantamista ^{68}Ga -DOTATATE-merkkiaineella, joka on SSTR₂:n ligandi. Potilailla ^{68}Ga -DOTATATE kertyi voimakkaasti sepelvaltimoiden kalkkiutuneisiin plakkeihin. (Taulukko 2.) (Rominger ym. 2010)

Tärkeä vaihe plakin kehitykselle on monosyyttien pääsy intiman puolelle. Kircher ja työtoverit (2008) leimasivat monosyyttejä ^{111}In -oxinilla ja injektivat leimattuja monosyyttejä ApoE^{-/-}-hiiriin. Gammakuvauksen avulla voitiin seurata monosyyttien kulkeutumista verenkierrosta plakkeihin, joissa suurin kertymä havaittiin makrofageja

sisältävillä alueilla. (Kircher ym. 2008) VCAM-1 adheesiomolekyylä on tärkeä monosyyttien ja muiden leukosyyttien päässä intiman puolelle. Nahrendorf ryhmänsä kanssa (2009) onnistui kuvantamaan ApoE^{-/-}-hiirissä VCAM-1-molekyylä ¹⁸F-4V-peptidin avulla. (Nahrendorf ym. 2009)

Hauraan plakin apoptoottiset makrofagit ja sileälihassolut ovat olleet merkkiaineiden kehityksen kohteena, sillä apoptoottiset solut ja nekroottinen ydin edesauttavat plakin repeytymistä (Laufer ym. 2009). Apoptoosin aikana solut ilmentävät pinnallaan fosfatidyyliseriiniä, jonka ligandi on Annexin A5. (Koopman ym. 1994; Laufer ym. 2009) Kolodgie ryhmänsä kanssa (2003) testasi ensimmäistä kertaa teknetiumilla leimattua Annexin A5:tä kokeellisessa kanimallissa ateroskleroottisten plakkien apoptoosin havaitsemiseen *ex vivo*. Annexin A5 kertyi huomattavasti enemmän ateroskleroottiseen aorttaan kuin kontrolliaorttaan. (Kolodgie ym. 2003) ^{99m}Tc-annexin A5:llä onnistuttiin kuvantamaan ApoE^{-/-}- ja LDLR^{-/-}-hiirten aortan plakkeja, ja histologian perusteella merkkiaineen kertymä oli yhtenevää makrofagien ja apoptoosin kanssa (Isobe ym. 2006). Myös ateroskleroosin kokeellisessa sikamallissa ^{99m}Tc-annexin A5:llä pystyttiin kuvantamaan sepelvaltimoiden plakkeja (Johnson ym. 2005). Ensimmäisessä kliinisessä kokeessa Kietselaer ja työtoverit (2004) onnistuivat ^{99m}Tc-annexin A5:llä kuvantamaan kaulavaltimoiden plakkeja potilailla, joilla oli hiljattain ollut sydänkohtaus (Kietselaer ym. 2004). Kun ^{99m}Tc-annexin A5:tä on verrattu ¹⁸F-FDG:hen, ^{99m}Tc-annexin A5 saattaisi olla parempi hauraiden plakkien kuin alkuvaiheen plakkien havaitsemiseen, sillä lisääntyntä apoptoosia esiintyy vasta plakkien myöhemmissä kehitysvaiheissa (Zhao ym. 2007).

Hauraassa plakissa esiintyy usein myös hapenpuutetta, mikä saattaa lisätä tulehdusta, rasvapartikkelien kertymistä plakkiin ja uudisverisuonien muodostumista. Potilaiden haurissa plakeissa tiedetään esiintyvän hapenpuutteesta kärsiviä alueita. (Hultén & Levin 2009, Sluimer ym. 2008) Silvola ja työtoverit (2011) ovat ainoat, jotka ovat testanneet plakkien hapenpuutteen havaitsemista LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}- ja IGF-II-LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}-hiirillä *ex vivo*. Testattu merkkiaine oli ¹⁸F-EF5, joka muodostaa kovalenttisiä sidoksia hapenpuutteesta kärsivien solujen kanssa. Tutkimuksessa ¹⁸F-EF5:n osoitettiin kertyvän ateroskleroottisten hiirten plakkien hapenpuutteesta kärsiville alueille. (Silvola ym. 2011) Potilaiden plakkien hapenpuutteen on osoitettu olevan

yhtenevää uudisverisuonien muodostumisen kanssa, joten uudisverisuonien moleekyylikuvantamista on käsitelty tarkemmin seuraavassa kappaleessa (Sluimer ym. 2008).

Taulukko 2. Esimerkkejä ateroskleroottisen plakin kuvantamiskohteista ja testatuista merkkiaineista.

PBR/TSPO = bentsodiatseptiinireseptori/translokaattoriproteiini, FR = folaattireseptori, SSTR₂ = somatostatiinireseptorialatyypin 2 ja VCAM-1 = verisuonen adheesiomolekyyli-1.

Kohde	Merkkiaine	Malli
Glukoosiaineenvaihdunta	¹⁸ F-FDG	hiiri, kani, ihminen
Koliiniaineenvaihdunta	¹⁸ F-FCH	hiiri, ihminen
	¹¹ C-koliini	hiiri, ihminen
Makrofagien PBR/TSPO	¹¹ C-PK11195	hiiri, ihminen
Makrofagien FR	^{99m} Tc-EC20	hiiri
Makrofagien SSTR ₂	⁶⁸ Ga-DOTATATE	ihminen
Monosyytit	¹¹¹ In-oxini	hiiri
VCAM-1	¹⁸ F-4V	hiiri
Apoptoosi	^{99m} Tc-Annexin A5	hiiri, kani, sika, ihminen
Hapenpuute	¹⁸ F-EF5	hiiri
Uudisverisuonitus	⁶⁸ Ga-DOTA-RGD	hiiri
	¹⁸ F-Galacto-RGD	hiiri

5.3 Uudiverisuonituksen ja $\alpha_v\beta_3$ -integriinin kuvantaminen

Viime vuosina hauraan plakin uudisverisuonitus ja kohdemolekyyli $\alpha_v\beta_3$ -integriini ovat olleet kiinnostuksen kohteina PET- ja gammakuvantamisessa, sillä $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentyminen on matalaa normaalissa fysiologiassa, mutta lisääntyy erilaisissa patologisissa tiloissa. Kesslerin tutkimusryhmä kehitti ensimmäisen lupaavan syklisten RGD-sekvenssin sisältävän monomeerisen pentapeptidin, joka sitoutui valikoiden $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin (Aumailley ym. 1991). Pentapeptidin rakenteen perusteella kehitettiin ensimmäinen radioleimattu RGD-peptidi, jota tutkittiin *in vivo*. Radiojodilla (^{123}I) leimattu peptidi kertyi kasvaimeen, mutta sitä kertyi liikaa myös maksaan ja ohutsuoleen, joten peptidi ei soveltunut potilaskäyttöön. (Beer & Schwaiger 2008; Schottelius ym. 2009)

Monomeeristen RGD-peptidien farmakokineettisiä ominaisuuksia on voitu parantaa muokkaamalla rakennetta erilaisin tavoin. Peptideihin on liitetty sokeriaminohappo-osa kuten glukoosi- tai galaktoosi-osa. Sokeriosan lisääminen on edistänyt peptidin poistumista elimistöstä munuaisten kautta. PEGylointi on toinen tapa, jolla on onnistuttu parantamaan monomeeristen RGD-peptidien farmakokineettisiä ominaisuuksia. Lisäksi on kehitetty multimeerisiä RGD-peptidejä, jotka ovat sitoutuneet erittäin hyvin $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin. (Kuva 3). (Beer & Schwaiger 2008; Schottelius ym. 2009)

Eri radioleimattuja RGD-peptidejä on tutkittu paljon prekliinisissä kokeissa. Monomeeriset ^{18}F -Galacto-RGD ja ^{123}I -Gluco-RGD ovat osoittaneet hyvää kasvainspesifisyyttä ihmisen M21-melanoomasolumallissa. Lisäksi esimerkiksi tetrameerinen ^{64}Cu -DOTA-E[E[c(RGDfK)]₂]₂ on sitoutunut hyvin $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin hiirten kasvaimissa. (Beer ym. 2011) RGD-peptideistä ^{18}F -Galacto-RGD on ensimmäinen PET-merkkiaine, joka on ollut kliinisissä kokeissa syöpäpotilailla. Merkkiaineella pystyttiin onnistuneesti kuvantamaan erilaisia syöpiä kuten melanoomaa ja osteosarkoomaa, jotka ilmensivät $\alpha_v\beta_3$ -integriiniä. Lisäksi ^{18}F -Galacto-RGD:n kokokehojaukauma ja kinetiikka olivat soveltuvia potilaiden kuvantamiseen. (Beer ym. 2005) Toinen tällä hetkellä kliinisissä kokeissa oleva RGD-peptidi on gammakuvausmerkkiaine, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Maraciclacidi (NC100692, GE Healthcare). Faasin II tutkimuksessa $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Maraciclacidin avulla pystyttiin kuvantamaan 19 rintasyöpää

22:sta. ^{99m}Tc -Maraciclacidi oli lisäksi turvallinen ja hyvin siedetty potilailla. (Bach-Gansmo ym. 2006).

Viime vuosina $\alpha_v\beta_3$ -integriiniä on tutkittu lupaavana PET-kuvantamiskohteena ateroskleroosissa kahdessa prekliinisessä tutkimuksessa. Haukkala ja työtoverit (2009) tutkivat galliumilla leimatun ^{68}Ga -DOTA-RGD-peptidin kertymistä ateroskleroottisiin plakkeihin LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä. DOTA-RGD on monomeerinen RGD-peptidi, joka sitoutuu $\alpha_v\beta_3$ - ja $\alpha_v\beta_5$ -integriineihin. Peptidin kokokehojaukamaa tutkittiin mittaamalla gammalaskijalla eri kudosten aktiivisuuksia, ja tarkempi analyysi peptidin kertymisestä ateroskleroottisiin plakkeihin tehtiin *ex vivo* -autoradiografialla. Korkein ^{68}Ga -DOTA-RGD kertymä havaittiin munuaisissa LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä ja C57BL/6N-kontrollihiirillä. Ryhmien välillä ei ollut eroa aortan ^{68}Ga -radioaktiivisuuskertymässä. Histologisten värjäysten perusteella LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä aortan kaaren plakit olivat fibroaterooma-tyyppisiä ja niissä oli selkeää makrofagien kertymää. Autoradiografia-analyysissä osoitettiin, että ^{68}Ga -DOTA-RGD kertymä oli merkittävästi korkeampi plakeissa kuin terveessä verisuonen seinämässä tai adventitiassa. (Haukkala ym. 2009)

Laitinen ja työtoverit (2009) selvittivät paljon tutkitun ^{18}F -Galacto-RGD-peptidin soveltuvuutta ateroskleroosin tulehduksen ja uudisverisuonituksen kuvantamiseen LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä. ^{18}F -Galacto-RGD on spesifinen ligandi $\alpha_v\beta_3$ -integriinille. Kokokehojaukama-mittauksissa osoitettiin, että ^{18}F -Galacto-RGD:n kertymä oli merkittävästi suurempi LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirten aortoissa kuin C57BL/6N-kontrollihiirten aortoissa. Ateroskleroottisilla hiirillä merkkiaineen kertymä oli lisäksi korkeampi maksassa. Autoradiografia-analyysi osoitti, että ^{18}F -Galacto-RGD:n kertymä oli merkittävästi suurempi aortan kaaren plakeissa kuin terveessä verisuonen seinämässä tai adventitiassa. Kun vertailtiin immunohistokemiallisia värjäyksiä ja autoradiografia-analyysin tuloksia, huomattiin, että merkkiaineen kertymä oli suurinta plakeissa, joissa oli paljon makrofageja. Uudisverisuonten muodostusta ei havaittu tutkituissa plakeissa. Tutkimus osoitti, että ^{18}F -Galacto-RGD saattaisi olla lupaava merkkiaine ateroskleroosin tulehduksen kuvantamiseen. (Laitinen ym. 2009)

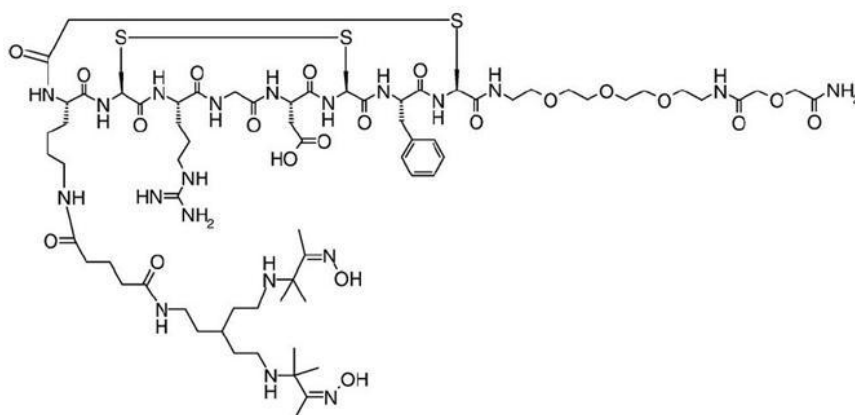
TUTKIELMAN KOKEELLINEN OSA

Tämän erikoistyön tarkoituksena oli selvittää uuden $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin kohdentuvan gammakuvausmerkkiaineen, ^{99m}Tc -Maraciclavidin soveltuvuutta ateroskleroottisten plakkien uudisverisuonituksen kuvantamiseen ja plakkien haurauden arvioimiseen ateroskleroosin $\text{LDLR}^{-/-}\text{ApoB}^{100/100}$ -hiirimallissa.

6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

6.1 Maraciclacatidi

Työssä käytettävä peptidi oli Maraciclacatidi toiselta nimeltä NC100692 (GE Healthcare), joka leimattiin ^{99m}Tc :llä. Maraciclacatidi on RGD-aminohapposekvenssin sisältävä syklinen monomeerinen peptidi ($M = 1697 \text{ g/mol}$), joka sitoutuu $\alpha_v\beta_3$ - ja $\alpha_v\beta_5$ -integriineihin. RGD-aminohapposekvenssi pysyy oikeassa konformaatioissa rikkisillan ja tioeetterisillan avulla. Radionuklidi ^{99m}Tc liittyy peptidin N-terminaaliseen päähän liitettyyn kelaattoriin ja peptidin C-terminaalinen pää on PEGyloitu (Kuva 5).



Kuva 5. Maraciclacatidin molekyyli rakenne. (Edwards ym. 2008)

6.2 Merkkiaineen leimaus

Työssä käytettävä ^{99m}Tc tuotettiin leimausta varten $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -generaattorilla (vuoroviikoin Map Medical, Tikkakoski, Suomi (raaka-aine ^{99}Mo -Molybdeeni Kanadasta) tai Covidien, Petten, Hollanti). Generaattorissa emonuklidi ^{99}Mo , jonka puoliintumisaika on 66 tuntia, hajoaa tytärnuklidi ^{99m}Tc :ksi, jonka puoliintumisaika on kuusi tuntia. ^{99m}Tc hajoaa edelleen ^{99}Tc :ksi lähettäen 140 kiloelektronivoltin gammasäteilyä. ^{99m}Tc eluoitiin generaattorista fysiologisella NaCl-liuoksella (Natriumklorid Braun 9 mg/ml, B. Braun Melsungen AG., Melsungen, Saksa).

Merkkiaineen leimaus suoritettiin GE Healthcare:n ohjeiden mukaisesti. Jokaista tutkimuspäivää varten tehtiin yksi merkkiainesynteesi. GE:ltä saatiin leimaukseen käytettävä valmis kuiva reaktioseos, joka sisälsi 75 μg (44 nmol) peptidiä. Reaktioseos otettiin jääkaapista huoneenlämpöön lyijykaappiin noin tuntia ennen leimausta. Kun

peptidi oli huoneenlämpöistä, lasipulloon lisättiin 2.0 GBq ^{99m}Tc :tä, jonka tilavuus oli noin 3.0 ml. Tämän jälkeen pulloa käännettiin muutaman kerran, jotta peptidi liukeni ja inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuuttia.

Ennen kuin ^{99m}Tc -Maraciclacatidi voitiin käyttää, sen radiokemiallinen puhtaus (RCP, engl. radiochemical purity) analysoitiin ohutlevykromatografian (TLC, engl. thin layer chromatography) avulla. Ajoliuoksena käytettiin metanolia (Methanol, Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Skotlanti) ja 1 molaariseksi laimennettua ammoniumasettaattia (5M NH_4OAc , Fluka Analytical (Sigma-Aldrich), Buchs, Sveitsi) suhteessa 50:50, jota laitettiin ajokammioiden uriin 10 ml/ura. Ajokammioiden annettiin tasoittua huoneenlämmössä kansi päällä 20 minuuttia ennen ajoa. ITLC-levyt (iTLC-SA, Varian, Inc. Lake Forest, CA, USA) lämpöaktivoitiin uunissa (110 °C) tunnin ajan ennen käyttöä. ^{99m}Tc -Maraciclacatidi-leimausliuoksesta otettiin näyte, josta valmistettiin laimennos (1 μl ^{99m}Tc -Maraciclacatidiä ja 100 μl NaCl:a) laatuajoa varten. ^{99m}Tc -Maraciclacatidi-laimennosta aplikoitiin toiselle ITLC-levylle 1 μl ja toiselle ITLC-levylle 2 μl . ITLC-levyt laitettiin ajokammioihin ajautumaan 48 minuutiksi. Ajon jälkeen levyt kuivattiin lämminpuhaltimella ja leikattiin kolmeen osaan. Levyt leikattiin 4.0 cm:n päästä ja 8.5 cm:n päästä aplikointipisteestä. Tuotteen piti olla 4.0 cm:n ja 8.5 cm:n välisessä osassa ja epäpuhtaudet keskiosan ulkopuolella. Koko levyn radioaktiivisuus ja keskiosan radioaktiivisuus mitattiin gammalaskijalla (1480 Wizard 3" Gamma Counter, Wallac, Turku, Suomi), joka oli ristiinkalibroitu annoskalibraattorin kanssa (VDC-202, Veenstra Instruments, Joure, Alankomaat). Mittauksista laskettiin radiokemiallinen puhtaus kaavalla, % ^{99m}Tc -Maraciclacatidi = levyn keskiosan aktiivisuus / koko levyn aktiivisuudella $\times 100\%$. Radiokemiallisen puhtauden piti olla yli 85 %, ja ^{99m}Tc -Maraciclacatidi piti käyttää kuuden tunnin sisällä valmistuksesta. Ylimääräisen ^{99m}Tc -Maraciclacatidin annettiin puoliintua lyijykaapissa, jonka jälkeen se hävitettiin normaalina laboratoriojätteenä.

6.3 Tutkimuseläimet

Tutkimuseläiminä käytettiin ateroskleroottisia $\text{LDLR}^{-/-}\text{ApoB}^{100/100}$ -hiiriä (kanta #003000, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) ja kontrollieläiminä C57BL/6N-kannan hiiriä. $\text{LDLR}^{-/-}\text{ApoB}^{100/100}$ -hiiriä pidettiin rasvadieetillä (TD 88137, Harlan Teklad, sisältäen 42 % kaloreita rasvasta ja 0.2 % kaloreita kolesterolista, ei sisällä natriumkolaattia) neljä kuukautta. Rasvadieetti oli aloitettu hiirten ollessa kaksi

kuukautta vanhoja. Kontrollihiiret olivat tutkimushetkellä neljän kuukauden ikäisiä ja ne olivat olleet tavallisella ruokinnalla. Tutkimuksen aikana hiiret olivat Turun yliopiston koe-eläinkeskuksen tiloissa ja niillä oli 12 tunnin valo-pimeä-sykli sekä ruokaa ja vettä koko ajan saatavilla. Tarkemmat tiedot tutkimuseläimistä on esitetty *Taulukossa 3*. Kaikki eläinkokeet olivat Etelä-Suomen läänin eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen hyväksymiä (lupanumero 1583/04.10.03/2012).

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytetyt eläimet.

Kanta	Naaraat	Paino (ka ± sd, g)	Urokset	Paino (ka ± sd, g)
LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100}	10	24 ± 4	10	34 ± 8
C57BL/6N	10	24 ± 5	10	27 ± 3

ka = keskiarvo, sd = keskihajonta (engl. standard deviation)

6.4 Radioaktiivisuuden kokokehojakaumatutkimukset

^{99m}Tc-Maraciclaidin kertyminen ja jakautuminen eri kudoksiin, vereen ja virtsaan tutkittiin kokokehojakaumamittauksilla (*ex vivo* -biodistributio). Injektiota varten hiiret nukutettiin inhalaatioanestesiolla (Isofluran Baxter, Baxter Oy, Helsinki, Suomi). Anestesia indusoiittiin 3-3.5 % isofluraanilla ja anestesian ylläpitoon käytettiin 1.5 % isofluraania. Hiiret pidettiin koko ajan lämpömaton päällä hypotermian välttämiseksi ja häntälaskimo kanyloitiin. Keskimäärin 12 ± 2.6 MBq (tilavuus 91 ± 21 µl) ^{99m}Tc-Maraciclaidiä injisoitiin häntälaskimoon bolus-injektiona ja kanyyli huuhdeltiin lopuksi natriumkloridilla. ^{99m}Tc-Maraciclaidin radiokemiallinen puhtaus oli jokaisella kerralla yli 95 % ja spesifinen radioaktiivisuus (SA, engl. specific radioactivity) synteessin lopussa keskimäärin 43 ± 3.4 MBq/nmol. Hiiret lopetettiin 60 minuutin kuluttua merkkiaineen injektioista. Ensin tehtiin sydänpunktio syvässä isofluraaninukutuksessa, jossa veri otettiin ruiskulla talteen sydäimestä heparinisoituun putkeen (Minicollect, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Itävalta). Tämän jälkeen eläin lopetettiin välittömästi niskamurroilla. Verestä otettiin näyte kokokehojakaumamittauksiin ja loppu kokoveri sentrifugoitiin välittömästi (2,118 g, 5 min + 4 °C) plasman erottamista varten. Hiiristä kerättiin talteen veren ja plasman lisäksi aortta, haima, häntä, imusolmukkeet, kateenkorva, keuhkot, lihas (reisi), luu (sääri), maksa, munuainen, perna, ruskea rasva (engl. BAT = brown adipose tissue), ohutsuoli, sydän (apex), valkea rasva (engl. WAT

= white adipose tissue) ja virtsa. Veri, plasma, virtsa ja palaset tutkittavista elimistä laitettiin punnittuihin putkiin, punnittiin (Kern ABT 220-5DM, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Saksa) ja radioaktiivisuudet mitattiin gammalaskijalla (1480 Wizard 3rd Gamma Counter, Wallac, Turku, Suomi). Ateroskleroottisten hiiren sydämet laitettiin 10 prosenttiseen formaliiniin (Reagen, Toivala, Suomi) jatkotutkimuksia varten. Radioaktiivisuuskonsentraatiot (radioakt./g kudosta) korjattiin ^{99m}Tc:n puoliintumisajan suhteen injektiohetkeen, josta vähennettiin myös taustasäteily ja häntään jäänyt radioaktiivisuus. Tulokset esitettiin %ID/g-arvoina (%ID/g = injisoidun radioaktiivisuuden prosenttiosuus / kudoksen paino, g) (ID, engl. injected dose).

6.5 Aortan autoradiografiatutkimukset

^{99m}Tc-Maraciclatidin kertyminen aorttaan tutkittiin yksityiskohtaisemmin *ex vivo* -autoradiografialla. Aortta preparoitiin varovasti esiin ja laskeva aortta katkaistiin pallean kohdalta. Aorttaa huuhdeltiin natriumkloridilla, jotta veri saataisiin pois eikä aortta pääsisi kuivumaan. Aortta puhdistettiin huolellisesti muun muassa ympäröivästä rasvakudoksesta. Sen jälkeen aortta jäädytettiin ja leikattiin kryomikrotomilla (Microtome cryostat, Leica CM3050, Nussloch, Saksa) (-15 °C) pitkittäissuuntaisesti rinnakkaisiksi 20 µm:n ja 8 µm:n jääleikkeiksi, jotka aseteltiin mikroskooppilaseille. Leikkeitä kuivattiin lämminpuhaltimen avulla 5 minuuttia, jonka jälkeen ne laitettiin kasetteihin valottumaan menetelmään tarkoitetuille IP-levyille (Fuji Imaging Plate BAS-TR2025, Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japani). Leikkeiden annettiin valottua 20 tuntia, jonka jälkeen IP-levyt skannattiin BAS-5000-lukijalla (Fuji Analyser BAS-5000, Fuji Tokio, Japani) käyttäen 25 µm:n resoluutiota. Leikkeet pakastettiin (-70 °C) jatkoanalyysjä varten.

20 µm:n jääleikkeille tehtiin hematoksyliini-eosiini-värjäys (HE-värjäys) aortan histologian tarkastelua varten. HE-leikkeet kuvattiin mikroskoopilla (Olympus BX43 system microscope, Olympus corporation, Tokio, Japani) tai lasiskannerilla (Pannoramic 250 Flash, 3DHistech Ltd., Budapest, Unkari) ja kuvankäsittelyohjelman (Gimp 2.6.10, Free Software Foundation Inc., Boston, MA, USA) avulla piirrettiin ääriivivakuvat, jotka yhdistettiin autoradiografiakuviin helpottamaan autoradiografia-analyysin tekemistä. Kustakin hiirestä valittiin 6-8 edustavaa aorttaleikettä analyysiä varten. Aortan histologian perusteella autoradiografiakuviin piirrettiin Tina-ohjelman

avulla (Tina 2.1, Raytest Isopemessgeräte, GmbH, Straubenhardt, Saksa) viisi erilaista milenkiintoaluetta (engl. ROI = region of interest). Alueet olivat intima (plakki), plakin alla oleva media, kalkkikohta plakissa, terve suonen seinämä ja adventitia. Tulokset esitettiin PSL/mm²-arvoina (PSL/mm² = fotostimuloitu luminesenssi / neliömillimetri) (engl. photostimulated luminescence). PSL/mm²-arvoista vähennettiin taustan aktiivisuus ja kunkin hiiren tulokset korjattiin ^{99m}Tc:n puoliintumisajan suhteen valotuksen aikana ja normalisoitiin injisoidun annoksen radioaktiivisuuden mukaan.

6.6 Immunohistokemialliset tutkimukset

Immunohistokemiallisilla värjäyksillä selvitettiin tarkemmin ateroskleroottisten hiiren aorttojen tulehdusastetta. Hiiren sydämet fiksoitiin formaliinilla ja valettiin paraffiiniin. Aortan tyvestä sydämen läppärakenteiden tasolta leikattiin poikittaisia 5 µm:n rinnakkaisia paraffinileikkeitä, joille tehtiin makrofagi-värjäys. Vasta-aineena käytettiin anti-Mac-3 -vasta-ainetta (Clone M3/84, BD Pharmigen, BD550292, USA). Värjäysprotokollassa antigeenin paljastus tehtiin kuumentamalla leikkeitä kattilassa 10 mM sitraattipuskurissa (pH 6.0), jonka jälkeen leikkeitä inkuboitiin tunnin ajan primääri vasta-aineella (rat anti-mouse Mac-3, laimennos 1:5000 sisältäen 3 % naudan seerumin albumiinia). Endogeeninen peroksidaasi blokattiin 1 %:lla vetyperoksidilla. Tämän jälkeen leikkeille laitettiin ensin sekundääri vasta-aine (polyclonal rabbit anti-rat, Dako, E0468, Tanska, laimennos 1:200 sisältäen 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6 + 0.05 % Tween 20) 30 minuutin ajaksi, jonka jälkeen laitettiin tertiääri vasta-aine (En Vision+ System-HRP-labelled goat anti-rabbit, DakoCytomation, K4003, Tanska, laimennos 1:200 sisältäen 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6 + 0.05 % Tween 20) 30 minuutin ajaksi. Taustaväriä käytettiin Mayerin hematoksyliiniä.

Aortan tyvileikkeet kuvattiin ja kustakin hiirestä valittiin 1-3 edustavaa leikettä analyysiin. GIMP-kuvankäsittelyohjelman avulla aortan tyvistä rajattiin erikseen intiman ja median alue, joista molemmista määritettiin pinta-ala ImageJ-analyysiohjelman avulla (ImageJ, Fiji, NIH, Bethesda, MD, USA). Samaa ohjelmaa käyttäen määritettiin makrofagien määrä ruskean värin perusteella intimassa. Tämän jälkeen voitiin pinta-aloista laskea intima-media-suhde (IM-suhde) sekä makrofagien prosentuaalinen osuus intimassa (makrofagi-% = makrofagien määrä / intiman pinta-ala × 100 %). IM-suhde × makrofagi-% kaavalla voitiin lisäksi kuvata makrofagien osuutta

suhteessa intiman kokoon. Lopuksi tarkasteltiin intiman makrofagi-% ja autoradiografiatulosten välistä korrelaatiota.

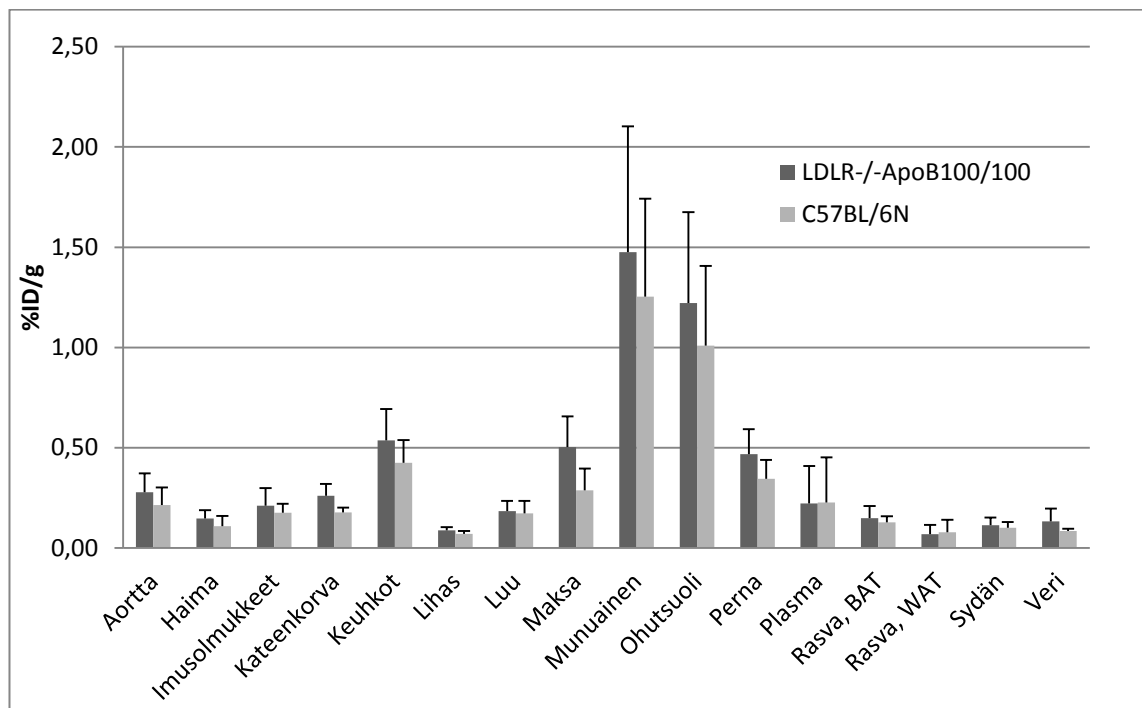
6.7 Tilastollinen analysointi

Kaikki tulokset on esitetty keskiarvoina \pm keskihajonnat ($\bar{x} \pm s.d.$). Ei-parittaisten tulosten tilastolliseen tarkasteluun kahden ryhmän välillä käytettiin t -testiä ja ANOVAa Tukey-korjauksella. Parittaisia tuloksia kahden ryhmän välillä tarkasteltiin parittaisen t -testin avulla. Korrelaatio arvioitiin lineaarisella regressioanalyysillä. Tilastolliset analyysit ja korrelaatio tehtiin SAS-tilasto-ohjelmalla (versio 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) tai Origin-ohjelmalla (versio 7.5, Microcal, Northampton, USA). P-arvon ollessa <0.05 , tuloksia pidettiin tilastollisesti merkitsevinä.

7 TULOKSET

7.1 Radioaktiivisuuden kokokehojakauma

Yhteensä 20 LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirtä (10 naarasta ja 10 urosta) ja 20 C57BL/6N-hiirtä (10 naarasta ja 10 urosta) sisällytettiin radioaktiivisuuden kokokehojakauma -analyysiin. *Kuvassa 6* on esitetty ^{99m}Tc-radioaktiivisuuden jakautuminen eri kudoksiin tunti ^{99m}Tc-Maraciclacitidi injektion jälkeen. Suurin radioaktiivisuuskertymä molemmissa ryhmissä havaittiin munuaisissa, ohutsuolessa, maksassa ja pernassa.



Kuva 6. ^{99m}Tc-Maraciclacitidin kokokehojakauma. Tulokset on esitetty %ID/g-arvoina ja naaraat ja urokset on yhdistetty ryhmissä. BAT = ruskea rasva ja WAT = valkea rasva.

Taulukoissa 4 ja 5 on esitetty tarkemmin merkkiaineen jakautuminen eri kudoksiin, ja molempien ryhmien sisällä naaraita ja uroksia on tarkasteltu erikseen. ^{99m}Tc-Maraciclacitidi kertyi enemmän ateroskleroottisten hiirten aorttaan (0.28 ± 0.09 %ID/g) kuin kontrollihiirten aorttaan (0.21 ± 0.09 %ID/g), mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0.052$). Kummassakaan ryhmässä aortan radioaktiivisuuskertymässä ei ollut eroa sukupuolten välillä. Ateroskleroottisilla hiirillä ^{99m}Tc-Maraciclacitidi kertyi merkitsevästi enemmän haimaan, kateenkorvaan, keuhkoihin, lihakseen, maksaan, pernaan ja vereen kuin kontrollihiirillä (*Taulukko 4*).

Taulukko 4. ^{99m}Tc -Maraciclavidin kokokehojakauma. Tulokset on esitetty %ID/g-arvoina (keskiarvo \pm keskihajonta) ja uros ja naaras hiiren tulokset on yhdistetty. p -arvo kuvaa tilastollista eroa ryhmien välillä (ANOVA).

	LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100}	C57BL/6N	p -arvo
Aortta	0.28 \pm 0.09	0.21 \pm 0.09	0.052
Aortta-sydän-suhde	2.64 \pm 1.10	2.20 \pm 0.74	0.263
Aortta-veri-suhde	2.37 \pm 1.35	2.62 \pm 1.08	0.744
Haima	0.15 \pm 0.04	0.11 \pm 0.05	0.013
Imusolmukkeet	0.21 \pm 0.09	0.18 \pm 0.04	0.477
Kateenkorva	0.26 \pm 0.06	0.18 \pm 0.02	<0.0001
Keuhkot	0.54 \pm 0.16	0.42 \pm 0.11	0.019
Lihäs	0.09 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.0003
Luu	0.18 \pm 0.05	0.17 \pm 0.06	0.781
Maksa	0.50 \pm 0.15	0.29 \pm 0.11	<0.0001
Munuainen	1.48 \pm 0.63	1.25 \pm 0.49	0.401
Ohutsuoli	1.22 \pm 0.45	1.01 \pm 0.40	0.276
Perna	0.47 \pm 0.12	0.34 \pm 0.09	0.001
Plasma	0.22 \pm 0.19	0.23 \pm 0.23	0.997
Rasva, BAT	0.15 \pm 0.06	0.13 \pm 0.03	0.317
Rasva, WAT	0.07 \pm 0.05	0.08 \pm 0.06	0.913
Sydän	0.11 \pm 0.04	0.10 \pm 0.03	0.391
Veri	0.13 \pm 0.06	0.09 \pm 0.01	0.002

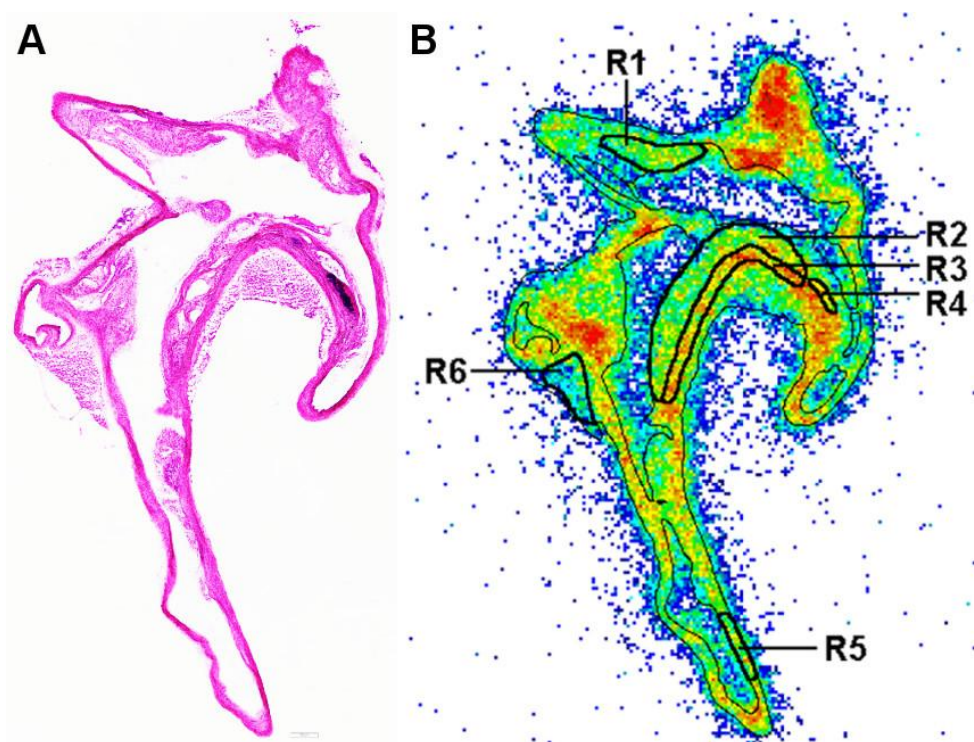
Taulukko 5. ^{99m}Tc -Maraciclavidin kokokehojakauma uros ja naaras hiirillä. Tulokset on esitetty %ID/g-arvoina (keskiarvo \pm keskihajonta). p -arvo kuvaa tilastollista eroa naaraiden ja urosten välillä ryhmissä.

	LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100}		p -arvo	C57BL/6N		p -arvo
	Naaraat	Urokset		Naaraat	Urokset	
Aortta	0.28 \pm 0.07	0.27 \pm 0.12	0.761	0.23 \pm 0.08	0.20 \pm 0.10	0.867
Aortta-sydän-suhde	2.06 \pm 0.48	3.22 \pm 1.26	0.019	2.15 \pm 0.73	2.25 \pm 0.78	0.787
Aortta-veri-suhde	1.65 \pm 0.52	2.94 \pm 1.56	0.031	2.71 \pm 1.09	2.51 \pm 1.14	0.715
Haima	0.18 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02	<0.0001	0.10 \pm 0.03	0.11 \pm 0.07	0.783
Imusolmukkeet	0.25 \pm 0.09	0.17 \pm 0.07	0.039	0.16 \pm 0.05	0.19 \pm 0.03	0.296
Kateenkorva	0.29 \pm 0.04	0.23 \pm 0.07	0.045	0.18 \pm 0.03	0.17 \pm 0.02	0.139
Keuhkot	0.25 \pm 0.09	0.50 \pm 0.18	0.440	0.47 \pm 0.12	0.38 \pm 0.09	0.105
Lihäs	0.10 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.012	0.07 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.124
Luu	0.21 \pm 0.06	0.16 \pm 0.03	0.083	0.20 \pm 0.08	0.15 \pm 0.03	0.076
Maksa	0.62 \pm 0.08	0.37 \pm 0.09	<0.0001	0.31 \pm 0.09	0.26 \pm 0.12	0.310
Munuainen	1.80 \pm 0.60	1.23 \pm 0.55	0.067	1.45 \pm 0.53	1.05 \pm 0.37	0.068
Ohutsuoli	1.34 \pm 0.59	1.11 \pm 0.24	0.274	1.22 \pm 0.37	0.79 \pm 0.31	0.012
Perna	0.52 \pm 0.07	0.42 \pm 0.15	0.081	0.37 \pm 0.05	0.32 \pm 0.12	0.287
Plasma	0.24 \pm 0.08	0.21 \pm 0.25	0.730	0.18 \pm 0.11	0.28 \pm 0.31	0.386
Rasva, BAT	0.19 \pm 0.05	0.11 \pm 0.05	0.002	0.13 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03	0.971
Rasva, WAT	0.09 \pm 0.04	0.05 \pm 0.05	0.053	0.07 \pm 0.04	0.08 \pm 0.08	0.684
Sydän	0.14 \pm 0.03	0.09 \pm 0.02	0.0002	0.11 \pm 0.02	0.09 \pm 0.03	0.051
Veri	0.18 \pm 0.07	0.10 \pm 0.02	0.013	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.333

Kun tarkasteltiin merkkiaineen kertymää ryhmissä naaraiden ja urosten välillä, kontrollihiirten ryhmässä ainoastaan ohutsuolen kertymä oli tilastollisesti suurempi naarailta (*Taulukko 5*). Ateroskleroottisten hiirten ryhmässä tilastollisesti suurempi kertymä havaittiin naarailta haimassa, imusolmukkeissa, kateenkorvassa, lihaksessa, maksassa, ruskeassa rasvassa, sydämessä ja veressä (*Taulukko 5*). Tuloksista laskettiin lisäksi merkkiaineen kertymän aortta-sydän- ja aortta-veri-suhteet. Kun vertailtiin ateroskleroottisia ja kontrollihiiriä, molemmissa ryhmissä suhteet olivat >2 . Ateroskleroottisten hiirten ryhmässä aortta-sydän- ja aortta-veri-suhde oli uroksilla tilastollisesti suurempi. ^{99m}Tc -Maraciclavidin havaittiin erittyvän voimakkaasti virtsaan, mutta tulokset on jätetty pois. Virtsa saatiin osasta hiiristä kerättyä vain muutama pisara, joten punnitustulokset eivät olleet luotettavia.

7.2 Aortan autoradiografia-analyysi

Autoradiografia-analyysiin sisällytettiin yhteensä 20 LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirtä (10 naarasta ja 10 urosta) ja 20 C57BL/6N-hiirtä (10 naarasta ja 10 urosta). Analyysissä määritettiin yhteensä 1625 mielenkiintoaluetta (ROI), joista 586 intimaan (plakkiin), 135 intiman alla olevaan mediaan, 40 kalkkiin, 427 terveeseen suonen seinämään ja 437 adventitiaan. Esimerkki autoradiografia-analyysistä on esitetty *Kuvassa 7*.



Kuva 7. Esimerkki aortan autoradiografia-analyysistä. HE-värjäys (A) ja (B) autoradiografia-kuva sateenkaarenväreillä yhdistettynä ääriiviokuvaan. Mielenkiintoalueiden (ROI) analyysi: R1-R2 = intima (plakki), R3 = intiman alla oleva media, R4 = kalkkikohta intimassa R5 = terve suonen seinämä ja R6 = adventitia.

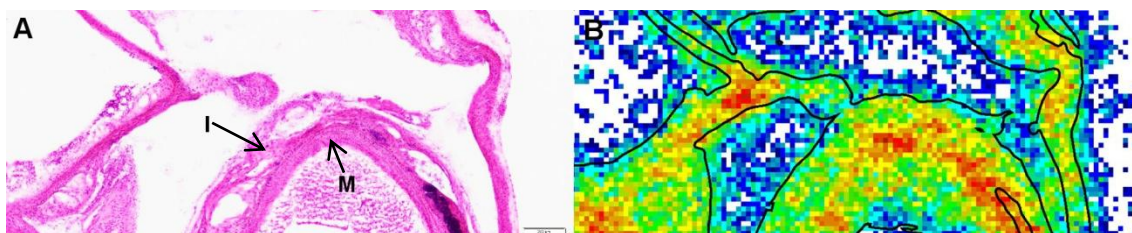
Taulukossa 6 on esitetty eri mielenkiintoalueiden tulokset, jossa PSL/mm²-arvot on korjattu ^{99m}Tc:n puoliintumisajan suhteen valotuksen aikana ja normalisoitu injisoidun annoksen radioaktiivisuuden mukaan. Ateroskleroottisilla hiirillä ^{99m}Tc-Maracicladi kertyi merkitsevästi enemmän intiman alla olevaan mediaan (217 ± 81 PSL/mm²) kuin intimaan (135 ± 37 PSL/mm², $p < 0.0001$) tai terveeseen suonen seinämään (151 ± 50 PSL/mm², $p = 0.001$) (*Kuva 8*).

Kun vertailtiin ateroskleroottisia naaraita ja uroksia toisiinsa ryhmissä, havaittiin, että ^{99m}Tc -Maraciclacidi kertyi uroksilla naaraita enemmän intiman alla olevaan mediaan ($p=0.022$) ja terveeseen suonen seinämään ($p=0.001$). Tarkasteltaessa PSL/mm²-arvoja, ateroskleroottisilla uroksilla oli kaikissa mielenkiintoalueissa hieman korkeampi merkkiaineen kertymä verrattuna naaraisiin (*Taulukko 6*). Terveen suonen kertymässä ei ollut eroa ateroskleroottisten ja kontrollihiirten välillä. Sen sijaan ateroskleroottisilla hiirillä ^{99m}Tc -Maraciclacidi kertyi enemmän adventitiaan kuin kontrollihiirillä ($p=0.022$). Kontrollihiirten ryhmässä sukupuolten välillä ei ollut eroa ^{99m}Tc -Maraciclacidin kertymässä terveeseen suonen seinämään eikä adventitiassa (*Taulukko 6*).

Taulukko 6. Autoradiografia-analyysin tulokset. Tulokset on esitetty PSL/mm²-arvoina (keskiarvo \pm keskihajonta) koko ryhmässä sekä naaraat ja urokset erikseen.

	LDLR ^{-/-} ApoB ^{100/100}			C57BL/6N		
	Kaikki	Naaraat	Urokset	Kaikki	Naaraat	Urokset
Intima (plakki)	135 \pm 37	120 \pm 20	149 \pm 43			
Intiman alla oleva media	217 \pm 81	175 \pm 43	260 \pm 94 ^a			
Kalkki	131 \pm 30	131 \pm 30				
Terve suonen seinämä	151 \pm 50	118 \pm 36	183 \pm 42 ^b	146 \pm 35	148 \pm 38	144 \pm 34
Adventitia	102 \pm 47 ^c	88 \pm 16	115 \pm 64	75 \pm 13	75 \pm 17	74 \pm 9

^a $p=0.022$ naaraiden ja urosten välillä ^b $p=0.001$ naaraiden ja urosten välillä ^c $p=0.022$ ryhmien välillä



Kuva 8. ^{99m}Tc -Maraciclacidi kertyi intiman alla olevaan mediaan. HE-värijäys (A) ja (B) autoradiografia-kuva sateenkaarenväreillä yhdistettynä ääriviivakuvaan. I = intima ja M = intiman alla oleva media.

PSL/mm²-arvoista laskettiin intima-terve suonen seinämä, intima-adventitia, media-terve suonen seinämä, media-adventitia, media-intima ja terve suonen seinämä-adventitia -suhteet, jotka on esitetty *Taulukossa 7*. Suhdeluvun avulla voitiin tarkastella, kertyikö ^{99m}Tc -Maraciclacidi enemmän esimerkiksi mediaan kuin terveeseen suonen

seinämään. Analyysi osoitti, että ateroskleroottisilla hiirillä ^{99m}Tc -Maraciclacitidi kertyi samanlaisesti intimaan ja terveen suonen seinämään (suhde 0.95 ± 0.26 , $p=0.466$). Sen sijaan ^{99m}Tc -Maraciclacitidi kertyi merkitsevästi enemmän intiman alla olevaa mediaan kuin terveen suoneen seinämään (suhde 1.50 ± 0.40 , $p=0.001$). Ateroskleroottisilla uroksilla ainoastaan terve suonen seinämä-adventitia -suhde (1.78 ± 0.52) oli tilastollisesti naaraiden suhdetta (1.32 ± 0.28 , $p=0.023$) suurempi. Naarailla intima-terve suonen seinämä -suhde (1.07 ± 0.22) oli uroksien suhdetta (0.83 ± 0.22 , $p=0.035$) suurempi (Taulukko 7). Muissa suhdeluvuissa ei ollut ateroskleroottisilla hiirillä eroa. Kontrollihiirten terve suonen seinämä-adventitia -suhde (1.95 ± 0.34) oli ateroskleroottisten hiirten suhdetta (1.55 ± 0.47 , $p=0.009$) suurempi. Kontrollihiirten ryhmässä naaraiden ja urosten terve-suonen seinämä-adventitia -suhteessa ei havaittu eroa (Taulukko 7).

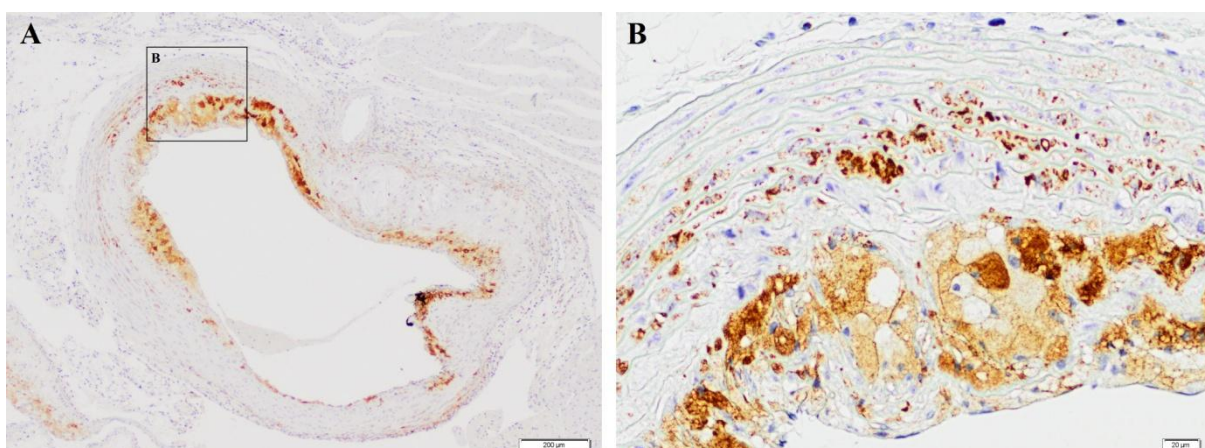
Taulukko 7. Autoradiografia-analyysin tulokset suhteina. Tulokset on esitetty suhdelukuina (keskiarvo \pm keskihajonta) koko ryhmässä sekä naaraat ja urokset erikseen. p -arvo kuvaa suhteen tilastollista merkitsevyyttä ryhmässä^a ja naaraiden ja urosten välistä eroa^b.

LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}	Kaikki	p-arvo^a	Naaraat	Urokset	p-arvo^b
Intima-terve suonen seinämä	0.95 ± 0.26	0.466	1.07 ± 0.22	0.83 ± 0.22	0.035
Intima-adventitia	1.38 ± 0.23	<0.0001	1.37 ± 0.12	1.39 ± 0.27	0.846
Media-terve suonen seinämä	1.50 ± 0.40	0.001	1.58 ± 0.41	1.43 ± 0.41	0.151
Media-adventitia	2.15 ± 0.43	<0.0001	2.02 ± 0.31	2.28 ± 0.48	0.206
Media-intima	1.57 ± 0.24	<0.0001	1.50 ± 0.25	1.65 ± 0.23	0.206
Terve suonen seinämä-adventitia	1.55 ± 0.47	0.005	1.32 ± 0.28	1.78 ± 0.52	0.023
C57BL/6N	Kaikki	p-arvo	Naaraat	Urokset	p-arvo
Terve suonen seinämä-adventitia	1.95 ± 0.34^c	<0.0001	1.99 ± 0.43	1.91 ± 0.24	0.614

^c $p=0.009$ ryhmien välillä

7.3 Immunohistokemiallinen analyysi

Ateroskleroottisten hiirten aortan tyvileikkeistä tarkasteltiin immunohistokemiallisten värjäysten perusteella plakin kokoa ja tulehdusastetta. Lisäksi tutkittiin, oliko ^{99m}Tc -Maraciclavidin kertymä yhtenevää makrofagien kertymän kanssa. Analyysiin otettiin mukaan 20 LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirtä (10 naarasta ja 10 urosta). Kaikkien hiirten aortan plakeissa oli havaittavissa tulehdus Mac-3 makrofagi-värjäyksen perusteella. Esimerkki tulehtuneesta plakista on esitetty *Kuvassa 9*.



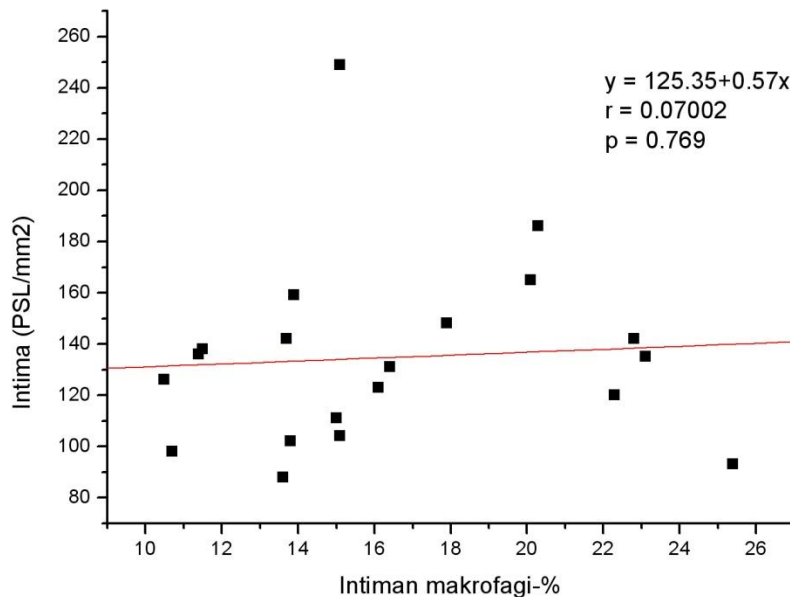
Kuva 9. Aortan tyvileikkeen makrofagi-värjäys (Mac-3). Kuvassa **A** on koko aortan tyvi ja kuvassa **B** 10-kertainen suurennos tulehtuneesta plakista. Ruskea väri kuvaa makrofageja.

Immunohistokemiallisten värjäysten avulla laskettiin intiman (plakin) ja median pinta-alat, joista määritettiin intima-media suhde (IM-suhde), joka oli keskimäärin 1.61 ± 0.93 . Naarilla IM-suhde (2.17 ± 1.0) oli merkittävästi suurempi kuin uroksilla (1.06 ± 0.36 , $p=0.004$). Makrofageja plakeissa esiintyi keskimäärin 16.4 ± 4.5 % eikä naaraiden ja urosten välillä havaittu eroa. Kun tarkasteltiin makrofagien prosenttiosuutta suhteessa plakin kokoon (IM-suhde \times makrofagi-%), se oli naarilla huomattavasti suurempi (33.9 ± 15.5) kuin uroksilla (25.5 ± 14.4 , $p=0.006$) (*Taulukko 8*).

Taulukko 8. Immunohistokemiallisen analyysin tulokset. Tulokset on esitetty keskiarvo \pm keskihajonta, ja p -arvo kuvaa tilastollista eroa naaraiden ja urosten välillä. IM-suhde = intima-media suhde.

LDLR^{-/-} ApoB^{100/100}	Kaikki	Naaraat	Urokset	p-arvo
IM-suhde	1.61 \pm 0.93	2.17 \pm 1.0	1.06 \pm 0.36	0.004
Makrofagi-%	16.4 \pm 4.5	16.5 \pm 5.1	16.3 \pm 4.0	0.928
IM-suhde \times makrofagi-%	25.5 \pm 14.4	33.9 \pm 15.5	17.1 \pm 6.7	0.006

Lisäksi laskettiin korrelaatio intiman makrofagien prosenttiosuuden ja autoradiografia-analyysissä havaitun merkkiaineen intima-kertymän välille. Tulos osoitti, että merkkiaineen kertymä ei ollut yhtenevää makrofagi-kertymän kanssa ($r=0.07002$, $p=0.769$) (Kuva 10). Tässä analyysissä korrelaatiota ei laskettu erikseen naaraille ja uroksille, koska merkkiaineen intima-kertymässä ja makrofagien prosenttiosuudessa ei ollut eroa naaraiden ja urosten välillä.



Kuva 10. Korrelaatio ^{99m}Tc-Maraciclatin intima-kertymän ja intiman makrofagien prosenttiosuuden välillä. Pisteet kuvaavat yksittäisten hiirten arvoja.

8 PÄÄTELMÄT JA POHDINTA

Tämän erikoistyön tarkoituksena oli selvittää uuden $\alpha_v\beta_3$ -integroiniin kohdentuvan gammakuvausmerkkiaineen, ^{99m}Tc -Maraciclavidin soveltuvuutta ateroskleroottisten plakkien uudisverisuonituksen kuvantamiseen ja plakkien haurauden arvioimiseen ateroskleroosin $\text{LDLR}^{-/-}\text{ApoB}^{100/100}$ -hiirimallissa. Hauraiden ateroskleroottisten plakkien uudisverisuonituksen kuvantaminen on lupaava kohde, sillä pienten verisuonten määrän on havaittu lisääntyneen merkittävästi hauraisissa ja repeytyneissä plakeissa sekä potilailla että eläinmalleissa. (Moulton ym. 1999 ja 2003; Moreno ym. 2004) $\alpha_v\beta_3$ -integroini on yksi keskeisimmistä uudisverisuonitusta säätelevistä tekijöistä, joten se saattaisi olla hyvä kuvantamisen kohdemolekyylillä plakkien haurauden arvioimisessa. $\alpha_v\beta_3$ -integroinin ilmentyminen on matalaa normaalissa fysiologiassa, mutta sen ilmentymisen on havaittu lisääntyneen potilaiden hauraisissa plakeissa. (Antonov ym. 2004; Beer ym. 2011; Virmani ym. 2005).

^{99m}Tc -Maraciclavidi on GE Healthcare'n kehittämä gammakuvausmerkkiaine, jolla ei vielä ole myyntilupaa. Uuden merkkiaineen kehittäminen on monivaiheinen prosessi, sillä merkkiaineen pitää täyttää radiolääkeaineelle asetetut vaatimukset. Kehitysvaiheita ovat muun muassa kohteen identifiointi ja validointi, radionuklidin valinta ja peptidin leimaus, merkkiaineen puhdistus ja formulointi, testaus solumalleilla (*in vitro*) ja eläinmalleilla (*in vivo*) sekä lopuksi kliiniset kokeet. Uuden merkkiaineen pitää sitoutua tarkasti ja valikoiden kohdemolekyylisiin kohdekudoksissa, puhdistua nopeasti muista kudoksista ja verenkierrosta, olla edullinen ja helppo tuottaa ja se ei saisi aiheuttaa haittavaikutuksia. Uuden merkkiaineen teho ja turvallisuus pitää osoittaa prekliinisissä kokeissa edeten lopulta kliinisiin kokeisiin. (Serdons ym. 2009)

^{99m}Tc -Maraciclavidin on todettu prekliinisissä kokeissa tunnistavan tarkasti $\alpha_v\beta_3$ -integroiniin ja sitoutuvan siihen alle yhden nanomoolin tehokkuudella. ^{99m}Tc -Maraciclavidin on myös todettu olevan aineenvaihdunnallisesti vakaa verenkierrossa (*in vivo* -stabiili) ja erittyvän nopeasti virtsaan. Hyvä *in vivo* -stabiilisuus on merkkiaineelle tärkeä asia, sillä gammakameran detektorit eivät pysty erottelemaan, tuleeko signaali alkuperäisestä merkkiaineesta vai *in vivo* -muodostuneesta radiometaboliitista. Lisäksi merkkiaineen nopea virtsaan erittyminen vähentää tutkittavan säderasitusta, kun radioaktiivisuus poistuu elimistöstä virtsatessa. (Dearling ym. 2013; Edwards ym. 2008)

Tällä hetkellä ^{99m}Tc -Maraciclacatidi on kliinisissä kokeissa syöpäpotilailla, joissa on onnistuneesti pystytty kuvantamaan rintasyöpiä ja rintasyöpien sekä keuhkosyöpien etäpesäkkeitä (Axelsson ym. 2010; Bach-Gansmo ym. 2006). Tässä erikoistyössä ^{99m}Tc -Maraciclacatidiä tutkittiin uudessa indikaatiossa hauraiden ateroskleroottisten plakkien kuvantamiseen LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä.

Hiiri eläinmallina soveltuu hyvin ateroskleroositutkimuksiin sen helpon saatavuuden, pienen koon, nopean lisääntymisen, pienten kustannusten ja geenien helpon muokattavuuden ansiosta. Esimerkiksi ryhmäkokoja voidaan kasvattaa tilastollisen luotettavuuden parantamiseksi tutkimuksissa, koska kustannukset eivät ole niin suuria. Hiirillä ateroskleroosi voidaan indusoida geneettisten muutosten ja runsasrasvaisen dieetin avulla. (Tannock & King 2010) Silvola ja työtoverit selvittivät vuonna 2011, miten ikä ja rasvadieetin pituus vaikuttavat LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirten plakkien kehittymiseen. Tutkimuksessa havaittiin, että kuuden kuukauden ikäinen LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiiri, joka oli neljä kuukautta rasvadietillä, soveltui parhaiten kuvantamistutkimuksiin, sillä näillä hiirillä oli suuret plakit ja eniten tulehdusta plakeissa. (Silvola ym. 2011) Lisäksi hiirimalleista LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiiren lipidiprofiili muistuttaa eniten ihmisen lipidiprofiilia (Powell-Braxton ym. 1998). Etujen ansiosta tähän erikoistyöhön valittiin eläinmalliksi kuuden kuukauden ikäinen LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiiri, joka oli neljä kuukautta rasvadietillä.

^{99m}Tc -Maraciclacatidin valmistus oli helppoa ja nopeaa, sillä GE:ltä saatiin valmis reaktioseos, johon lisättiin vain radionuklidi. ^{99m}Tc tuotetaan generaattorilla, joten sen tuottaminen on halvempaa kuin esimerkiksi syklotronilla tuotettavan 18-Fluorin. Käytännössä synteesi ja laatuajo veivät aikaa hieman yli tunnin, jonka jälkeen ^{99m}Tc -Maraciclacatidi oli käyttövalmis. Synteesi oli myös erittäin luotettava, sillä radiokemiallinen puhtaus oli aina yli 95 %. Kliinistä käyttöä ajatellen ^{99m}Tc -Maraciclacatidin valmistuksen nopeus ja luotettavuus ovat erittäin hyviä ominaisuuksia.

Radioaktiivisuuden kokokehojakaumamittauksissa ^{99m}Tc -Maraciclacatidi kertyi enemmän ateroskleroottisten hiirten kuin kontrollihiirten aorttaan lähestyen tilastollista merkitsevyyttä. Kokokehojakaumamittauksissa saadaan tavallisesti karkea arvio merkkiaineen kertymisestä ja jakautumisesta eri kudoksiin ja tarkempi analyysi tehdään

ex vivo -autoradiografialla. Kokokehojakaumamittauksissa aortan kertymään vaikuttaa se, kuinka hyvin aortan saa preparointivaiheessa puhdistettua ympäröivistä kudoksista. Kontrollihiirten terve aortta on vaikea puhdistaa, koska terve verisuoni on erittäin ohut ja vaikeasti havaittavissa ympäröivästä rasvakudoksesta. Sen ympärille jää usein rasvaa, joka saattaa näkyä näissä tuloksissa tilastollisen eron puuttumisena. Ateroskleroottiset aortat sen sijaan ovat paljon helpompia puhdistaa, koska plakit on helppo nähdä ja rasvan saa puhdistettua helposti pois. ^{99m}Tc -Maraciclavidin on osoitettu aikaisemmissa tutkimuksissa jakaantuvan erityisesti munuaisiin, ohutsuoleen, keuhkoihin, maksaan ja pernaan (Dearling ym. 2013; Edwards ym. 2008). RGD-peptideille tyypillistä on jakaantuminen suolistoon, munuaisiin ja keuhkoihin (Liu ym. 2007; Laitinen ym. 2009; Haukkala ym. 2009). Samansuuntaisia tuloksia saatiin tässäkin tutkimuksessa sekä LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä että C57BL/6N-kannan hiirillä. ^{99m}Tc -Maraciclavidin kertyi kuitenkin ateroskleroottisilla hiirillä merkitsevästi enemmän haimaan, kateenkorvaan, keuhkoihin, lihakseen, maksaan, pernaan ja vereen kuin kontrollihiirillä. Tulos saattaa kertoa siitä, että patologisia muutoksia on nähtävissä myös muissa rasva-aineenvaihduntaan liittyvissä elimissä kuten maksassa.

Tässä erikoistyössä lopetusaikapisteeksi valittiin tunti injektiohetkestä. ^{99m}Tc :n radioaktiivinen puoliintumisaika on kuusi tuntia, joten olisi ollut mahdollista käyttää myös pidempää aikapistettä. Halusimme kuitenkin verrata ^{99m}Tc -Maraciclavidin muihin LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä testattuihin RGD-peptideihin (Laitinen ym. 2009; Haukkala ym. 2009). Aikaisemmissa tutkimuksissa tunnin aikapisteessä ^{18}F -Galacto-RGD kertyi merkitsevästi enemmän ateroskleroottisten hiirten kuin kontrollihiirten koko aorttaan (Laitinen ym. 2009). ^{68}Ga -DOTA-RGD:llä vastaavaa eroa ei havaittu tunnin aikapisteessä samoin kuin ei ^{99m}Tc -Maraciclavidinilla (Haukkala ym. 2009). ^{99m}Tc -Maraciclavidin kertyi kuitenkin yli kaksi kertaa enemmän aorttaan ja sydämeen kuin vereen tunti injektion jälkeen, joten aikapiste valittiin oikein ja ^{99m}Tc -Maraciclavidin kinetiikka olisi erittäin suotuisa ateroskleroottisten plakkien *in vivo* -kuvantamiselle.

^{99m}Tc -Maraciclavidin kertyminen aorttaan tutkittiin tarkemmin *ex vivo* -autoradiografialla. Samaa menetelmää on käytetty aikaisemmissa tutkimuksissa, joissa molemmat ^{18}F -Galacto-RGD ja ^{68}Ga -DOTA-RGD kertyivät intimaan 1.4 kertaa enemmän suhteessa terveen suonen seinämään ja ero oli tilastollisesti merkitsevä

(Laitinen ym. 2009; Haukkala ym. 2009). ^{99m}Tc -Maraciclavidin kertymä taas oli samanlaista intimassa ja terveen suonen seinämässä suhteen ollessa 0.95. Syynä saattaa olla se, että aikaisemmissa tutkimuksissa oli käytetty noin vuoden ikäisiä hiiriä, jotka olivat olleet noin puoli vuotta rasvadieetillä, joten plakit saattoivat olla erilaisia. ^{99m}Tc -Maraciclavidin kertyi kuitenkin merkitsevästi enemmän intiman alla olevaan mediaan kuin terveen suonen seinämään suhteen ollessa 1.5. Tutkimuksessa histologisten analyysien perusteella ^{99m}Tc -Maraciclavidin radioaktiivisuuskertymän ja makrofagien välillä ei ollut korrelaatiota.

^{99m}Tc -Maraciclavidin on hiljattain tutkittu verisuonen seinämän tulehduksen kuvantamisessa ApoE^{-/-}-hiirillä, jossa tulehdus aiheutettiin kirurgisesti kaulavaltimoihin. *In vivo* -kuvantamisella pystyttiin osoittamaan, että ^{99m}Tc -Maraciclavidin kertyi merkitsevästi enemmän tulehtuneeseen kaulavaltimoon kuin kontrollivaltimoon ja kertymä oli yhtenevää makrofagien esiintyvyyden kanssa. (Razavian ym. 2011) Aikaisemmassa tutkimuksessa käytettiin ApoE^{-/-}-hiiriä, joiden tulehdusmekanismi saattaa olla erilainen LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}-hiirten ja ihmisen tulehdusmekanismin kanssa (Nakashima ym. 1994). Lisäksi kaulavaltimoiden tulehdus oli aiheutettu kirurgisesti (Razavian ym. 2011). Haukkalan ja työtovereiden (2009) tutkimuksessa ei myöskään havaittu korrelaatiota ^{68}Ga -DOTA-RGD:n ja makrofagien välillä (Haukkala ym. 2009).

Potilasnäytteistä on tutkittu $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymistä intiman lisäksi mediassa. $\alpha_v\beta_3$ -integriinin on osoitettu ilmentyvän mediassa ja myös osassa intiman sileälihassoluissa. $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymistä on havaittu potilailla lisäksi terveen verisuonen seinämässä. $\alpha_v\beta_3$ -integriini saattaa olla keskeinen säätelijä sileälihassolujen liikkumisessa median ja intiman välillä tulehdusprosessin aikana. (Antonov ym. 2004; Dufourcq ym. 1998; Hoshiga ym. 1995) Tämän tutkimuksen perusteella näyttäisi siltä, että LDLR^{-/-}-ApoB^{100/100}-hiirillä ^{99m}Tc -Maraciclavidin kertymisen mekanismi aorttaan saattaisi liittyä lähinnä sileälihassolujen liikkumisen säätelyyn ja verisuonen uudelleenmuovautumiseen (engl. remodeling) eikä siihen, että $\alpha_v\beta_3$ -integriiniä ilmennettäisiin makrofagien pinnalla.

Erikoistyössä ei kuvannettu ateroskleroottisia plakkeja *in vivo*, sillä Turussa ei ole käytössä pieneläimille soveltuvaa gammakameraa. Sen sijaan teimme tarkan

autoradiografiatutkimuksen, jolla yritimme selvittää minne ^{99m}Tc -Maraciclacitidi kulkeutuu aortan plakeissa. Autoradiografia-analyysillä voitiin osoittaa, että ^{99m}Tc -Maraciclacitidi kertyi ateroskleroottisilla hiirillä intiman alla olevaan mediaan eikä intimaan. ^{99m}Tc -Maraciclacitidin kertyminen intiman alla olevaan mediaan vaatii kuitenkin lisätutkimuksia. Immunohistokemiallisten värjäysten avulla voitaisiin aorttaleikkeistä tutkia $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ja endoteelisolujen ilmentymistä mediassa. Näin saataisiin tietoa, esiintyykö $\text{LDLR}^{-/-}\text{ApoB}^{100/100}$ -hiirillä uudisverisuonitusta median puolella ja onko mahdollista, että uudisverisuonitusta ei ole vielä ehtinyt muodostua plakkeihin.

^{18}F -FDG on tällä hetkellä hauraiden plakkien molekyylikuvantamiseen käytetyin merkkiaine, sillä ^{18}F -FDG:llä on pystytty kuvantamaan tutkimuspotilaiden tulehtuneita kaulavaltimoplakkeja (Menezes ym. 2011; Rudd ym. 2002 Tawakol ym. 2006) ^{18}F -FDG kertyy kuitenkin voimakkaasti sydänlihakseen, jolloin sepelvaltimoiden kuvantaminen on haastavaa ja siksi uusia spesifisempiä merkkiaineita yritetään kehittää hauraiden plakkien kuvantamiseen (Williams & Kolodny 2009). Myös $\text{LDLR}^{-/-}\text{ApoB}^{100/100}$ -hiirillä ^{18}F -FDG on osoittautunut hyväksi vertailumerkkiaineeksi uusien merkkiaineiden kehittämisessä, sillä esimerkiksi ^{18}F -FDG:n kertymä intimassa on 2.3 kertaa suurempi kuin terveen suonen seinämässä kuusi kuukautta vanhoilla hiirillä. ^{18}F -FDG:hen verrattuna ^{99m}Tc -Maraciclacitidi kertyi vähemmän sydänlihakseen, mutta samalla intiman kertymä oli pieni. Se, onko ^{99m}Tc -Maraciclacitidin kertymä intimaan riittävän suuri *in vivo* -kuvantamista varten, pitää selvittää jatkotutkimuksilla.

Tutkimuksessa ehkä hieman yllättäen oli havaittavissa eroja sukupuolten välillä ^{99m}Tc -Maraciclacitidin kertymässä. Molemmissa ryhmissä naaraita oli 10 ja uroksia 10, joten tutkittavien eläinten lukumäärä saattoi olla riittävä saamaan esiin tilastollisia eroja sukupuolten välillä. Missään analyysissä kontrollihiirten ryhmässä ei ollut eroa sukupuolten välillä, mikä voi kertoa siitä, että ateroskleroottisilla hiirillä taudin ilmeneminen ja eteneminen saattaa olla erilainen naarailla ja uroksilla. On esitetty, että $\text{ApoE}^{-/-}$ - ja $\text{LDLR}^{-/-}$ -hiirillä ihmisen tapaan estrogeeneillä saattaisi olla ateroskleroosilta suojaava vaikutus, ja naarailla ateroskleroosi kehittyisi uroksia myöhemmin. Osassa tutkimuksissa $\text{ApoE}^{-/-}$ - ja $\text{LDLR}^{-/-}$ -hiirillä uroksille on havaittu kehittyvän suuremmat

plakit kuin naaraille. (Meyrelles ym.2011; Tangirala 1995) LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirillä sukupuolella ei pitäisi olla vaikutusta plakkien kehittymiseen (Heinonen ym. 2007).

Tässä erikoistyössä ^{99m}Tc-Maraciclacatidi kertyi naarailla merkittävästi enemmän haimaan, imusolmukkeisiin, kateenkorvaan, lihakseen, maksaan, ruskeaan rasvaan, sydämeen ja vereen. Naarailla ^{99m}Tc-Maraciclacatidin kertymän intima-terve suonen seinämä -suhde oli merkittävästi suurempi kuin uroksilla, ja naarailla oli havaittavissa isommat plakit kuin uroksilla. Korrelaatiota plakkien koon ja ^{99m}Tc-Maraciclacatidin kertymän välillä ei havaittu. Uroksilla ^{99m}Tc-Maraciclacatidi kertyi kuitenkin merkittävästi enemmän mediaan kuin naarailla. Autoradiografia-analyysin tekeminen on haastavaa johtuen hiiren aortan pienestä koosta, ja esimerkiksi terveen suonen määrittäminen autoradiografiakuvista voi joskus olla hankalaa. Hajonta saattaa myös sekoittaa sukupuolten välistä vertailua.

LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}- ja ApoE^{-/-}-hiirillä on raportoitu uudisverisuonien kehittymistä aortan suuriin tulehtuneisiin plakkeihin, mutta läheskään kaikkiin plakkeihin uudisverisuonitusta ei muodostu (Mollmark ym. 2012; Moulton ym. 1999 ja 2003; Tanaka 2011). Lisäksi plakkien repeytyminen on hiirillä harvinaista, tosin ApoE^{-/-}-hiirillä plakkien repeytymistä on raportoitu (Calara ym. 2001; Tannock & King 2010). LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}-hiirimalli ei siis välttämättä ole soveltuvin malli hauraiden plakkien uudisverisuonituksen kuvantamiseen.

Seuraavaksi ^{99m}Tc-Maraciclacatidiä kannattaisi testata muilla eläinmalleilla kuten ateroskleroosin kanimallilla. Klassinen ateroskleroosin kanimalli on Watanabe-kani, jolta perinnöllisesti puuttuu LDL-reseptori. Watanaben kanille ateroskleroosi kehittyy iän myötä ja kehittymistä edistetään noin vuoden kestäväällä runsasrasvaisella dietillä. (Watanabe ym. 1980) Kaneille voidaan ateroskleroosi aiheuttaa myös kokeellisesti. Kani soveltuu hyvin ateroskleroositutkimuksiin sen riittävän suuren koon vuoksi ja kanimallien ateroskleroosin kehittyminen, lipidiprofiili ja plakkien morfologia on hyvin ihmisen kaltainen. (Xiangdong ym. 2011) Tulevaisuudessa voitaisiin testata myös rakenteeltaan multimeerisiä RGD-peptidejä. Maraciclacatidi on syklinen monomeerinen peptidi. Multimeerisillä peptideillä on todettu olevan paremmat farmakokineettiset

ominaisuudet kuin monomeerisillä peptideillä. Lisäksi multimeeriset peptidit sitoutuvat paremmin $\alpha_v\beta_3$ -integroiniin. (Beer & Schwaiger 2008)

Yhteenvetona voidaan todeta, että ^{99m}Tc -Maraciclacatidi kertyi enemmän ateroskleroottisten hiirten kuin kontrollihiirten aorttaan, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Autoradiografia-analyysissä suurin ^{99m}Tc -Maraciclacatidin kertymä havaittiin intiman alla olevassa mediassa. ^{99m}Tc -Maraciclacatidi kertyi yli kaksi kertaa enemmän aorttaan ja sydämeen kuin vereen, joten ^{99m}Tc -Maraciclacatidin kinetiikka olisi erittäin suotuisa ateroskleroottisten plakkien *in vivo* -kuvantamiselle.

LÄHTEET

Antonov A. S., Kolodgie F. D., Munn D. H. ja Gerrity R. G. (2004). Regulation of Macrophage Foam Cell Formation by $\alpha\beta_3$ Integrin. Potential role in Human Atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 165:247–258.

Aumailley M., Gurrath M. Müller G., Calvete J. ja Kessler H. (1991). Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* 291(1):50–54.

Axelsson R, Bach-Gansmo T, Castell-Conesa J ja McParland B. J. (2010). An open-label, multicenter, phase 2a study to assess the feasibility of imaging metastases in latestage cancer patients with the alpha v beta 3-selective angiogenesis imaging agent $^{99m}\text{Tc-NC100692}$. *Acta. Radiol.* 51:40–46.

Ayala-López W., Xia W., Varghese B. ja Low P. S. (2010). Imaging of Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice: Targeting of a Folate-Conjugated Radiopharmaceutical to Activated Macrophages. *J. Nucl. Med.* 51:768–774.

Bach-Gansmo T., Danielsson R. Saracco A., Wilczek B., Bogsrud T. V., Fangberget A. Tangerud Å ja Tobin T. (2006). Integrin Receptor Imaging of Breast Cancer: A Proof-of-Concept Study to Evaluate $^{99m}\text{Tc-NC100692}$. *J. Nucl. Med.* 47:1434–1439.

Beekman F. J., Van der Have F., Vastenhouw B., Van der Linden A. JA., Rijk P. P., Burbach P. H., ja Smidt M. P. (2005). U-SPECT-I: A Novel System for Submillimeter-Resolution Tomography with Radiolabeled Molecules in Mice. *J. Nucl. Med.* 46:1194–1200.

Beer A. J., Haubner R., Goebel M., Luderschmidt S., Spilker M. E., Wester H-J., Weber W. A. ja Schwaiger M. (2005). Biodistribution and Pharmacokinetics of the $\alpha_v\beta_3$ -Selective Tracer $^{18}\text{F-Galacto-RGD}$ in Cancer Patients. *J. Nucl. Med.* 46:1333–1341.

Beer A. J., Kessler H., Wester H-J. ja Schwaiger M. (2011). PET Imaging of Integrin $\alpha v \beta 3$ Expression. *Theranostics*. 1:48–57.

Beer A. J., & Schwaiger M. (2008). Imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *Cancer Metastasis Rev.* 27:631–644.

Boggs K. P., Rock C. O. ja Jackowski S. (1995). Lysophosphatidylcholine and 1-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step. *J. Biol. Chem.* 270:7757–7764.

Bucerius J., Schmaljohann J., Böhm I., Palmedo H., Guhlke S., Tiemann K., Schild H. H., Biersack H-J. ja Manka C. (2008). Feasibility of ^{18}F -fluoromethylcholine PET/CT for imaging of vessel wall alterations in humans – first results. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 35:815–820.

Calara F., Silvestre M., Casanada F., Yuan N., Napoli C. ja Palinski W. (2001). Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J. Pathol.* 195:257–263.

Carmeliet P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6(1):389–395.

Carmeliet P., & Jain R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407:249–257.

Chatziioannou A. F. (2005). Instrumentation for Molecular Imaging in Preclinical Research Micro-PET and Micro-SPECT. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2:533–536.

Curtiss L. K. (2000). ApoE in Atherosclerosis: A Protein With Multiple Hats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1852-1853.

Constantinescu C. C. ja Mukherjee J. (2009). Performance evaluation of an Inveon PET preclinical scanner. *Phys. Med. Biol.* 54(9):2885–2899.

Dahlöf B. (2010). Cardiovascular Disease Risk Factors: Epidemiology and Risk Assessment. *Am. J. Cardiol.* 105(1):3A–9A.

Dearling J. L. J., Barnes J. W., Panigrahy D., Zimmerman R. E. Fahey F., Treves S. T., Morrison M. S., Kieran M. W. ja Packard A.B. (2013). Specific uptake of ^{99m}Tc -NC100692, an $\alpha\beta 3$ -targeted imaging probe, in subcutaneous and orthotopic tumors. *Nucl. Med. Biol.* 40:788–794.

Dufourcq P., Louis H., Moreau C., Daret D., Boisseau M. R., Lamazière J. M. D. ja Bonnet J. (1998). Vitronectin Expression and Interaction With Receptors in Smooth Muscle Cells From Human Atheromatous Plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:168–176.

Edwards D., Jones P., Haramis H., Battle M., Lear R., Barnett D. J., Edwards C., Crawford H., Black A. ja Godden V. (2008). ^{99m}Tc -NC100692 – a tracer for imaging vitronectin receptors associated with angiogenesis: a preclinical investigation. *Nucl. Med. Biol.* 35:365–375.

Farese jr. R. V., Véniant M. M., Cham C. M., Flynn L. M., Pierotti V., Loring J. F., Traberii M., Ruland S., Stokowski R. S., Huszar D. ja Young S. G. (1996). Phenotypic analysis of mice expressing exclusively apolipoprotein B48 or apolipoprotein B100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6393-6398.

Folkman J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1(1):27–31.

Gaemperli O., Shalhoub J., Owen D. R. J., Lamare F., Johansson S., Fouladi N., Davies A. H., Rimoldi O. E. ja Camici P. G. (2011). Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with ^{11}C -PK11195 positron emission tomography/computed tomography. *Eur. Heart. J.* 33(15):1902–10.

Hansson G. K. (2005). Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* 352:1685–95.

Hansson G. K., & Hermansson A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 12(3):204–212.

Haubner R. (2006). $\alpha_v\beta_3$ -integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 33:S54–S63.

Haukkala J., Laitinen I., Luoto P., Iveson P., Wilson I., Karlsen H., Cuthbertson A., Laine J., Leppänen P., Ylä-Herttuala S., Knuuti J. ja Roivainen A. (2009). ^{68}Ga -DOTA-RGD peptide: biodistribution and binding into atherosclerotic plaques in mice. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 36:2058–2067.

Heikkilä J., Kupari M., Airaksinen J., Huikuri H., Nieminen M. S. ja Peuhkurinen K. (2008). *Kardiologia*. Kustannus Oy. Duodecim. Helsinki.

Heinonen S. E., Leppänen P., Kholová I., Lumivuori H., Häkkinen S-K., Bosch F., Laakso M. ja Ylä-Herttuala S. (2007). Increased Atherosclerotic Lesion Calcification in a Novel Mouse Model Combining Insulin Resistance, Hyperglycemia, and Hypercholesterolemia. *Circ. Res.* 101:1058-1067.

Hood J. D., & Cheres D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Canc.* 2:91–100.

Horton M. A. (1997). The $\alpha_v\beta_3$ Integrin "Vitronectin Receptor". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:721–725.

Hoshiga M., Alpers C. E., Smith L. L., Giachelli C. M. ja Schwartz S. M. (1995). $\alpha_v\beta_3$ Integrin Expression in Normal and Atherosclerotic Artery. *Circ. Res.* 77:1129–1135.

Hulten L. M. & Levin M. (2009). The role of hypoxia in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 20:409–414.

Ishibashi S., Herz J., Maedat N., Goldstein J. L. ja Brown M. S. (1994). The two-receptor model of lipoprotein clearance: Tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 91:4431-4435.

Isobe S., Tsimikas S., Zhou J., Fujimoto S., Sarai M., Branks M. J., Fujimoto A., Hofstra L., Reutelingsperger C. P., Murohara T., Virmani R., Kolodgie F. D., Narula N., Petrov A. ja Narula J. (2006). Noninvasive Imaging of Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E-Deficient and Low-Density-Lipoprotein Receptor-Deficient Mice with Annexin A5. *J. Nucl. Med.* 47:1497–1505.

Johnson L. L., Schofield L., Donahay T., Narula N. ja Narula J. (2005). ^{99m}Tc-Annexin V Imaging for In Vivo Detection of Atherosclerotic Lesions in Porcine Coronary Arteries. *J. Nucl. Med.* 46:1186–1193.

Kato K., Schober O., Ikeda M., Schäfers M., Ishigaki T., Kies P., Naganawa S. ja Stegger L. (2009). Evaluation and comparison of ¹¹C-choline uptake and calcification in aortic and common carotid arterial walls with combined PET/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 36:1622–1628.

Kesäniemi A., & Salomaa V. (2009). Duodecim Terveyskirjasto, Sepelvaltimotauti. www.terveyskirjasto.fi, luettu 18.1.2013.

Khurana R., Simons M., Martin J. F. ja Zachary I. C. (2005). Role of Angiogenesis in Cardiovascular Disease: A Critical Appraisal. *Circulation.* 112:1813–1824.

Kietselaer B. L., Reutelingsperger C. P., Heidendal G. A., Daemen M. J., Mess W. H., Hofstra L. ja Narula J. (2004). Noninvasive Detection of Plaque Instability with Use of Radiolabeled Annexin A5 in Patients with Carotid-Artery Atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 350:1472–1473.

King M. A., Pretorius P. H., Farncombe T. ja Beekman F. (2002). Introduction to the Physics of Molecular Imaging With Radioactive Tracers in Small Animals. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 39:221–230.

Kircher M. F., Grimm J., Swirski F. K., Libby P., Gerszen R. E., Allport J. R. ja Weissleder R. (2008). Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions. *Circulation.* 117:388–395.

Kolodgie F. D., Petrov A., Virmani R., Narula N., Verjans J. W., Weber D. K., Hartung D., Steinmetz N., Vanderheyden J. L., Vannan M. A., Gold H. K., Reutelingsperger C. P. M., Hofstra L. ja Narula J. (2003). Targeting of Apoptotic Macrophages and Experimental Atheroma With Radiolabeled Annexin V: A Technique With Potential for Noninvasive Imaging of Vulnerable Plaque. *Circulation.* 108:3134-3139.

Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T. ja van Oers M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 84:1415–1420.

Korpela H. (2009). Isotooppilääketeiede, Säteilyn käyttö, STUK.

Laitinen I. E. K., Luoto P., Någren K., Marjamäki P. M., Silvola J. M. U., Hellberg S., Laine V. J. O., Ylä-Herttuala S., Knuuti J. ja Roivainen A. (2010). Uptake of ¹¹C-Choline in Mouse Atherosclerotic Plaques. *J. Nucl. Med.* 51:798–802.

Laitinen I., Marjamäki P., Haaparanta M., Savisto N., Laine J. O., Soini S. L., Wilson I., Leppänen P., Ylä-Herttuala S., Roivainen A. ja Knuuti J. (2006). Non-specific binding of [¹⁸F]FDG to calcifications in atherosclerotic plaques: experimental study of mouse and human arteries. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 33:1461–1467.

Laitinen I., Marjamäki P., Någren K., Laine V. J. O., Wilson I., Leppänen P., Ylä-Herttuala S., Roivainen A. ja Knuuti J. (2008). Uptake of inflammatory cell marker

[¹¹C]PK11195 into mouse atherosclerotic plaques. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 36:73–80.

Laitinen I., Saraste A., Weidl E., Poethko T., Weber A. W., Nekolla S. G., Leppänen P., Ylä-Herttuala S., Höglzwimmer G., Walch A., Esposito I., Wester H-J., Knuuti J. ja Schwaiger M. (2009). Evaluation of $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Targeted Positron Emission Tomography Tracer ¹⁸F-Galacto-RGD for Imaging of Vascular Inflammation in Atherosclerotic Mice. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 2:331–338.

Laufer E. M., Winkens H. M., Corsten M. F., Reutelingsperger C. P., Narula J. ja Hofstra L. (2009). PET and SPECT imaging of apoptosis in vulnerable atherosclerotic plaques with radiolabeled Annexin A5. *J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 53:26–34.

Libby P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 420:868–874.

Libby P., DiCarli M., ja Weissleder R. (2010). The Vascular Biology of Atherosclerosis and Imaging Targets. *J. Nucl. Med.* 51:33S–37S.

Libby P., & Theroux P. (2005). Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation.* 111:3481–3488.

Liu S., Hsieh W. Y., Jiang Y., Kim Y. S., Sreerama S. G., Chen X., Jia B. ja Wang F. (2007). Evaluation of a (^{99m}Tc)-labeled cyclic RGD tetramer for noninvasive imaging integrin $\alpha(v)\beta_3$ -positive breast cancer. *Bioconjug. Chem.* 18:438–446.

Lusis A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature.* 407:233–241.

Matter C. M., Wyss M. T., Meier P., Späth N., Von Lukowicz T., Lohmann C., Weber B., Ramirez de Molina A., Lacal J. C., Ametamey S. M., Von Schulthess G. K., Lüscher T. F., Kaufmann P. A. ja Buck A. (2006). ¹⁸F-Choline Images Murine Atherosclerotic Plaques Ex Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:584–589.

Menezes L. J., Kotze C. W., Agu O., Richards T., Brookes J., Goh V. J., Rodriguez-Justo M., Endozo R., Harvey R., Yusuf S. W., Ell P. J. ja Groves A. M. (2011). Investigating Vulnerable Atheroma Using Combined ^{18}F -FDG PET/CT Angiography of Carotid Plaque with Immunohistochemical Validation. *J. Nucl. Med.* 52:1698–1703.

Meyrelles S. S., Peotta P. A., Pereira T. M. C. ja Vasquez E. C. (2011). Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids. Health. Dis.* 10:1–18.

Mollmark J. I., Park A. J.-H., Kim J., Wang T. Z., Katzenell S., Shipman S. L., Zagorchev L. G., Simons M. ja Mulligan-Kehoe M. J. (2012). Fibroblast Growth Factor-2 Is Required for Vasa Vasorum Plexus Stability in Hypercholesterolemic Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32:2644–2651.

Moore K., & Tabas I. (2011). Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell.* 145(3):341–355.

Moreno P. R., Purushothaman K. R., Fuster V., Echeverri D., Trusczyńska H., Sharma S. K., Badimon J. J. ja O'Connor W. N. (2004). Plaque Neovascularization Is Increased in Ruptured Atherosclerotic Lesions of Human Aorta: Implications for Plaque Vulnerability. *Circulation.* 110:2032–2038.

Moulton K. S., Heller E., Konerding M. A., Flynn E., Palinski W. ja Folkman J. (1999). Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation.* 99:1726–1732.

Moulton K. S., Vakili K., Zurakowski D., Soliman M., Butterfield C., Sylvén E., Lo K.-M., Gillies S., Javaherian K. ja Folkman J. (2003). Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(8):4736–4741.

Mukhopadhyay R. (2013). Mouse models of atherosclerosis: explaining critical roles of lipid metabolism and inflammation. *J. Appl. Genetics.* 54(2):185-92.

Naghavi M., Libby P., Falk E., Casscells S. W., ym. (2003). From Vulnerable Plaque to Vulnerable patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I. *Circulation*. 108:1664–1672.

Nahrendorf M., Keliher E., Panizzi P., Zhang H., Hembrador S., Figueiredo J-L., Aikawa E., Kelly K., Libby P. ja Weissleder R. (2009). ^{18}F -4V for PET-CT Imaging of VCAM-1 Expression in Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.: Cardiovasc. Imaging*. 2:1231–1222.

Nakashima Y., Plump A. S., Raines E. W., Breslow J. L. ja Ross R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 14:133-140.

Powell-Braxton L., Véniant M., Latvala R. D., Hirano K. I., Won W. B., Ross J., Dybdal N., Zlot C. H., Young S. G. ja Davidson N. O. (1998). A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nat. Med.* 4(8):934-8.

Piedrahita J. A., Zhang S. H., Hagman J. R., Oliver P. M. ja Maeda N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 89:4471-4475.

Pugliese F., Gaemperli O., Kinderlerer A. R., Lamare F., Shalhoub J., Davies A. H., Rimoldi O. E., Mason J. C. ja Camici P. G. (2010). Imaging of Vascular Inflammation with [^{11}C]-PK11195 and Positron Emission Tomography/Computed Tomography Angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56:653–61.

Razavian M., Marfatia R., Mongue-Din H., Tavakoli S., Sinusas A. J., Zhang J., Nie L. ja Sadeghi M. M. (2011). Integrin-Targeted Imaging of Inflammation in Vascular Remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31:2820–2826.

Reynolds L. E., Wyder L., Lively J. C., Taverna D., Robinson S. D., Huang X., Sheppard D., Hynes R. O. ja Hovalala-Dilke K. M. (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins. *Nat. Med.* 8(1):27–34.

Riou L. M., Broisant A., Dimastromatteo J., Pons G., Fagret D. ja Ghezzi C. (2009). Pre-clinical and clinical evaluation of nuclear tracers for the molecular imaging of vulnerable atherosclerotic: an overview. *Curr. Med. Chem.* 16(12):1499–1511.

Roivainen A., Jalkanen S. ja Nanni C. (2012). Gallium-labelled peptides for imaging of inflammation. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Suppl.* 1:S68–77.

Rominger A., Saam T., Vogl E., Ubleis C., la F. C., Förster S., Haug A., Cumming P., Reiser M. F., Nikolaou K., Bartenstein P. ja Hacker M. (2010). In vivo imaging of macrophage activity in the coronary arteries using ^{68}Ga -DOTATATE PET/CT: correlation with coronary calcium burden and risk factors. *J. Nucl. Med.* 51:193–197.

Rudd J.H.F., Warburton E. A., Fryer T. D., Jones H. A., Clark J. C., Antoun N., Johnström P., Davenport A. P., Kirkpatrick P. J., Arch B. N., Pickard J. D. ja Weissberg P. L. (2002). Imaging Atherosclerotic Plaque Inflammation With [^{18}F]-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *Circulation.* 105:2708-2711.

Saraste A., Nekolla S. G. ja Schwaiger M. (2009). Cardiovascular molecular imaging: an overview. *Cardiovasc. Res.* 83:643–652.

Schottelius M., Laufer B., Kessler H. ja Wester H-J. (2009). Ligands for Mapping $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression In Vivo. *Acc. Chem. Res.* 42:969–980.

Serdons K., Verbruggen A. ja Bormans G. M. (2009). Developing new molecular imaging probes for PET. *Methods.* 48:104–111.

Silva R., D'Amico G. Kairbaan M., Hovalala-Dilke K. M. ja Reynolds L. E. (2008). Integrins: The Keys to Unlocking Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1703–1713.

Silvola J. M. U., Saraste A., Forsback S., Laine V. J. O., Saukko P., Heinonen S. E., Ylä-Herttuala S., Roivainen A. ja Knuuti J. (2011). Detection of Hypoxia by [¹⁸F]EF5 in Atherosclerotic Plaques in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31:1011–1015.

Silvola J. M. U., Saraste A., Laitinen I., Savisto N., Laine J. O., Heinonen S. E. Ylä-Herttuala S., Saukko P., Nuutila P., Roivainen A. ja Knuuti J. (2011). Effects of Age, Diet, and Type 2 Diabetes on the Development and FDG Uptake of Atherosclerotic Plaques. *J. Am. Coll. Cardiol.: Cardiovasc. Imaging.* 4(12):1294–301.

Sluimer J. C. Gasc J-M., van Wanroij J. L., Kisters N., Groeneweg M., Gelpke M. D. S., Cleutjens J. P., van den Akker L. H., Corvol P., Wouters B. G., Daemen M. J. ja Bijmens A-P J. (2008). Hypoxia, Hypoxia-Inducible Transcription Factor, and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques Are Correlated With Intraplaque Angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51:1258–1265.

Stary H. C. (2000). Lipid and Macrophage Accumulation in Arteries of Children and The Development of Atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:1297S–1306S.

Tanaka K., Nagata D., Hirata Y., Tabata Y., Nagai R. ja Sata M. (2011). Augmented angiogenesis in adventitia promotes growth of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 215:366–373.

Tangirala R. K., Rubin E. M. ja Palinskil W. (1995). Quantitation of atherosclerosis murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid. Res.* 36:2320–2328.

Tannock L. R. ja King V. L. (2010). Animal models of atherosclerosis: More than mice. *Atherosclerosis.* 212:32–33.

Tawakol A., Fayad Z. A., Mogg R., Alon A., Klimas M. T., Dansky H., Subramanian S. S., Abdelbaky A., Rudd J. H. F., Farkouh M. E., Nunes I. O., Beals C. R. ja Shankar S.

S. (2013). Intensification of Statin Therapy Results in a Rapid Reduction in Atherosclerotic Inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62:909–917.

Tawakol A., Migrino R. Q., Bashian G. G., Bedri S., Vermylen D., Cury R. C., Yates D., LaMuraglia G. M., Furie K., Houser S., Gewirtz H., Muller J. E., Brady T. J. ja Fischman A. J. (2006). In Vivo ^{18}F -Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging Provides a Noninvasive Measure of Carotid Plaque Inflammation in Patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48(9):1818–24.

Véniant M. M., Zlot C. H., Walzem R. L., Pierotti V., Driscoll R., Dichek D., Herz J. ja Young S. G. (1998). Lipoprotein Clearance Mechanisms in LDL Receptor–Deficient “Apo-B48-only” and “Apo-B100-only” Mice. *J. Clin. Invest.* 102(8):1559–1568.

Virmani R., Kolodgie F. D., Burke A. P., Farb A. ja Schwartz S. M. (2000). Lessons From Sudden Coronary Death: A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1262–1275.

Virmani R., Kolodgie F. D., Burke A. P., Finn A. V., Gold H. K., Tulenko T. N., Wrenn S. P. ja Narula J. (2005). Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture: Angiogenesis as a Source of Intraplaque Hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:2054–2061.

Watanabe Y. (1980). Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis.* 36:261–268.

Williams G. & Kolodny G.M. (2009). Retrospective study of coronary uptake of ^{18}F -fluorodeoxyglucose in association with calcification and coronary artery disease: a preliminary study. *Nucl. Med. Common.* 30:287–291.

Worthley S. G., Zhang Z. Y., Machac J., Helft G., Tang C., Liew G. Y. H. Zaman A. G., Worthley M. I., Fayad Z. A., Buchsbaum M. S., Fuster V. ja Badimon J. J. (2009). In vivo non-invasive serial monitoring of FDG-PET progression and regression in a rabbit model of atherosclerosis. *Int. J. Cardiovasc. Imaging.* 25:251–257.

Xiangdong L., Yuanwu L., Hua Z., Liming R., Qiuyan L. ja Ning L. (2011). Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell*. 2(3):189–201.

Zhao Y., Kuge Y., Zhao S., Morita K., Inubushi M., Strauss H. W., Blankenberg F. G. ja Tamaki N. (2007). Comparison of ^{99m}Tc -Annexin A5 with ^{18}F -FDG for the detection of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 34:1747–1755.

Zhao Y., Kuge Y., Zhao S., Strauss H. W., Blankenberg F. G. ja Tamaki N. (2008) Prolonged High-Fat Feeding Enhances Aortic ^{18}F -FDG and ^{99m}Tc -Annexin A5 Uptake in Apolipoprotein E-Deficient and Wild-Type C57BL/6J Mice. *J. Nucl. Med.* 49:1707–1714.