



**TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
ÅBO YRKESHÖGSKOLA**

Opinnäytetyö

**ORTOTOOPPINEN, SYNGEENINEN
5TGM1 MULTIPPELI MYELOOMA
HIIRIMALLI. PILOTTITUTKIMUS**

Salla Talvitie

**Bioanalytiikka
2009**

TURUN
AMMATTIKORKEAKOULU

TIIVISTELMÄ

Koulutusohjelma: Bioanalytiikka	
Tekijä: Salla Talvitie	
Työn nimi: Ortotooppinen, syngeeninen 5TGM1 multippeli myelooma hiirimalli. Pilottitutkimus	
Suuntautumisvaihtoehto: Solu- ja molekyylibiologia	Ohjaajat Mika Venojärvi, Mari Suominen
Opinnäytetyön valmistumisajankohta: Kevät 2009	Sivumäärä: 83 + 5
<p>Multippeli myelooma on syöpä, jossa B-solulinjaan kuuluva plasmamoluklooni lisääntyy luuytimessä. Kyseessä on vakava sairaus, johon ei ole olemassa parantavaa hoitoa. Tämä tauti kattaa noin prosentin kaikista syövästä. Taudille on keskeistä luun mikroympäristön muutokset, jonka seurauksena potilaille kehittyy lyyttisiä luustomuutoksia. Muutokset luuytimessä vaikuttavat myös muihin taudille tyypillisiin oireisiin kuten erilaisiin sytopenioihin ja hyperkalsemiaan.</p> <p>Tutkimuksen tarkoituksena oli testata julkaisuihin perustuvaa hiirimallia ja tutkia, toimiiko tämä hiirimalli samalla tavalla kuin aikaisemmissa julkaisuissa on kuvattu. Tutkimuksessa käytettiin kolmea tutkimusryhmää, joista yksi oli kontrolliryhmä ja kaksi muuta ryhmää olivat hoidollisia. Hoidolliset ryhmät saivat kahdella eri annoksella bortezomib-lääkettä, jota käytetään multippelin myelooman hoitoon. Samalla selvitettiin, onko bortezomib tehokas lääke tässä eläinmallissa multippelin myelooman hoitoon ja tutkittiin, kumpi bortezomib-annos antaa paremman annosvasteen. Hiiriltä otettiin tutkimuksen aikana verinäytteet kuudesta eri aikapisteestä, joista määritettiin P1NP-, TRACP5b- ja paraproteiinipitoisuudet. Näiden parametrien avulla saatiin vastaukset tutkimusongelmiin. Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää kyseistä hiirimallia ja löytää mahdollinen verrokilääke tuleviin tutkimuksiin sekä saada alustava käsitys siitä minkä suuruista bortezomib-annosta olisi hyvä käyttää.</p> <p>Tutkimustulosten perusteella havaittiin, että malli toimi kuten aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu. Lisäksi saatiin selville, että bortezomib on tehokas lääke multippelin myelooman hoitoon ja sitä voidaan käyttää tulevissa tutkimuksissa verrokilääkkeenä. Samalla kuitenkin huomattiin toksisuutta odottamattoman alhaisilla pitoisuuksilla, joka antaa rajoituksia lääkkeen annokseen. Siihen kumpi bortezomib-annos antaa paremman annosvasteen ei saatu luotettavaa tulosta, koska toinen hoidollinen ryhmä (ryhmä 3) supistui tutkimuksen aikana vain kahden eläimen suuruiseksi. Näin pienestä ryhmästä ei voi tehdä statistisia analyyskejä, eikä näin ollen tehdä luotettavia päätelmiä.</p>	
Hakusanat: Multippeli myelooma, eläinmalli, luun biokemialliset merkkiaineet	
Säilytyspaikka: Turun ammattikorkeakoulun kirjasto	

Degree Programme: Biomedical Laboratory Sciences	
Author: Salla Talvitie	
Title: Orthotopic, syngeneic 5TGM1 multiple myeloma mouse model. A pilot study	
Specialization line: Cell- and molecular biology	Instructor(s): Mika Venojärvi, Mari Suominen
Date: Spring 2009	Total number of pages: 83 + 5
<p>Multiple myeloma is a plasma-cell cancer which multiplies in bone marrow. It covers about one percent of all cancers and there is no cure for this disease. The changes of bone microenvironment are characteristic of this disease and it causes lytic bone changes, hypercalcaemia and different kinds of cytopenias.</p> <p>The purpose of this study was to test a mouse model which is based on the previously published studies. There were all in all three study groups on which one was the control group and the two others were treatment groups. The treatment groups got bortezomib medicine with two different doses. At the same time was studied if bortezomib is a potent treatment for multiple myeloma in this animal model and which dose gives a better dose response. Blood samples were taken from the mice at six time points. P1NP, TRACP5b and paraprotein levels were analysed from the blood samples. The conclusions of the study were made based on the blood sample results. The goal of the study was to evolve the mouse model and to find a possible reference substance for the future studies and also get a preliminary conception of how big the dose would be best.</p> <p>The result of the study was that the model worked as it should. It was also found out that the bortezomib is a potent treatment for the disease and it could be used in the future studies as a reference substance. It was also found out that bortezomib had a toxic effect with unexpectedly low doses. The question of which dose would give better dose response, wasn't solved, because the other treatment group (group 3) shrank during the study to two animals. Because the group was so small the statistical analyse could not be done. Therefore reliable conclusion could not be done.</p>	
Keywords: Multiple myeloma, animal model, biochemical markers of bone	
Deposit at: The library of Turku University of Applied Sciences	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	MULTIPPELI MYELOOMA JA SEN TUTKIMINEN	8
2.1	Multippeli myelooma	8
2.1.1	Patogeneesi	8
2.1.2	Taudinkulku	10
2.1.3	Hoito	12
2.2	Luusto	13
2.2.1	Luun rakenne	14
2.2.2	Luun uudistuminen	16
2.3	Luun biokemialliset merkkiaineet	19
2.3.1	Luun muodostuksen merkkiaineet	20
2.3.2	Luun hajotuksen merkkiaineet	21
2.4	Eläinmalli	22
3	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT	26
4	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	28
4.1	Toteutussuunnitelma	28
4.2	Tutkimuksen kulku	30
4.2.1	Kokeen aloitus	30
4.2.2	Punnitus	32
4.2.3	Annostelu	32
4.2.4	Verinäytteiden otto	34
4.2.5	Kokeen lopetus	35
4.2.6	Verinäytteiden analysointi	36
4.3	Metodologiset lähtökohdat	43
4.4	Eettisyyden tarkastelu	44

4.4.1	Eläinkokeen eettisyys	44
4.4.2	Tutkijan eettisyys	47
5	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	49
5.1	Tilastollinen testaus	49
5.2	Tulokset	51
5.3	Tutkimustuloksien tarkastelu	68
6	POHDINTA	72
6.1	Tutkimustulosten pohdinta	72
6.2	Tutkimuksen luotettavuuden pohdinta	74
6.3	Jatkotutkimusaiheet	77
	LÄHTEET	78
	LIITTEET	
	LIITE 1: Sanasto	
	LIITE 2: Toimeksiantosopimus	
	LIITE 3: Aikataulu	
	KUVAT	
	Kuva 1. Pitkän luun rakenne.	15
	Kuva 2. Luun osteoneja.	16
	Kuva 3. Luun uudistumisen vaiheet.	18
	KUVIOT	
	Kuvio 1. Vuokaavio tutkimuksen etenemisestä.	29
	Kuvio 2. Ryhmien tutkimuspäivän -1 P1NP- pitoisuudet.	51
	Kuvio 3. Ryhmien tutkimuspäivän 13 P1NP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	52

Kuvio 4. Ryhmien tutkimuspäivän 20 P1NP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	53
Kuvio 5. Ryhmien tutkimuspäivän 27 P1NP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	54
Kuvio 6. Ryhmien tutkimuspäivän 34 P1NP-pitoisuudet.	55
Kuvio 7. Ryhmien tutkimuspäivän 42 P1NP-pitoisuudet.	56
Kuvio 8. Ryhmien tutkimuspäivän -1 TRACP5b-pitoisuudet.	57
Kuvio 9. Ryhmien tutkimuspäivän 13 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	58
Kuvio 10. Ryhmien tutkimuspäivän 20 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	59
Kuvio 11. Ryhmien tutkimuspäivän 27 TRACP5- tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	60
Kuvio 12. Ryhmien tutkimuspäivän 34 TRACP5b- pitoisuudet.	61
Kuvio 13. Ryhmien tutkimuspäivän 42 TRACP5b tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	62
Kuvio 14. Ryhmien tutkimuspäivän -1 IgG _{2b} -pitoisuudet.	63
Kuvio 15. Ryhmien tutkimuspäivän 27 IgG _{2b} -tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	64
Kuvio 16. Ryhmien tutkimuspäivän 34 IgG _{2b} -tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	65
Kuvio 17. Ryhmien tutkimuspäivän 42 IgG _{2b} -tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.	66
Kuvio 18. P1NP-tulosten prosentuaalisten muutosten kehitys tutkimuksen aikana.	67
Kuvio 19. TRACP5b-tulosten prosentuaalisten muutosten kehitys tutkimuksen aikana.	67
Kuvio 20. Paraproteiinitulosten prosentuaalisten muutosten kehitys tutkimuksen aikana.	68

TAULUKOT

Taulukko 1. Standardien laimennussarja.	41
Taulukko 2. Harjoitusnäytteiden laimennussarja.	42

1 JOHDANTO

Multippeli myelooma on syöpä, jossa B-solulinjaan kuuluva plasmamoluklooni lisääntyy luuytimessä. Kyseessä on vakava sairaus, johon ei ole olemassa parantavaa hoitoa. Tämä tauti kattaa noin prosentin kaikista syövistä. Taudille on keskeistä luun mikroympäristön muutokset, jonka seurauksena potilaille kehittyy lyyttisiä luustomuutoksia. Muutokset luuytimessä vaikuttavat myös muihin taudille tyypillisiin oireisiin kuten erilaisiin sytopenioihin ja hyperkalsemiaan (Remes 2007, 454–490.) Työn lukemisen helpottamiseksi työn loppuun liitteeksi 1 on lisätty sanasto selventämään niitä lääketieteellisiä termejä, joita ei ole selitetty tekstissä.

Tutkimus tehtiin Pharmatest Services Oy:n toimeksiannosta. Tutkimus lähti käytännön tarpeesta kehittää eläinmallia, jolla voitaisiin tutkia lääkeainekandidaatteja multippelia myeloomaa vastaan. Työ on tärkeää, koska tällä hetkellä tauti johtaa hoitoresistenttiin terminaalivaiheeseen keskimäärin 3-4 vuoden kuluessa diagnoosista (Remes 2007, 455). Omalta osaltaan tutkija halusi saada lisää kokemusta tieteellisestä tutkimuksesta. Tutkimusaihe oli tutkijasta mielenkiintoinen

Tutkimuksen tarkoituksena oli testata julkaisuihin (Garrett, Dallas, Radl & Mundy 1997, 517; Wang et al. 2006, 2434; Edwards et al. 2008, 2833) perustuvaa hiirimallia, ja tutkia, toimiiko tämä hiirimalli samalla tavalla kuin aikaisemmissa julkaisuissa on kuvattu. Tutkimuksessa oli kolme tutkimusryhmää, joista yksi toimi kontrolliryhmä ja kaksi muuta ryhmää olivat hoidollisia. Hoidolliset ryhmät saivat kahdella eri annoksella uudehkoa lääkettä bortezomib:a, joka on proteasomi-inhibiittori. Sitä käytetään kliinisesti multippelin myelooman hoitoon (Harousseau et al. 2006, 1498). Samalla selvitettiin, onko bortezomib tehokas lääke multippelin myelooman hoitoon ja tutkittiin, kumpi bortezomib-annos antaa paremman annosvasteen.

Tutkimuksen tavoitteena oli olla yksi kehitysaskel kohti toimivaa hiirimallia. Samalla haettiin mahdollista verrokkilääkeainetta tuleviin lääkeainekandidaattien testaamiseen, sekä selvitettiin alustavasti, minkälaista lääkettä olisi hyvä käyttää.

2 MULTIPPELI MYELOOMA JA SEN TUTKIMINEN

2.1 Multippeli myelooma

Multippeli myelooma on syöpä, jossa B-solulinjaan kuuluva monoklonaalinen plasmaseloklonee lisääntyy luuytimessä. Myeloomasolut kuuluvat morfologialtaan ja tehtävältään lymfosyyttien kehityslinjan erikoistuneimpiin soluihin, plasmaseluihin. (Remes 2006, 697.) Myeloomasolut erittävät, plasmaselujen tapaan, immunoglobuliineja, joiden määrä ja laatu ovat epänormaaleja. Myeloomasolut erittävät vereen ja virtsaan monoklonaalista immunoglobuliinia tai sen osaa, jota kutsutaan paraproteiiniksi tai M-komponentiksi. Myeloomat jaetaan luokkiin juuri M-komponentin avulla. (Remes & Rajamäki 2000, 377–378.)

2.1.1 Patogeneesi

Multippeliin myeloomaan sairastuneiden keski-ikä on noin 65 vuotta. Myeloomaan sairastuu vuodessa 2,5 henkilöä 100 000 suomalaista kohden. Keskimäärin Suomessa todetaan vuodessa 230 uutta multippeli myelooma tapausta. Tämä tarkoittaa, että noin prosentti kaikista syöivistä on multippeliä myeloomaa. Myelooman aiheuttajaa ei tiedetä. Oletetaan, että kyseessä on monitekijäinen tapahtuma, jossa geneettisellä alttiudella on merkitystä. Yleensä multippelin myelooman syntyä edeltää MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) eli merkitykseltään epäselvä monoklonaalinen gammopatia, joka vuosien tai vuosikymmenten aikana muuttuu myeloomaksi. (Remes 2006, 696–697.) Vuosittainen riski, että MGUS kehittyy myeloomaksi tai muuksi samankaltaiseksi maligniksi taudiksi, on noin yhden prosentin luokkaa. Jotta MGUS muuttuisi myeloomaksi, vaaditaan monimutkaisia geneettisiä tapahtumia, joissa muun muassa luuytimen mikroympäristö muuttuu taudin kannalta suotuisaksi. (Kyle & Rajkumar 2004, 1860–1861.) MGUS ei itsessään ole pahanlaatuinen tila (Jagannath 2008, 7).

Henkilöillä, jotka ovat altistuneet ydinsäteilylle tai saaneet suuria röntgenannoksia pitkien aikojen kuluessa, kuten radiologit, on muita suurempi riski sairastua

multippeliin myeloomaan. On havaittu, että myös maanviljelijät ovat muuta väestöä alttiimpia myeloomalle. Epävarmoja myeloomalle altistavia ympäristötekijöitä ovat asbesti, bentseeni, hiusten värjäysaineet sekä teollisuuden eri kemikaalit. On myös mahdollista, että pitkäkestoinen antigeenialtistus, esimerkiksi nivelreumassa ja kroonisissa tulehduksissa, saattaa altistaa myelooman synnylle. Myelooman esiintyvyydessä on lisäksi rotujen välisiä eroja. Amerikan mustaihoisella väestöllä multippelin myelooman esiintyminen on kaksi kertaa yleisempää kuin valkoisilla. Japanilaisilla ja kiinalaisilla taas taudin esiintyminen on vähäistä. (Remes 2006, 696–697; Remes 2007, 454–455.)

Luuytimen mikroympäristöllä on tärkeä rooli pahanlaatuisten plasmakomponenttien selviytymisessä ja kasvussa. Luuytimen mikroympäristö koostuu ekstrasellulaarisen matriksin proteiineista, erilaisista kantasoluista ja niiden esiasteista, luuytimen endoteliallisista soluista, osteoblasteista ja osteoklasteista. (Jagannath 2008, 9.) Vaikuttaa siltä, että plasmakomponenttien, luusolujen ja luuytimen solujen välille on muodostunut noidankehä, joka aikaansaa osteoklastien muodostumisen, joka vuorostaan stimuloi pahanlaatuisten solujen kasvua. (Libouban, Moreau, Baslé, Bataille & Charppard 2004, 859). Myeloomakomponenttien tarttuminen matriksin proteiineihin suojaa soluja sytostaattien vaikutuksilta sekä edesauttaa lääkeresistenssiä ja estää apoptoosia. Myeloomakomponenttien sitoutuminen stromakomponentteihin puolestaan indusoi näitä tuottamaan sytokiineja, kuten IL-6 (interleukiini 6), IGF-1 (insulin like growth factor 1) ja VEGF (vascular endothelial growth factor). Ne taas indusoivat myeloomakomponenttien proliferaatiota, migraatiota, lääkeresistenssiä ja estävät apoptoosia. Myeloomakomponentit pystyvät itsekin tuottamaan sytokiineja, kuten TNF- α (tumor necrosis factor- α), TGF- β (transforming growth factor- β) ja VEGF:a, jotka taas stimuloivat stromakomponenttien IL-6 tuotantoa. Myeloomakomponenttien tärkein kasvutekijä on IL-6. Sytokiinit aktivoivat myös tärkeitä solun sisäisiä signaalireittejä ja niiden lopputuotteita, kuten apoptoosia estäviä proteiineja. Useat tekijät, kuten VEGF, edistävät angiogeneesiä, joka liittyy aktiiviseen tautiin. Näin ne ovat osaltaan mukana taudin synnyssä. (Remes 2006, 698.)

2.1.2 Taudinkulku

Taudin eteneminen on usein melko rauhallista ja on mahdollista, ettei hoitoja tarvita vuosiin, sillä oireetonta tautia ei hoideta. Keskimääräinen elinaika diagnoosin jälkeen on 3-4 vuotta. Multippelille myeloomalle on tyypillistä plasmasolujen ylimäärä luuytimessä, seerumin tai virtsan M-komponentti ja luuston lyyttiset muutokset. (Remes 2006, 699.) Usein taudin alkuvaiheessa oireet ovat epäselviä ja muistuttavat muiden tilojen oireita (Jagannath 2008, 7).

Jotta diagnostiset kriteerit täytyvät, pitää plasmasoluja olla luuytimessä vähintään 10 %:a kaikista soluista (Kyle & Rajkumar 2004, 1860). Plasmasolujen ylimäärä luuytimessä aiheuttaa luuytimen vajaatoimintaa, josta on seurauksena erilaiset sytopeniat. Punasolujen vajaatuotannosta on seurauksena anemia, jota esiintyy 60 %:lla potilaista. Leukosytopeniasta on seurauksena lisääntynyt infektioherkkyys. Bakteeri-infektiot ovat tavallisia myeloomapotilailla ja ne aiheuttavat huomattavan sairastuneisuuden ja kuolleisuuden. Immuunipuolustus on muutenkin häiriintynyt, koska plasmasolut eivät välttämättä pysty tuottamaan normaaleja immunoglobuliineja. Potilailla esiintyy myös trombosytopeniaa, joka aiheuttaa verenvuotoja. Verenvuototaipumus voi johtua myös hyperviskositeetistä, jota ilmenee alle 10 %:lla potilaista. Hyperviskositeetti aiheuttaa lisäksi väsymystä, sekavuutta ja tinnitusta. (Remes 2006, 700–701; Remes 2007, 458–560.)

70 %:lla potilaista havaitaan diagnoosivaiheessa röntgenkuvista taudille tyypillisiä reikämäisiä lyyttisiä luustomuutoksia, joista aiheutuu luustokipuja. Usein potilailla on selkäkipua, joka johtuu selkänikamien kompressiomurtumista. Useasti havaitaan myös kylkiluiden ja pitkien luiden murtumia. Osteoporoosi voi olla taudin alkuvaiheen ainoa luustomuutos. (Remes 2006, 699.)

Luustotaudin kehittyminen liittyy kiinteästi luuytimen mikroympäristön muutoksiin. Luustotaudin syynä on osteoklastien lisääntynyt aktiivisuus. (Garrett, Dallas, Radl & Mundy 1997, 515.) Osteoblastien liian alhaisella aktiivisuudella ja osteoklastien liiallisella aktiivisuudella on merkittävä osa luustotaudin synnyssä (Remes 2006, 698).

Vuosia on ajateltu osteoklastien toiminnan olevan pääosassa myelooman luustotaudin kehittymisessä. Edwards et al. (2008, 2833) viittaavat artikkelissaan tutkijoiden Abildgaard et al. tekemään tutkimukseen, jossa alkuvaiheessa olevassa multippelissa myeloomassa on havaittu osteoblastien määrään kasvaneen luussa. Pidemmälle edenneessä taudissa osteoblastien määrä ja aktiivisuus vähenevät. Uusissa tutkimuksissa on havaittu, että tautiin sairastuneiden potilaiden luun muodostuksesta kertovien merkkiaineiden tasot ovat pienentyneet. On selvää, että luun muodostuksen pieneneminen on keskeisessä roolissa taudin patogeneesissä, vaikka siihen vaikuttavia mekanismeja ei tunneta vielä kovin hyvin. (Edwards et al. 2008, 2833.) Stroomasolut, myeloomasolut ja osteoblastit erittävät osteoklasteja aktivoivia tekijöitä, joihin kuuluu sytokiineja, mutta äskettäin löydetty RANKL (receptor activation of Nf- κ B ligand)/OPG (osteoprotegeriini)- systeemi ja MIP-1 α (magrophage inflammatory protein 1-alfa) ovat myös hyvin tärkeitä osteoklasteja aktivoivia tekijöitä. Osteoklastien aktiivisuus riippuu RANKL:n ja OPG:n tasapainotilasta. RANKL indusoi sitoutuessaan osteoklastisoluja reseptoriinsa (RANK) mahdollistaen osteoklastiesiasteiden kehittymisen luuta hajottaviksi osteoklasteiksi. Liukoinen OPG taas estää RANKL:n sitoutumisen reseptoriinsa (RANK). Normaalisti RANKL/OPG-systeemi huolehtii siitä, että luun muodostus ja hajotus pysyy tasapainossa. Myeloomasolut pystyvät lisäämään stroomasolujen RANKL:n ilmentymistä. Samalla ne voivat estää OPG:n vaikutusta, jolloin RANKL voi vapaasti stimuloida osteoklastien toimintaa. Hiljattain on löydetty DKK-1 (Dickkopf-1), joka on osteoblastien erikoistumista ja erilaistumista estävä proteiini. Myeloomasolut ilmentävät DKK-1 geeniä ylen määrin. (Remes 2006, 698.) Multippelissä myelooma sairastavilla potilailla on huomattu olevan kohonneet seerumin DKK-1 tasot, jonka on havaittu korreloivan potilaan luuleesioiden määrään. Uusissa tutkimuksissa on havaittu, että luun hajotusta ja kasvainkuormaa on saatu pienennettyä estämällä DKK-1:n vaikutusta, jolloin osteoblastien toiminta on lisääntynyt. (Edwards et al. 2008, 2833.)

Lyyttisiin luustomuutoksiin liittyy hyperkalsemia, jota tavataan noin kolmasosalla potilaista. Se on myös seurausta osteoklastien liiallisesta aktivaatiosta, jolloin luusta vapautuu runsaasti kalsiumia ekstrasellulaariseen nesteeseen. Hyperkalsemian oireita

ovat pahoinvointi, väsymys, sekavuus, laihtuminen ja polyuria (runsas virtsaneritys). Jos tila pääsee kehittymään hyperkalsemiakriisin asteelle, on tilanne hengenvaarallinen. Munuaisten vajaatoiminta liittyy läheisesti hyperkalsemiaan. Munuaisten vajaatoiminnasta kärsii noin 20 % potilaista jo diagnoosivaiheessa. (Remes 2006, 700–701; Oyajobi 2007 [Viitattu 18.12.2008].)

2.1.3 Hoito

Multippeliin myeloomaan ei ole olemassa parantavaa hoitoa, mutta potilaiden oireita voidaan hoitaa ja elinaikaa pidentää. Oireettoman taudin hoitamisesta ei ole todettu olevan hyötyä (Kyle & Rajkumar 2004, 1861). Noin 60 %:a potilaista saavuttaa hoitovasteen. Hoitovaste voidaan saada toistuvasti, mutta lopulta tauti johtaa hoitoresistenttiin terminaalivaiheeseen. (Remes 2007, 463.)

Jo yli 35 vuoden ajan myelooman standardihoitona on ollut melfalaamin ja kortikosteroidin yhdistelmä. Tämän standardihoidon hyviä puolia on sen hyvä siedettävyys ja helppo, suun kautta tehty annostelu. Tuloksia on pyritty parantamaan solusalpaajien hoitoannoksia suurentamalla, joka on osoittautunut toimivaksi. Eräs hoitoja hankaloittava tekijä on taudin taipumus tulla resistenssiksi käytetyille lääkkeille. Yksi parhaiten tunnettu syy tähän on moniresistenssigeenin ilmaantuminen myeloomasoluihin. (Remes 2007, 465–466.)

Vanhon lääkkeiden rinnalle kehitetään uusia lääkkeitä. Talidomidia on alettu käyttää taudin etenemisen hidastamiseen. Sen vaikutus perustuu angiogeenin estoon. (Kyle & Rajkumar 2004, 1861 ja 1867.) Se myös lisää soluvälitteisiä sytotoksisia vaikutuksia, käynnistää apoptoosin ja estää stroomasolujen adheesiota (Remes 2007, 465–466).

Uudehko lääke pitkälle edenneeseen multippeliin myeloomaan on bortezomib, joka on proteasomi-inhibiittori. Se on osoittautunut prekliinisissä malleissa hyvin tehokkaaksi monia eri syöpiä, mukaan lukien multippelia myeloomaa, vastaan. Sen vaikutus perustuu solujen kasvun estoon ja apoptoosin käynnistämiseen. Se lisäksi inhiboi myeloomasolujen ja stroomasolujen vuorovaikutusta, kuin myös sytokiinien kuten IL-

6:n ja TNF- α :n, tuotantoa. (Kyle & Rajkumar 2004, 1867–1868.) Sitä käytetään jo kliinisesti multippelin myelooman hoidossa ja sillä on saatu aikaan hyviä tuloksia (Harousseau et al. 2006, 1498).

Lääkehoidon tueksi potilaille tehdään autologisia kantasolusiirtoja eli potilaalle annetaan hänen omia, yleensä verestä eristettyjä, kantasolujaan. Hoidosta saadaan hyviä tuloksia. Hoidon kuolleisuus on pieni, 1-2 %:a, ja useat potilaat saavat jopa täydellisen vasteen, mutta se menetetään yleensä kahdessa vuodessa. Yhdistettynä korkea-annoshoitoon potilaiden keskimääräinen elinaika pitenee noin vuodella. (Kyle & Rajkumar 2004, 1862; Remes 2007, 466.)

Toinen vaihtoehto on allogeeninen kantasolusiirto, eli potilaalle annetaan toisen ihmisen kantasoluja. Sen etuna on, ettei siirrännäinen ole voinut kontaminoitua syöpäsoluilla ja täydellisiä hoitovasteita on paljon. Kuitenkin vain 5-10 %:a potilaista on sopivia allogeeniseen kantasolusiirtoon. Siirtoja rajoittavat sopivan luovuttajan löytäminen ja potilaan kunto. (Kyle & Rajkumar 2004, 1864 ja 1866.) Hoito on myös hyvin toksinen ja siihen liittyy suuri toimenpidekuolleisuus, joka voi olla jopa 30–40 %:a (Remes 2007, 466).

2.2 Luusto

Ihmisen kokonaispainosta noin 10–15 %:a muodostuu luustosta (Hammett-Stabler 2004, 1). Aikuisen luusto koostuu 213 luusta, joiden tehtäviin kuuluu kehon tukirankana ja lihasten kiinnityspintana toimiminen, jolloin luusto on osaltaan mahdollistamassa liikkeitä. Luut suojaavat tärkeitä elimiä, esimerkiksi kallonluut suojaavat aivoja ja kylkiluut suojaavat sisäelimiä. Luusto ylläpitää mineraalitasapainoa toimien muun muassa kalsiumin ja fosfaatin varastona. Luustosta vapautuu verenkiertoon mineraaleja tarvittaessa, jolloin tärkeiden mineraalien tasapaino säilyy. Luuytimessä tapahtuu hematopoiesi eli verisolujen tuotanto. (Tortora & Grabowski 2000, 160; Dempster 2006, 7.) Verisolujen tuotanto tapahtuu punaisessa luuytimessä, jota löytyy aikuisella pitkien luiden, kuten reisiluun ja olkavarren luiden proksimaalipäissä sekä litteissä luissa, kuten kylkiluissa (Siitonen &

Koistinen 2000, 13). Luuytimessä tuotetaan punasoluja, valkosoluja ja verihiutaleita. Lisäksi vanhemmiten luuhun alkaa kerääntyä keltaista luuydintä, joka toimii triglyseridien varastona. (Tortora & Grabowski 2000, 160.)

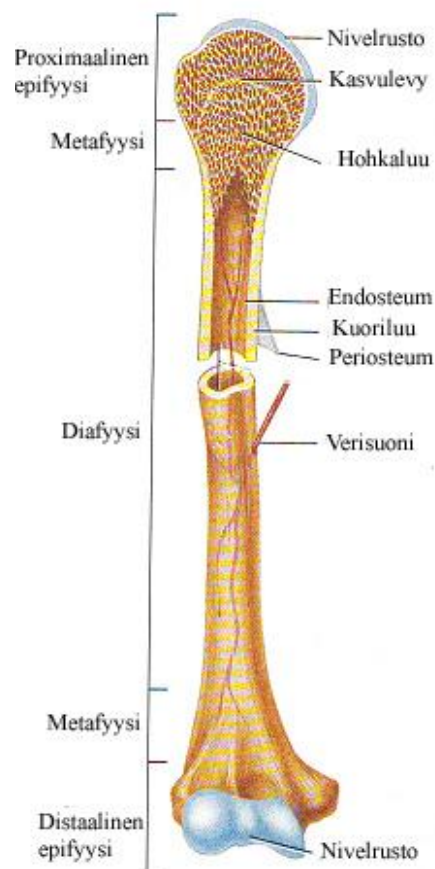
Elimistön sidekudoksesta suurin osa on luuta. Luumatriksi poikkeaa muusta sidekudoksesta, koska se on fysiologisesti mineralisoitunut ja uusiutuu jatkuvasti läpi elämän. (Rodney & Boskey 2006, 12.) Luusto koostuu erilaisista luusoluista, orgaanisesta matriksista, mineraaleista ja vedestä (Tortora & Grabowski 2000, 162). Luusoluihin kuuluu mesenkymaalista alkuperää olevia kantasoluja, jotka voivat erilaistua joko luuta muodostaviksi soluiksi eli osteoblasteiksi tai rustosoluiksi (Bjorn 2006, 2). Osteoblastit tuottavat kollageenia ja muita orgaanisia rakenneosia, joita tarvitaan luun muodostuksessa (Tortora & Grabowski 2000, 162). Osteosyytit ovat kypsiä luusoluja. Ne ovat muodostuneet osteoblasteista, jäätyään valmistamansa luun ”vangeiksi.” Vaikka ne eivät enää kykene muodostamaan luuta, ne pysyvät yhteydessä toisiinsa ja luun pinnalla oleviin soluihin. Näin ne kykenevät ”aistimaan” ympäröivän luun mekaanisia muutoksia ja välittämään tietoa luun pinnalla oleviin soluihin. Ne kykenevät aloittamaan tai säätelemään luun uudistumista. (Dempster 2006, 9.) Kun ne järjestäytyvät lieriömäisesti verisuonten ympärille, niitä kutsutaan osteoneiksi (Nienstedt, Hänninen, Arstila & Björkqvist 2004, 63). Monosyytti-makrofagi linjaa olevat osteoklastit ovat luuta hajottavia soluja (Ross 2006, 30). Ne erittävät lysosomaalisia entsyymeitä ja happoja, joiden avulla ne liuottavat luun proteiineja ja mineraaleja (Tortora & Grabowski 2000, 163).

20–40 % luusta on orgaanista matriksia. Se koostuu valtaosaksi osteoblastien syntetisoimista kollageenisäikeistä, joka on pääasiassa tyyppin 1 kollageenia. 50–70 % luusta on mineraaleja, joista tärkeimmät ovat kalsium ja fosfaatti. Ne esiintyvät luussa valtaosaksi kiteisenä hydroksiapatiittina. Vettä luustossa on 5-10 %. Alle 3 % luustosta koostuu lipideistä. (Rodney & Boskey 2006, 14.)

2.2.1 Luun rakenne

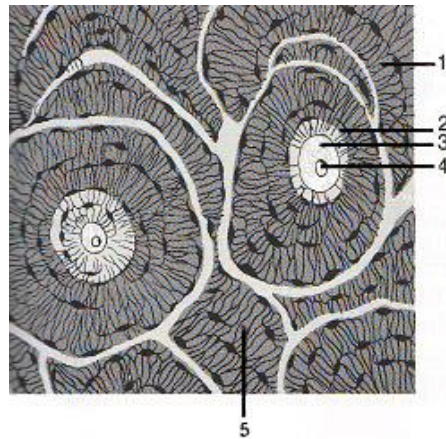
Luita on monenmuotoisia ja niiden muoto on pitkälti kiinni niiden toiminnasta. Pieniä luita ovat nikamat ja ranteen pienet luut. Litteisiin luihin kuuluvat lapaluut ja

rintalasta. Pitkiä luita ovat raajanluut kuten reisiluu ja olkaluu. (Nienstedt et al. 2004, 105.) Tässä tarkastellaan lähemmin pitkien luiden rakennetta. (Kuva 1) Pitkien luiden onttoa varsiosaa kutsutaan diafyysiksi. Diafyysin päissä sijaitsevat epifyysit. (Dempster 2006, 7.) Lähempänä vartaloa olevassa päässä on proksimaalipää ja kauempana vartalosta olevassa päässä on distaalipää, joissa molemmissa on epifyysit. Epifyysin alla on alue, jota kutsutaan metafyysiksi. Se liittää kasvunsa päättäneessä luussa diafyysin ja epifyysin toisiinsa. Kasvavassa luussa metafyysi sisältää rustoisen epifyysilevyn eli kasvulevyn. Kasvulevy mahdollistaa diafyysin pituuskasvun, mutta kasvun loputtua kasvulevyn rusto muuttuu luuksi. (Tortora & Grabowski 2000, 161–162.) Luun ulkopuolta ympäröi sidekudoskalvo periosteum eli luukalvo. Se sisältää hermopäätteitä, osteoblasteja, osteoklasteja ja verisuonia, jotka ravitsevat luuta. Luun sisäpuolella on vastaavanlainen kalvo, jota kutsutaan endosteumiksi. (Dempster 2006, 7.)



Kuva 1. Pitkän luun rakenne muokattu Tortora & Grabowski mukaan (2000, 161).

Luukudosta on kahden tyyppistä: kuoriluuta eli kortikaaliluuta ja hohkaluuta eli trabekulaariluuta. 80 %:a aikuisen luustosta on kuoriluuta. Muun muassa diafyysit ovat pääasiassa koostuneet kuoriluusta. 20 %:a luusta on hohkaluuta, jota löytyy epifyysistä, metafyyssistä ja luuytimen ympäriltä. Makroskooppisesti tarkasteltuna kuoriluu on tiivistä, kun taas hohkaluussa on hunajakennoa muistuttava verkkomainen rakenne. Mikroskooppisesti tarkasteltuna sekä kuoriluu että hohkaluu koostuvat luun lieriömäisistä perusyksiköistä osteoneista. Kuoriluun osteoneja kutsutaan usein Haversin kanaviksi. Ne on sylinterimäisiä ja muodostavat rakenteen joka muistuttaa puun oksia (Kuva 2). (Dempster 2006, 7.)



Kuva 2. Luun osteoneja. Kuvan keskellä näkyy kaksi osteonia. 1 luusolu ulokkeineen, 2 soluväliainetta, 3 verisuonikanava, 4 verisuoni, 5 vanhan osteonin jäännös. Muokattu Nienstedt et al. mukaan (2004, 63).

2.2.2 Luun uudistuminen

Luusto saavuttaa huippumassansa pian kasvun päätyttyä. Sen vuoksi aikuisen luustossa tapahtuvat muutokset liittyvät pääasiassa luun uusiutumiseen. Luusto uusiutuu pienissä osissa luun solujen vaikutuksesta uusiutumiskierron aikana. Luun muodostus ja uudelleenmuodostus koostuu neljästä vaihteesta: aktivaatiosta, resorptiosta eli luun hajotuksesta, palautumisesta ja formaatiosta eli luun muodostuksesta (Kuva 3). (Välimäki 2000, 190.)

Aktivaatio pitää sisällään ne tapahtumat, joita tarvitaan uinuvan luun pinnan muuttamiseksi sopivaksi luun hajotukseen. Tarkkaan ei tiedetä, miten luun hajotuspaikka ja -laajuus tarkalleen valikoituvat. Oletetaan, että osa luun hajotuksesta kohdistuu korjattaviin alueisiin, mutta valtaosa hajotuksesta on todennäköisesti satunnaista. Aktivaatiossa osteoklastien yksitumaiset esiasteet muuttuvat monitumaisiksi preosteoklasteiksi. Osteoklastit kiinnittävät itsensä luumatriksiin rengasmaisella erittäin tiiviillä liitoksella (engl. sealing zone). Muodostamalla liitoksen osteoklasti luo luun hajotukselle mikroympäristön itsenä ja luumatriksin välille. (Dempster 2006, 9.)

Luun hajotusvaiheessa erityiset protonipumput pystyvät tuottamaan suolahappoa. Haponmuodostuksen seurauksena pH laskee osteoklastin ja luun pinnan välillä arvoon 4,0. Haponmuodostukseen liittyy myös useiden entsyymien, kuten katepsiini K:n ja TRACP:n (tartraattiresistentti hapan fosfataasi), erittyminen, jotka ovat mukana resorptiossa. Happo ja entsyymit liuottavat tehokkaasti matriksin mineraalit ja orgaanisen aineksen, muodostaen sylinterimäisiä tunneleita tai makkaran muotoisia resorptiokuoppia, joita kutsutaan Howshipin kuopiksi, riippuen siitä, minkälaisessa luussa resorptio tapahtuu. Sylinterimäisiä tunneleita muodostuu kuoriluuhun ja makkaran muotoisia kuoppia muodostuu taas hohkaluuhun. Resorptiovaihe päättyy osteoklastien apoptoosiin. (Dempster 2006, 9.)

Palautumisvaiheessa resorptiokuoppaan kerääntyy mononukleaarisia soluja, kuten monosyyttejä, preosteoblasteja ja osteosyyttejä, jotka ovat vapautuneet luun sisästä osteoklastien toimesta. Tässä vaiheessa kaikki tärkeät kytketymissignaalit lähetetään kutsumaan osteoblasteja resorptiokuoppiin korvaamaan luuta, joka hajotettiin. Jollei olisi tehokasta kytketymissjärjestelmää, jokaisessa luun uusiutumissyklissä olisi seurauksena luukatoa. Tarkasti ei tiedetä kuinka kytketymissjärjestelmä toimii, mutta on olemassa useita teorioita, kuinka tämä voisi toimia. Yhden teorian mukaan osteoklastit vapauttavat kasvutekijöitä luusta, jotka toimisivat kemiallisina houkuttimina osteoblastien esiasteille ja stimuloivat osteoblastien jakaantumista ja erilaistumista. (Dempster 2006, 9.)

Luun muodostus on kaksivaiheinen tapahtuma, jossa osteoblastit aluksi syntetisoivat orgaanista matriksia ja sitten säätelevät sen mineralisointia. Samalla kun osteoblastit muodostavat uutta luuta hajotetun tilalle, osa niistä jää itse muodostamansa luun vangeiksi muuttuen samalla osteosyyteiksi. Kun kollageeninen orgaaninen matriksi on muodostettu, osteoblastit laukaisevat mineralisaation pienillä matriksirakkuloilla, jotka muodostavat suotuisat olosuhteet mineraalien saostumiselle. (Dempster 2006, 9.) Luun mineralisaatiossa mineraalit alkavat kasaantua kerroksiksi kollageenisen matriksin päälle. Luun kypsyessä mineraalikristallit kasvavat kokoa. Valmiit kristallit ovat pääasiassa hydroksiapatiittia. (Rodney & Boskey 2006, 14.)



Kuva 3. Luun uudistumisen vaiheet muokattu Välimäki mukaan (2000, 194).

2.3 Luun biokemialliset merkkiaineet

Luun biokemialliset merkkiaineet kertovat luumetaboliasta eli sen hajoamisesta ja muodostumisesta. Biokemialliset merkkiaineet jaetaan luun hajotuksen ja muodostuksen merkkiaineisiin. (Cremers, Ganero & Seibel 2008, 1862.) Niitä voidaan määrittää seerumista ja virtsasta (Välimäki 2000, 239). Niillä on tärkeä merkitys luusairauksien hoitoon tarkoitettujen uusien lääkkeiden kehittelyssä. Niiden avulla saadaan tärkeää tietoa, kannattaako lääkkeen kehitystä jatkaa tai minkälaista annosta olisi hyvä käyttää. Lääkkeen käyttöön hyväksynnän jälkeen luun biokemiallisten merkkiaineiden avulla etsitään uusia indikaatiota lääkkeille. (Cremers et al. 2008, 1871.)

Kliinisesti luun biokemiallisia merkkiaineita käytetään luun hajoamista estävän hoidon tehon seurannassa, lääkkeen imeytymisen ja annoksen arvioimisessa, potilaan hoitomyöntyvyyden selvittämiseen, murtumariskin ennakoimiseen ja luumassan vähenemisen ennustamiseen. Luun biokemialliset merkkiaineet tarjoavat tietoa luuston tilasta huomattavasti aikaisemmin kuin esimerkiksi luun tiheysmittaukset. Luun tiheysmittauksia voidaan käyttää hoidontehon seurantaan vasta 1-2 vuoden kuluttua, kun taas luun aineenvaihdunnan merkkiaineilla saadaan luun muodostumisesta tietoa 2-3 kuukaudessa ja hajoamisesta jo 4-6 viikon kuluessa hoidon aloittamisesta. Lisäksi merkkiaineet ovat suhteellisen halpa ja helposti käytettävissä oleva tapa seurata luuston tilaa. (Välimäki 2000, 239; Camacho & Kleerekloper 2006, 128 ja 130.) Arvoja on aina tulkittava potilaan henkilökohtaiseen lähtötasoon suhteutettuna (Suominen 12.2.2009, henkilökohtainen tiedonanto).

Myös eläimiltä voidaan tutkia luun biokemiallisia merkkiaineita. Koirille, hevosille, hiirille ja rotille on jo olemassa ELISA- ja RIA-menetelmiin perustuvia reagenssipakkauksia, joilla voidaan määrittää osa luun biokemiallisista merkkiaineista. Niitä käytetään paljon eläinmalleissa, joissa eläimillä tutkitaan erilaisia ihmisten sairauksia kuten osteoporoosia, luumetastaaseja ja niveltulehduksia. Määrittäykseen tarvittavat näytteet voidaan kerätä noninvasiivisesti, jolloin samasta eläimestä voidaan ottaa useita näytteitä ja saada tietoa luumetaboliasta pitkällä

aikavälillä. Lisäksi luun biokemiallisia merkkiaineita voidaan hyödyntää tutkittaessa luustokasvainten kasvua. Esimerkiksi BALP:n (luustoperäinen alkalinen fosfataasi) hyödyntämistä koirien luusyövän kehityksen ennakoimiseen on tutkittu. Merkkiaineita voidaan käyttää myös nivelrikon tutkimiseen eläimillä. Lisäksi hammassairauksien tutkimisessa on hyödynnetty luun biokemiallisia merkkiaineita. Vielä tällä hetkellä yksittäisen eläimen luustosairauden tutkimisessa merkkiaineilla ei ole kovinkaan suurta merkitystä, johtuen muun muassa suuresta biologisesta variabiliteetista. Sen sijaan prekliinisissä ja kliinisissä tutkimuksissa, jossa käytetyt ryhmäkoot ovat riittävän suuria, luun biokemialliset merkkiaineet ovat hyvin hyödyllisiä. (Allen 2003, 108–111.)

2.3.1 Luun muodostuksen merkkiaineet

Luun muodostuksen merkkiaineisiin kuuluvat P1NP eli tyypin 1 kollageenin aminotermiinalinen propeptidi ja P1CP eli tyypin 1 kollageenin karboksitermiinalinen propeptidi. Nämä kaksi merkkiainetta kertovat tyypin 1 kollageenin tuottamisen aktiivisuudesta ja ovat sille spesifisiä. Tyypin 1 kollageenia on muodostunut prokollageenista, ja sitä löytyy luuston lisäksi pehmytkudoksista kuten ihosta, jänteistä, suurista suonista ja lihaksista, mutta eniten sitä on luustossa. Siksi muutokset kollageenin konsentraatiossa kertovat pääasiassa luustossa tapahtuvista muutoksista, koska kollageenin vaihtuvuus on nopeampaa luussa kuin muissa kudoksissa. (Cremers et al. 2008, 1862.) P1NP:n ja P1CP:n pitoisuudet ovat vuorokaudenaikaan sidottuja (Hammett-Stabler 2004, 47). Korkeimmillaan pitoisuudet ovat aikaisin aamulla (klo 4.00–8.00), kuten muillakin seerumiin tai virtsaan erittyvillä luunmuodostuksen merkkiaineilla (Camacho & Kleerekloper 2006, 129). P1NP arvot nousevat huomattavasti 1-4 viikon kuluttua murtumasta ja pysyvät koholla vähintään vuoden (Cremers et al. 2008, 1862).

Osteokalsiini on herkkä ja spesifi merkkiaine, jota esiintyy ainoastaan luussa ja hammasluussa. Sitä syntetisoivat kypsät osteoblastit, liikakasvuiset rustosolut ja odontoblastit (Cremers et al. 2008, 1861) eli hammasluuta muodostavat solut (Niensted et al. 2004, 298). Se kertoo kuitenkin lähinnä vain osteoblastien aktiivisuudesta ja sitä myöden luun muodostuksesta, koska odontoblasteja on paljon

vähemmän kuin osteoblasteja (Hammett-Stabler 2004, 43). On kuitenkin syytä muistaa, että osteokalsiini on kiinnittyneenä luumatriksiin ja sitä vapautuu myös luun hajotuksen aikana. Sen vuoksi osteokalsiinia voidaan pitää luun metabolian merkkiaineena, eikä ainoastaan luun muodostuksen merkkiaineena. (Camacho & Kleerekloper 2006, 128.)

BALP eli luustoperäinen alkalinen fosfataasi kertoo myös luun muodostumisesta. Sitä muodostuu osteoblastien toiminnan seurauksena, ja sillä on tärkeä merkitys mineralisaatiossa, vaikka sen tarkkaa roolia prosessissa ei tiedetä. Se saattaa kyetä hillitsemään osteoklastien aktiivisuutta (Hammett-Stabler 2004, 43). BALP:n pitoisuuksien ei ole havaittu olevan sidoksissa vuorokauden aikaan. (Camacho & Kleerekloper 2006, 128–129.)

2.3.2 Luun hajotuksen merkkiaineet

Tartraattiresistentillä happamalla fosfataasilla eli TRACP:lla on kuusi isoentsyymiä, joista TRACP5b kertoo luun hajotuksesta. Hapan fosfataasi on lysosomaalinen entsyymi, jota löytyy luun lisäksi useista kudoksista, kuten prostatasta, pernasta ja verihiiutaleista (Camacho & Kleerekloper 2006, 129). TRACP5b:tä löytyy luusta kypsistä osteoklasteista hajotuksen yhteydessä. TRACP5b osallistuu tyypin 1 kollageenin hajotukseen. Tyypin 1 kollageenin hajotuksessa osittain hajonnut kollageeni otetaan käsiteltäväksi osteoklastien vesikkeleiden sisään. Vesikkeleissä TRACP5b hajottaa tyypin 1 kollageenin hajoamistuotteita vielä pienemmiksi osiksi. Näin ollen se kertoo spesifisti osteoklastien aktiivisuudesta. Uusimmat tutkimukset ovat kuitenkin antaneet viitteitä, että TRACP5b kertoisi enemmänkin osteoklastien lukumäärästä kuin luun hajotuksen nopeudesta. (Cremers et al. 2008, 1861.) Tähän tulokseen ovat tulleet tutkijat Rissanen, Suominen, Peng ja Halleen (2007, 108), jotka osoittivat rotilla tehdyllä ovariektomia (munasarjojen poisto) kokeella, että TRACP5b on luotettava merkkiaine osteoklastien lukumäärälle eikä niinkään luun hajotuksen nopeudelle. Lisäksi ihmiset, jotka kärsivät Albert-Schönbergin taudista eli ADO-II:sta eli autosomaali dominantti osteopetroosi tyyppi II:ta, on korkeat TRACP5b arvot, vaikka heidän osteoklastinsa ovat tehostomia. Heillä on suuret määrät osteoklasteja,

vaikka ne ovat kykenemättömiä suorittamaan tehtäväänsä. Tämäkin viittaa siihen, että TRACP5b kertoo nimenomaan osteoklastien lukumäärästä. (Alatalo et al. 2004, 883.)

TRACP5b nousee multippelin myelooman edetessä, kuten muutkin hajotuksen merkkiaineet, ja niitä käytetään taudin tilan seuraamiseen. Luun muodostuksen merkkiaineiden merkittävydestä löytyy kahdenlaista tietoa. Lähteestä riippuen kerrotaan, että luun muodostuksen merkkiaineet pysyvät yleensä normaaliarvojen sisällä, ja niillä ei ole multippelin myelooman kehityksen kannalta merkitystä. (Cremers et al. 2008, 1870–1871.) Tutkijat Pika et al. (2008, 62) puolestaan havaitsivat tutkimuksessaan, että 21 %:lla multippelia myeloomaa sairastavista potilaista oli epänormaalit PINP-tasot.

Muita hajotuksen merkkiaineita ovat virtsasta mitattavat NTx eli tyypin 1 kollageenin N-terminaalinen telopeptidi ja CTx eli tyypin 1 kollageenin C-terminaalinen telopeptidi. Kollageeniketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa amino (N)- ja karboksi (C)-terminaalisisidosten avulla. Telopeptidit ovat se alue, jossa nämä sidokset sijaitsevat. Kollageenin hajotessa telopeptidit pääsevät verenkiertoon ja päätyvät munuaisiin, joista ne erittyvät virtsaan. (Camacho & Kleerekloper 2006, 129.) Ne ovat kumpikin herkkiä merkkiaineita, vaikkakin CTx on melko epävakaa. Lisäksi CTx-pitoisuus on riippuvainen munuaisten ja maksan toiminnasta. (Cremers et al. 2008, 1863–1864.)

2.4 Eläinmalli

Multippelin myelooman mallintamiseen tarvitaan eläinmalleja, jotta opittaisiin ymmärtämään multippelin myelooman vaikutusmekanismeja, ja mitkä tekijät siihen vaikuttavat. Eläinmallien avulla pystytään myös tutkimaan potentiaalisten lääkeainekandidaattien tehokkuutta. Multippeli myelooman mallintamiseen käytetään C57BL/KaLwRij kannan hiiriä, koska on todettu, että tämän kannan ikääntyvillä eläimillä ilmenee spontaanisti multippelia myeloomaa, jossa on samat piirteet kuin ihmisissä esiintyvissä taudissa. Kokeissa käytetään kuitenkin alun perin terveitä nuoria eläimiä, joihin istutetaan eri solulinjoja, jotka on alun perin saatu spontaanisti ilmenneistä tautitapauksista. (Garrett, Dallas, Radl & Mundy 1997, 515.)

Taudin kulku riippuu siitä, minkälaista solulinjaa käytetään. Spontaanisti multippelia myeloomaa aiheuttavaa solusarjaa kutsutaan 5TMM:ksi. Tästä sarjasta on olemassa kaksi eri linjaa: 5T2MM ja 5T33MM. 5T2MM on näistä kahdesta hitaammin etenevä ja hyvin paljon ihmisen multippelia myeloomaa muistuttava. 5T33MM on hyvin aggressiivinen linja, jossa kasvaimet muodostuvat hyvin nopeasti luuytimeen ja pernaan, mutta myös muihin elimiin. Tämä solulinja ei vastaa kovin hyvin ihmisten multippelia myeloomaa. (Libouban et al. 2004, 859–860.) 5TMM solusarjaa muokkaamalla on kehitetty useita uusia solulinjoja.

Tutkijat Radl, Croese, Zurcher, Van den Enden-Vieveen ja Leeuw (1988, 593) havaitsivat C57BL/KaLwRij kannan hiirillä esiintyvän spontaanisti multippelia myeloomaa. He kasvattivat eri solulinjojen soluja pistämällä sairastuneiden eläinten luuytimensoluja saman kannan nuorten eläinten laskimoon, koska solut eivät kasvaneet in vitro (Libouban et al. 2004, 860). Tässä tavassa kasvattaa soluja ongelmana oli, että vain osa solulinjoista säilytti alkuperäiset ominaisuudet, kun osa linjoista alkoi kehittyä alkuperäistä aggressiivisemmaksi (Radl et al. 1988). Tällä tekniikalla on vaikea tehdä tutkimusta, koska pistettävien solujen määrää on vaikea vakioda (Garrett et al. 1997, 515). Lisäksi tämä menetelmä on kallis ja hankala ylläpitää (Suominen 12.2.2009, henkilökohtainen tiedonanto).

Garrett et al. (1997, 515–520) halusivat kehittää eläinmallin, jolla voidaan tutkia myeloomasolujen osteoklastien aktivaatiomekanismeja. He onnistuivat kasvattamaan 5T33MM solulinjan, jota voidaan kasvattaa soluviljelyllä. Tässä menetelmässä on etuna, että tutkijat pystyivät pistämään tarkan määrän soluja eläimiin. He pystyivät tarkasti ennustamaan, milloin hiirille muodostuu kasvaimia ja milloin ne saavuttavat terminaalivaiheen. Tutkijat onnistuvat tavoitteissaan ja tutkimustulostensa perusteella he olettivat, että luuytimen mikroympäristö vaikuttaa myeloomasolujen kasvuun. He olettivat, että IL-6:lla saataisi olla mahdollinen vaikuttaja luuytimen osteoklastien aktivaatioon.

Libouban et al. (2004, 859–865) kehittivät uuden solulinjan hiirimalliin, jossa he tutkivat erityisesti, kuinka luuytimen mikroympäristö vaikuttaa multippelin myelooman syntyyn. Heidän kehittämänsä uusi solulinja, 5THL, oli saatu aikaisemman kokeen hiiristä, joille oli tehty munasarjojen poisto ja istutettu 5T2MM linjan soluja. Tutkijat olivat aikaisemmassa kokeessa huomanneet, että munasarjojen poisto lisäsi myeloomasolujen kasvua. He kasvattivat näistä hiiristä saatuja myeloomasoluja saman kannan terveissä hiirissä kuuden sukupolven ajan, eikä solulinja muuttunut tämän kasvatuksen aikana. Tuloksena saatiin uusi solulinja, joka muistuttaa hyvin paljon ihmisen tautia ja oli nopeakasvuisempi ja aggressiivisempi kuin alkuperäinen 5T2MM linja. Munasarjojen poisto muutti luuytimen mikroympäristöä muun muassa siksi, että eläinten estrogeenitaso laski (Suominen 12.2.2009, henkilökohtainen tiedonanto). Sen seurauksena alkuperäisen 5T2MM linja ilmiäsu muuttui niin paljon, että uusi solulinja syntyi ja se nimettiin 5THL:ksi (Libouban et al. 2004, 865).

Vaikka edellä mainitut mallit ovat toimivia, niiden heikkoutena on se, ettei syövän kehittymistä ole voinut luotettavasti seurata. Edellä kuvatuissa malleissa syövän etenemistä seurattiin mittaamalla seerumin monoklonaalisen paraproteiinin määrä. Tämä ei ole kovin hyvä tapa seurata syövän kehitystä, koska menetelmällä on taipumusta antaa vääriä negatiivisia tuloksia. Toinen yleisesti käytetty syövän tutkimusmenetelmä on histologia ja luun histomorfometriset analyysit. Niiden avulla ei voida seurata syövänkehitystä, koska kudospäytteen keräämistä varten eläimet täytyy lopettaa. Lisäksi histomorfometriset analyysit tehdään yleensä vain takaraajojen pitkistä luista ja lannenikamista, koska histomorfometriset menetelmät eivät sovellu suuren työmääränsä vuoksi kovin hyvin koko luurangon kasvainkuorman arvioimiseen. (Oyajobi et al. 2007, 1701–1708.)

Edellä kuvattujen ongelmien vuoksi Oyajobi et al. (2007, 1701–1708.) kehittivät hiirimallin, jolla voi eläintä vahingoittamatta, luotettavasti ja helposti seurata syövän etenemistä. He liittivät 5TGM1-solulinjaan green fluoresecent protein:n (GFP), jolloin he saivat aikaan solulinjan, joka aiheuttaa ihmisen multippelin myelooman kaltaisen taudin, ja jonka kasvaimet samalla fluoresoivat vihreällä. Solut he istuttivat pistolla

häntälaskimoon C57BL/KaLwRijHsd kannan hiiriin. Käyttämällä fluoresenssi illuminaattoria ja CCD-kameraa (Charge Coupled Device) nukutettujen hiirten koko kehon kasvaintaakka saadaan nopeasti selville hiirtä ja kasvaimia vahingoittamatta. Menetelmä on myös herkkä ja tarkka, sillä se ei antanut vääriä positiivisia eikä negatiivisia tuloksia.

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

Tutkimuksen tarkoituksena oli testata, toimiiko tämä hiirimalli samalla tavalla kuin aikaisemmissa julkaisuissa on kuvattu. Tutkimus on suunniteltu julkaistujen artikkeleiden pohjalta. Koska tätä mallia ei ole aikaisemmin käytetty Pharmatest Services Oy:ssä, se piti testata ennen kuin sitä voidaan tarjota asiakkaalle. Samalla selvitettiin, onko bortezomib tehokas lääke multippelin myelooman hoitoon tässä eläinmallissa, ja tutkittiin, kumpi bortezomib-annos antaa paremman annosvasteen.

Aiemmissa julkaisuissa on todettu, että kaksi viikkoa inokulointien jälkeen hiirten seerumin paraproteiinitasot alkavat nousta. 3-4 viikon kuluttua luumetastaasit voivat olla havaittavissa röntgenkuville ja osalle hiiristä on kehittynyt suurentunut perna, anemia, takaraajahalvaus, huomattavaa painonlaskua ja kakeksia eli tila, jossa eläin kuihtuu ja näivettyy. Eläimet lopetetaan tyypillisesti 3-5 viikon kuluttua inokuloinnin jälkeen. (Pharmatest Service Ltd 2009, 6.)

Tutkimus oli osa laajempaa kehitysprojektiä, jossa toimeksiantaja kehittää asiakkaille tarjottavaa multippeli myelooma hiirimallia. Mallia on tarkoitus käyttää asiakasprojekteissa uusien lääkeainekandidaattien tehon tutkimiseen, jolloin voidaan päättää, kannattaako lääkkeenkehitystä jatkaa, sekä siihen mikä on lääkkeen tehokkain annos ilman sivuvaikutuksia, ja mikä on paras annosteluajataulu. Uusien lääkkeiden kehittäminen on hyvin tärkeää, koska multippeliin myeloomaan ei ole olemassa tällä hetkellä parantavaa hoitoa. Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää tätä hiirimallia. Tämä tutkimus oli kuitenkin vain yksi askel kohti toimivaa hiirimallia. Mallia on tarkoitus myöhemmin kehittää pidemmälle. Tavoitteena oli löytää myös verrokkilääke asiakkaiden lääkeainekandidaateille. Tällä kokeella saatiin alustava käsitys siitä, onko bortezomib sopiva verrokkilääkkeeksi, ja minkä suuruista annosta olisi jatkossa hyvä käyttää. Kokeessa käytetyillä annoksilla nähtiin, ilmeneekö kokeessa odottamatonta

variaatiota aiheuttavia seikkoja. Varsinainen annosvastekoe pitää tehdä vähintään kolmella eri annoksella.

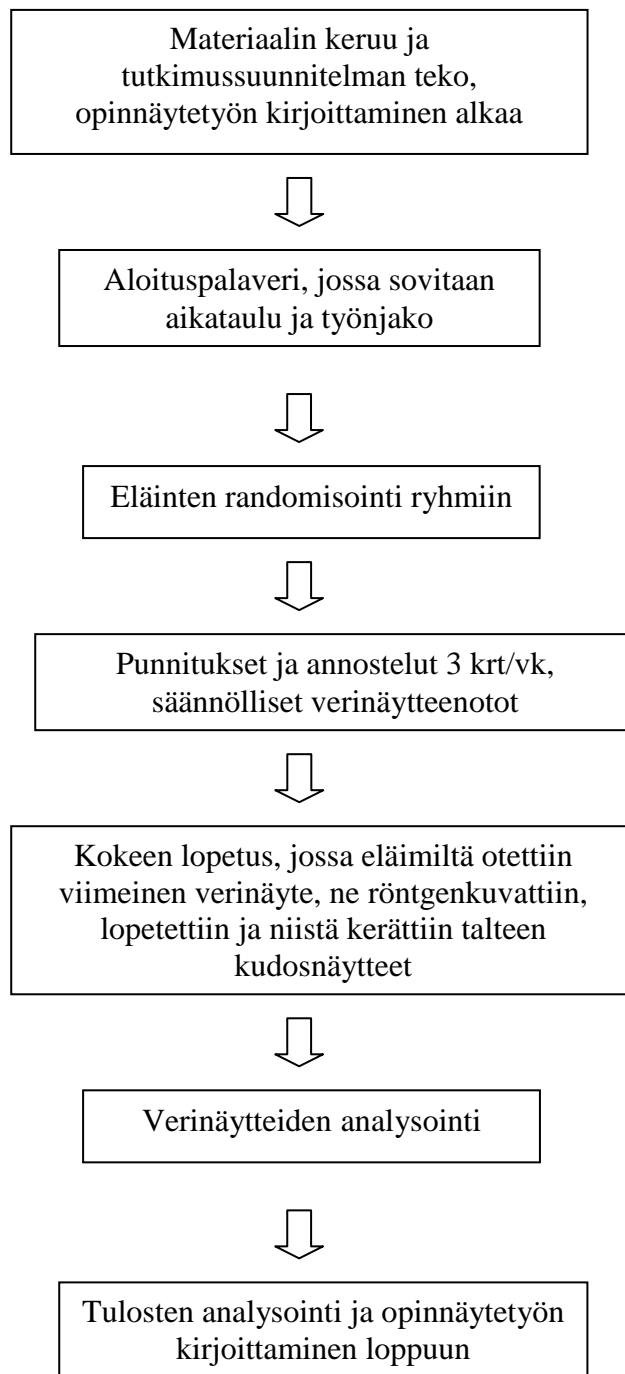
Tutkimusongelmat:

1. Toimiiko malli, niin kuin aiemmissa julkaisuissa on kuvattu?
2. Tehoaako bortezomib tässä hiirimallissa multippeliin myeloomaan?
3. Kumpi bortezomib-annos antaa paremman annosvasteen?

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

4.1 Toteutussuunnitelma

Tutkimusta varten haettiin ja saatiin lupa Pharmatest Service Oy:ltä. Tutkimusta varten tehtiin toimeksiantosopimus (LIITE 2) Pharmatest Services Oy:n laboratoriopäällikön Jukka Rissasen ja tutkijan välillä. Tutkimuksen eläinkoeosuus tehtiin 18.2–3.4.2009 välisenä aikana. Alun perin koe piti suorittaa 18.2–20.3.2009 välisenä aikana, mutta eläinkoeosuutta pidennettiin kahdella viikolla, koska hiirten taudinkulku ei edennyt odotetusti. Eläinkoeosuus suoritettiin Biolaboratorion eläintiloissa. Eläinkoeosuuden jälkeen tehtiin luun biokemiallisten merkkiaineiden mittaukset ja analysoitiin niiden tulokset. Kuviossa 1 on esitetty tutkimuksen kulku.



Kuvio 1. Vuokaavio tutkimuksen etenemisestä.

4.2 Tutkimuksen kulku

Tässä tutkimuksessa käytettiin ortotooppista, syngeneistä hiirimallia, jonka aiheuttama tauti muistuttaa suuresti ihmisen multippelia myeloomaa. Mallissa käytetyt hiiret ovat immunokompetentteja eli niillä on normaalivastustuskyky, joka mahdollistaa sen, että mallilla voidaan tehdä myös immunoterapiakokeita. Tutkimuksessa käytettiin hiiren 5TGM1 myeloomasoluja, jotka istutettiin eläimiin häntälaskimon kautta. Taudin etenemistä seurattiin säännöllisillä verikokeilla, joista analysoitiin TRACP5b-, P1NP- ja paraproteiinipitoisuudet. Tutkimus suunniteltiin alun perin 28 päivää kestäväksi, mutta koska koe ei edennyt odotetulla tavalla, koetta jatkettiin 42 päivän mittaiseksi.

4.2.1 Kokeen aloitus

Jo hyvissä ajoin ennen tutkimuksen alkua tutkimusjohtaja Mari Suominen oli anonut eläinkoelautakunnalta eläinkoeluvan (numero STH902A) koetta varten. Ennen tutkimuksen alkua tutkimusjohtaja Suominen laati tutkimusprotokollan, joka käytiin läpi aloituspalaverissa, jossa sovittiin tutkimuksen työnjaosta ja aikataulusta (LIITE 3). Ennen kokeen alkua tohtori Oyajobilta University of Texas Health Science Center:stä saatuja hiiren 5TGM1 myeloomasoluja kasvatettiin tarvittava määrä koetta varten Pharmatest Services Oy:ssä.

Tutkimuksessa käytettiin C57BL/KaLwRij kannan naarashiiriä, jotka olivat kokeen alussa 7 viikon ikäisiä. Hiiret oli tilattu Harlan:lta Hollannista. Kokeessa käytettiin 24 hiirtä, jotka jaettiin kolmeen tutkimusryhmään ($n = 8$). Otskooksi tutkimusjohtaja valitsi 24, koska koe tehtiin ensimmäisen kerran, eikä haluttu eläinten menevän hukkaan, jos koe olisi epäonnistunut, esimerkiksi sen vuoksi, etteivät käytetyt solut olisikaan olleet elinkykyisiä inokuloinnin jälkeen. Tämän vuoksi ryhmäkoot pidettiin pieninä. Kuitenkin ryhmäkoko 8 on riittävän iso, jotta voidaan tehdä tilastollisia analyysejä.

Tutkimuksen alussa, tutkimuspäivänä -2 hiiret randomisoitiin eli jaettiin tutkimusryhmiin painon perusteella. Sillä pyrittiin varmistamaan, että tutkimusryhmät

olisivat mahdollisimman yhdenmukaisia. Randomisoinnin yhteydessä hiiret merkittiin korvamerkeillä, jotta ne tunnistettiin jatkossa.

Tutkimusryhmät olivat seuraavat:

Ryhmä 1: Kontrolliryhmä, joka sai vehikkeliä (1,6 % etanolia 0,9 % NaCl:ssa) vatsaonteloon kolme kertaa viikossa.

Ryhmä 2: Testiaineryhmä, joka sai bortezomib:a vatsaonteloon 1 mg/kg kolme kertaa viikossa.

Ryhmä 3: Testiaineryhmä, joka sai bortezomib:a vatsaonteloon 2 mg/kg kolme kertaa viikossa.

Tutkimuspäivänä 0 hiiriin inokuloitiin eli istutettiin hiiren 5TGM1 myeloomasolut niiden häntälaskimon kautta. Hiiriä esilämmitettiin lämpölamppujen alla muutamia minutteja ennen inokulointia, jotta niiden hännän laskimot laajenisivat ja niihin olisi helpompi inokuloida solut. Pharmatest Service Oy:n työntekijä valmisti kaksi solususpensiota, joissa oli miljoona myeloomasolua 200 µl:ssa. Suspension sisälsi solujen lisäksi PSB-liuosta (phosphate-buffered saline). Noin puolet eläimistä inokuloitiin ensimmäisestä solususpensioerästä ja toinen puoli toisesta solususpensioerästä. Hiiriin inokuloitiin 200 µl suspensiota. Hiiriä pistettiin 27G 3/4" neulalla, joka oli kiinnitetty 1 ml:n ruiskuun. Soluja sekoitettiin varovasti pasteur-pipetillä joka kerta ennen uuden inokulointiannoksen ottoa ruiskuun, jotta solususpensio oli mahdollisimman tasalaatuista kaikilla eläimillä. Ruiskuun otettiin 50 µl ylimääräistä solususpensiota, jotta inokuloitaessa oli hieman pelivaraa, jos pisto ei onnistuisi ensi yrittämällä. Ylimääräistä solususpensiota ei injektoitu hiireen, jos pisto onnistui hyvin. Onnistuneen inokuloinnin jälkeen neulaa ei otettu heti pois suonesta vaan odotettiin joitakin sekunteja. Odotusaikana solut ehtivät lähteä verenkierron mukaan, eikä ollut vaaraa, että ne tulisivat ulos pistokohdasta. Inokuloinnin jälkeen pistokohtaa painettiin hetki puuvanulapulla verentulon tyrehtyttämiseksi. Lopuksi kunkin eläimen seurantakaavakkeeseen kirjattiin päivämäärä, kuinka inokulointi onnistui ja kuka sen suoritti. Tutkija pisti noin puolet 24 eläimestä ja tutkimusjohtaja

toisen puolen. Kolme eläintä, joiden inokuloinnit epäonnistuivat, korvattiin varaeläimillä, joiden inokulointi onnistui moitteettomasti.

4.2.2 Punnitus

Hiiret punnittiin kolme kertaa viikossa maanantaisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin. Ensimmäisen kerran hiiret punnittiin tutkimuspäivänä -2 randomisointia varten ja viimeisen kerran tutkimuspäivänä 42. Hiiret tunnistettiin korvamerkkien perusteella ja punnittiin yksitellen Mettler Toledo jyr sijävaalla 0,1 gramman tarkkuudella. Vaaka ilmoitti eläimen painon kolmen painon keskiarvona. Vaaka siis rekisteröi hiiren painon kolmesta eri kohdasta ja laskee niistä keskiarvon. Jyr sijöiden punnituksessa käytetään tällaisia vaakoja, koska eläimet liikkuvat koko ajan vaalla olevassa punnituslaatikossa. Sen vuoksi ei voida käyttää vaakaa, joka rekisteröi vain yhden painon, koska silloin ei saataisi luotettavaa tulosta. Saatu paino kirjattiin ylös kunkin eläimen seuranta-kaavakkeeseen.

Hiirten painoja seurattiin tarkasti, koska hiirten saamat yhdisteannokset, jotka injektoidiin hiiriin, laskettiin niiden painon perusteella. Lisäksi eläimen painon kehitys antaa tärkeää tietoa eläimen kunnosta. Eläimen kunnan huononemisen näkee helposti eläimen painon laskuna. Yhtenä eläimen lopetuskriteerinä on sen painon putoaminen 20 %:lla huippupainosta. Punnitusten yhteydessä oli hyvä tarkastella eläimen yleiskuntoa ja kaikki sen voimissa tapahtuvat muutokset kirjattiin eläimen seuranta-kaavakkeeseen. Eläimistä seurattiin niiden liikkumista, mahdollisia halvausoireita, pirteyttä ja kakeksiaa.

4.2.3 Annostelu

Tutkija valmisti kaikki annostelussa käytetyt yhdisteet tutkimusprotokollan ohjeiden mukaisesti. Aluksi kylmäkuivattu bortezomib-jauhe liuotettiin 1 ml:n etanolia (C_2H_5OH), jolloin saatiin pitoisuudeltaan 25 mg/ml oleva käyttöliuos, jota laimentamalla fysiologiseen suolaliuokseen (0,9 % NaCl) valmistettiin ryhmien 1 ja 2 annosteluyhdisteet. Samalla valmistettiin vehikkeliyhdiste. Valmiit yhdisteet jaettiin

päiväkohtaisiin annoksiin ja pakastettiin – 20 °C:seen. Tarvittavat putket otettiin sulamaan juuri ennen annosteluja.

Hierren annostelu tehtiin kolmena päivänä viikossa maanantaisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin. Ensimmäisen kerran hierren annostelu tehtiin tutkimuspäivänä 3 ja viimeisen kerran tutkimuspäivänä 40. Annostelut tehtiin yhdessä punnitusten kanssa, koska eläinten saama annos laskettiin joka kerta uudelleen uuden painon mukaisesti. Annos kirjattiin aina eläimen seurantaavakkeeseen.

Ryhmä 1 sai annostelussa 5 ml/kg vehikkeliä, joka oli 1,6 % etanolia fysiologisessa suolaliuoksessa. Ryhmä 2 sai 5 ml/kg pitoisuudeltaan 1 mg/kg olevaa bortezomibia, joka oli liuotettu fysiologiseen suolaliukseen. Ryhmä 3 sai 5 ml/kg pitoisuudeltaan 2 mg/kg olevaa bortezomibia, joka oli liuotettu fysiologiseen suolaliukseen.

Annostusta muutettiin heti ensimmäisen annostelukerran jälkeen, koska tutkimuspäivänä 5 neljä eläintä ryhmästä 3 löydettiin kuolleena häkistään. Kuolinsyyksi epäiltiin suuren bortezomib-annoksen toksisuutta. Tämän vuoksi eläinten saama annos pienennettiin puoleen eli hiiret saivat yhdistettä 2,5 ml/kg. Tällöin ryhmän 3 hiiret saivat bortezomibia 1 mg/kg. Myös ryhmän 2 annosmäärää pienennettiin puolella eli 2,5 ml/kg, jolloin hiiret saivat bortezomibia 0,5 mg/kg. Ryhmän 2 annosta pienennettiin, koska lähes kaikkien eläinten painot olivat pudonneet edellisestä punnituskerrasta. Syy painonlaskuun johtui luultavasti bortezomibista. Myös ryhmän 1 annosmäärä puolitettiin 2,5 ml/kg, vaikka hierren voinnissa ei ollut tapahtunut muutosta huonompaan. Ryhmän 1 annosta muutettiin, jotta kaikki hiiret saisivat samanlaisen käsittelyn kokeen aikana. Annoksen pienentämisen jälkeen ryhmän 2 eläinten vointi alkoi parantua ja niiden paino alkoi nousta. Ryhmän 3 eläinten vointi parani joksikin aikaa annoksen pienennyksen jälkeen. Myöhemmin niistä kahden hiiren vointi alkoi huonontua uudelleen. Muun ryhmän kunto säilyi melko vakaana tutkimuksen loppuun asti.

Yhdisteet injektoidiin eläinten vatsaonteloon eli pisto tehtiin intraperitoneaalisesti (i.p.) alimman nisän yläpuolelta vatsanpeitteiden läpi. Hierren päätä kallistettiin

annosteltaessa alaviistoon, jotta eläimen suolet valuisivat vatsan yläosaan. Näin pyritään ehkäisemään sitä, ettei neula pistettäessä vahingoittaisi eläimen suolia. Annosteltaessa käytettiin 1ml:n ruiskua, johon oli kiinnitetty 27G $\frac{3}{4}$ " neula. Annostelun jälkeen annostelija kirjasi seurantakaavakkeisiin kuinka annostelu onnistui, päivämäärän ja annostelijan nimikirjaimet.

Tutkimuspäivänä 12 alettiin kahdelle ryhmän 3 eläimelle antaa injektiona temgesic-kipulääkettä, jonka vaikuttavana aineena on buprenorfiini. Hiirille ruvettiin antamaan kipulääkettä, koska niiden vointi oli huonontunut. Niille kehittyi ilmeisesti jonkinlainen hermovaurio, jonka seurauksena ne eivät hallinneet takaruumistaan. Tämä oli todennäköisesti bortezomib:n haittavaikutus. Hiirille annettiin kahdesti päivässä kipulääkettä 0,1 mg/kg ihon alle eli subkutaanisesti (s.c.). Kipulääke annosteltiin hiiren niskanahan alle. Tämän antotavan etu on, että lääke vapautuu hiiren elimistöön vähitellen ja antaa kivunlievitystä pitkällä aikavälillä. Injektion antoon käytettiin 1 ml:n ruiskua, johon oli kiinnitetty 27G $\frac{3}{4}$ " neula. Kaikki eläimet saivat temgesic-kipulääkettä tutkimuksen kolmen viimeisen tutkimuspäivän ajan, vaikka niillä ei olisi havaittukaan kliinisiä kivunmerkkejä. Tämä oli varotoimenpide, jolla varmistettiin se, ettei hiirillä ole kipuja.

4.2.4 Verinäytteiden otto

Hiiristä otettiin kuusi kertaa verta tutkimuksen aikana tutkimuspäivinä -1, 13, 20, 27, 34 ja 42. Verinäyte otettiin takajalan päällä kulkevasta isosta laskimosta. Hiiriä esilämmitettiin lämpölampun alla muutamia minuutteja ennen näytteenottoa, jotta niiden verenkierto vilkastuisi ja suonet laajenisivat. Tämä teki näytteenoton mukavammaksi sekä hiirelle että näytteenottajalle. Hiiret laitettiin 50 ml:n falcon-putkeen, jonka pää oli leikattu auki hiiren hapensaannin varmistamiseksi. Putkea käytettiin, jotta hiiri ei päässyt puremaan näytteenottajaa ja samalla varmistettiin, ettei näytteenottaja rutista hiirtä kädessään. Takajalasta rapsutettiin osa karvoista pois kirurgiveitsen terällä, jotta suoni saatiin paremmin esille. Näytteenottokohdan ympärille laitettiin hieman valkovaseliinia, jotta muodostunut veripisara ei leviäisi pitkin hiiren jalkaa. Hiiren takajalka otettiin staasimaiseen otteeseen keskisormen ja peukalon väliin, jotta suoni pullistuisi. Hiiren suonta pistettiin pienellä 25G $\frac{5}{8}$ "

neulalla, jolloin suonen syntyi reikä ja siitä alkoi valua verta. Verta kerättiin Microvetten 100 µl kapillaariseerumiputkeen. Näytteitä pyrittiin ottamaan juuri 100 µl, jottei ylitettäisi turvallista näytemäärää. Hiiren verimäärä on 5-6 % sen painosta (Jaakkola 1996, 186), joten 100 µl on noin 10 % 20 grammaa painavan hiiren verimäärästä. Näytteenoton jälkeen pistokohtaa painettiin hetki puuvanulapulla verentulon tyrehtyttämiseksi. Näytteenoton jälkeen hiiren numero, näytteenottoaika ja näytteenottajan nimikirjaimet kirjattiin tutkimuskaavakkeisiin.

Verinäytteet saivat seisoa huoneenlämmössä 30–60 minuuttia ennen sentrifugointia, jotta ne ehtivät hyytyä kunnolla. Näytteet sentrifugoitiin $2500 \times g$ 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen seerumi erotettiin eppendorf-putkeen. Lähes kaikki näytteet sentrifugoitiin kahteen kertaan, jotta kaikki seerumi saataisiin talteen. Näytteistä saatiin seerumia noin 30–50 µl. Erottelun jälkeen seerumit pakastettiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen. Verinäytteistä analysoitiin P1NP-, TRACP5b- ja paraproteiini- eli IgG_{2b}-pitoisuudet.

4.2.5 Kokeen lopetus

Koe lopetettiin tutkimuspäivinä 42. Koe lopetettiin ennenaikaisesti tutkimuspäivänä 20 kahdelta ryhmän 3 hiireltä, koska niiden kunto oli heikentynyt voimakkaasti. Lisäksi tutkimuspäivänä 40 lopetettiin yksi hiiri ryhmästä 2, koska se oli halvaantunut. Hiirten lopetus ja sitä seuranneet toimet tehtiin kuitenkin yhtäläisesti varsinaisen lopetuspäivän kanssa.

Lopetuspäivän aamuna hiiret punnittiin ja niille annettiin kipulääke. Ennen lopetusta niiltä otettiin viimeinen verinäyte. Hiiret nukutettiin mouse cocktail:ksi kutsutulla seoksella. Se sisältää fysiologista suolaliuosta, Rompun-lääkettä sekä Ketaminol-lääkettä. Rompun on lihasrelaksantti ja rauhoittava lääke, jonka vaikuttavana aineena on ksylatsiini. Ketaminol on nukutusaine, jonka vaikuttavana aineena on ketamiinihydrokloridi. 1 ml mousecocktail:a pitää sisällään 570 µl NaCl:a, 50 µl Rompun:a ja 380 µl Ketaminol:a. Hiirten mouse cocktail-annos laskettiin eläimen painon mukaan ja sen antovolyyminä oli 5 ml/kg. Nukutetut hiiret kuvattiin röntgenillä, jonka jälkeen vielä nukutuksessa olevat eläimet lopetettiin niskavedolla eli

niiden niska murrettiin. Lopetuksen jälkeen hiirille tehtiin ruumiinavaus, jossa tutkittiin, oliko eläimen sisäelimissä tapahtunut muutoksia. Samalla eläinten takajalat ja perna otettiin talteen histomorfometrisiä analyysejä varten. Myös muita elimiä, kuten imusolmukkeita, otettiin talteen, jos niissä näkyi epäilyttävään näköisiä muutoksia. Tähän opinnäytetyöhön histomorfometriset analyysit ja röntgenkuvaus eivät kuuluneet vaan toimeksiantaja tekee niistä itse omia analyysejään.

4.2.6 Verinäytteiden analysointi

Verinäytteet analysoitiin eläinkoeosuuden päättymisen jälkeen. Eläimiltä otettiin verinäytteitä kuudesta eri aikapisteestä tutkimuspäivinä -1, 13, 20, 27, 34 ja 42. Niistä kaikista määritettiin P1NP ja TRACP5b. Paraproteiini- eli IgG_{2b}-määritys, joka kertoo multipelissa myeloomassa esiintyvistä paraproteiineista, tehtiin ensimmäisen, neljännen, viidennen ja kuudennen aikapisteen näytteistä. Toisen ja kolmannen aikapisteen näytteistä jätettiin analysoimatta paraproteiinipitoisuus, koska tutkimuksenjohtaja ei katsonut sitä tarpeelliseksi. Hänen mielestään jo määritetyistä aikapisteistä saatiin tarpeeksi informaatiota.

Kolmesta ensimmäisestä aikapisteestä määritykset tehtiin 20 eläimen näytteestä. Tutkimuksesta hylättiin niiden kolmannen ryhmän eläinten näytteet, jotka löydettiin kuolleena tutkimuspäivänä 5. Hylättyjä eläimiä oli neljä kappaletta. Neljänneestä, viidennestä ja kuudennesta aikapisteestä määritykset tehtiin vain 18 eläimen näytteestä, koska kaksi kolmannen ryhmän eläintä oli lopetettu tutkimuspäivänä 20, jolloin niistä ei enää saatu loppujen aikapisteiden näytteitä.

P1NP määritys

Ensimmäisenä näytteestä analysoitiin P1NP. Määrityksessä käytettiin Immunodiagnostic Systems Ltd:n (IDS Ltd) Rat/Mouse P1NP EIA reagenssipakkausta (Ref no: AC-33F1; Lot: 62456; Exp. 08/2009). Menetelmä perustuu kilpailevaan entsyymi-immunomääritykseen. Siinä hyödynnetään polyklonaalista kanin anti-P1NP vasta-ainetta, jolla kuoppalevyn kaivojen pohja on päällystetty. Seerumin P1NP ja reagenssipakkauksen leimattu antigeeni kilpailevat

sitoutumisestaan rajalliseen määrään vasta-ainetta. Leimasta saatu signaali on käänteisesti verrannollinen P1NP konsentraatioon. (Immunodiagnostic Systems Ltd 2007, 1.)

Mittaus suoritettiin pakkauksen ohjeidenmukaisesti. Pakkaus otettiin jääkaapista huoneenlämpöön lämpiämään puolta tuntia ennen määritysten tekemistä. Samalla otettiin seeruminäytteet sulamaan jääkaappiin. Tarvittavat standardit, kontrollit ja P1NP Biotin oli toimitettu lyofilisoidussa muodossa eli kylmäkuivattuna. Ennen määrittämistä ne liuotettiin ohjeiden mukaisesti ionisoituun veteen. Lisäksi Wash Solution laimennettiin ennen määrittämistä ohjeen mukaisesti ionisoituun veteen. Liuosten annettiin seistä 10 minuuttia ennen pipetointien aloittamista. Muut tarvittavat reagenssit oli toimitettu käyttövalmiina. Ennen pipetoinnin aloittamista kontrolleista ja näytteistä tehtiin pipetointikaavio, jonka mukaisesti standardit, kontrollit ja näytteet pipetoitiin kaivoihin. Yhdelle kuoppalevyille voitiin standardien ja kontrollien lisäksi pipetoida 88 näytettä, mutta kertaakaan ei käytetty koko levyä kerralla vaan näytteet analysoitiin pienissä erissä. Ensimmäisellä kerralla määritettiin tutkimuspäivän -1 näytteet. Seuraavalla kerralla analysoitiin tutkimuspäivien 13, 20 ja 27 näytteet. Tämän jälkeen analysoitiin tutkimuspäivän 34 näytteet ja viimeisellä kerralla tutkimuspäivän 42 näytteet.

Kun kaikki tarvittavat esivalmistelut oli tehty, päästiin aloittamaan näytteiden pipetointi kuoppalevyille. Ensimmäiseksi kuuteen ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin 50 µl standardeja, kukin omaan kaivoonsa. Standardien pitoisuudet olivat seuraavat: 0 ng/ml; 0,8 ng/ml; 2,0 ng/ml; 7,2 ng/ml; 23,1 ng/ml ja 63,0 ng/ml. Seuraavaksi pipetoitiin 50 µl kontrolleja. Määrittäksessä käytettiin kahta kontrollia. Tämän jälkeen pipetoitiin näytteet. Kuhunkin kaivoon pipetoitiin 5 µl näytettä ja 45 µl Sample Diluent:a. Näiden päälle lisättiin 50 µl P1NP Biotin:a. Kuoppalevy peitettiin tämän jälkeen pakkauksen mukana tulevalle suojalle ja laitettiin kuoppalevyn ravistelijaan tunniksi huoneenlämpöön inkuboitumaan. Suojan tarkoituksena oli estää liuosten haihtuminen kaivoista, ja samalla se esti, etteivät kaivojen liuokset pääse loiskumaan viereisiin kaivoihin. Tässä kohtaa jäljelle jääneet näytteet vietiin takaisin pakkaseen odottamaan seuraavia määrittäksiä.

Inkuboinnin jälkeen kuoppalevy laitettiin Wallac 1296–026 Delfia Platewash pesuriin, jossa se pestiin kolme kertaa. Pesuri käytti kerrallaan kunkin kaivon pesemiseen 300 µl Wash Solution-liuosta, joka oli valmistettu ennen määritysten aloittamista. Pesun jälkeen ylösalaisin käännettyä kuoppalevyä taputeltiin voimakkaasti käsipaperin päällä, jotta kaivoista saataisiin viimeisetkin pesunestepisarot lähtemään.

Tämän jälkeen kaikkiin kaivoihin pipetoitiin 150 µl Enzyme Conjugate- reagenssia. Kuoppalevy suojattiin tämän jälkeen pakkauksen mukana tulevalla suojalla ja jätettiin inkuboitumaan huoneenlämpöön 30 minuutiksi. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevy pestiin pesurilla samoin kuin aikaisemmin.

Seuraavaksi kaikkiin kaivoihin pipetoitiin 150 µl TMB Substrate-reagenssia. Pipetoinnin jälkeen kuoppalevy peitettiin suojalla ja jätettiin inkuboitumaan huoneenlämpöön 30 minuutiksi. Inkuboinnin jälkeen kaivoihin lisättiin Stop Solution:a (suolahappo, HCl) 50 µl, jolloin tapahtui värinmuutosreaktio. Värin intensiteetti mitattiin 450 nm Wallac Victor²V 1420 Multilabel HTS Counter-laitteella. Intensiteetti oli käänteisesti verrannollinen P1NP konsentraatioon. Tulokset hyväksyttiin sen jälkeen kun oli tutkittu, että saatu standardikuvaaja oli oikeanlainen ja kontrollit asettuivat niille asetettuihin rajoihin.

TRAP määrittäminen

P1NP määritysten jälkeen näytteistä määritettiin TRACP5b. Tähän käytettiin Immunodiagnostic Systems Ltd:n (IDS Ltd) Mouse TrapTM reagenssipakkausta (Ref no: Sb-TR103; Lot: 62458; Exp. 07/2010). Menetelmässä käytetään polyklonaalista vasta-ainetta, joka on valmistettu käyttämällä rekombinoitua hiiren TRACP:a antigeeninä. Määrittämisessä vasta-aine on inkuboitu anti-kani IgG:lla päällystetyn kuoppalevyn pohjaan. Pesujen jälkeen inkuboitujen standardien kontrollien ja näytteiden sisältämä aktiivinen TRACP5b on kiinnittynyt vasta-aineeseen. TRACP5b määrä määritetään kromogeenisubstraatin aikaansaaman värireaktion avulla. Värin

intensiivisyys on suoraan verrannollinen TRACP5b aktiivisuuteen. (Immunodiagnostic Systems Ltd 2008, 1.)

Reagenssipakkaus otettiin huoneenlämpöön lämpiämään puolta tuntia ennen määrittämisen aloittamista. Tämän jälkeen valmistettiin tarvittavat reagenssit. Standardit, kontrolli ja Anti-MouseTRAP Antibody oli toimitettu kylmäkuivattuna jauheena, joka piti liuottaa ionisoituun veteen. Liuosten annettiin seistä 15 minuuttia ennen pipetointien aloittamista. Wash Buffer piti laimentaa ionisoidulla vedellä tarvittavaan vahvuutensa. Myös Substrate Solution:iin piti liuottaa kaksi Substrate-tablettia, mutta tämä piti tehdä juuri ennen kuin liuosta tarvittiin. Sitä ei valmistettu etukäteen. Muut tarvittavat reagenssit oli toimitettu käyttövalmiina. Pipetoitavista standardeista, kontrollista ja näytteistä kirjoitettiin pipetointikaavio. Kaavioon laitettiin ylös käytetty annetuista ohjeista poikkeava näytemäärä. Näytteet analysoitiin pienissä erissä. Ensimmäisellä kerralla analysoitiin tutkimuspäivien -1, 13, 20 ja 27 näytteet. Seuraavalla kerralla määritettiin tutkimuspäivien 42 näytteet. Viimeisellä kerralla mitattiin tutkimuspäivän 34 näytteet.

Tarvittavien valmistelujen jälkeen kuoppalevyn kaivoihin pipetoitiin 100 µl Anti-MouseTRAP Antibody:a. Kuoppalevy suojattiin pakkauksen mukana tulevalla suojalla ja laitettiin huoneenlämpöön kuoppalevyn ravistelijaan tunniksi inkuboitumaan. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevy pestiin Wallac 1296–026 Delfia Platewash pesurilla neljä kertaa. Pesuri käytti kunkin kaivon pesemiseen kerrallaan 300 µl Wash Buffer-liuosta. Pesun jälkeen kuoppalevy käännettiin ylösalaisin ja taputeltiin voimakkaasti käsipapereiden päällä, jotta saatiin viimeisetkin pesunesteiden rippeet pois kaivoista.

Pesun jälkeen viiteen ensimmäiseen kaivoon pipetoitiin 100 µl kutakin standardia, kukin omaan kaivoonsa. Standardien pitoisuudet olivat seuraavat: 0 U/l; 0,29 U/l; 1,06 U/l; 2,8 U/l ja 12,8 U/l. Kuudenteen kaivoon pipetoitiin 100 µl kontrollia. Tämän jälkeen pipetoitiin kaivoihin pipetointikaavion mukaisessa järjestyksessä näytteet. Kaivoihin laitettiin ohjeesta poiketen vain 10 µl näytettä ja 90 µl 0,9 % natriumkloridia (NaCl). Ohjeen mukaan näytettä olisi pitänyt laittaa 25 µl ja 0,9 %

NaCl:a 75 µl. Ohjeesta poikettiin, koska haluttiin näytteiden riittävän vielä IgG_{2b}-määritykseen. Tämän jälkeen kaikkiin kaivoihin lisättiin 25 µl Releasing Reagent:a. Pipetoinnin jälkeen kuoppalevy suojattiin pakkauksen mukana tulevalla suojalla ja laitettiin huoneenlämpöön inkuboitumaan kuoppalevyn ravistelijaan tunniksi. Jäljelle jääneet näytteet vietiin takaisin pakkaseen odottamaan seuraavaa määrittystä.

Inkubointia seurasi pesu samalla tavalla kuin edellä on kuvattu. Pesun jälkeen kaivoihin pipetoitiin 100 µl vastavalmistettua Substrate Solution:a. Kuoppalevy suojattiin suojalla ja laitettiin inkuboitumaan + 37 °C:een kahdeksi tunniksi. Inkuboinnin jälkeen kaikkiin kaivoihin lisättiin 25 µl Stop Solution:a (natriumhydroksidi, NaOH). Kaivojen värireaktiot mitattiin 405 nm Wallac Victor²V 1420 Multilabel HTS Counter-laitteella. Saatu tulos oli suoraan verrannollinen TRAPC5b:n määrään näytteessä.

Paraproteiini- eli IgG_{2b}-määritys

Multipelissa myeloomassa esiintyvän paraproteiini- eli IgG_{2b}-pitoisuuden määrittämisessä käytettiin Bethyl Laboratories Inc:n reagenssipakkausta (Lot. E101-137). Käytetty menetelmä on spesifinen hiiren IgG_{2b}:n määrittämiseen ja se perustuu ELISA-menetelmään (Bethyl Laboratories Inc. 2009, 3).

Ennen näytteiden analysoimista määrittämisprotokolla kokeiltiin kerran läpi etukäteen, jotta saatiin säädettyä sopivat inkubointiajat ja reagenssien pitoisuudet. Samalla haettiin sopivaa näytteiden laimennussuhdetta, jotta saatiin näytteiden paraproteiini-pitoisuus sopimaan menetelmän herkkyysrajoihin. Kokeilussa käytettiin kahta eri näytettä, joista tehtiin laimennossarja.

Reagenssipakkaus otettiin huoneenlämpöön lämpiämään puolta tuntia ennen määrittäysten aloittamista. Ennen määrittäksen aloittamista valmistettiin tarvittavat reagenssit. Reagenssit oli toimitettu joko jauheina, kapseleina tai liuoksina. Ensin valmistettiin Wash Solution. Tarvittava jauhepaketti liotettiin litraan ionisoitua vettä ja sekoitettiin, kunnes jauhe oli kokonaan liuennut veteen. Seuraavaksi valmistettiin

Postcoat Solution. Siinä tarvittava jauhe liuotettiin litraan ionisoitua vettä ja sekoitettiin, kunnes jauhe oli kokonaan liuennut veteen. Tämän jälkeen valmistettiin Coating Buffer. Mittalasilla mitattiin 100 ml ionisoitua vettä, johon luotettiin tarvittava jauhe, joka oli laitettu kapselin sisään. Kapseli rikottiin ja sen sisus lisättiin veteen. Viimeiseksi valmistettiin Sample/Conjugate Diluent. Siihen tarvittiin 100 ml Postcoat Solution:a, johon lisättiin 0,5 ml Tween 20-liuosta ja sekoitettiin hyvin. Muut tarvittavat liuokset valmistettiin juuri ennen kuin niitä tarvittiin. Pipetoitavista standardeista ja näytteistä kirjoitettiin pipetointikaavio.

Määrittäminen aloitettiin tekemällä kuoppalevyn kaivojen päällystys Capture vasta-aineella. Ensin valmistettiin tarvittava liuos, joka sisälsi 20 µl Capture vasta-ainetta ja 2000 µl Coating Buffer:a. Jokaiseen tarvittavaan kaivoon pipetoitiin 100 µl tätä liuosta. Kaivot suojattiin suojalla ja annettiin inkuboitua 60 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin Wash Solution:lla käsin käyttämällä monikanavapipettiä pesuliuksen annostelussa. Pesu toistettiin kolme kertaa. Pesun jälkeen kuoppalevy käännettiin ylösalaisin ja sitä taputeltiin voimakkaasti käsipapereiden päällä, jotta kaivoista saatiin viimeisetkin pesunestepisarot pois.

Tämän jälkeen kaivoin pipetoitiin 200 µl Postcoat Solutionia. Kaivot peitettiin suojalla ja jätettiin inkuboitumaan 30 minuutiksi huoneenlämpöön. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevy pestiin kolme kertaa samoin kuin edellä on kuvattu. Inkuboinnin aikana valmistettiin tarvittavat standardien ja näytteiden laimennussarjat. Taulukoissa 1 ja 2 on esitetty laimennussarjojen teko.

Taulukko 1. Standardien laimennussarja.

Standardien laimennussarja			
Kohta	ng/ml	Kalibraattori	Sample Diluent
0	1000	1 µl	2,6 ml
1	200	200 µl kohdasta 0	200 µl
2	100	200 µl kohdasta 1	200 µl
3	50	200 µl kohdasta 2	200 µl
4	25	200 µl kohdasta 3	200 µl
5	12,5	200 µl kohdasta 4	200 µl
6	6,25	200 µl kohdasta 5	200 µl
7	3,12	200 µl kohdasta 6	200 µl

Taulukko 2. Harjoitusnäytteiden laimennussarja.

Harjoitusnäytteiden laimennussarja			
Kohta	Näyte	Sample Diluent	Laimennussuhde
1	5 µl	95 µl	1:20
2	2 µl	1998 µl	1:1000
3	20 µl kohdasta 2	180 µl	1:10 000
4	20 µl kohdasta 3	180 µl	1:100 000
5	20 µl kohdasta 4	180 µl	1:1 000 000

Standardeja ja näytelaimennoksia pipetoitiin 100 µl kuhunkin kuoppalevyn kaivoon pipetointikaavion mukaisessa järjestyksessä. Kuoppalevy peitettiin suojalla ja jätettiin inkuboitumaan huoneenlämpöön 60 minuutiksi. Inkuboinnin jälkeen kuoppalevy pestiin viisi kertaa samoin kuin edellä on kuvattu.

Standardien ja näytteiden inkuboinnin aikana valmistettiin HRP Conjugate liuos. Siinä HRP Conjugate:a liuotettiin Conjugate Diluentiin 1:75 000. Ensin valmistettiin 1:1000 vahvuinen liuos, josta laimentamalla lisää 1:75 saatiin halutun vahvuinen liuos. Valmistettua liuosta pipetoitiin kaikkiin kaivoihin 100 µl, jonka jälkeen kuoppalevy suojattiin. Kuoppalevy jätettiin inkuboitumaan huoneenlämpöön 60 minuutiksi, jonka jälkeen se pestiin viisi kertaa samoin kuin edellä on kuvattu.

Seuraavaksi kaivoihin lisättiin TMB substraattiliuos. Liuos valmistettiin juuri ennen kaivoihin pipetointia lisäämällä substraattiliuos B:tä A:han 1:1. Substraattiliuosta pipetoitiin kaivoihin 100 µl. Kuoppalevy suojattiin ja jätettiin inkuboitumaan 20 minuutiksi huoneenlämpöön. Viimeiseksi kaivoihin lisättiin 100 µl konsentraatiooltaan 2 mol/l olevaa rikkihappoa (H₂SO₄) substraattireaktion pysäyttämiseksi. Kaivojen värinreaktiot mitattiin 450 nm Wallac Victor²V 1420 Multilabel HTS Counter-laitteella. Tuloksien perusteella näytteiden laimennussuhteeksi valittiin 1:10 000, jolla varsinaiset määritykset tehtiin.

Näytteet analysoitiin kahdessa erässä. Ensin analysoitiin tutkimuspäivien -1 ja 42 sekä kolmen terveen hiiren näytteet ja sitten tutkimuspäivien 27 ja 34 näytteet. Varsinaisten näytteiden analysointi tapahtui samoin kuin edellä on kuvattu paitsi, että pesut tehtiin

Wallac 1296–026 Delfia Platewash pesurilla, johon oli lisätty sopiva pesuohjelma. Näytteitä laimennettaessa tehtiin ensin 1:1000 vahvuinen laimennos, johon pipetoitiin 1 µl näytettä ja 999 µl Sample Diluent:a. Tästä laimennoksesta pipetoitiin 10 µl näytelaimennosta kaivoihin, jonka lisättiin päälle 90 µl Sample Diluent:a, jolloin kaivoihin saatiin laimennos 1:10 000.

4.3 Metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivinen tutkimus eli hypoteettis-deduktiivinen, eksperimentaalinen tai positivistinen tutkimus on tutkimusmalli, jonka juuret löytyvät luonnontieteistä. Tämän tutkimusstrategiassa korostetaan yleispätevien syiden ja seurausten lakeja. Sen taustalta löytyy niin sanottu realistinen ontologia, jonka mukaan todellisuus muodostuu objektiivisesti havaittavista faktoista. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2002, 129.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa on keskeistä, että johtopäätökset perustuvat aiempiin tutkimuksiin ja teorioihin. Tutkimuksen käsitteet pitää määritellä. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa koejärjestelyt tai aineiston keruu pitää olla suunniteltu niin, että havaintoaineisto soveltuu määrälliseen ja numeeriseen mittaamiseen. Muuttujat pitää muodostaa niin, että ne voidaan laittaa taulukkomuotoon ja aineisto voidaan sovittaa tilastollisesti käsiteltävään muotoon. Päätelmät tehdään tilastolliseen analysointiin perustuen, jolloin tuloksia voidaan kuvata muun muassa tilastollisten muuttujien avulla ja tulosten merkittävyys voidaan tilastollisesti testata. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2002, 129.)

Tämä tutkimus on kvantitatiivinen. Kaikki edellä mainitut kvantitatiivisen tutkimuksen keskeiset piirteet sopivat tähän tutkimukseen.

4.4 Eettisyyden tarkastelu

Eettisessä tarkastelussa keskityttiin eläinkokeiden ja tutkijan etiikkaan.

4.4.1 Eläinkokeen eettisyys

Eläinkokeiden suorittaminen on tarkoin laissa säädeltyä toimintaa. Koe-eläintoiminnasta vastaavan lain tehtävänä on varmistaa, että eläimiä pidetään ja käytetään koe-eläintoiminnassa vain tärkeistä ja tarpeellisista syistä. Sen tehtävänä on myös varmistaa, että eläimiä käytetään mahdollisimman vähän, ja että eläimille koe-eläintoiminnassa aiheutetaan mahdollisimman vähän kipua, tuskaa, kärsimystä tai pysyvää haittaa. Se edellyttää myös, että eläinkoe tulee aina korvata muulla tieteellisellä menetelmällä, jos se on mahdollista tavoitellun tuloksen saavuttamiseksi. (Finlex 2006 [Viitattu 22.10.08 ja 21.1.09].)

Koe-eläintoiminta on luvanvaraista. Laitos, jossa halutaan tehdä eläinkokeita, joutuu hakemaan lupaa koe-eläintoiminnan harjoittamiseen lääninhallitukselta. Luvan saaminen edellyttää, että laitoksessa on asianmukaiset tilat, välineet, laitteet ja henkilökunta. Lisäksi sen eläinlääkintähuolto pitää olla järjestetty lain edellyttämällä tavalla. Jokaista laitoksessa tehtävää eläinkoetta varten on anottava lupa eläinkoelautakunnalta, joka arvioi täyttääkö koetta varten laadittu suunnitelma kaikki vaadittavat kriteerit. (Finlex 2006 [Viitattu 22.10.08 ja 21.1.09].)

Eräs eläinkokeiden ohjenuora on kolmen R:n-periaate. Kolme ärrää tulee sanoista replacement (korvaaminen), reduction (vähentäminen) ja refinement (parantaminen). Replacement tarkoittaa, että eläinkokeet tulee korvata muulla menetelmällä aina kun se on mahdollista. (Mäkinen 2006, 61.) Eläinkokeita korvaavia menetelmiä ovat esimerkiksi solu- ja kudosisviljelyt. Niiden avulla voidaan tutkia erilaisia solutason tapahtumia, joita ei voisi tutkia edes eläinkokeilla tutkia. Muita vaihtoehtoisia tutkimusmenetelmiä ovat tietokonemallinnus, kivuntunnon kehitysmättömien eliöiden käyttö, mekaaniset mallit ja ihmisten tutkiminen. Yhdistelemällä eri malleja voidaan eläinkokeiden määrää vähentää. (Salmi 2005, 105–106.) Reduction tarkoittaa,

että eläinkokeissa käytettyjen eläinten määrä pitää olla pienin mahdollinen. Refinement tarkoittaa, että koe-eläinten kohtelua pitää jatkuvasti parantaa ja niiden kärsimysten määrää vähentää. (Mäkinen 2006, 61.)

Eläinkokeet aiheuttavat paljon keskustelua puolesta ja vastaan. Ne ovat eettisesti hyvin monitahoisia asioita, joihin ei ole olemassa yhtä oikeaa vastausta. Yksi keskeinen asia on, onko ihmisellä oikeutta millään lailla hyödyntää eläimiä. Tällöin pitää pohtia, voiko ihminen hyödyntää eläimiä ravinnon-, turkisten- tai tieteellisen tiedon tuotannossa. Voidaan myös pohtia, onko ihmisellä oikeutta pitää edes lemmikkejä, koska tällöin ihminen hyödyntää eläimiä oman mielihyvän tuottamiseen. Jos hyväksytään, että ihminen voi hyödyntää eläimiä, voidaan lähemmin pohtia eläinkokeiden tarpeellisuutta. (Aaltola & Oksanen 2002, 15–159.)

Asiaa voidaan tarkastella monelta kannalta ja eri eettisten teorioiden pohjalta. Eläinkokeita voidaan tarkastella muun muassa utilitaristisen- tai deontologisen teorian tai hyve-etiikan pohjalta. Utilitaristisen eli hyötyeettisen teorian mukaan eettinen arvo määräytyy hyödyllisten vaikutusten perusteella, joita toiminnalla on. Tässä teoriassa punnitaan, onko ihmisen hyvinvointi tärkeämpi asia kuin eläinten tuntema kärsimys. (Siitonen 2005, 27–28.)

Eläinkokeiden puolustajat perustelevat kantansa juuri niiden hyödyllisyydellä. Heidän argumenttinaan on se, että eläinkokeilla saavutetaan ihmiskunnalle hyödyllistä tietoa, jota voisi olla muilla keinoin kenties mahdotonta tai hyvin vaikea saavuttaa. Lääketiede on saavuttanut huomattavia edistysaskeleita eläinkokeiden avulla. Juuri lääketieteessä eläinkokeet ovat standarditutkimusmetodi, eikä niitä ole helppo korvata muilla menetelmillä. (Aaltola & Oksanen 2002, 156–157.)

Eläinkokeiden vastustajat vetoavat tässä kohdassa eläinten tuntemaan kärsimykseen ja pelkoon. Heidän mielestään ihminen ei saa aiheuttaa eläimille kärsimystä ja tuskaa toteuttaakseen omia tarkoituksiaan. Sen perusteella voidaan ajatella, että kaikki eläimille tuskaa tuottavat kokeet täytyy lopettaa. Eläinten tuntemaan kivun määrittely perustuu tieteellisiin analyyseihin, joka ovat parhaimmillaankin vain arvio siitä, mitä

eläin tuntee. Jää siis tutkijan päätettäväksi, missä kulkee raja hyväksyttävästä kivusta. Ihmisen ja eläimen suojeleminen joutuvat tässä vastakkain, eikä ongelmaan pystytä antamaan kaikkia osapuolia tyydyttävää vastausta. Yksi merkittävä ongelma on, ettei ole olemassa mittaria, joka antaisi absoluuttisen totuuden siitä, kuinka paljon ihmisen saamat hyödyt ovat eläimien haittoja merkittävämmät. (Siitonen 2005, 28; Clarkeburn & Mustajoki 2007, 62.) Eläinkokeiden yksi keskeinen lähtökohta kuitenkin on, että eläinkokeessa tulee välttää ja vähentää eläinten tuntemaa kipua kaikin mahdollisin tavoin (Tuomisto 1996, 21).

Deontologinen eli velvollisuusteoria taas kiinnittää huomiota velvollisuuteen. Siinä pohditaan, millainen suhtautuminen eläinkokeisiin on eettisesti vastuullista ja mikä vastuutonta riippumatta kokeista aiheutuvista haitoista tai hyödyistä. Tässä velvollisuus suojella ihmisiä ja velvollisuus suojella eläimiä joutuvat vastakkain. (Siitonen 2005, 29.)

Hyve-etiikassa pyritään sellaisten taipumusten kasvattamiseen, joka mahdollistaa ”oikein tekemisen”. Tavoiteltavaksi katsottuja taipumuksia ovat esimerkiksi rehellisyys, myötätuntoisuus, johdonmukaisuus ja rohkeus. Koe-eläinten hoitamisessa ja eläinkokeiden tekemisessä tarvitaan näitä ominaisuuksia. Sekä eläinkokeiden puolustajat että niiden vastustajat vetoavat näihin hyveisiin, joskin heidän tulkintansa näistä hyveistä eroavat. (Siitonen 2005, 9.)

Tätä tutkimusta ei olisi voitu korvata muilla kokeilla, koska esimerkiksi solumallilla ei olisi voitu tutkia myelooman vaikutusta luustoon, eikä sitä minkälaiset vaikutukset bortezomib:lla on eläimiin. Koetta ei voitu myöskään tehdä kivuntunnon kehittymättömmillä eliöillä, koska tällä hetkellä ei ole olemassa sellaista multippeli myeloomamallia, jolla tämä olisi mahdollista. Koska tällä hetkellä ei ole olemassa muuta keinoa tutkia tämän tyyppisiä sairauksia kuin eläinkokeet, tutkija hyväksyy eläinten tuntemaan kärsimyksen, koska sen avulla voidaan pelastaa ihmishenkiä. Kokeen aikana ei voitu muuta kuin lievittää eläinten kipua ja lopettaa ne, jos niiden kärsimykset kasvoivat liian suuriksi. Tutkija yritti parhaan taitonsa mukaan kohdella eläimiä kunnioittavasti, ja ajatella aina niiden parasta niin paljon kuin se oli kokeen

onnistumisen kannalta mahdollista. Tutkija toivoo kuitenkin, että löytyisi keino, jolla eläinkokeet voitaisiin korvata, jottei eläinten tarvitsisi tuntea kipua, pelkoa tai kärsimystä.

Tässä kokeessa eläimille annettiin syöpäsolut injektiona häntälaskimoon. Injektioiden sekä verinäytteiden oton katsotaan olevan toimenpiteinä vähäisiä ja niiden aiheuttaman kivun lyhytaikaista (Skutnabb 1996, 9-10). Eläimet kärsivät kokeen aikana syövän kehittymisestä johtuvista kivusta ja haitasta sekä bortezomib:n haittavaikutuksista. Eläinten tuntemaa kipua pyrittiin kaikin tavoin lievittämään kokeen aikana. Ne saivat temgesic-kipulääkettä kivun lievitykseksi heti kliinisten oireiden ilmaannuttua. Lisäksi kaikki eläimet saivat kipulääkettä joka tapauksessa kokeen kolmen viimeisen päivän ajan, vaikkei niillä oireita ilmaantunutkaan. Kun havaittiin, että bortezomib annos oli liian iso eläimille, sitä pienennettiin välittömästi. Näin pyrittiin varmistamaan, etteivät eläimet kärsisi tästä syystä. Annos oli valittu aikaisempien artikkeleiden perusteella, eikä se niiden perusteella ollut toksinen, joten toksisuus oli yllättävää. Lisäksi eläimet, joiden paino tippui yli 20 %, jotka halvaantuivat tai joiden kärsimykset olivat muuten liian suuret, lopetettiin välittömästi tutkimuksenjohtajan luvalla.

4.4.2 Tutkijan eettisyys

Tutkimusaiheen valinta pitää sisällään jo monia eettisiä kysymyksiä (Clarkeburn & Mustajoki 2007, 53). Tässä tapauksessa tutkija ei voinut juuri vaikuttaa aiheen valintaan, koska aihe annettiin hänelle toimeksiantajan taholta. Aihe ei kuitenkaan sotinut tutkijan omia eettisiä arvoja vastaan. Tämä aihe oli toimeksiantajalle tärkeä, ja sen avulla pyritään osaltaan vaikuttamaan multippelin myeloomaan tehoavien lääkkeiden kehitykseen. Toimivan hiirimallin kehityksessä pyritään lopulta pääsemään tilanteeseen, että löydettäisiin tehokas lääkeaine, jonka avulla voitaisiin säästää ihmishenkiä.

Tutkimuksen aikana tulee välttää kaikenlaista epärehellisyyttä, kuten toisten tekstin plagiointia (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2002, 27). Tutkimuksen aikana tutkija ei esittänyt omaan toisten tekstiä, vaan laittoi lähdemerkinnät Turun

Ammattikorkeakoulun sääntöjen mukaisesti kaikkiin käytettyihin tekstiviitteisiin. Työn teoreettista osaa kirjoitettaessa harjoitettiin lähdekritiikkiä. Tutkija yritti hakea mahdollisimman tuoreita lähteitä. Pääsääntöisesti tutkimuksessa käytettiin alle 10 vuotta vanhoja lähteitä. Ainoastaan muutamassa kohdassa hyväksyttiin yli 10 vuotta vanhoja lähteitä työhön, koska ne olivat oleellisia työn kannalta. Tällainen poikkeus oli muun muassa kohdassa 2.4 Eläinmalli, jossa esitettiin, kuinka multippelin myelooman eläinmalli on kehittynyt vuosien saatossa. Tutkija pyrki etsimään saman tiedon useammasta lähteestä, eikä kelpuuttanut epäilyttäviltä tuntuvia lähteitä työhön.

Toisten tutkijoiden osuutta tutkimuksen tekoon ei vähätelty (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2002, 27). Tutkimuksen suuren työmäärän ja tutkijan kokemattomuuden vuoksi hänen oli mahdotonta tehdä kaikkea itse. Tutkija sai paljon apua ja tukea Pharmatest Service Oy:n työntekijöiltä tutkimuksen tekemiseen. Tutkijalla oli apunaan kaikissa tutkimuksen vaiheissa kokenut työpari, jolta tutkija pystyi aina kysymään neuvoja. Tutkija sai Pharmatest Services Oy:n työntekijöiltä korvaamatonta apua, eikä tutkimus olisi valmistunut ilman heitä. Tutkimukseen osallistui myös Biolaboratorion työntekijöitä, jotka vastasivat koe-eläinten hoidosta.

Tutkimuksen raportointi ei saa olla puutteellista tai harhaanjohtavaa. Lisäksi tutkimustulokset pitää esittää kaunistelematta eikä niitä saa sepittää (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2002, 28.) Tutkimus tehtiin tunnollisesti ja hyviä tutkimustapoja noudattaen. Opinnäytetyössä tutkimuksen kulku on raportoitu huolellisesti ja tarkasti. Kaikki vaiheet kuvattiin sellaisina kuin ne tutkimuksessa tehtiin. Myös tutkimuksen kaikki takaiskut esitettiin juuri sellaisina kuin ne olivat. Tietoisesti lukijaa ei ole johdettu missään kohdassa harhaan. Tutkimustuloksia ei kaunisteltu, vaan ne esitettiin sellaisina kuin olivat.

5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

5.1 Tilastollinen testaus

Tilastollinen testaus tehtiin Microsoft Excel- ja SPSS 15.0 ohjelmilla. Tulokset syötettiin ensin Exceliin, josta ne siirrettiin SPSS 15.0 tilasto-ohjelmaan. Tilastolliset muuttujat määritettiin jokaisen tutkimuspäivän ja joka tutkimuksen kohdalla erikseen. Ryhmän 2 ja ryhmä 3 tuloksia verrattiin aina ryhmän 1 tuloksiin eli niille tehtiin parivertailu. Ryhmän 3 tuloksista ei tehty tilastollista analyysiä enää tutkimuspäivän 20 jälkeen, koska ryhmässä oli vain kaksi hiirtä eikä niistä pystynyt tekemään tilastollista analyysiä.

Kaikista aikapisteistä määritettiin Excelillä keskiarvo ja keskihajonta. Lisäksi Excelillä laskettiin kaikkien tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivän -1 tasosta. Tulosten analysoinnissa käytettiin tulosten prosentuaalista muutosta tutkimuspäivän -1 arvoihin lähes kaikkien tutkimuspäivien ja määritysten kohdalla. Vain muutamassa kohdassa käytettiin varsinaisia mittaustuloksia. Tähän päädyttiin, koska mittauksia teki kaksi eri ihmistä, jolloin tuloksissa näkyi pipetointikäsiälästä johtuvia eroja. Tällöin prosentuaaliseen muutokseen perustuva analysointi, ei olisi ollut luotettava. Käyttämällä varsinaisia mittaustuloksia saatiin häivytettyä pipetointikäsiälästä johtuvia eroja.

Tiedot syötettiin SPSS 15.0 ohjelmaan. Jos aikapisteissä oli kolme vertailtavaa ryhmää, tehtiin ensin normaalijakaumatestaus. Jos tulokset noudattivat normaalijakaumaa, niille tehtiin varianssin homogeenisuuden testaus. Mikäli varianssit olivat homogeeniset, tehtiin One Way ANOVA-testi, jolla testattiin jääkö H_0 -hypoteesi eli ”ryhmien välillä ei ole eroa” voimaan vai hylätäänkö se ja H_1 -hypoteesi eli ”ryhmien välillä on eroa” astuu voimaan. H_1 -hypoteesi astui voimaan, jos p:n arvolla oli tilastollista merkitsevyyttä. Jos H_1 -hypoteesi astui voimaan, tehtiin Dunnett testi, jolla selvitettiin kuinka paljon ryhmien välillä on tilastollista eroa. Jos

jäljellä oli ainoastaan kaksi ryhmää, tehtiin ensin normaalijakauman testaus ja sen jälkeen Independent-Samples T-testi. Mikäli tulosten jakauma ei ollut normaali jonkin päivän tai mittauksen kohdalla tai varianssi ei ollut homogeeninen, tuloksille tehtiin logaritmi- tai neliöjuurimuunnoksia tarpeen mukaan.

Tilastollisesti merkittäviä olivat p:n arvot, jotka olivat alle 0,05. Merkitsevyys määritettiin seuraavasti:

Tilastollisesti erittäin merkitsevä = $p < 0,001 = ***$

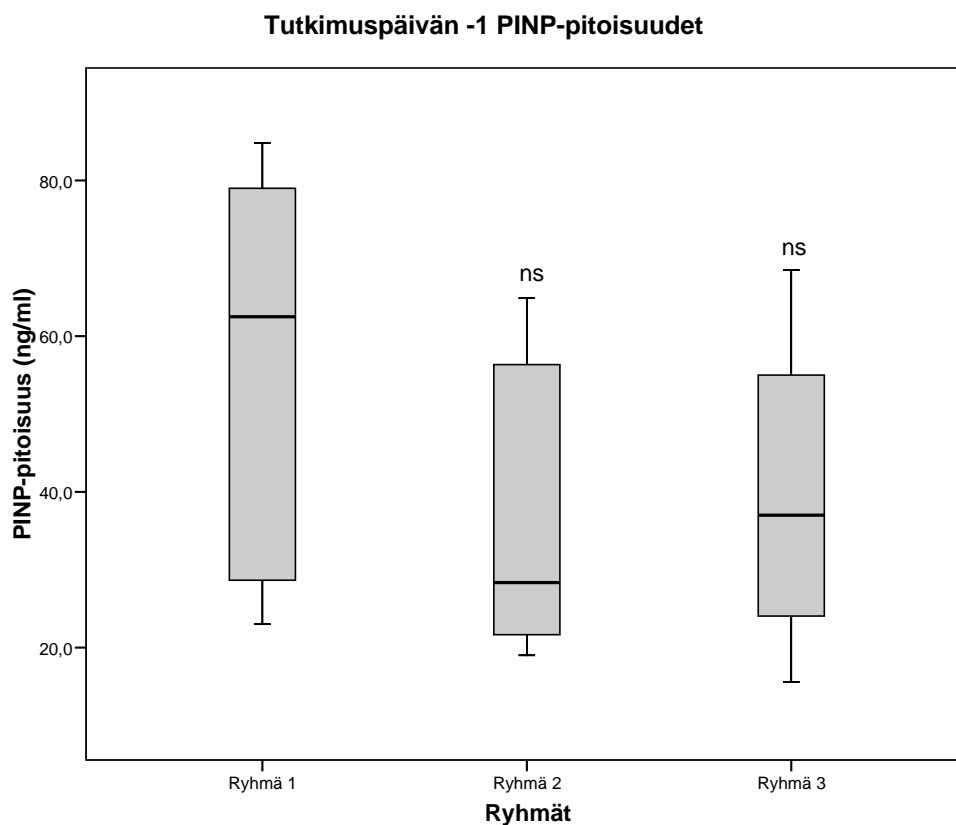
Tilastollisesti merkitsevä = $0,001 \leq p < 0,01 = **$

Tilastollisesti melkein merkitsevä = $0,01 \leq p < 0,05 = *$

Tilastollisesti merkityksetön = $p > 0,05 = ns$ (non significant)

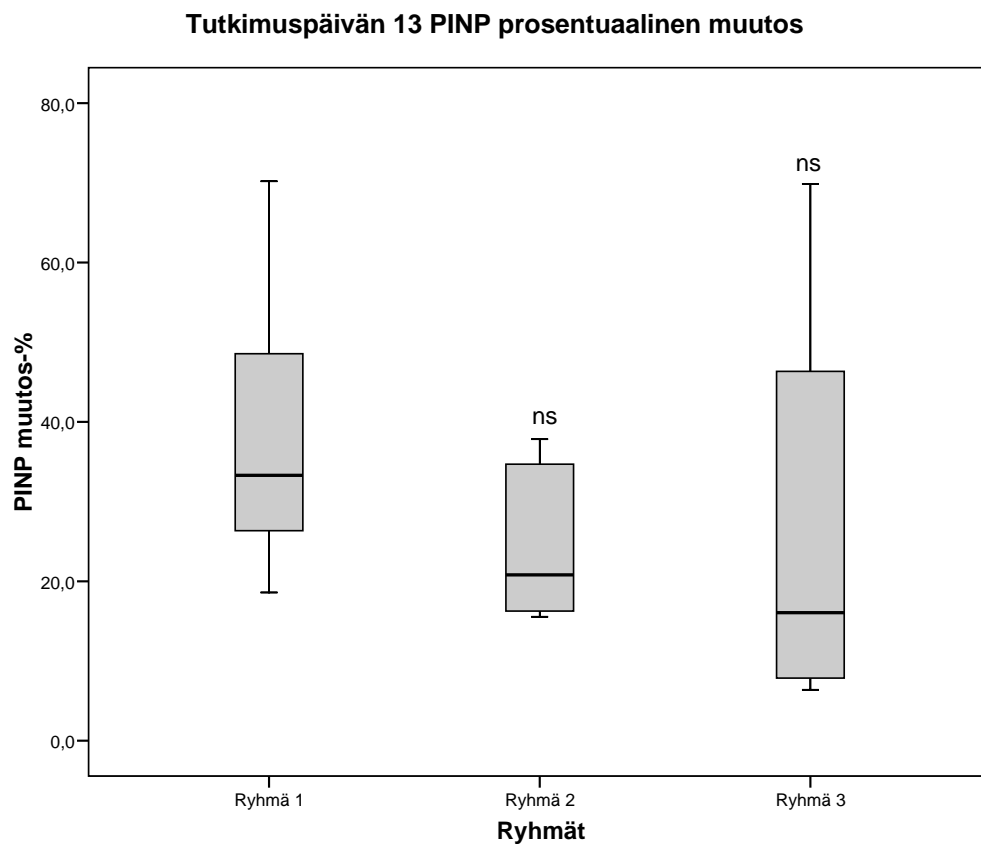
5.2 Tulokset

Tutkimuspäivän -1 PINP-tuloksille tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, ettei jakauma ole normaali. Tämän jälkeen tuloksille tehtiin logaritminen muunnos ja tehtiin normaalijakauman testaus uudestaan. Muunnoksen jälkeen tulokset olivat normaalisti jakautuneita. Tuloksen varianssin homogeenisyys testattiin ja se osoittautui homogeeniseksi. Seuraavaksi tuloksille tehtiin One Way ANOVA testaus, jossa p:n arvoksi saatiin 0,307, joka tarkoittaa ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkitsevää muutosta (ns). Kuviossa 2 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän -1 PINP-pitoisuudet.



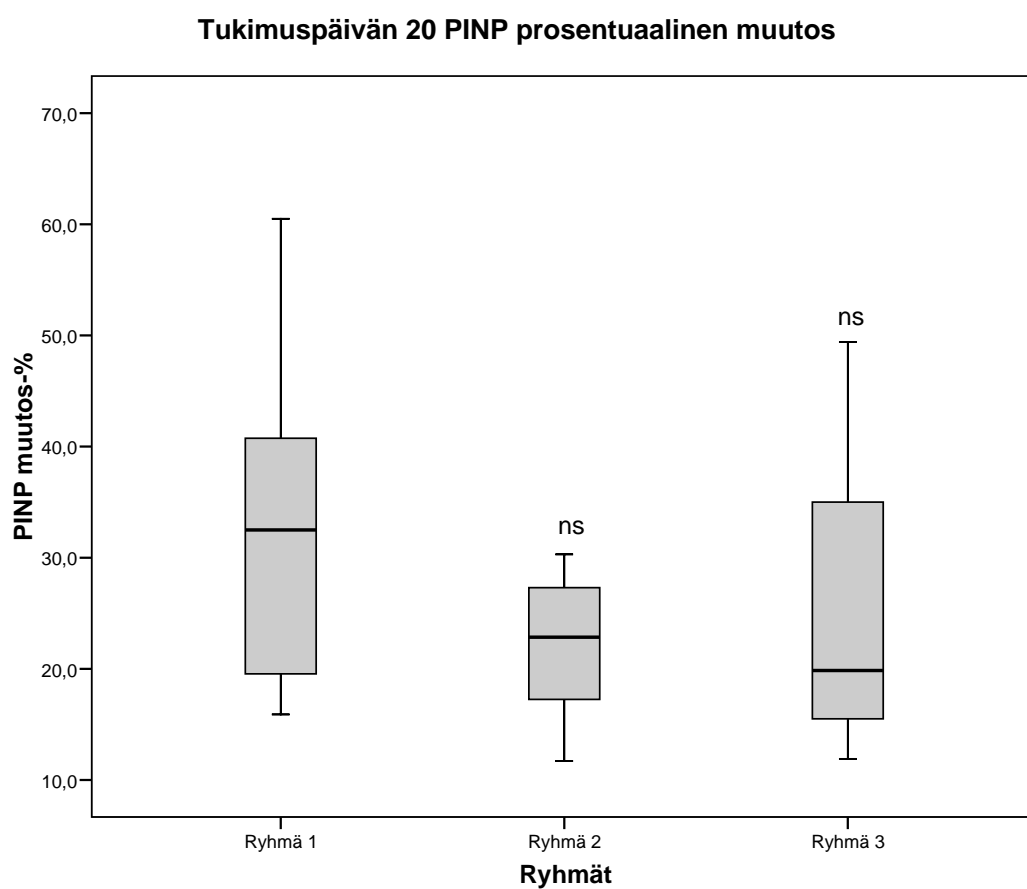
Kuvio 2. Ryhmien tutkimuspäivän -1 PINP- pitoisuudet.

Tutkimuspäivän 13 PINP-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin varianssin homogeenisyyden testaus, jossa havaittiin, että varianssi oli homogeeninen. Seuraavaksi tehtiin One Way ANOVA testi, jossa saatiin p:n arvoksi 0,302, joka tarkoittaa, ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkitsevää muutosta (ns). Kuviossa 3 on esitetty tutkimuspäivän 13 PINP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



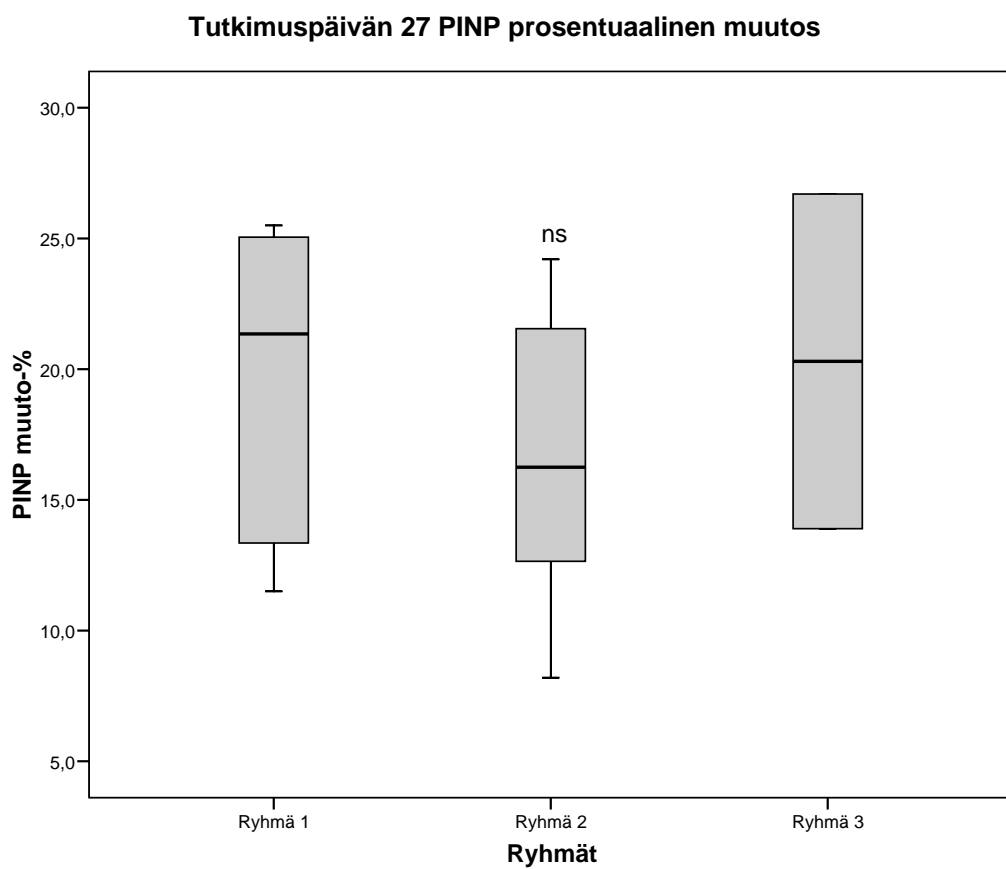
Kuvio 3. Ryhmien tutkimuspäivän 13 PINP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 20 P1NP-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, ettei jakauma ole normaali. Tämän jälkeen tehtiin logaritmimuunnos, jonka jälkeen jakauma muuttui normaaliksi. Tämän jälkeen tehtiin varianssin homogeenisyyden testaus, jossa havaittiin, että varianssi oli homogeeninen. Seuraavaksi tehtiin One Way ANOVA testi, jossa saatiin p:n arvoksi 0,272, joka tarkoittaa, ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkitsevää muutosta (ns). Kuviossa 4 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 20 P1NP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



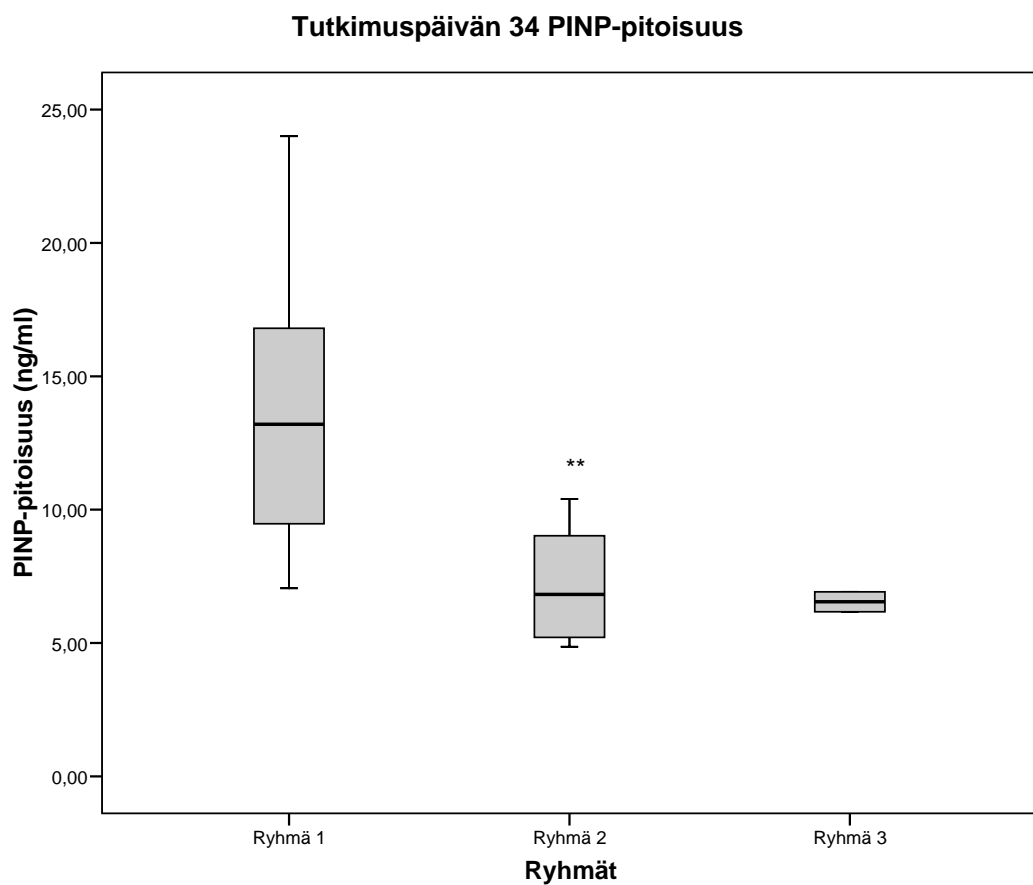
Kuvio 4. Ryhmien tutkimuspäivän 20 P1NP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 27 P1NP-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,339, joka tarkoittaa ettei ryhmien 1 ja 2 välillä ole tilastollisesti merkitsevää muutosta (ns). Kuviossa 5 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 27 P1NP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



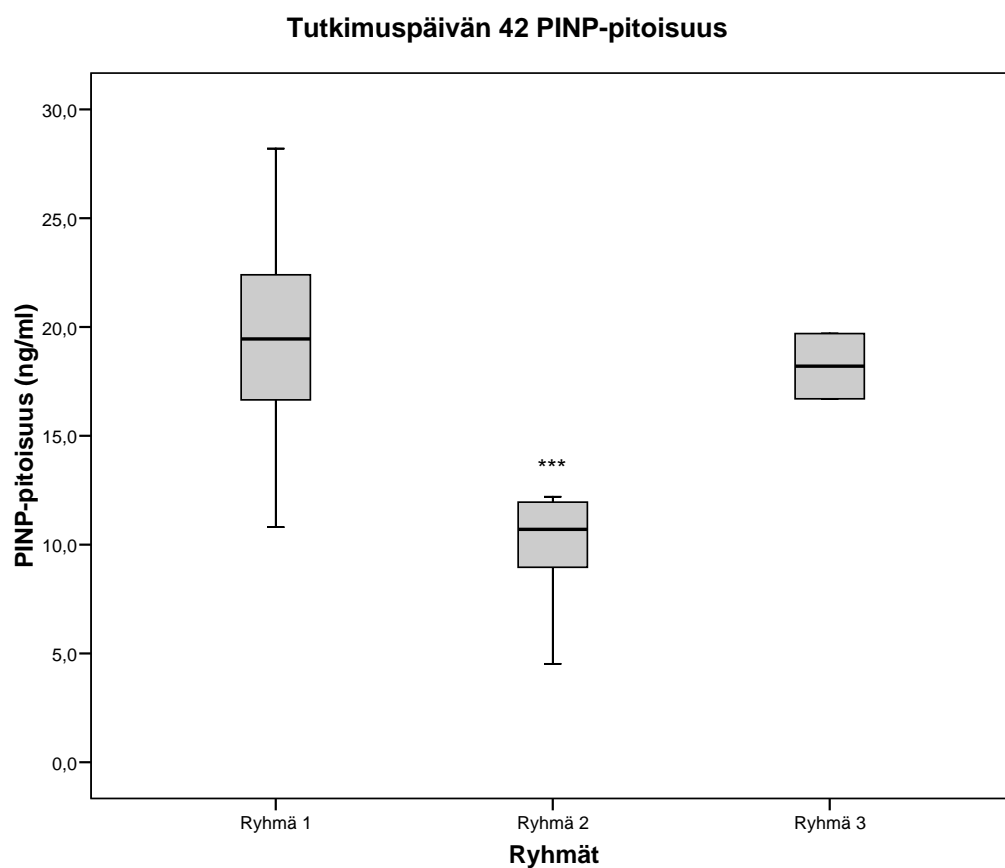
Kuvio 5. Ryhmien tutkimuspäivän 27 P1NP-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 34 P1NP-tuloksille tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, ettei jakauma ole normaali. Tämän jälkeen tehtiin logaritmuutos, jonka jälkeen jakauma ei ollut vielääkään normaali. Seuraavaksi tehtiin neliöjuurimuunnos, jonka jälkeen jakauma muuttui normaaliksi. Tämän jälkeen tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,005, joka tarkoittaa, että ryhmien välillä on tilastollisesti merkitsevää muutosta (**). Kuviossa 6 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 34 P1NP-pitoisuudet.



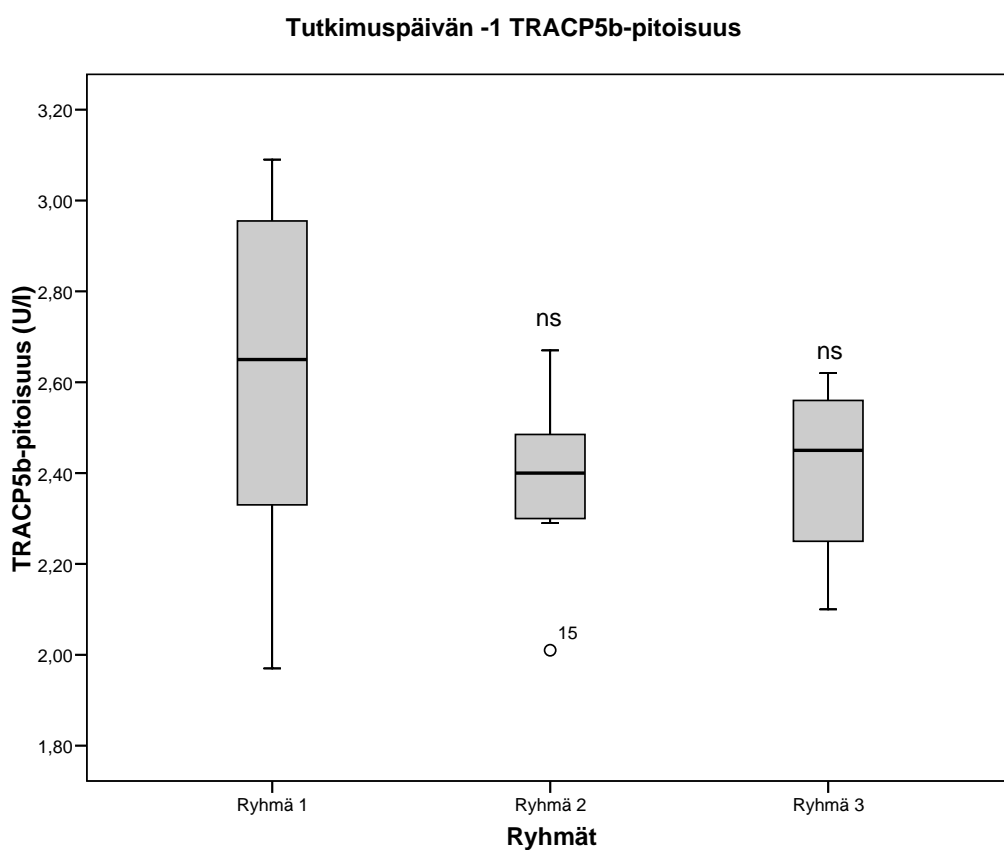
Kuvio 6. Ryhmien tutkimuspäivän 34 P1NP-pitoisuudet.

Tutkimuspäivän 42 P1NP-tuloksista tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,000, joka tarkoittaa, että ryhmien välillä on tilastollisesti erittäin merkittävä muutos (***). Kuviossa 7 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 42 P1NP-pitoisuudet.



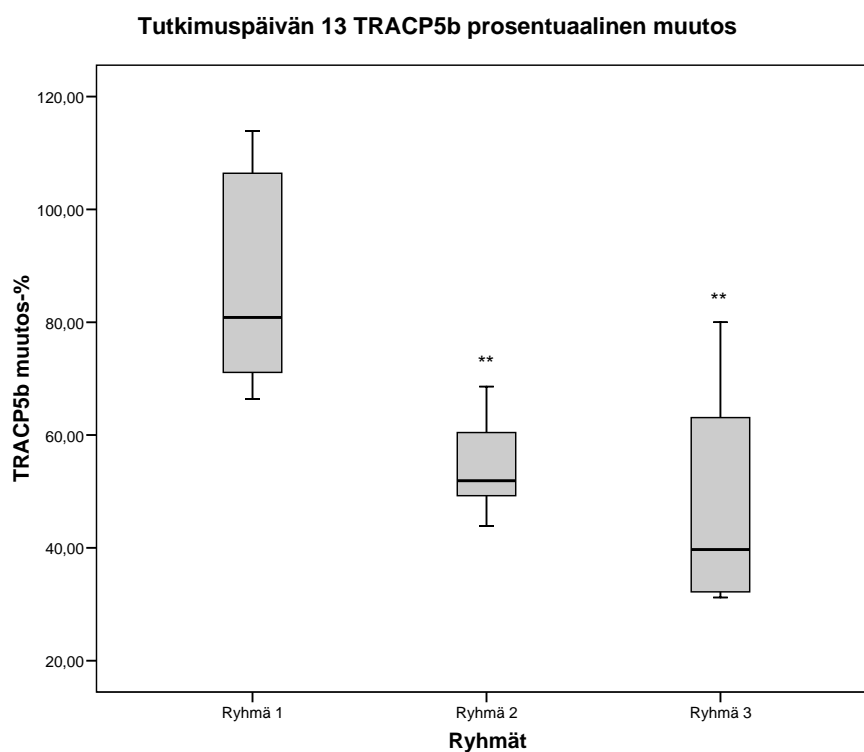
Kuvio 7. Ryhmien tutkimuspäivän 42 P1NP-pitoisuudet.

Tutkimuspäivän -1 TRACP5b-tuloksille tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Seuraavaksi testattiin varianssin homogeenisyys, joka havaittiin homogeeniseksi. Tämän jälkeen tehtiin One Way ANOVA testi, jossa saatiin p:n arvoksi 0,266. Tämä tarkoittaa, ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkittävää muutosta (ns). Kuviossa 8 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän -1 TRACP5b-pitoisuudet.



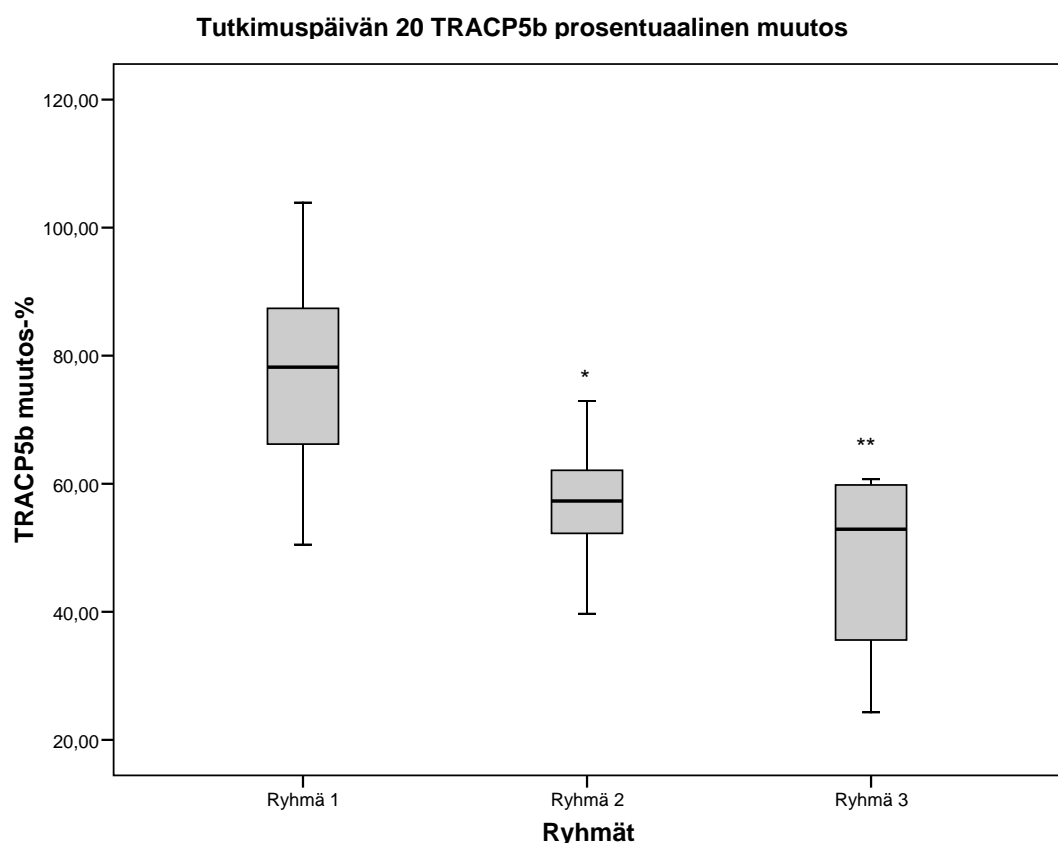
Kuvio 8. Ryhmien tutkimuspäivän -1 TRACP5b-pitoisuudet.

Tutkimuspäivän 13 TRACP5b-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin varianssin homogeenisyyden testaus. Varianssin homogeenisyyden testauksessa havaittiin, ettei varianssi ole homogeeninen. Tämän jälkeen tehtiin logaritmuunnos, joka ei parantanut varianssin homogeenisyyttä. Tämän jälkeen tehtiin neliöjuurimuunnos, jonka jälkeen testattiin varianssin homogeenisyys. Neliöjuurimuunnoksen jälkeen varianssi oli muuttunut homogeeniseksi. Tämän jälkeen tehdystä One Way ANOVA:sta saatiin p:n arvoksi 0,001 eli ryhmien välillä on tilastollisesti merkitsevää muutos (**). Dunnett parivertailu testissä ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi saatiin 0,002, joka tarkoittaa, että tulosten välillä on tilastollisesti merkitsevä muutos (**). Ryhmien 1 ja 3 väliseksi p:n arvoksi saatiin 0,001, joka tarkoittaa, että tulosten välillä on tilastollisesti merkittävä muutos (**). Kuviossa 9 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 13 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



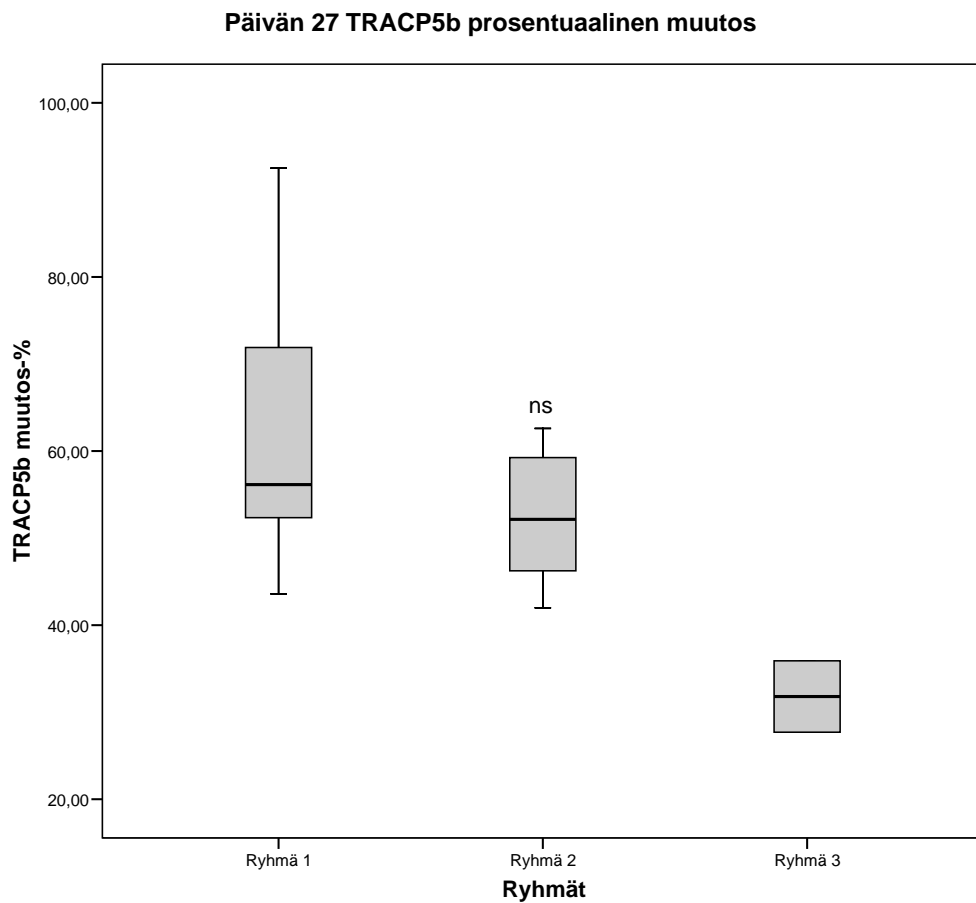
Kuvio 9. Ryhmien tutkimuspäivän 13 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 20 TRACP5b-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin varianssin homogeenisyyden testaus. Varianssi todettiin homogeeniseksi, jonka jälkeen tehtiin One Way ANOVA-testi. Siitä saatiin p:n arvoksi 0,006, joka tarkoittaa, että ryhmien välillä on tilastollisesti merkitsevää muutosta (**). Parierot testattiin Dunnnett testillä, jossa ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi saatiin 0,022, joka tarkoittaa, että ryhmien välillä on tilastollisesti melkein merkitsevä muutos (*). Ryhmien 1 ja 3 väliseksi p:n arvoksi saatiin 0,007, joka tarkoittaa, että tulosten välillä on tilastollisesti merkittävä muutos (**). Kuviossa 10 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 20 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



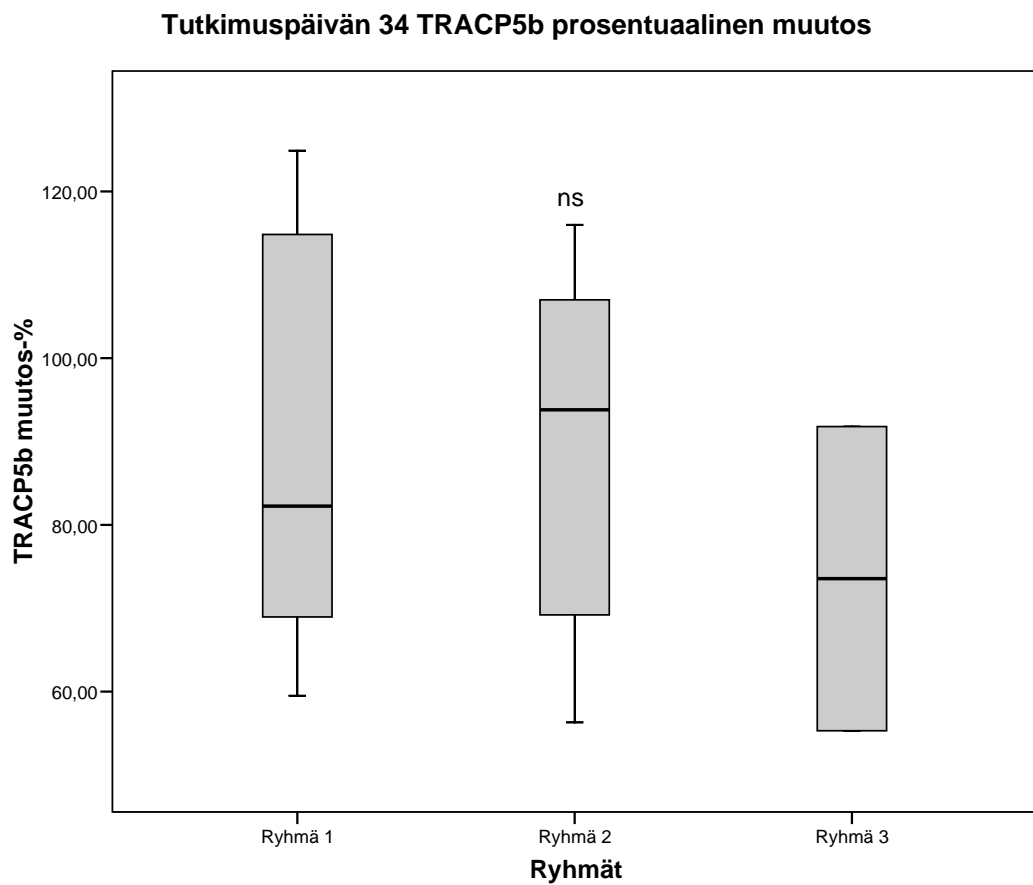
Kuvio 10. Ryhmien tutkimuspäivän 20 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 27 TRACP5b-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,148, joka tarkoittaa, ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkittävää eroa (ns). Kuviossa 11 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 27 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



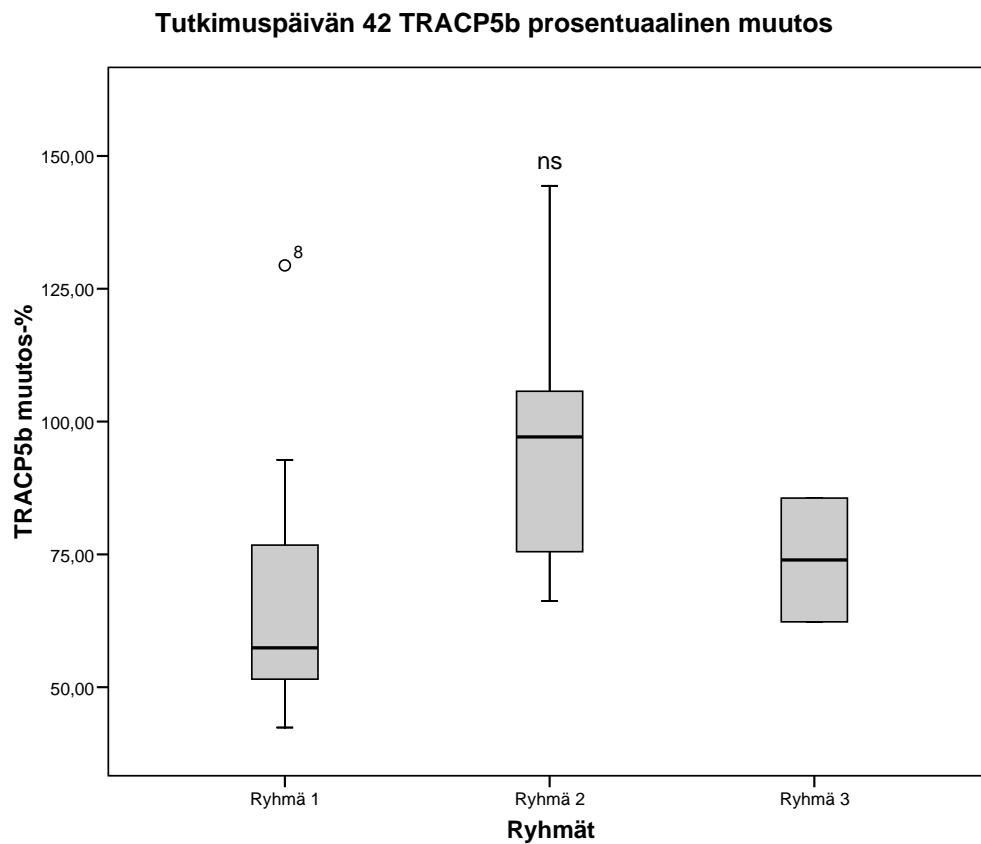
Kuvio 11. Ryhmien tutkimuspäivän 27 TRACP5- tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 34 TRACP5b-tuloksille tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,535, joka tarkoittaa, ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkittävää eroa (ns). Kuviossa 12 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 34 TRACP5b- pitoisuudet.



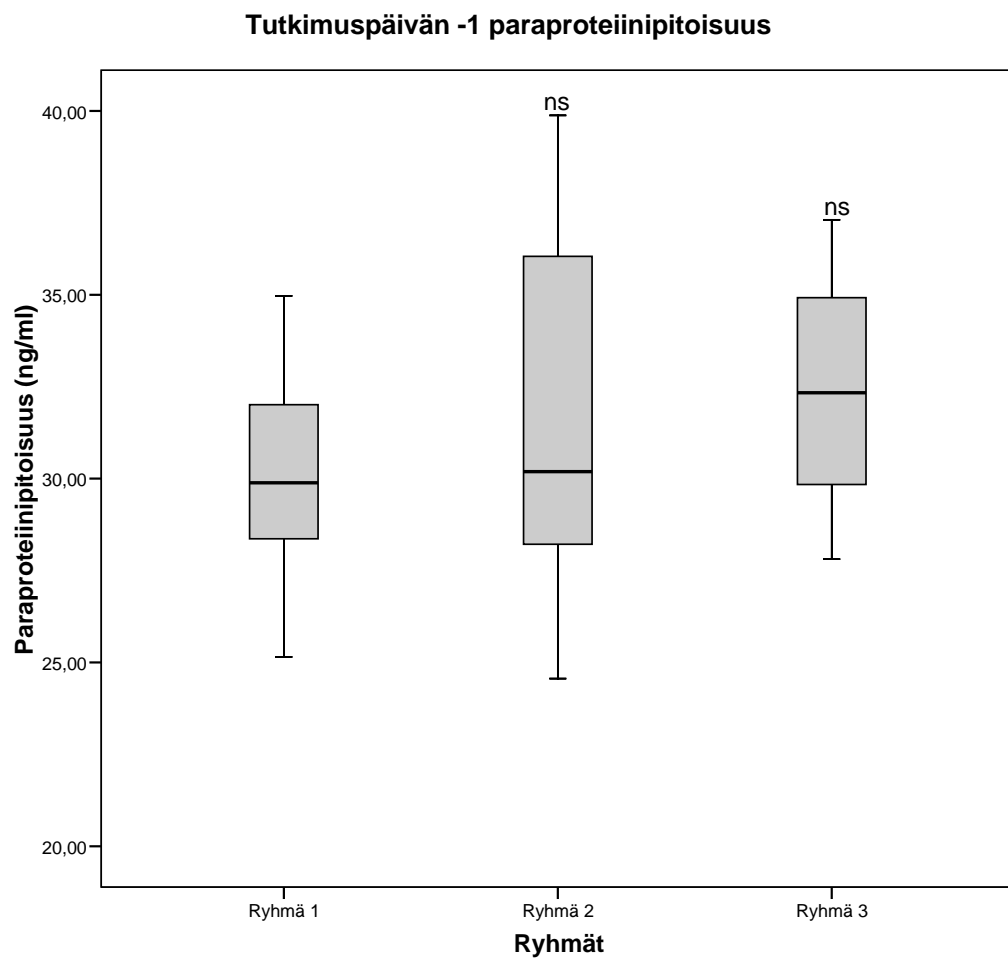
Kuvio 12. Ryhmien tutkimuspäivän 34 TRACP5b- pitoisuudet.

Tutkimuspäivän 42 TRACP5b-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Tämän jälkeen tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,057, joka tarkoittaa, ettei ryhmien välillä ole tilastollisesti merkitsevää eroa (ns). Kuviossa 13 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 42 TRACP5b-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



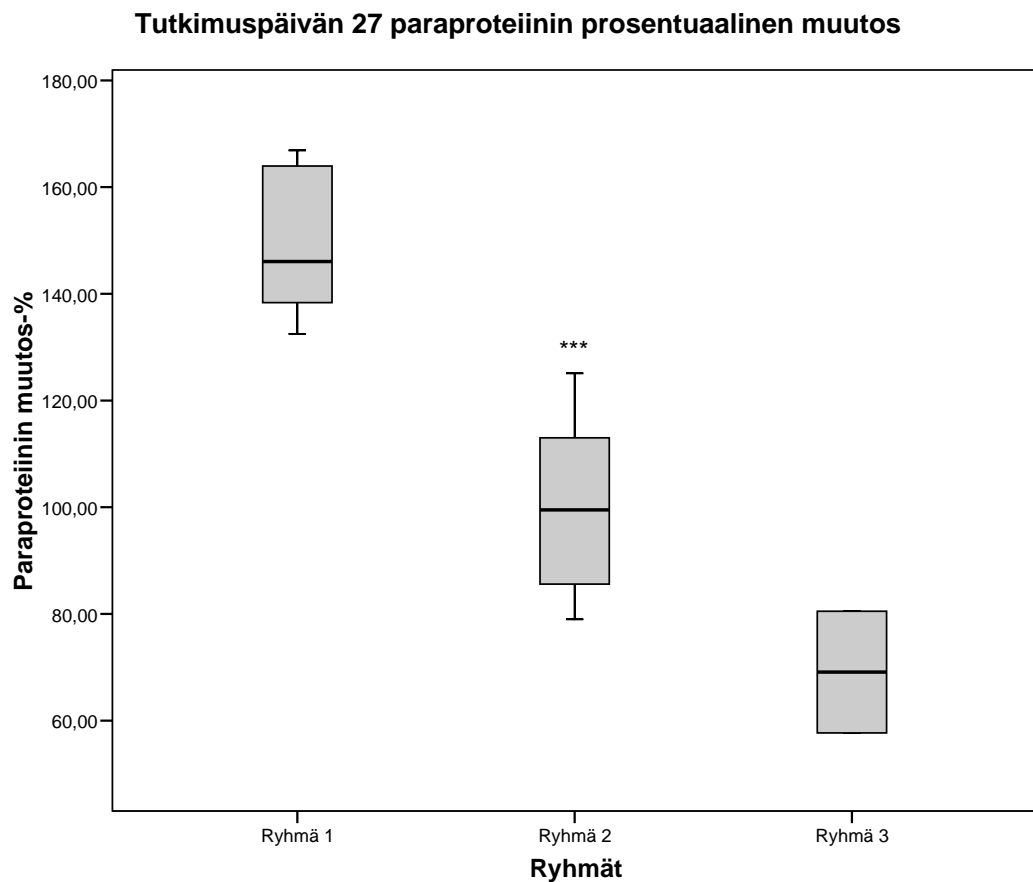
Kuvio 13. Ryhmien tutkimuspäivän 42 TRACP5b tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän -1 IgG_{2b} eli paraproteiinituloksille tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma oli normaali. Seuraavaksi testattiin varianssin homogeneisyys, joka havaittiin homogeeniseksi. Tämän jälkeen tehtiin One Way ANOVA testi, jossa saatiin p:n arvoksi 0,614, joka tarkoittaa, ettei tulosten välillä ole tilastollisesti merkitsevää eroa (ns). Kuviossa 14 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän -1 IgG_{2b} -pitoisuudet.



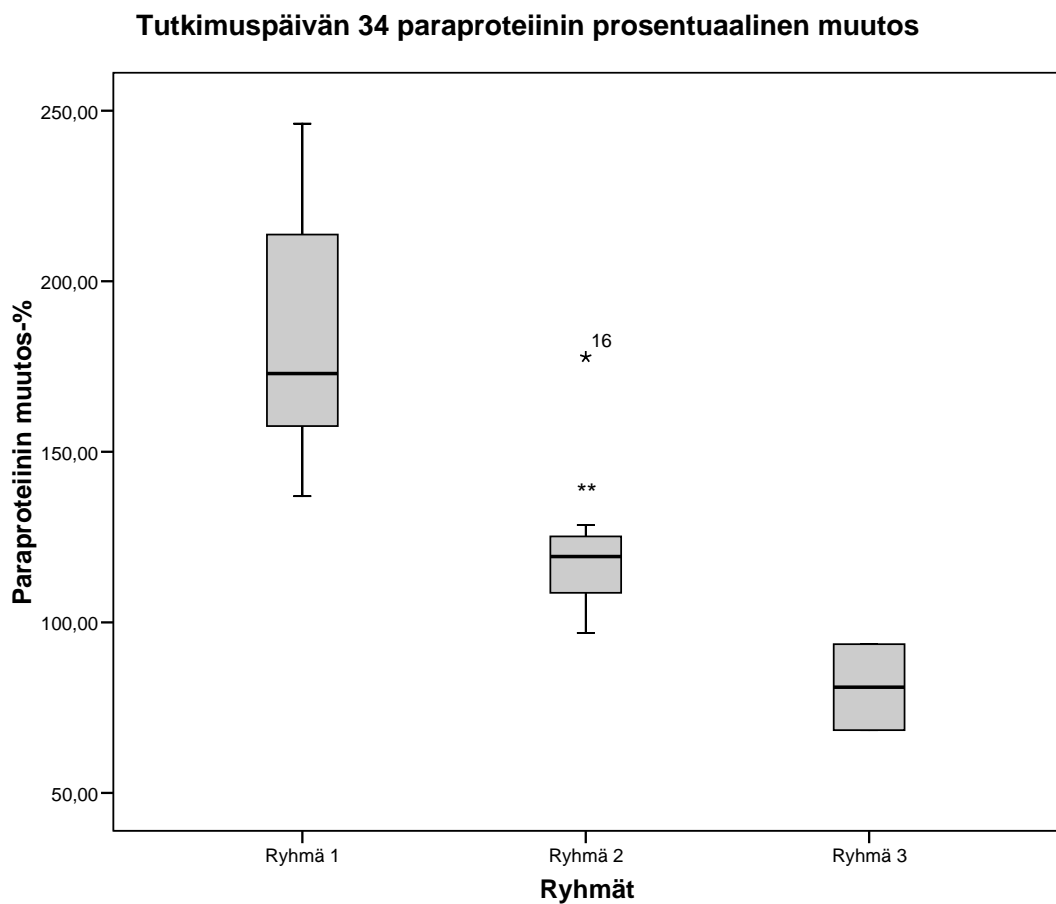
Kuvio 14. Ryhmien tutkimuspäivän -1 IgG_{2b} -pitoisuudet.

Tutkimuspäivän 27 IgG_{2b}-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma on normaali. Seuraavaksi tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,000, joka tarkoittaa, että ryhmien välillä on tilastollisesti erittäin merkitsevä muutos (***). Kuviossa 15 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 27 IgG_{2b}-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



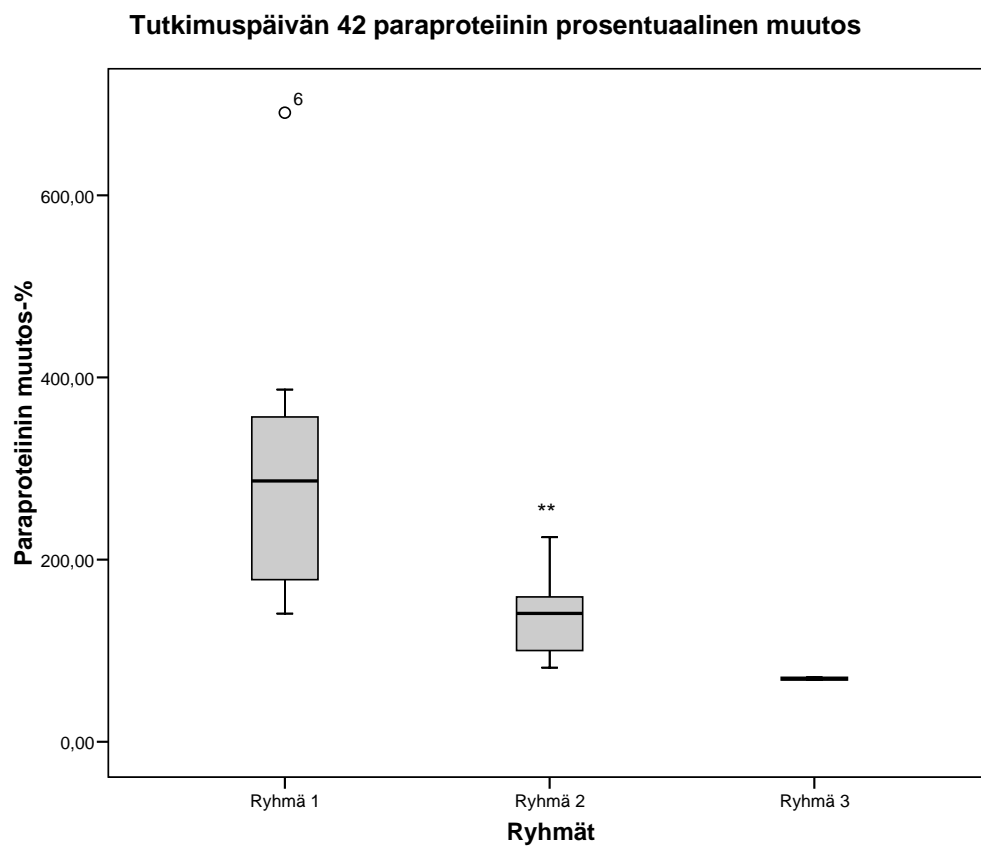
Kuvio 15. Ryhmien tutkimuspäivän 27 IgG_{2b}-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 34 IgG_{2b}-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, että jakauma on normaali. Seuraavaksi tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,002, joka tarkoittaa, että ryhmien välillä on tilastollisesti merkitsevä muutos (**). Kuviossa 16 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 34 IgG_{2b}-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.



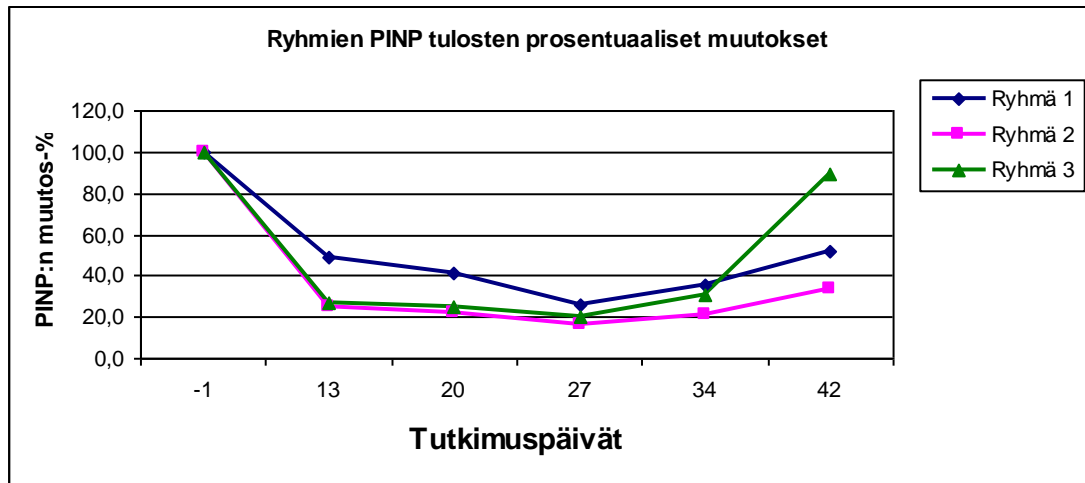
Kuvio 16. Ryhmien tutkimuspäivän 34 IgG_{2b}-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

Tutkimuspäivän 42 IgG_{2b}-tulosten prosentuaaliselle muutokselle tehtiin ensin normaalijakauman testaus, jossa havaittiin, ettei jakauma ole normaali. Tämän jälkeen tehtiin logaritmimuunnos, jonka jälkeen jakauma muuttui normaaliksi. Tämän jälkeen tehtiin Independent-Samples T-testi. Siitä saatiin ryhmien 1 ja 2 väliseksi p:n arvoksi 0,005, joka tarkoittaa, että ryhmien välillä on tilastollisesti merkitsevä muutos (**). Kuviossa 17 on esitetty ryhmien tutkimuspäivän 42 IgG_{2b}-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

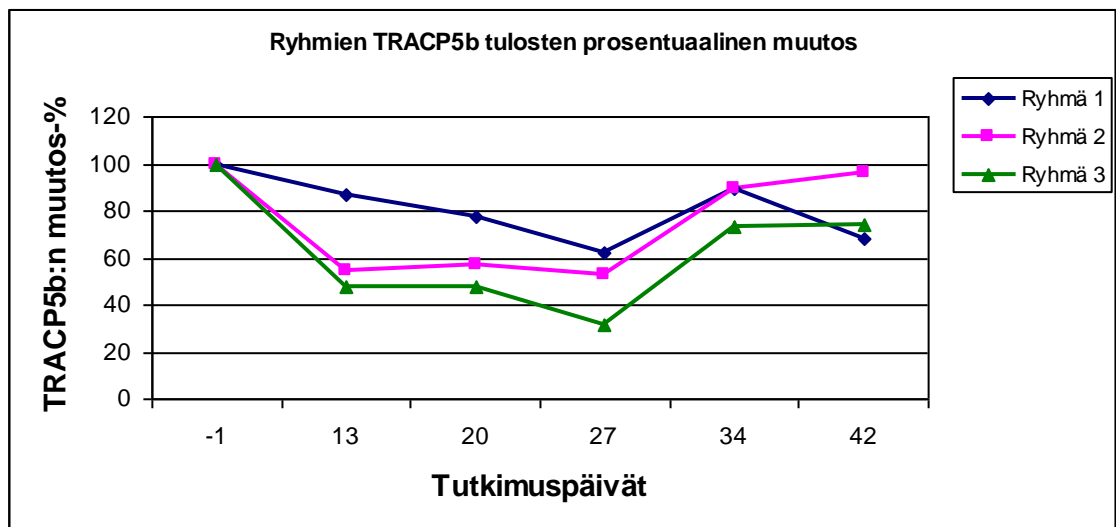


Kuvio 17. Ryhmien tutkimuspäivän 42 IgG_{2b}-tulosten prosentuaalinen muutos tutkimuspäivästä -1.

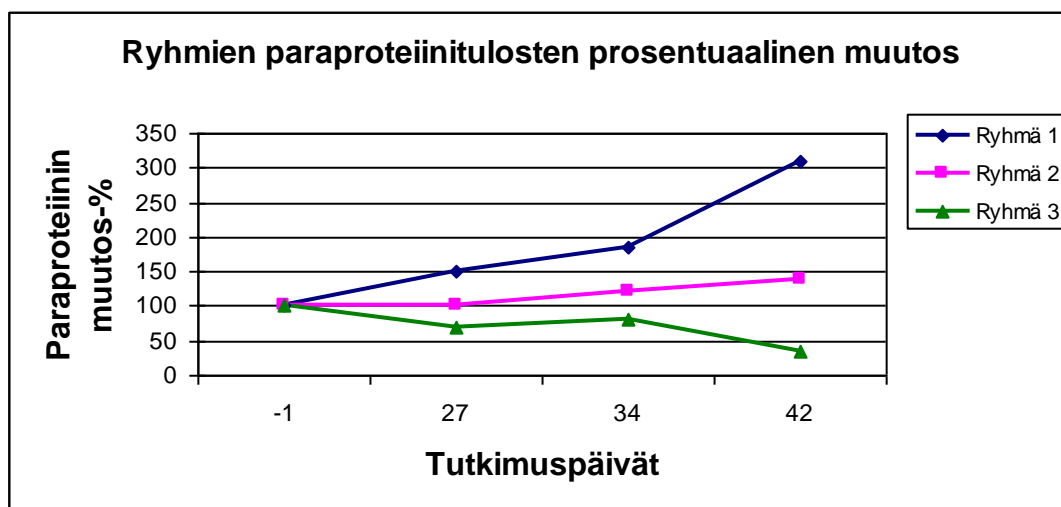
Lopuksi on havainnollistettu, miten P1NP- (Kuvio 18), TRACP5b- (Kuvio 19) ja paraproteiinitulosten (Kuvio 20) prosentuaaliset muutokset ovat kehittyneet tutkimuksen aikana.



Kuvio 18. P1NP-tulosten prosentuaalisten muutosten kehitys tutkimuksen aikana.



Kuvio 19. TRACP5b-tulosten prosentuaalisten muutosten kehitys tutkimuksen aikana.



Kuvio 20. Paraproteiinitulosten prosentuaalisten muutosten kehitys tutkimuksen aikana.

5.3 Tutkimustuloksien tarkastelu

Tutkimuksen kannalta keskeisessä asemassa ovat paraproteiini- eli IgG_{2b}-tulokset. Niiden tulosten kautta tulkitaan, kuinka multippeli myelooma ilmeni ja eteni hiirissä. Samalla paraproteiinipitoisuuksien kautta tulkitaan myös P1NP- ja TRACP5b-tuloksia, koska tauti saattoi vaikuttaa myös näihin parametreihin.

Tutkimuspäivänä -1 ryhmien paraproteiinipitoisuuksien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää muutosta, mikä tarkoittaa, että ryhmät olivat lähtökohdiltaan samanlaiset ja vertailukelpoisia keskenään. Heti tutkimuspäivän 27 kohdalla ryhmien 1 ja 2 välille syntyi tilastollisesti merkitsevä ero. Ero säilyi koko tutkimuksen ajan. Kuviosta 20 havaitaan, että paraproteiinipitoisuuksien kehitys oli sellaista kuin ennen tutkimuksen alkua oletettiin. Tuloksista nähdään, että ryhmän 1, eli kontrolliryhmän, paraproteiinipitoisuudet ovat koko tutkimuksen ajan kaikkein korkeimmat. Ero kontrolliryhmän ja hoidollisten ryhmien välillä kasvoi jatkuvasti tutkimuksen loppua kohden. Tämä tarkoittaa, että ryhmän 1 hiirissä tauti kehittyi ja eteni kaikkein voimakkaimmin. Tuloksista havaitaan lisäksi, että ryhmän 2, eli bortezomib:a 0,5 mg/kg saaneen ryhmän, paraproteiinipitoisuudet ovat huomattavasti pienemmät kuin ryhmän 1 ja niiden välillä on tilastollisesti merkitsevä muutos. Tämän pohjalta

voidaan päätellä, että ryhmän 2 hiirissä taudin ilmeneminen ja eteneminen eivät olleet niin voimakkaita kuin ryhmän 1 hiirillä. Lisäksi kuviosta 20 havaitaan, että ryhmän 3, eli bortezomib:ia 1 mg/kg saaneen ryhmän, paraproteiinipitoisuudet ovat kaikkein matalimmat. Niiden paraproteiinitasot olivat tutkimuksen lopussa matalammat kuin tutkimuksen alussa. Tästä ryhmästä ei voida kuitenkaan tehdä luotettavia tulkintoja sen pienen koon vuoksi, vaan päätelmät ovat vain suuntaa antavia. Tuloksista nähdään, että ryhmän 1 hiiret, jotka eivät saaneet hoitavaa lääkettä, olivat kaikkein sairaimpia. Hoidollisissa ryhmissä nähdään annosvasteinen hoitotulos, jota ei kuitenkaan voi pitää luotettavana tuloksena. Luotettavasti voidaan päätellä, että bortezomib tehoaa multippleliin myeloomaan. Suuntaa antavasti voidaan todeta, että suuremmalla bortezomib annoksella olisi parempi annosvaste.

Tutkimuspäivän -1 ryhmien P1NP-pitoisuuksien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää muutosta, mikä tarkoittaa, että ryhmät olivat lähtökohdiltaan samanlaiset ja vertailukelpoisia keskenään. Tutkimuspäivien 13, 20 ja 27 tilastollisen testauksen tuloksista havaitaan, ettei ryhmien välillä tapahdu tilastollisesti merkitseviä muutoksia. Kuviosta 18 kuitenkin nähdään, että hiirten P1NP-pitoisuudet laskevat aina tutkimuspäivään 27 asti. Lasku on kaikilla ryhmillä niin tasaista, ettei tilastollisesti merkitseviä muutoksia synny. P1NP-pitoisuuksien lasku ei ollut yllättävää, sillä kokeessa käytetyt hiiret olivat nuoria ja kasvavassa iässä olevia. Hiirten kasvu alkoi kuitenkin kokeen aikana vähitellen hidastua, jolloin on täysin luonnollista, että myös luun muodostus hidastuu.

Vasta tutkimuspäivän 34 kohdalla, jolloin P1NP pitoisuudet olivat kääntyneet nousuun, nähdään ryhmien 1 ja 2 välillä tilastollisesti merkitsevä muutos. Ryhmien 1 ja 2 väliset erot kasvavat tutkimuspäivään 42 tultaessa. P1NP-pitoisuuksien kääntyminen nousuun tutkimuspäivänä 27 oli hieman yllättävää, sillä taudin kehityksen kannalta olisi ollut luultavampaa, että P1NP-pitoisuudet olisivat laskeneet entisestään. Multipplelissa myeloomassa luun hajotus kiihtyy, eikä luun muodostus pysy vauhdissa mukana, jolloin on seurauksena osteoporoosi. Sen vuoksi olisi loogista olettaa, että luunmuodostuksen biokemiallisten merkkiaineiden, mukaan lukien P1NP, pitoisuudet kääntyisivät laskuun. Erityisesti kuviossa 18 havaittava ryhmän 3 P1NP-

pitoisuus, joka nousee jopa huomattavasti korkeammalle kuin kontrolliryhmän P1NP-tasot, on odottamaton. Tosin ryhmän tuloksista ei voi tulkita mitään, koska korkeat tulokset voivat johtua jostakin satunnaisvirheestä, kuten pipetointivirheestä.

Voi olla, että taudin alkuvaiheessa luun mikroympäristö ei ole muuttunut vielä niin paljon, että luun muodostuksesta vastaavat aineet ja solut olisivat jääneet vielä alakynteen. Tällöin ne yrittävät vielä vastata kiihtyneen luun hajotuksen aiheuttamaan luukatoon. Mahdollisesti luun muodostuksesta kertovat biokemiallisten merkkiaineiden pitoisuudet alkavat laskea vasta sitten, kun luun hajotus on saanut yliotteen luun muodostuksesta. Toinen vaihtoehto on, että kyse on vain P1NP-pitoisuuden luonnollisesta vaihtelusta.

Tutkimuspäivän -1 ryhmien TRACP5b-pitoisuuksien välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää muutosta, mikä tarkoittaa, että ryhmät olivat lähtökohdiltaan samanlaiset ja vertailukelpoisia keskenään. Tuloksista havaitaan, että ryhmien välillä on tutkimuspäivinä 13 ja 20 tilastollisesti merkitsevät erot. Tutkimuspäivästä 27 eteenpäin ryhmien väliset TRACP5b-pitoisuuksien erot tasoittuvat, eikä niiden välillä enää ole tilastollisesti merkitsevää muutosta. Lisäksi kuviosta 19 havaitaan, että TRACP5b-pitoisuudet laskevat tutkimuspäivästä -1 aina tutkimuspäivään 27 asti. TRACP5b-pitoisuudet kääntyivät kaikilla ryhmillä nousuun tutkimuspäivään 34 mennessä. Tämä oli odotettavissa, koska multipple myelooma lisää luun hajotusta, jolloin on luonnollista, että myös luun hajotuksesta kertovien biokemiallisten merkkiaineiden, mukaan lukien TRACP5b, pitoisuudet nousevat.

Odottamatonta sen sijaan oli, että ryhmän 2 ja 3 TRACP5b-pitoisuudet nousivat kontrolliryhmän pitoisuuksia korkeammiksi tutkimuspäivänä 42. Yllättävää oli myös, että kontrolliryhmän TRACP5b-pitoisuudet olivat laskeneet tutkimuspäivänä 42, vaikka olisi ollut loogista olettaa, että arvot olisivat olleet korkeampia kuin tutkimuspäivänä 34. Odottamattomiin tuloksiin voi yhtenä syynä olla analysointivirhe. Näytteiden analysoinnit on tehty eri päivinä ja eri henkilöiden toimesta. Virheen olisi pitänyt tapahtua, joko jompanakumpana tai molempina päivinä ja sen olisi pitänyt olla systemaattinen, jotta tulokset selittyisivät virheellä. Molemmilla analysointikerroilla

tapahtunut virhe on äärimmäisen epätodennäköinen, eikä systemaattinen virhe muutenkaan tunnu todennäköiseltä. Yksittäisiä pipetointivirheitä voi joukossa olla, mutta se ei todennäköisesti vaikuttaisi lopullisiin tuloksiin niin paljon, että odottamattomat tulokset selittyisivät sillä. Eri henkilöiden pipetointikäsitäsmillä voidaan tuloksia selittää osittain, muttei kokonaan.

On myös mahdollista, että tulos johtuu bortezomib:sta. Bortezomib-ryhmien eläimillä oli mahdollisesti enemmän luuta jäljellä, ja siitä johtuen niiden TRACP-tasot nousivat voimakkaammin tutkimuksen lopussa kuin kontrolliryhmän. Tällöin osteoklasteilla oli enemmän pinta-alaa, johon asettua, jolloin ne pystyivät hajottamaan enemmän luuta. Tästä olisi seurauksena se, että niiden TRACP5b tasot olivat korkeampia kuin kontrolliryhmän.

Yhteenvedona kaikista saaduista tuloksista voidaan päätellä, että malli toimii niin kuin aikaisemmissa tutkimuksissa on kuvattu. Hiirille kehittyi multippeli myelooma, joka vaikutti kaikkein voimakkaimmin kontrolliryhmään, joka ei saanut lääkehoitoa. Bortezomib-lääkettä saaneet hoidolliset ryhmät selvisivät pienemmällä syöpäkuormalla jopa olemattomalla. Voidaan siis todeta, että se on tehokas lääke taudin hoitoon. Tutkimustulosten perusteella ei voida luotettavasti sanoa, kumpi bortezomib-annos antoi paremman annosvasteen, koska ryhmästä 3 ei voida tehdä luotettavia päätelmiä. Suuntaa antavasti voidaan todeta, että 1 mg/kg bortezomib-annos olisi tehokkaampi kuin 0,5 mg/kg annos taudin kulun hidastamiseen. Tutkimuksessa havaittiin myös, että 2 mg/kg annos oli liian toksinen, eikä tätä annostusta ole syytä käyttää.

6 POHDINTA

6.1 Tutkimustulosten pohdinta

Tutkimuksessa saatiin vastauksia tutkimusongelmiin, muttei aivan siinä mittakaavassa kuin oli suunniteltu. Tutkimuksen tuloksista ei kaikilta osin voi tehdä yleistettäviä johtopäätöksiä, koska kaikilla saaduilla tuloksilla ei ole tilastollista arvoa. Ryhmän 3 tuloksista ei voi tehdä luotettavia päätelmiä, koska ryhmä supistui heti tutkimuksen alussa neljän eläimen suuruisiksi ja tutkimuspäivän 20 jälkeen ryhmässä oli ainoastaan kaksi eläintä, joista ei voi tehdä lainkaan tilastollisesti päteviä päätelmiä. Tässä suhteessa tutkimuksen tulokset jäivät vajavaisiksi, eivätkä vastanneet tutkimusongelmiin niin laajasti kuin alun perin toivottiin. Sen sijaan saatiin hieman yllättäen tietoa bortezomib:n toksisista vaikutuksista, kun 2 mg/kg annos osoittautui liian suureksi hiirille.

Koe ei edennyt niin kuin aikaisemmissa tutkimuksissa oli kuvattu, vaan venyi oletettua pidemmäksi. Esimerkiksi tutkijoiden Wang et al. (2006, 2434) kokeessa hiiret lopetettiin kolmen viikon kuluttua inokuloinneista. Yleensä kokeet oli saatu loppuun 3-5 viikon kuluttua inokuloinneista (Pharmatest Service Ltd 2009, 6), mutta tämä koe piteni arvioidusta neljästä viikosta kuuteen viikkoon. Kokeen pitenemiseen kahdella viikolla vaikutti todennäköisesti hiiriin tutkimuspäivänä 0 inokuloitujen syöpäsolujen huono viabiliteetti. Huono viabiliteetti havaittiin inokuloitien jälkeen, kun Pharmatest Services Oy:n työntekijä laski inokuloinnista tulleiden solujen viabiliteetin. Siinä havaittiin, että vain noin 30 % soluista oli elinkykyisiä. Inokulointiin tullessa solujen viabiliteetti oli ollut noin 90 %. Solujen viabiliteetti oli siis laskenut huomattavasti kuljetusten ja inokulointien aikana. Huono viabiliteetti saattoi johtua siitä, että samaa solususpensioerää käytettiin liian kauan. Viabiliteetti olisi voinut säilyä parempana, jos inokuloinnit olisi tehty esimerkiksi kolmesta solususpensioerästä kahden sijasta. Lisäksi solut saattoivat olla inokulointipäivänä jo

liian vanhoja. Solut oli jaettu uuteen kasvumediumiin kolme päivää ennen inokulointeja, jolloin niiden paras jakautumisnopeus oli ollut jo päivää tai kahta aikaisemmin. Kolme päivää vanhat solut olivat jo inokuloitaessa kuolemassa, jolloin ne eivät kestäneet sitä, että niistä tehtiin solususpensio kylmään PBS-liuokseen ja laitettiin jälle odottamaan inokulointeja. Myös solujen uudelleen suspensointi ennen inokulointiannoksen ottoa ruiskuun saattoi olla liian rajua, jolloin osa soluista ehkä kuoli käsittelyssä.

Tässä tutkimuksessa havaittiin, etteivät paraproteiinipitoisuuksien muutokset tapahtuneet aivan samassa aikataulussa kuin aikaisemmissa tutkimuksissa. Tutkijoiden Garrett, Dallas, Radl ja Mundy (1997, 517) multippelin myeloomamallin kehitystutkimuksessa, hiirten, joihin oli inokuloitu 100 000 syöpäsolua, paraproteiinipitoisuudet alkoivat nousta kahden viikon kuluttua inokuloinneista. Nyt tehdyssä tutkimuksessa paraproteiinipitoisuudet eivät nousseet yhtä nopeasti, vaikka soluja inokuloitiin 10-kertainen määrä Garrett et al. tutkimukseen verrattuna. Syynä eroon oli luultavasti solujen huono viabiliteetti.

Lisäksi tutkimusta tarkasteltaessa pitää huomioida se, ettei paraproteiinipitoisuuden määrittäminen ole täysin luotettava keino seurata syövän etenemistä. Tutkijat Oyajobi et al. (2007, 1701–1708) selvittivät tutkimuksessaan paraproteiinipitoisuusmääritysten heikkouksia. Menetelmällä on taipumusta antaa vääriä negatiivisia tuloksia, joten tämän tutkimuksen tuloksia ei voida aivan kriittikittömästi esittää. Voidaan kuitenkin olettaa, että määritysten tuloksia voidaan hyvillä mielin pitää suuntaa antavina, vaikka joukossa on mahdollisesti joitakin vääriä negatiivisia tuloksia. Tämä on yksi mallin heikkouksista, johon pitää kiinnittää huomiota ja pyrkiä pääsemään eroon. Tutkimuksen paraproteiinitasot olivat kuitenkin loogisia ja odotettuja tuloksia. Tämä tukee paraproteiinimittausten käyttöä ja ne tulevat olemaan jatkossa osa multippeli myeloomamallia. Tulevaisuudessa, kun mallin kehitystä jatketaan, paraproteiinimääritysten rinnalla tullaan käyttämään GFP:llä transfektoituja syöpäsoluja, joiden kasvua voidaan seurata CCD-kameralla (Charge Coupled Device). Tämä tulee lisäämään hiirimallin luotettavuutta ja pätevyyttä.

Tutkimuksen yllättäen tutkimuspäivänä 27 nousuun kääntynyt P1NP-tulos saa tukea aikaisemmista tutkimuksista. Tutkijat Edwards et al. (2008, 2833) viittaavat artikkelissaan tutkijoiden Abildgaard et al. tekemään tutkimukseen, jossa alkuvaiheessa olevassa multipelissa myeloomassa on havaittu osteoblastien määrän kasvaneen luussa. Pidemmälle edenneessä taudissa osteoblastien määrä ja aktiivisuus vähenevät. Tämän perusteella voidaan siis olettaa, että on mahdollista, että myös luun muodostuksen merkkiaineiden pitoisuudet nousisivat taudin alkuvaiheessa. Tämän tutkimus tukee myös aikaisempia tuloksia (Pika et al. 2008, 62), joiden mukaan luun muodostuksen merkkiaineita on syytä käyttää multipelin myelooman seurannassa.

Tämä tutkimus lähes saavutti sille asetetut tavoitteet. Tämä oli aloitus multipeli myeloomahiirimallin kehittämiseen. Tutkimuksen perusteella havaittiin, että on tehtävä vielä paljon työtä, ennen kuin saadaan kehitettyä valmis malli, jota voidaan tarjota asiakkaille. Tämän tutkimuksen avulla varmistuttiin siitä, että malli on käyttökelpoinen ja sen kehitystä kannattaa jatkaa. Lisäksi nyt on löydetty yksi vaihtoehto mallin verrokkilääkkeeksi, johon asiakkaan lääkeainekandidaattia voidaan verrata. Saadut tulokset osoittavat, että bortezomib on tehokas lääke multipelin myelooman hoitoon, ja sillä saadaan tilastollisesti merkittäviä eroja kontrolliryhmän ja hoidollisten ryhmien välille. Myös alustava käsitys mahdollisesta jatkossa käytettävästä annoksesta saatiin. Tutkimuksen perusteella voidaan sanoa, ettei hiirille kannata antaa 2 mg/kg pitoisuudeltaan olevaa bortezomib-annosta, koska sillä on niin suuret toksiset vaikutukset, etteivät eläimet kestä sitä. Sen sijaan 0,5 mg/kg ja 1 mg/kg pitoisuuksien välillä ei voida luotettavasti tehdä eroa, koska ryhmien välillä ei voitu tehdä tilastollista testausta. Siksi ei tiedetä, onko ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa. Alustavasti vaikuttaa kuitenkin siltä, että 1mg/kg bortezomib-annos olisi tehokkaampi.

6.2 Tutkimuksen luotettavuuden pohdinta

Tutkimuksissa pyritään aina arvioimaan sen luotettavuutta. Kaksi tärkeää käsitettä määriteltäessä tutkimuksen luotettavuutta on reliabiliteetti ja validiteetti. Reliabiliteetilla eli luotettavuudella tarkoitetaan mittauksen tai tutkimuksen kykyä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia ja sen toistettavuutta. (Vilka, 2005, 161.)

Reliaabelius voidaan määrittää usealla tavalla. Esimerkiksi jos kaksi arvioitsijaa päätyy samaan lopputulokseen, voidaan tulosta pitää luotettavana. Kvantitatiivisissa tutkimuksissa on useita erilaisia tilastollisia menettelytapoja, joilla voidaan arvioida mittareiden luotettavuutta. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2000, 213.)

Tutkimuksen validiteetti eli pätevyys tarkoittaa mittarin tai tutkimusmenetelmän kykyä mitata sitä, mitä tutkimuksessa halutaan mitata. Pätevässä tutkimuksessa ei siis saa olla systemaattisia virheitä. Tutkimuksen validius pitää ottaa huomioon jo tutkimuksen suunnitteluvaiheessa. Tutkimuksen suunnittelussa pitää huolellisesti määrittää käsitteet, perusjoukko ja muuttujat sekä suunnitella tarkasti aineiston kerääminen ja mittarin suunnittelu. (Vilka, 2005, 161.)

Tutkimuksen suurimpana heikentävänä tekijänä oli tutkijan kokemattomuus ja tottumattomuus tehdä tieteellistä tutkimusta, erityisesti eläinkokeita. Tutkija oli aikaisemmin pääasiassa vain seurannut tieteellisen tutkimuksen ja eläinkokeiden tekemistä, osallistuen vain niiden pieniin yksittäisiin osa-alueisiin. Tämä tutkimus oli tutkijan ensimmäinen, jossa hän oli kokonaisvaltaisesti mukana.

Kokemattomuus oli huomattava heikentävä tekijä erityisesti kahdessa eri osa-alueessa. Ensiksikin tutkija teki pääsääntöisesti kaikki annostelut itse lukuun ottamatta muutamaa poikkeusta. Muutamana poikkeuskertana annostelun suoritti Pharmatest Services Oy:n työntekijä, jolla on paljon kokemusta hiirien annostelusta, joten tätä ei voida pitää heikentävänä tekijänä, vaikka annostelija vaihtui. Tutkijalla oli hyvin vähän aikaisempaa kokemusta intraperitonealisesta annostelusta ja subkutaanisesta annostelusta hänellä ei ollut lainkaan aikaisempaa kokemusta. Tämä on saattanut vaikuttaa tutkimustuloksiin erityisesti tutkimuksen alkuvaiheessa. Tutkimuksen loppua kohden tutkijan annostelutaidot kehittyivät ja tästä johtuva virhelähde pieneni. Tutkijalla oli aina tutkimuksen alkuvaiheessa annosteluissa mukana kokenut ohjaaja, joka seurasi tutkijan työskentelyä. Ohjaaja varmisti, ettei systemaattista virhettä päässyt syntymään, joka oli tutkimuksen pätevyyttä ja luotettavuutta lisäävä tekijä. Vasta, kun tutkija hallitsi annostelun, hän teki annosteluja itsenäisesti.

Toinen merkittävä tutkimuksen luotettavuutta heikentävä tekijä oli tutkijan kokemattomuus luun biokemiallisten merkkiaineiden ja paraproteiinimääritysten tekemisessä. Tutkija ei ollut koskaan aikaisemmin tehnyt tämän kaltaisia immunokemiallisia määryksiä. Määryksissä haastavinta oli pienten näytemäärien pipetointi. Tutkijalla oli aikaisempaa kokemusta erilaisista pipetointitekniikoista ja pienten tilavuuksien pipetoinnista, mutta varsinaisesta sarjapipetoinnista tutkijalla ei ollut kovin paljon kokemusta. Lisäksi määryksiä varten oli tärkeää saada näytteet pipetoitua näytekaivoihin nopeasti, mikä lisäsi virhemahdollisuuksien määrää. Tutkijan työskentelyä seurasi ohjaaja, joka on tutkimuksen luotettavuutta lisäävä tekijä, mutta tämä ei estänyt esimerkiksi pipetointivirheitä. Ohjaajan valvonta esti kuitenkin systemaattisten virheiden muodostumisen, joka lisää tutkimuksen pätevyyttä. Pipetointivirheitä tapahtui todennäköisesti mittauksia tehdessä. Erityisen todennäköistä se on tutkimuspäivän -1 P1NP-määryksen yhteydessä. Siinä oli mukana muutamia näytteitä, joista tuli poikkeuksellisen korkeita tuloksia, jotka luultavasti eivät ole todellisia. Mittaus oli ensimmäinen, jonka tutkija teki, ja tulosten kummallisuus johtui todennäköisesti pipetointivirheestä. Mittausta ei voitu kuitenkaan uusida, koska näytteitä ei ollut enää jäljellä. Näytteiden riittävyys onkin ongelmallista kun tehdään monta eri määrystä pienestä näytemäärästä. Tämä heikentää tutkimuksen luotettavuutta ja toistettavuutta.

Toinen määryksien luotettavuutta heikentävä seikka on se, ettei kaikkia määryksiä tehnyt sama henkilö. Osan P1NP- ja TRACP5b-määryksistä teki Pharmatest Services Oy:n työntekijä. Tällöin tuloksiin vaikutti eri ihmisten pipetoinnin käsialaerot, jotka hankaloittivat tulosten tulkintaa. Toisaalta työntekijä, joka teki osan määryksistä, on kokenut immunokemiallisten mittausten tekijä, joten voidaan olettaa, että hänen tekemät mittaukset ovat luotettavampia kuin tutkijan tekemät. Paraproteiinimittausten suorittamisessa pipetointikäsialasta johtuvat erot haluttiin eliminoida, koska ne olivat tutkimuksen kannalta hyvin keskeisiä määryksiä. Pipetointikäsialasta johtuvat erot tuloksissa estettiin sillä, että tutkija teki itse kaikki määrykset, mikä lisäsi tulosten luotettavuutta ja pätevyyttä.

Lisäksi tutkimuksen luotettavuutta ja pätevyyttä heikensi, että ryhmä 3 supistui lopulta vain kahden eläimen suuruisiksi. Sen tilastollista pätevyyttä heikensi heti alussa neljän eläimen kuolema. Jäljelle jääneiden eläinten avulla pystyttiin kuitenkin tekemään vielä suuntaa antavia johtopäätöksiä. Kun ryhmä 3 supistui vain kahteen eläimeen, ei niiden tuloksilla ollut enää tilastollista merkitystä. Tällöin liian monet satunnaismuutoksia aiheuttavat tekijät pääsevät vaikuttamaan tuloksiin. Tämä oli hyvin harmillista, koska nyt tulosten perusteella ei voi tehdä lainkaan yleistettäviä pohdintoja.

6.3 Jatkotutkimusaiheet

Yhtenä jatkotutkimusaiheena on kokeen suorittaminen sellaisenaan uudestaan. Koska tässä tutkimuksessa hiiriin inokuloitujen solujen viabiliteetti oli huono, pitäisi koe tehdä uudelleen soluilla, joiden viabiliteetti olisi hyvä. Tämän kokeen venyminen kaksi viikkoa suunniteltua pitemmäksi johtui luultavasti solujen kehnosta viabiliteetista. Uudella tutkimuksella selvitettäisiin sitä, onko solujen viabiliteetilla vaikutusta kokeen kestoon ja kuinka paljon sillä on vaikutusta.

Koska tässä kokeessa havaittiin, että 2 mg/ml bortezomib-annos on liian voimakas hiirille, voitaisiin mallilla tehdä bortezomib:n annosvastekoe. Kokeessa selvitettäisiin, kuinka suurta bortezomib-annosta hiiret sietävät ja mikä olisi optimaalisin annos. Annosvastekokeessa pitäisi käyttää vähintään kolmea eri annosta.

Hiirimallia tullaan kehittämään eteenpäin ja tulevaisuudessa tullaan tekemään koe, jossa käytetään GFP:lla (green fluorescent protein) transfektoituja myeloomasoluja. Kokeessa käytettäisiin useampaa 5TGM1-GFP-kloonia, joista olisi tarkoitus löytää sellainen, joka aiheuttaa hiirissä multippelin myelooman ja fluoresoi vihreää valoa. Kasvainten aiheuttama fluoresenssi saataisiin näkyviin käyttämällä CCD-kameraa (Charge Coupled Device). Tällaisen hiirimallin kehittäminen olisi järkevää, koska aikaisempien tutkimusten perusteella tiedetään, ettei paraproteiinipitoisuuden määrittäminen ole yksinään kaikissa tapauksissa luotettava keino seurata syövän kehitystä (Oyajobi et al. 2007, 1701–1708).

LÄHTEET

Kirjalliset lähteet

Aaltola, E & Oksanen, M. 2002 Eläinten käyttö tutkimuksessa. Teoksesta Karjalainen, S; Launis, V; Pelkonen, R & Pietarinen, J. (toim.). Tutkijan eettiset valinnat. Helsinki: Gaudeamus Kirja.

Alatalo, S; Ivaska, K; Wasguesback, S; Econs, M; Väänänen, H. & Halleen, J. 2004. Osteoclast-Derived Serum Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b in Albers-Schöberg Disease (Type II Autosomal Dominant Osteopetrosis). *Clinical Chemistry* 50:5, 883.

Allen, M.J. 2003. Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. *Veterinary Clinical Pathology*. Vol 32. No. 3, 108-111.

Bjorn, R. 2006, Bone embryology. Teoksesta The American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 6th Edition. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research.

Camacho, P & Kleerekoper, M. 2006 Biochemical Markers of Bone Turnover. Teoksesta The American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 6th Edition. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research.

Clarkeburn, H & Mustajoki, A. 2007. Tutkijan arkipäivän etiikka. Tampere: Vastapaino.

Cremers, S; Ganero, P & Seibel, M.J. 2008. Biochemical Markers of Bone Metabolism. Teoksesta Bilezikain, J.P; Raisz, L.G. & Martin T.J. (toim.). Principles of Bone Biology. 3rd Edition. San Diego: Elsevier.

Dempster, D.W. 2006. Anatomy and functions of the adult skeleton. Teoksesta The American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 6th Edition. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research.

Edwards, C; Edwards, J; Lwin, S; Esparza, J; Oyajobi, B; McCluskey, B; Munoz, S; Grubbs, B. & Mundy G. 2008. Increasing Wnt signaling in the bone marrow disease and reduces tumor burden in bone in vivo. Blood. (Mach), Vol 11, 2833.

Garrett, I.R.; Dallas, S; Radl, J & Mundy, G.R. 1997. A Murine Model of Human Myeloma Bone Disease. Elsevier Science Inc. (June), 515-520.

Garrett, I.R.; Dallas, S; Radl, J & Mundy, G.R. 1997. A Murine Model of Human Myeloma Bone Disease. Elsevier Science Inc. (June), 515-520.

Hammett-Stabler, C. 2004. Osteoporosis from pathophysiology to treatment. Washington: AACCPress.

Harousseau, JL; Attal, M; Leleu, X; Troncy, J; Pegourie, B; Stoppa, AM; Hulin, H; Benboubker, L; Fuzibet, JG; Renaud, M; Moreau, P; Avet-Loiseau, H. 2006 Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. Haematologica 2006; 91:1498-1505

Hirsjärvi, S; Remes, P. & Sajavaara, P. 2002. Tutki ja kirjoita. 6.-8. painos. Helsinki: Tammi.

Jaakkola U-M. 1996. Hiiri koe-eläimenä. Teoksesta Nevalainen, T; Jaakkola, U; Kohila, T & Pudas, J. (toim.). Rottia tutkijoita tuloksia. Helsinki: FinLAS ry.

Jagannath, S. 2008. Pathophysiological Underpinning of Multiple Myeloma Progression. Journal of Managed Care Pharmacy. Vol 14, no.7, 7-11.

Kyle, R. A & Rajkumar, V. 2004. Multiple Myeloma. *The New England Journal of Medicine* 351, 1860–1873.

Libouban, H; Moreau, M. F; Baslé, M. F; Bataille, R & Charppard, D. 2004. Selection of a highly aggressive myeloma cell line by an altered bone microenvironment in the C57BL/KaLwRij mouse. *Elsevier Inc. (January)*, 859–866.

Mäkinen, O. 2005. *Tutkimuseetiikan ABC*. Helsinki: Gummerus.

Nienstedt, W; Hänninen, O; Arstila A & Björkqvist S-E. 2004. *Ihmisen fysiologia ja anatomia*. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Nevalainen, T. 1996. *Johdatus koe-eläin toimintaan*. Teoksesta Nevalainen, T; Jaakkola, U; Kohila, T & Pudas, J. (toim.). *Rottia tutkijoita tuloksia*. Helsinki: FinLAS ry.

Oyajobi, B; Munoz, S; Kakonen, R; Williams, P; Gupta, A; Wideman, C; Story, B; Grubbs, B; Armstrong, A; Dougall, W; Garrett, R & Mundy G. 2007. Detection on myeloma in skeleton of mice by whole-body optical fluorescence imaging. *Molecular Cancer Therapeutics (June)*, 1701-1708.

Pika, T; Minarik, J; Schneiderka, P; Budikova, M; Langova, K; Lochman, P; v Bacovsky, J; Farbiakova, V; Scudla, V. 2008. The correlation of serum immunoglobulin free light chain levels and selected biological markers in multiple myeloma. *Biomedical Paper*. 152(1):61–64.

Radl, J; Croese, J. W; Zurcher, C; Van den Enden-Vieveen, M. H. & Leeuw, A. M. 1988. Animal model of human disease. Multiple myeloma. *American Journal of Pathology*. No.3 September. 593–597.

Remes, K. & Rajamäki, A. 2000. *Multippleli myelooma*. Teoksesta Ruutu, T; Rajamäki, A & Krusius, T (toim.). *Veritaudit*. 2. painos. Helsinki: Duodecim.

Remes, K. 2006. Multippeli myelooma. Teoksesta Joensuu, H; Roberts, P. J; Teppo, L & Tenhunen, M. (toim.). Syöpätaudit. 3. painos. Helsinki: Duodecim.

Remes, K. 2007. Multippeli myelooma ja muut gammapatiat. Teoksesta Ruutu, T; Rajamäki, A; Lassila, R & Porkka, K. (toim.). Veritaudit. 3.painos. Helsinki: Duodecim.

Rissanen, J; Suominen, M; Peng, Z & Halleen, J. 2008. Secreted Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b is a Marker of Osteoclast Number in Human Osteoclast Cultures and the Rat Ovariectomy Model. *Calcif tissue Int.* (2008) 82, 108-115.

Rodney, P. & Bosky, A. 2006, Extracellular Matrix and Bio mineralization of Bone. Teoksesta The American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 6th Edition. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research.

Ross, F.P. 2006. Osteoclast Biology and Bone Resorption. Teoksesta The American Society for Bone and Mineral Research. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 6th Edition. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research.

Salmi, R. 2005. Onko eläinkokeille vaihtoehtoja? Teoksesta Hirsjärvi, P; Mäkinieni, J; Saunanoja, S. & Siitonen, A. (toim.). Koe-eläinetiikkaa. Helsinki: Yliopistopaino.

Siitonen, A. 2005. Eläinkokeet eettisenä kysymyksenä. Teoksesta Hirsjärvi, P; Mäkinieni, J; Saunanoja, S. & Siitonen, A. (toim.). Koe-eläinetiikkaa. Helsinki: Yliopistopaino.

Skutnabb, P. 1996. Koe-eläintoimintaa koskeva lainsäädäntö Suomessa. Teoksesta Nevalainen, T; Jaakkola, U; Kohila, T & Pudas, J. (toim.). Rottia tutkijoita tuloksia. Helsinki: FinLAS ry.

Tuomisto, J. 1996. Eläinkoetoiminnan eettiset ja evaluation periaatteet ja vaihtoehdot koe-eläin käytölle. Teoksesta Nevalainen, T; Jaakkola, U; Kohila, T & Pudas, J. (toim.). Rottia tutkijoita tuloksia. Helsinki: FinLAS ry.

Välimäki, M. 2000. Luusto ja mineraaliaineenvaihdunta. Teoksesta Välimäki, M; Sane, T. & Dunkel, L. (toim.). Endokrinologia. Helsinki: Duodecim.

Wang, S; Yang, J; Qian, J; Wezeman, M; Kwak, L.W. & Yi, O. 2006. Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. Blood (107), 2432-2439.

Elektroniset lähteet

Ojajobi, B. 2007 Multiale meloma/hypercalcemia. [Viitattu 18.12.2008] Saatavissa <http://arthrititis-research.com/content/9/S1/S4>.

Finlex 20.1.2006/62 Laki koe-eläintoiminnasta. [Viitattu 22.10.08 ja 21.1.2009]

Saatavissa

<http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2006/20060062?search%5Btype%5D=pika&search%5Bpika%5D=el%C3%A4inkoe>. Lainsäädäntö → Ajantasainen lainsäädäntö → 2006 → 20.1.2006/62

Terveysportti. 2009. Lääketieteensanakirja. [Viitattu 9.4.2009] Saatavissa

http://www.terveysportti.fi.ezproxy.turkuamk.fi/terveysportti/rex_terminologia.koti.

Julkaisemattomat lähteet

Bethyl Laboartories Inc. 2009. Mouse IgG_{2b} ELISA Quantation Kit. Montgomery: Bethyl Laboartories Inc.

Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd). 2007 Rat/Mouse P1NP EIA. Boldon: Immunodiagnostic Systems Ltd.

Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd). 2008. MouseTRAP™ Assay. Boldon: Immunodiagnostic Systems Ltd.

Pharmatest service Ltd. 2009. Study Protocol Orthopic, syngenic 5TGM1 multiple myeloma mouse model. A pilot study. Turku: Pharmatest Service Oy.

Suominen, Mari, biologi. Henkilökohtainen tiedonanto 12.2.2009. Pharmatest Service oy.

SANASTO

Adheesio	1. fysiikassa tartuntavoima; 2. kiinni takertuminen
Angiogeneesi	suonien synty ja kehitys, (veri)suonien (uudis)muodostus
Apoptoosi	ohjelmoitu solukuolema
B-solu	imusolu, joka syntyy kantasolustaan ja kypsyy immunologisesti luuytimessä, lisääntyy imukudoksessa ja voi aktivoitua vasta-aineita erittäväksi plasmasoluksi antigeenin vaikutuksesta
C-terminaali	karboksyylipää, karboksyyliterminaali eli peptidiketjun se pää, jossa on vapaa karboksyyli-ryhmä
Ekstrasellulaarinen	solunulkoisen
Endoteeli	verisuonien, imusuonien ja sydämen sisäpintoja verhoava ohut yhdenkertainen solukerros
Endoteliaalinen	endoteeliin liittyvä
Fluoresenssi	aineen kyky absorboida valoenergiaa ja aikaansaada tätä viritysentergiaa pitempiaaltoista lyhytkestoista säteilyä
Formaatio (luun)	luun muodostus
Gammopatia	veren immunoglobuliinien sairaaloinen muutos
Hyperkalsemia	veren kalsiumrunsaus
Hyperviskositetti	veren liiallinen sakeus
Immunoglobuliini	vasta-aineina toimivia proteiineja, joiden molekyyli koostuu kahdesta raskaketjusta ja kahdesta kevytkejusta ja jotka jakaantuvat raskaiden ketjujen rakenteen perusteella ryhmiin IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM
Inhibiittori	tekijä joka estää tai hidastaa esimerkiksi entsyymaattista reaktiota tai fysiologista toimintoa
Inhiboida	estää
Inkuboida	pitää määrälämpötilassa
Kompressiomurtuma	puristuksen aiheuttama luunmurtuma
Leukosytopenia	valkosolujen niukkuus

Luumatriksi	luun väliaine, luun sidekudosrunko
Lysosomaalinen	lysosomeihin liittyvä
Lysososmi	pieniä solulimassa sijaitsevia kalvon ympäröimiä soluelimiä, joiden sisällä olevat hydrolyyttiset entsyymit pilkkovat solulle tarpeettomia tai haitallisia makromolekyylejä
Lyyttinen	liuottava, hajottava
Makrofagi	muun muassa löyhässä sidekudoksessa esiintyviä suuria syöjäsoluja
Mesenkymaalinen	mesenkyymiin kuuluva tai liittyvä
Mesenkyymi	alkeistukikudos eli mesodermin alkioikäinen hyytelömäinen sidekudos, josta aikanaan kehittyy kypsää tukikudosta
Metabolia	aineenvaihdunta
Migraatio	1. elimen vaeltaminen tavanomaisesta asemastaan; 2. solujen vaeltaminen alkiokehityksen aikana
Monoklonaalinen	yhdestä kantasolusta polveutuva (solujoukko), yhteen klooniin liittyvä
Mononukleaarinen	yksitumainen
Monosyytti	suhteellisen suurikokoinen veren valkosolu (syöjäsolu), jolla on liuskoittumaton tuma ja joka voi siirtyä kudoksiin makrofagiksi
N-terminaali	aminopää, aminotermiini eli peptidiketjun se pää, jossa on vapaa aminoryhmä
Ortotooppinen	oikeapaikkainen, oikeasijaintinen
Osteoblasti	luunemosolu ja osteosyytin varhaismuoto
Osteoklasti	luunsyöjäsolu
Osteoni	kypsän luun perusyksikkö
Osteosyytti	luun sisällä sijaitsevia ja sitä huoltavia soluja
Paraproteiini	yhden solukloonin tuottama, elektroforeesissa kapeana vyöhykkeenä näkyvä immunoglobuliini tai sen osa
Patogeneesi	taudin synty eli käsitys sairauden synnystä ja kehityksestä
Plasmasolu	B-imusolusta aktivoitunut, liukoisia vasta-aineita tuottava solu

Polyuria	runsasvirtsaisuus
Proliferaatio	(solujen) lisääntyminen, lukumäärän kasvu, lisäkasvu, uudiskasvu
Proteasomi	solunsisäisiä kappaleita, joissa ubikitiinin merkitsemät proteiinit pilkkoutuvat
Protonipumppu	ionipumppu joka siirtää vetyioneja kalvon läpi
Resorptio (luun)	luun hajotus
Stroomasolu	tukikudossolu
Syngeeninen	(kudokset tai yksilöt) joilla on sama genotyyppi
Sytokiini	monentyyppisten solujen tuottamia, solujen välisinä viestiaineina toimivia pienimolekyylisiä proteiineja
Sytopenia	(veren) solujen niukkuus
Terminaalivaihe	loppuvaihe
Trombosytopenia	verihiutaleniukkuus
Variabiliteetti	vaihtelevuus, muuntelevuus
Vehikkeli	lääkkeen vaikuttamaton perusaine
Verrokki	kontrolli
Vesikkeli	nesterakkula
Viabilitetti	elinkykyisyys

(Terveysportti 2009 [viitattu 9.4.09].)



OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

Sopijaosapuolet:

Toimeksiantajan nimi Pharmatest Services Oy

Toimeksiantajan osoite Itäinen Pitkäkatu 4C, 20520 Turku

Yhteyshenkilö/asema Jukka Rissanen/Laboratoriopäällikkö

Yhteystiedot puh. 02 2784702 e-mail jukka.rissanen@pharmatest.fi

Opiskelija: Salla Talvitie

Yhteystiedot puh. 041 5447575 e-mail sari.talvitie@students.turkuamk.fi

Osoite Rakuunatie 62 F 60, 20720 Turku

Osapuolet ovat tänään sopineet toimeksiannosta seuraavaa:

Opinnäytetyön aihe:

Ortoteoppinen syngeneen 5TGM1 multipeli myeloma hiirimalli.
Pilottitutkimus

Alkamisaika: 18.2.2009 Työ on valmis 5.5.2009

Muuta:

Tutkimuksen tarkoituksena on testata 5TGM1 hiirimallia
Tutkimuksessa käytetään kolmea tutkimusryhmää (n=8),
joista yksi toimii kontrolliryhmänä ja kaksi muuta
ryhmää ovat hoidollisia. Tutkimuksen toisena tarkoituk-
senä on testata, onko bortezomid tehokas lääke
multipelin myelooman hoitoon

Opinnäytetyön ohjaajana Turun AMK:ssa toimii

Mika Venojärvi
Puh.

044-9075479

Päiväys ja allekirjoitukset:

18.02.2009
Päiväys

Jukka Rissanen
Toimeksiantajan edustaja

Salla Talvitie
Opiskelija
Salla Talvitie

AIKATAULU		
Päivämäärä	Tutkimuspäivä	Tapahtuma
Keskiviikko 18.2	-2	Randomisointi
Torstai 19.2	-1	Verinäytteenotto
Perjantai 20.2	0	Inokulointi
Lauantai 21.2	1	
Sunnuntai 22.2	2	
Maanantai 23.2	3	Punnitus ja annostelu
Tiistai 24.3	4	
Keskiviikko 25.2	5	Punnitus ja annostelu
Torstai 26.2	6	
Perjantai 27.2	7	Punnitus ja annostelu
Lauantai 28.2	8	
Sunnuntai 1.3	9	
Maanantai 2.3	10	Punnitus ja annostelu
Tiistai 3.3	11	
Keskiviikko 4.3	12	Punnitus ja annostelu
Torstai 5.3	13	Verinäytteenotto
Perjantai 6.3	14	Punnitus ja annostelu
Lauantai 7.3	15	
Sunnuntai 8.3	16	
Maanantai 9.3	17	Punnitus ja annostelu
Tiistai 10.3	18	
Keskiviikko 11.3	19	Punnitus ja annostelu
Torstai 12.3	20	Verinäytteenotto
Perjantai 13.3	21	Punnitus ja annostelu
Lauantai 14.3	22	
Sunnuntai 15.3	23	
Maanantai 16.3	24	Punnitus ja annostelu
Tiistai 17.3	25	
Keskiviikko 18.3	26	Punnitus ja annostelu
Torstai 19.3	27	Verinäytteenotto
Perjantai 20.3	28	Punnitus ja annostelu
Lauantai 21.3	29	
Sunnuntai 22.3	30	
Maanantai 23.3	31	Punnitus ja annostelu
Tiistai 24.3	32	
Keskiviikko 25.3	33	Punnitus ja annostelu
Torstai 26.3	34	Verinäytteenotto
Perjantai 27.3	35	Punnitus ja annostelu
Lauantai 28.3	36	
Sunnuntai 29.3	37	
Maanantai 30.3	38	Punnitus ja annostelu
Tiistai 31.3	39	
Keskiviikko 1.4	40	Punnitus, annostelu ja kipulääkkeen anto
Torstai 2.4	41	Kipulääkkeen anto
Perjantai 3.4	42	Punnitus, kipulääkkeen anto, verinäytteenotto ja lopetus