

Uudisverisuonten kasvattaminen – kohti iskeemisten kudosten parempaa verenkiertoa

Uudisverisuonten kasvattamiseen tähtäävä hoito iskeemisten kudosten ja kudostraumojen verenkierron parantamiseksi on uusi lupaava molekulaarisen lääketieteen sovellus. Eläinkokeissa erityisesti endoteelikasvutekijägeenien (VEGF-geenien) siirrot käyttäen tehokkaita virusgeeninkuljettimia ovat parantaneet luuranko- ja sydänlihaksen verenkiertoa erittäin tehokkaasti. Uudisverisuonten kasvattamisen merkittävin haittavaikutus on kapillaarien läpäisevyyden lisääntyminen ja siitä aiheutuva kudosturvotus. VEGF:n tarpeeksi pitkäaikaisen ilmentymisen on osoitettu johtavan muodostuvien suonten stabiloitumiseen ja turvotuksen vähentymiseen. On todennäköistä, että ainakin aluksi tämän uuden hoitomuodon onnistumismahdollisuudet ovat parhaimmillaan tavanomaisten revaskularisaatiomenetelmien liitännäishoitona.

Ateroskleroottisen valtimosairauden komplikaatiot ovat alati kasvava uhka teollistuneen maailman väestön terveydelle huolimatta tehostuneesta primaari- ja sekundaari-preventiosta sekä kirurgisten ja perkutaanisten tekniikoiden edistysaskelista. Tämän vuoksi on pyritty kehittämään uusia hoitomuotoja. Kudoksen verenkierron parantamista kasvutekijägeeninsiirtojen ja kantasolujen avulla kutsutaan terapeuttiseksi verisuonten uudismuodostukseksi (terapeuttinen angiogeneesi).

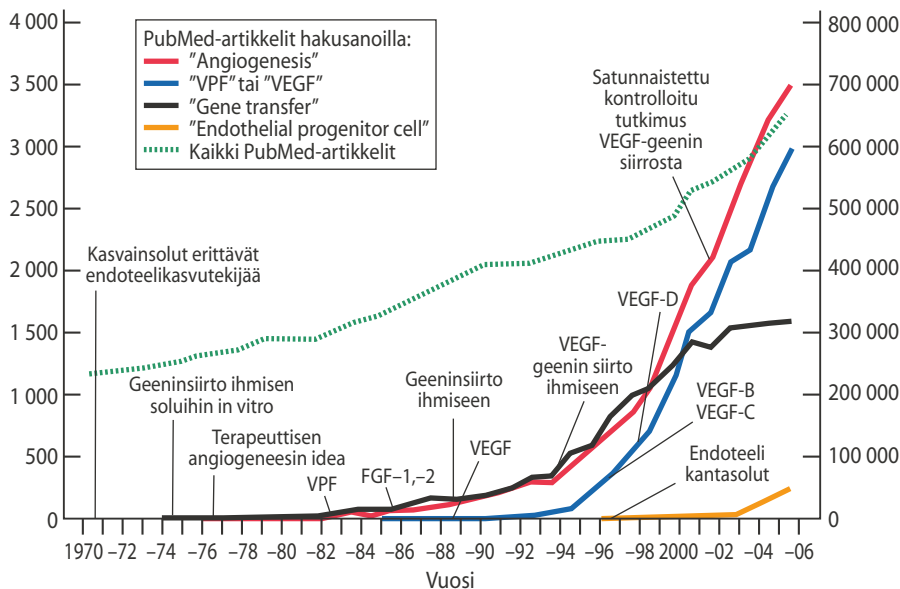
Tutkijoiden kiinnostus verisuonten uudismuodostukseen on kasvanut voimakkaasti 1970-luvun alusta lähtien, kun kasvainten havaittiin erittävän niiden kasvulle välttämätöntä, kapillaarisuonten kasvua stimuloivaa ja niiden läpäisevyyttä lisäävää kasvutekijää (Folkman ym. 1971). Tieto angiogeneettisen kasvutekijän olemassaolosta synnytti melko nopeasti idean sen käytöstä sydänlihaskemian hoidossa (Svet-Moldavsky ja Chimishkyan 1977). Kului kuitenkin yli kaksikymmentä vuotta, ennen kuin molekyylibiologisten menetelmien kehitys mahdol-

listi tämän kasvutekijän – endoteelikasvutekijän (VEGF tai VEGF-A) – kloonauksen (Leung ym. 1989). Tämän jälkeen tutkijoiden kiinnostus verisuonten kasvuun VEGF:ään ja geeniterapiaan on kasvanut lähes eksponentiaalisesti (kuva 1).

Ensimmäiset prekliiniset ja kliiniset kokeet uudisverisuonten kasvattamiseksi tehtiin ruiskuttamalla rekombinantteknikalla tuotettua VEGF:ää ja muita kasvutekijöitä kudoksiin tai verenkiertoon ja käyttämällä plasmidi-DNA:ta, yksinkertaisinta geeninkuljetinta eli vektoria. Nykyaikaisissa geeninsiirtosovelluksissa hyödynnetään kuitenkin viruksista muokattuja geeninsiirtovektoreita niiden huomattavasti paremman tehon takia. Toisena tutkimushaarana on ollut luuytimen tai verenkierron kantasolujen käyttö verisuonten kasvattamiseksi ja sydämen pumppaustoiminnan parantamiseksi. Lymfangiogeneesia eli imusuonten kasvua voidaan myös stimuloida siirtämällä imusuonikasvutekijöiden kuten VEGF-C:n geeni kudokseen ja siten mahdollisesti lievittää hankinnaista tai perinnöllistä lymfödeemaa (Jussila ym. 1998, Ylä-Herttuala ja Alitalo 2003).

PubMed-artikkelit hakusanoilla /
vuosi

Kaikki PubMed-artikkelit /
vuosi



KUVA 1. Terapeuttisen angiogeneesin kehitys 1970-luvulta nykypäiviin. Angiogeneesin ja geeniterapian tutkimus (asteikko vasemalla) on lisääntynyt julkaisujen perusteella yleistä lääketieteen tutkimusta (oikealla) nopeammin 1980- ja 1990-lukujen taitteesta lähtien. Tuolloin molekyylibiologiset menetelmät mahdollistivat kasvutekijägeenien kloonauksen ja geeniinsiirtotektoreiden kehityksen. Alan tärkeät virstanpylväät on merkitty julkaisukäyrille.

FGF = fibroblastikasvutekijä, VPF = vascular permeability faktor, VEGF = endoteelikasvutekijä.

Verisuonten kasvumekanismeja

Angiogeneesi tarkoittaa jo olemassa olevan kapillaarisuoniston kasvamista erilaistuneiden endoteelisolujen ja perisytytien eli tukisolujen proliferaation ja migraation seurauksena. Angiogeneesi on erittäin keskeinen tapahtuma sikiön kehityksen ja kasvun ohella mm. haavojen parantumisessa, luutumissa, naisen lisääntymisfysiologiassa sekä patologisissa prosesseissa kuten kasvainten kasvussa ja metastasoinnissa, diabeettisessa retinopatiassa ja reuma-artriitissa (Carmeliet 2003). Tärkein angiogeneesin ärsyke on kudosten hapenpuute: kun lähimpään kapillaariin on matkaa noin 100 µm, tarvitaan uusia haaroja tuomaan happeutunutta verta hypoksille soluille. Verisuonten terapeuttista kasvatamista kutsutaan usein terapeuttiseksi angiogeneesiksi, vaikka se tarkasti ottaen kattaa vain yhden verisuonten kasvun osa-alueen.

Arteriogeneesi. Angiogeneesia tärkeämpi verisuonten kasvumekanismi sydämen ja alaraajo-

jen laajemman iskemian lievittämiseksi on kollateraali- ja valtimoiden kasvu, jota on viime vuosina alettu kutsuttu arteriogeneesiksi (Schaper ja Scholz 2003). Toisin kuin angiogeneesissä hypoksia ei ole kollateraalien kasvun suora ärsyke, vaan suuren valtimon ahtautuminen aiheuttaa verenpainegradientin pienten ohittavien valtimonastomoosien proksimaali- ja distaalipäiden välille, minkä seurauksena mediakerrosta vastaan kohdistuva paine ja endoteelikerrosta vastaan kohdistuva verenvirtauksen leikkausvoima kasvavat. Tämä puolestaan johtaa mekanoreseptoreiden välityksellä kasvusignaaleihin. Endoteelin ärsytyksen aiheuttamalla paikallisella tulehdusreaktiolla on ajateltu olevan tärkeä rooli arteriogeneesissä (Schaper ja Scholz 2003), mutta toisaalta tulehdus voi olla myös kollateraalien voimakkaan kasvun seuraus eikä syy. Aiemman valtimoahtauman takia muodostuneet kollateraalit suojaavat sydänlihasta iskemialta mm. akuuteissa koronaarisyndroomissa, mutta niiden verenkuljetuskyky jää väijäämättä ahtautuneen

valtimon alkuperäisestä tasosta Poiseuillen lain mukaisesti (Schaper ja Scholz 2003).

Vaskulogeneesi. Aiemmin kantasolujen ajateltiin osallistuvan verisuonten muodostukseen vain sikiönkehityksen aikaisessa vaskulogeneesissä eli verisuoniston rakentumisessa mesodermin hemangioblasteista. Viime vuosikymmenen lopulla eristettiin kuitenkin myös aikuisen verestä endoteeli- ja kantasolumarkkereita ilmentäviä soluja, jotka soluviljelymaljalla erilaistuivat endoteelisoluiksi ja joiden havaittiin hakeutuvan kasvaviin verisuoniin in vivo (Asahara ym. 1997). Viimeaikaisissa kriittisissä tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että luuydinperäiset solut eivät merkittävästi liity kasvaviin verisuoniin vaan toimivat etupäässä tukisoluina ja edistävät angiogeneesiä erittämällä parakriinisesti kasvutekijöitä (Rehman ym. 2003, O'Neill ym. 2005). Lisäksi osa aiemmin kantasoluiksi tulkituista veren soluista on ollut todennäköisesti kantasolumarkkereita ilmentäviä monosyyttejä ja muita tulehdussoluja (Rehman ym. 2003).

VEGF ja muut verisuonikasvutekijät

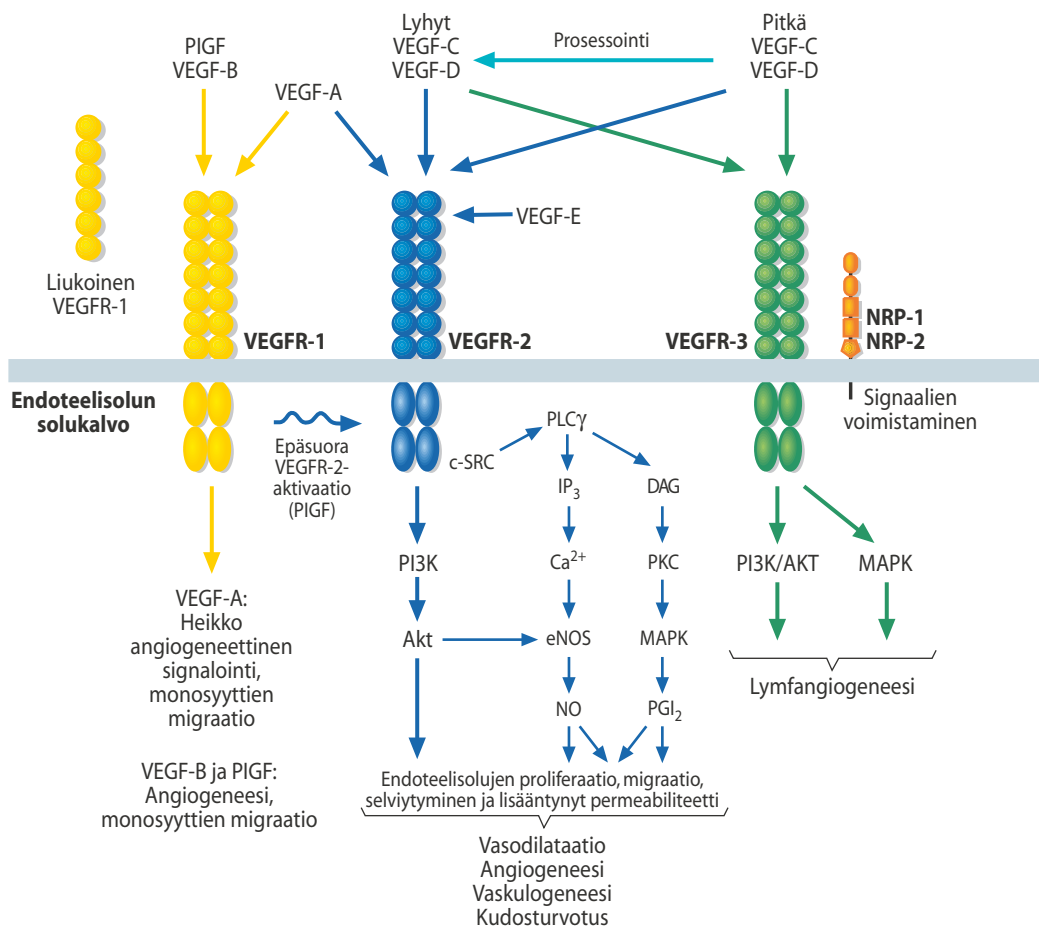
Vaikka on löydetty runsaasti erilaisia verisuoniin ja niiden kasvuun vaikuttavia tekijöitä, VEGF on osoittautunut kaikkein tärkeimmäksi. VEGF:stä tekee erityisen se, että tämä tekijä on täysin välttämätön sikiön vaskulogeneesille ja angiogeneesille, sen erityis lisääntyy tehokkaasti HIF-1 α :n (hypoxia-inducible factor 1 α) välityksellä hapenpuutteessa ja se sitoutuu tärkeimpään angiogeneesiä välittävään reseptoriin VEGF-reseptori 2:een (VEGFR-2) (Ferrara ym. 1996, Ferrara 2004). VEGF on myös voimakkain tunnettu verisuonten läpäisevyyttä lisäävä tekijä, ja se aiheuttaa patologisissa tiloissa nesteen kertymistä kudoksiin, minkä takia sitä aluksi kutsuttiin myös verisuonten permeabiliteettitekijäksi (vascular permeability factor, VPF). VEGF:n neljä eripituista muotoa VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ja VEGF₂₀₆ eroavat toisistaan lähinnä sitoutumiskyvyssä solunulkoiseen matriksiin siten, että VEGF₁₂₁ on liukoinen ja VEGF₂₀₆ sitoutuu lähes kokonaan soluväliaineeseen. VEGF₁₆₅ on biologisesti voimakkain muoto, koska siinä yhdistyvät sopivan voimakas matriksiin sitoutuminen ja

suuri biologinen aktiivisuus (Ferrara 2004). Hypoksian lisäksi VEGF:n ilmentymistä stimuloiivat sytokiinit ja monet kasvutekijät, mikä johtaa iskeemisen tai muuten vaurioituneen kudoksen verenkierron lisääntymiseen (Rissanen ym. 2002, Ferrara 2004, Tuomisto ym. 2004).

VEGF:n lisäksi samaan perheeseen kuuluvat VEGF-B, -C, -D, -E ja istukkakasvutekijä (PlGF). Ne poikkeavat toisistaan sitoutumisessa signalointireseptoreihin VEGFR-1, -2 ja -3 sekä neuropiliiniapreseptoreihin. Kuvassa 2 on esitetty VEGF-perheen jäsenten sitoutuminen reseptoreihinsa ja niiden aiheuttamat biologiset vaikutukset. Myös muissa VEGF-perheen jäsenissä kuin VEGF:ssä on selkeää angiogeneettistä tai lymfangiogeneettistä potentiaalia, vaikka ne eivät näytä olevan välttämättömiä yksilön kehitykselle ja hyvinvoinnille – poikkeuksena VEGF-C, joka on välttämätön imusuonten muodostumiselle (Joukov ym. 1996, Kärkkäinen ym. 2004). VEGF-perheen lisäksi nykyään tunnetaan useita muitakin verisuonikasvutekijöitä, joita on esitelty taulukossa.

Terapeuttisen angiogeneesin alkutaival

Rekombinanttiproteiinit ja plasmidi-DNA. Ensimmäiset eläinkokeet terapeuttisen angiogeneesin stimuloimiseksi tehtiin 1990-luvun alussa alaraaja- ja sydänlihaskemiamalleissa ruiskuttamalla lihakseen, systeemiseen verenkiertoon tai jopa ihon alle fibroblastikasvutekijä 1:n (FGF-1:n), FGF-2:n ja VEGF:n rekombinanttiproteiineja sekä tekemällä plasmidi-DNA-välitteisiä geeninsiirtoja. Näiden kokeiden positiiviset vaikutukset iskeemisen alueen kapillaarien ja kollateraalivaltimoiden kasvuun innoittivat myöhemmin useisiin klinisiin tutkimuksiin alaraajaiskemiapotilailla ja tavanomaisiin revaskularisaatiotoimenpiteisiin soveltumattomilla sepevaltimotautipotilailla (Baumgartner ym. 1998, Losordo ym. 2002, Fortuin ym. 2003). Eläinkokeiden hyviä tuloksia ei kuitenkaan pystytty toistamaan ihmisillä, ja kontrolloitujen tutkimusten tulokset voidaan tulkita negatiiviksi (Lederman ym. 2002, Simons ym. 2002, Henry ym. 2003, Kastrup ym. 2005). Synnä näihin epäonnistumisiin on todennäköisesti rekombi-



KUVA 2. Endoteelikasvutekijä- eli VEGF-perheen jäsenten sitoutuminen kolmeen solukalvon tyrosiini-kinasireseptoriin (VEGFR-1, -2 ja -3) ja niiden välittämät biologiset vaikutukset. VEGFR-1:n biologia tunnetaan vain osittain. Se on ainakin VEGF-A:n tapauksessa angiogeneesin negatiivinen säätelijä. PIGF:n ja VEGF-B:n sitoutuminen VEGFR-1:een näyttää kuitenkin johtavan tiettyissä tilanteissa angiogeneettiseen vasteeseen, ilmeisesti ainakin osittain VEGFR-2:n epäsuoran aktivaation seurauksena. VEGFR-2 välittää typpioksidivälitteisesti vaskulogeneesiä, angiogeneesiä ja verisuolen permeabiliteettiä. VEGFR-3 säätelee imusuonten kehitystä ja kasvua. VEGF-C ja VEGF-D ilmentyvät pitkänä muotoina, jotka pilkkoutuvat proteolyttisesti lyhyemmiksi. Pitkät muodot sitoutuvat pääasiassa VEGFR-3:een, kun taas lyhyet muodot aktivoivat tehokkaasti myös VEGFR-2:ta ja aiheuttavat näin ollen myös angiogeneesiä. VEGF-E on yhteisnimitys viruksista eristetyille VEGF-homologeille, jotka sitoutuvat vain VEGFR-2:een. Neuropiliiniin 1 ja 2 (NRP-1 ja -2) ovat apureseptoreita, joiden signaalikapasiteetti on heikko mutta jotka voimistavat VEGFR-2:n ja VEGFR-3:n kautta kulkevia signaaleja tiettyjen VEGF-perheen jäsenten sitoutuessa niihin.

Akt = seriini-treoniini kinaasi Akt (proteiinikinaasi B), c-Src = c-Src tyrosiini-kinasii, DAG = diasyglyseroli, eNOS = endoteelin typpioksidisyntaasi, IP₃ = trifosfoinositoli, MAPK = mitogeneeniaktivoitu proteiini-kinasii, NO = typpioksidi, PGI₂ = prostasykliini, PLCγ = fosfoliipaasi Cγ, PIGF = istukkakasvutekijä, PI3K = fosfatidyli-inositoli-3-OH-kinaasi, PKC = proteiini-kinasii C, VEGF = endoteelin kasvutekijä.

nanttproteiinien lyhyt puoliintumisaika ja plasmidi-DNA:lla saavutettava erittäin heikko geeninsiirtotehokkuus in vivo (Rutanen ym. 2004).

Suonensisäinen adenovirusvälitteinen geeninsiirto. Adenovirukset ovat nykyään käytetyimpiä ja tehokkaimpia geeninkuljettimia syövän sekä sydän- ja verisuonisairauksien geeniterapiassa

(Ylä-Herttua ja Alitalo 2003, Hakkarainen ym. 2005). Ryhmämme ensimmäiset kliiniset tutkimukset sydämessä ja alaraajoissa tehtiin ruiskuttamalla adenovirus-VEGF-geeninsiirtoliuosta sepelvaltimoihin ja alaraajojen valtimoihin pallolaajennuksen jälkeen estämään laajentuneen kohdan uudelleen ahtautumisen (Lai-

TAULUKKO. Tärkeimpiä veri- ja imusuonten kasvua stimuloivia kasvutekijöitä ja niiden välittämiä vaikutuksia sekä poistogeenisen hiiren ilmiä. VEGF = endoteelikasvutekijä, PIGF = istukkakasvutekijä, FGF = fibroblastikasvutekijä, PDGF = verihitulekasvutekijä, HGF = hepatosyyttikasvutekijä, Ang = angiopoietini, IGF = insuliininkaltainen kasvutekijä, TGF- β = transformoiva kasvutekijä beeta. Ainakin PIGF:n, FGF:ien, PDGF:ien, HGF:n ja IGF:ien angiogeneettinen aktiivisuus näyttää suurimmaksi osaksi perustuvan siihen, että ne lisäävät VEGF:n ilmentymistä.

Kasvutekijä	Reseptori	Tärkeimmät vaikutukset	Poistogeenisen hiiren ilmiä
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1 ja -2	Vaskulogeneesi, angiogeneesi, verisuonten homeostaasi, permeabiliteetin lisääntyminen	Letaali puutteellisen vaskulogeneesin ja angiogeneesin takia
PIGF ja VEGF-B	VEGFR-1	Angiogeneesi, monosyyttien migraatio	Normaali tai vähäisiä puutteita angiogeneesissä patologisissa tiloissa
VEGF-C	VEGFR-2 ja -3	Imusuonten kasvu ja kehitys; angiogeneesi	Letaali puutteellisen lymfangiogeneesin takia
VEGF-D	VEGFR-2 ja -3	Imusuonten kasvu; angiogeneesi	Normaali
FGF-1 (aFGF), -2 (bFGF), -4 ja -5	FGFR1-5	Fibroblastien ja muiden mesenkymaalisten solujen proliferaatio ja migraatio	FGF-1 ja FGF-2: normaali/vähäinen fenotyyppi; FGF-4: letaali sisäsolumassan puutteellisen proliferaation takia
PDGF-A, -B, -C ja -D	PDGFR- α ja - β	Perisyttien, sileälihassolujen ja fibroblastien proliferaatio ja migraatio	PDGF-B: letaali perisyttien puutteen takia
HGF	c-met	Hepatosyyttien, sileälihassolujen ja fibroblastien proliferaatio ja migraatio	Letaali puutteellisen organogeneesin takia
Ang-1 ja -2	Tie-2	Verisuonten stabiliteetin ja permeabiliteetin säätely	Ang-1: letaali verisuoniston kehityshäiriön takia; Ang-2: imusuonten kehityshäiriö
IGF-1 ja -2	IGFR	Kasvuhormonin vaikutusten välitys; angiogeneesi	IGF-1 ja IGF2: osittain letaali luurankoli hasten kasvuhäiriön takia
TGF- β	T β R, tyypit I ja II	Tilanteesta riippuvainen soluproliferaation ja angiogeneesin induktio tai esto, matriksin synteesi	Letaali ekstraembryonaalisen mesodermin puutteellisen erilaistumisen ja puutteellisen vaskulogeneesin takia

تين ym. 1998 ja 2000, Hedman ym. 2003). Uudelleen ahtautumisessa ei havaittu eroa adeno-VEGF- ja verrokkiryhmän välillä, mutta sekundaarisena löydöksenä sydänlihaksen perfuusiodefektin havaittiin kuitenkin kuusi kuukautta VEGF-geenin adenovirusvälitteisen siirron jälkeen olevan pienempi kuin verrokeilla (Hedman ym. 2003). Alaraajaiskemiatopotilailla puolestaan angiografiassa havaittava verisuonitus lisääntyi geeninsiirtokohdan distaalipuolella kolmen kuukauden kuluttua VEGF-geenin adenovirusvälitteisestä siirrosta (Mäkinen ym.

2002). Näihin tutkimuksiin ei liittynyt vakavia haittavaikutuksia, mutta puolet adenovirusgeeninsiirron saaneista potilaista sai lievän, ohimenevän kuumereaktion (Mäkinen ym. 2002, Hedman ym. 2003). Suuri ja pitkäaikainen systeeminen kasvutekijäpitoisuus voisi teoriassa nopeuttaa piilevien kasvainten kasvua ja heikentää valtimoiden ateroomia, mutta tästä ei ole todettu viitteitä kliinisissä tutkimuksissa VEGF-geenin lyhytaikaisen siirron jälkeen. Myös sepelvaltimoon ruiskutetun adeno-FGF-4:n on raportoitu olevan turvallista, mutta Grinesin ym. (2002)

tutkimuksessa se ei parantanut potilaiden suorituskäkyä enemmän kuin lumehoito 12 viikon kuluttua tehdyssä kuormituskokeessa.

Tehokasta angiogeneesiä eläinkokeissa

Geeniinsiirtoreitin valinta. Ylivoimaisesti tehokkain geeniinsiirto kohdekudoksessa saavutetaan toistaiseksi kudoksensisäisillä adenovirusruiskeilla (Vajanto ym. 2002, Rissanen 2003, Rissanen ym. 2003a). Sydänlihaksen sisään on luonnollisesti hankalampi antaa ruiskeita kuin alaraajojen lihaksiin, ja pelkästään injektioiden takia tehty torakotomia vähentää selkeästi geeniterapian mielekkyyttä. Huomattava edistysaskel sydämeen tehtävän geeniin siirron kannalta on sydämen elektrofysiologisen CARTO-tutkimusjärjestelmän rinnalla kehitetty neulakatetrisysteemi (NOGA), joka on mahdollistanut perkutaanisen, kolmiulotteisesti kohdennetun sydänlihaksensisäisen geeniin siirron (Losordo ym. 2002, Rutanen ym. 2004, Kastrup ym. 2005).

Prekliiniset kokeet. Eläinkokeissa erityisesti lihaksensisäiset adenovirusvälitteiset VEGF- ja FGF-4-geenin siirrot sekä VEGF-D:n lyhyen muodon geenin siirrot ovat vaikuttaneet tehokkaasti kapillaarien ja kollateraali- ja sydänlihaksessa (Pettersson ym. 2000, Vajanto ym. 2002, Rissanen ym. 2003a ja 2005, Rutanen ym. 2004). Kuva 3 havainnollistaa VEGF:n ja VEGF-D:n lyhyen muodon stimuloiman angiogeneesin voimakkuutta kanin alaraajan lihaksessa ja sian sydämessä. VEGF-C:n ja VEGF-D:n pitkät muodot stimuloivat imusuonten kasvua lähes täysin VEGFR-3:n välityksellä, ja täysin selektiiviseksi VEGFR-3-ligandiksi muokattu VEGF-C^{156S} on pelkkä imusuonikasvutekijä (Saaristo ym. 2002, Rissanen ym. 2003b).

Kudosperfuusion lisääntyminen. Olemme mitanneet jopa 27-kertaisen perfuusion lisääntymisen kanin normaalissa levossa olevassa alaraajalihaksessa kuusi päivää VEGF-geenin adenovirusvälitteisen siirron jälkeen, ja vieläkin suurempi perfuusio on kokemustemme mukaan mahdollista saavuttaa (Rissanen ym. 2005). Millään aiemmalla hoidolla ei ole pystytty aikaansaamaan näin voimakasta, suprafysiologis-

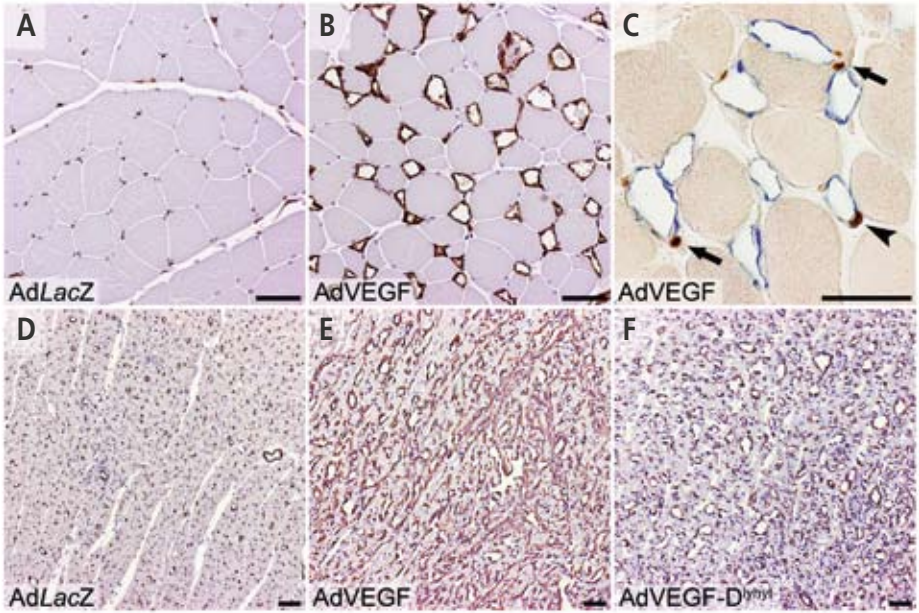
ta perfuusiota eikä saavutettu levossa olevassa luurankolihaksessa samantasoista verenkiertoa kuin normaalisti todetaan vain maksimaalisen fyysisen rasituksen aikana. Sydänlihaksessa perfuusion kasvu on ollut selvästi pienempi kuin luurankolihaksessa, mikä johtuu todennäköisesti sydänlihaksen huomattavasti vilkkaammasta luontaisesta verenkierrosta (Rutanen ym. 2004). Kuvassa 4 on esitetty kanin alaraajan verenkierron tutkimista kontrastiatinetehosteisella kaikukuvauksella ja magneettikuvauksella.

Verisuonten kasvu ja kudosturvotus. Uusien verisuonten tarve kohdekudoksessa näyttää vaikuttavan merkittävästi verisuonten kasvutapaan geeniterapian jälkeen. Terveessä lihaksessa kapillaaripaineen huomattava nousu johtaa kapillaarien sileälihaskerroksen voimistumiseen ja muuntumiseen kohden arteriolirakennetta. Iskeemisessä lihaksessa sen sijaan verisuonten kasvu näyttäisi johtavan enemmän uusien kapillaarihaarojen ja pysyvien kollateraaliyhteyksien muodostumiseen ja tätä kautta iskeemisen alueen verenkierron parantumiseen (Vajanto ym. 2002, Rissanen ym. 2003a ja 2005). VEGFR-2:n stimulaation aiheuttama kapillaarien läpäisevyyden suora lisääntyminen ja toisaalta kapillaaripaineen kasvu aiheuttavat angiogeneettisen geeniterapian haittavaikutuksena annoksesta riippuvaista ja ohimenevää kudosturvotusta (kuva 4). Liiallinen kudosturvotus on luonnollisesti haitallista, mutta se on suurelta osin vältettävissä valitsemalla sopiva virusannos (Rissanen ym. 2003a, Rutanen ym. 2004). Verisuonten permeabiliteetin liiallinen lisääntyminen ja myös VEGF-välitteinen angiogeneesi voidaan tarvittaessa kumota suurella annoksella kortikosteroidia, kuten deksametasonia (P. Korpisalo, julkaisematon tieto). Puhdistettu adenovirus aiheuttaa lisäksi ohimenevän lievän tulehdusreaktion kohdekudoksessa.

Kuinka parantaa angiogeneettisen geeniterapian tuloksia?

Liian pieni VEGF-pitoisuus? Huolimatta perfuusion tehokkaasta lisääntymisestä eläintutkimuksissa ensimmäinen lihaksensisäisillä ruiskeilla toteutettu satunnaistettu ja kontrolloitu

Angiogeneesi alaraajassa



Angiogeneesi sydämessä

KUVA 3. Adenovirusvälitteinen VEGF-geenin siirto aiheuttaa voimakkaan angiogeneesin alaraajan lihaksessa ja sydämessä. Immuno-histokemialliset värjäykset kanin m. semimembranosuksesta (A–C) ja sian sydänlihaksesta (D–F) kuusi päivää geeninsiirron jälkeen. A ja B) Verisuonen endoteeli (CD31, ruskea), C) endoteeli (CD31, sininen) ja soluproliferaatio (BrDU, ruskea) ja D–F) verisuonen sileälihas (α SMA, ruskea). Kapillaarit ovat normaalin kokoisia LacZ-merkkigeenin siirron jälkeen (A). Adenovirus-VEGF laajentaa kapillaareja voimakkaasti, jolloin niiden pinta-ala kasvaa noin 20-kertaiseksi (B). Kapillaarien laajentuminen tapahtuu endoteelisolujen (nuolenpää) ja perisytyttien eli tukisolujen (nuolet) proliferaation kautta (C). Vertailugeeninsiirto sydänlihaksessa (D). Myös sydämessä adenovirus-VEGF (E) ja adenovirus-VEGF-D^{lyhyt} (F) saavat aikaan voimakkaan angiogeneesin, jonka pääasiallisin piirre on kapillaarien koon kasvu ja niiden perisytyttikerroksen vahvistuminen.

tutkimus adenovirusvälitteisestä VEGF₁₂₁-geenin siirrosta klaudikaatiopotilailla ei vaikuttanut toivotulla tavalla potilaiden kävelymatkaan 12 viikon seurannassa (Rajagopalan ym. 2003). Syynä oli mahdollisesti liian pieni adenovirus-VEGF-annos, joka oli painoon suhteutettuna noin 100 kertaa pienempi kuin ryhmämme eläinkokeissa käytetty virusannos. On kuitenkin mahdollista, ettei lyhytkestoisella adenovirusvälitteisellä VEGF:n tuotannolla koskaan saavuteta perfuusion tai suorituskyvyn pysyvää parantumista ihmisen iskeemisissä kudoksissa, joissa ateroskleroosi tai diabetes on aiheuttanut endoteelin toimintahäiriön.

VEGF:n pitkäkestoisen (yli 1 kk) tuotannon pysyvä vaikutus verenkiertoon on osoitettu käyttäen muuntogeenisiä hiiriä, joilla VEGF ilmenee säädellysti sydänlihaksessa (Dor ym. 2002). Geeniterapian kannalta erityisen mielenkiintoinen on AAV-vektori (adeno-associated virus).

Arsicin ym. (2003) eläinkokeissa sillä suoritettujen geeninsiirron jälkeen alaraajan lihasperfuusio oli 2,5-kertainen vielä kolme kuukautta VEGF-geenin siirron jälkeen. AAV:llä tai lentiviruksilla (mm. HIV) saavutettu tehokas pitkäkestoinen kasvutekijägeenin siirto vaatii todennäköisesti säätelyjärjestelmän (Koponen ym. 2003), jolla kudoksen kasvutekijäpitoisuus voidaan pitää terapeuttisen alueen sisällä sopivan angiogeneesin stimuloimiseksi ja haittavaikutusten kuten turvotuksen ja hemangioomien välttämiseksi.

Kasvutekijäyhdistelmät. Muiden kuin VEGF-perheen ja joidenkin FGF-perheen jäsenten potentiaali terapeuttisessa angiogeneesissa on vielä epävarma, ja myös »kasvutekijäcocktailien» todellinen merkitys on osoittamatta. Kuitenkin geenin ilmentymistä säätelevän proteiinin kuten HIF-1 α :n geenin siirto on mielenkiintoinen mahdollisuus, koska lisäämällä samanaikaisesti VEGF:n ohella myös muiden kasvutekijöi-

den ilmentymistä voidaan ainakin periaatteessa saavuttaa fysiologisempi angiogeneettinen vaste. Angiopoietiini 1:n on väitetty vähentävän VEGF:n indusoimaa kapillaarien läpäisevyyden kasvua ja stabiloivan uudissuonia (Thurston ym. 2000), mutta sen vaikutusmekanismi on epäselvä. Verihiutalekasvutekijä- (PDGF-) tai FGF-perheen jäsenillä voi olla merkitystä perisyöttien ja sileälihassolujen rekrytoimisessa kasvaviin suoniin VEGF-geenin siirron jälkeen, mutta niiden liiallinen ilmentyminen voi toisaalta johtaa kudofibroosiin.

Kantasoluhoidon alustavia tuloksia

Tähän saakka tehdyissä kliinisissä tutkimuksissa on potilaisiin ruiskutettu autologinen luumytilimen tai veren koko mononukleaarisolufraktio, jossa varsinaisia kantasoluja on alle 0,1 %. Niinpä olisi oikeampaa puhua soluhoidosta kuin kantasoluhoidosta. Lisäksi sepelvaltimoon ruiskutetuista luumytilimen mononukleaarifraktion soluista vain noin 2 % jää sydänlihakseen; loput päätyvät pääasiassa maksaan ja pernaan (Hofmann ym. 2005). Tähän mennessä on julkaistu muutama pieni satunnaistettu kontrolloitu tutkimus luumytilimen mononukleaarisolujen käytöstä sydänlihaksen verenkierron ja toiminnan parantamiseksi ST-nousuinfarktin jälkeen (Janssens ym. 2006, Meyer ym. 2006, Lunde ym. 2006, Schächinger ym. 2006). BOOST-tutkimuksessa todettiin soluja saaneessa ryhmässä ejektiofraktion parantuminen suhteessa verrokkeihin kuuden kuukauden kuluttua muttei enää 18 kuukauden kuluttua (Meyer ym. 2006). Kahdessa vastaavanlaisessa tutkimuksessa luumytilimen soluja saaneiden potilaiden tai sydänlihaksen perfuusio ei parantunut neljän kuukauden seurannassa enemmän kuin lumehoitoa saaneilla (Janssens ym. 2006, Lunde ym. 2006). REPAIR-AMI-tutkimuksessa havaittiin pieni

n. 2,5 %:n ejektiofraktion absoluuttinen parantuminen suhteessa lumeryhmään (Schächinger ym. 2006).

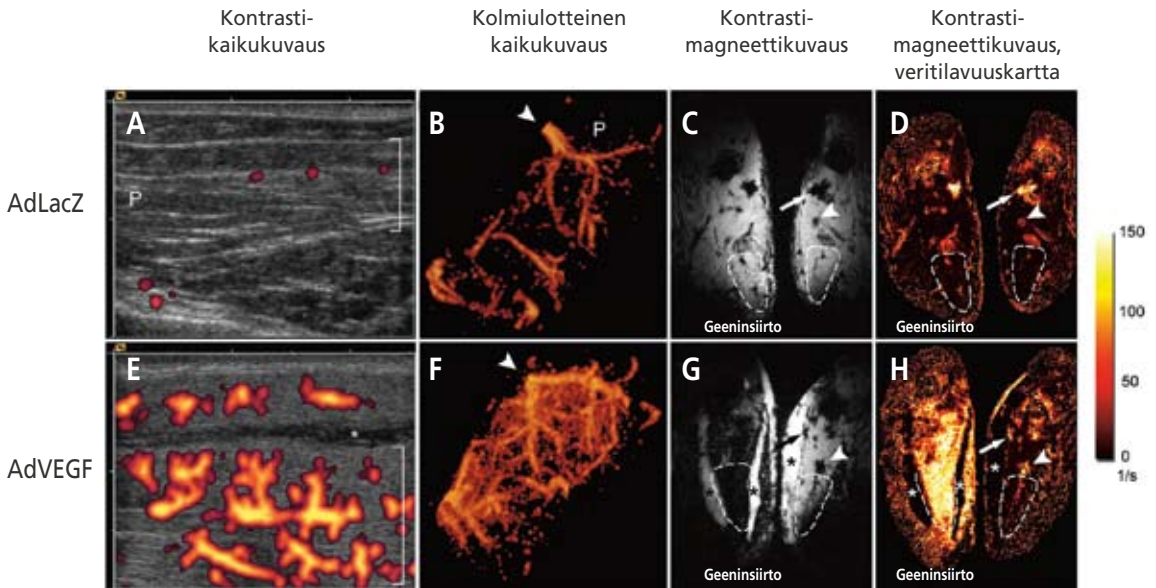
Näyttää siis siltä, että ainakaan sepelvaltimoon ruiskutetut »köyhän miehen» kantasolut eivät merkittävästi paranna sydämen toimintaa infarktin jälkeen. Mahdollinen heikko hoitovaikeus perustuu todennäköisimmin solujen erittämiin parakriinisiin kasvutekijöihin eikä niiden erilaistumiseen endoteelisoluiksi tai supisteleviksi sydänlihassoluiksi. Tulevaisuudessa tutkijoiden mielenkiinto saattaa kääntyä luumytilimen kantasoluista omnipotenttien sikiön kantasolujen suuntaan, mutta niiden terapeuttinen potentiaali on vielä osoittamatta mm. teratoomien riskin ja alan eettisten ongelmien takia.

Lopuksi

Geeniterapian kliinistä läpimurtoa on odotettu jo 1980-luvulta saakka, jolloin eläteltiin toiveita nopeasti syntyvistä sovelluksista (de la Chapel-

YDINASIAT

- Uudisverisuonten kasvattaminen on uusi, toistaiseksi kokeellinen hoito verenkierron parantamiseksi iskeemisissä kudoksissa.
- Endoteelikasvutekijä- eli VEGF-perhe on tärkein veri- ja imusuonten kasvua säätelevä kasvutekijäperhe.
- Adenovirusvälitteinen VEGF-geenin siirto lisää kudoperfuusion ohimenevästi jopa monikymmenkertaiseksi, kun taas AAV:n (adeno-associated virus) avulla tehdyllä geeninsiirrolla saadaan pysyvämpi mutta heikompi vaikutus verenkiertoon.
- Verisuonten runsaan kasvun merkittävin haittavaikutus on kudosturvotus.
- Verisuonten uudismuodostus voi nopeuttaa myös luumytilimen ja pehmytkudostaumojen parantumista.
- Luuydinperäisillä (kanta)soluilla tehdyt tutkimukset verenkierron tai sydämen pumppaustoiminnan stimuloimiseksi ovat tuottaneet ristiriitaisia tuloksia.



KUVA 4. Verenkierron kuvantaminen ja perfuusion mittaaminen kanin takajalan lihaksesta kuusi päivää VEGF-geenin adenovirusvälitteisen siirron jälkeen. Suurten ultraäänikontrastiainekupliin (SonoVue, keskimääräinen halkaisija 2,5 μm) avulla mitattuna adenovirus-VEGF lisää kanin m. semimembranosuksen perfuusion (osoitettu hakasulkeilla, A ja E) jopa 27-kertaiseksi, sen sijaan LacZ-merkkiproteiinin siirrolla ei ole vaikutusta lihaksen perfuusion. Kolmiulotteiset perfuusiokaikukuvat m. semimembranosuksen sisältä osoittavat koko verisuonipuuston kasvaneen adenovirus-VEGF:n vaikutuksesta (B ja F). Poikittaiset T_2^* -painotteiset kontrastimagneettikuvat kanin reisistä osoittavat, kuinka superparamagneettinen kontrastiaine (Resovist, keskimääräinen halkaisija 62 nm) vähentää huomattavasti signaalia adenovirus-VEGF:llä hoidetussa lihaksessa (katkoviivan sisällä) merkinä lisääntyneestä veritilavuudesta (C ja G). Magneettikuvausdatasta laskettu veritilavuuskartta osoittaa saman löydöksen vielä havainnollisemmin (D ja F). Nuolenpäät kuvissa osoittavat syvän reisivaltimon ja nuolet pinnallisen reisivaltimon. Haittavaikutuksena suuri adenovirus-VEGF-annos lisää kapillaarinen permeabiliteettia, mistä seuraa sekä kaikukuvaus että magneettikuvaus havaittava lihasödeema ja plasman kertymistä lihasväleihin (tähdet). Kuva Rissanen ym. (2005) artikkelista ja julkaistu Lippincott Williams & Wilkinsin luvalla.

le 1983, Pettersson ja Palotie 1988). Toisaalta on muistettava, että monoklonaalisten vasta-aineidenkin kehitys tehokkaiksi lääkkeiksi vei parikymmentä vuotta. Tuhansien potilaiden ja yli tuhannen kliinisen geeniterapiatutkimusohjelman jälkeen on osoitettu selkeä kliininen teho mm. periytyvässä SCID-immuunipuutostaudissa ja pahanlaatuisessa glioomassa (Cavazzana-Calvo ym. 2000, Immonen ym. 2004). Adenovirusvälitteinen p53-kasvunrajoitegeenin siirto pään ja kasvojen levyepiteelikarsinooman hoitoon on saanut lisäksi myyntiluvan Kiinassa (Zhang ym. 2003). Geeniterapian pahimpia takaiskuja ovat olleet retroviruksen aiheuttamat leukemiatapaukset ja yhden ylisuurella adenovirusannoksella hoidetun immuunipuutteisen potilaan kuolema. Verisuonten kasvun stimuloiminen luuytimen kantasoluilla ei ole ainakaan vielä

tuottanut positiivisia kliinisiä tuloksia. Suuri määrä kliinisiä tutkimuksia ja vähäinen määrä läpimurtoja on valitettava osoitus liian kovasta kiireestä kohti kliinisiä kokeita ennen kuin on hankittu tarvittava prekliininen tietotaito.

Terapeuttisen angiogeneesin kliinisen soveluksen kriittisinä tekijöinä tulevat olemaan optimaalinen kasvutekijäpitoisuus riittävän laajalla alueella iskeemisessä kudoksessa ja riittävän pitkäkestoinen ilmentyminen, jotta saadaan aikaan kudospesuusion kliinisesti merkittävä parantuminen ja toisaalta vähennetään haittavaikutuksia. Todennäköisesti terapeuttinen angiogeneesi voi olla käyttökelpoisin pallolaajennuksen ja ohitusleikkauksen liitännäishoitona vaikeaa ateroskleroottista verisuonitautia sairastavilla. Tästä on Kuopiossa meneillään alustava kliininen tutkimus (I. Vajanto ym., julkaisematon

tieto). Hoidosta saattaa tulla jossakin vaiheessa varteenotettava mahdollisuus myös potilaille, jotka eivät lainkaan sovellu hoidettaviksi tavanomaisilla menetelmillä. Koska verisuonten kasvu on välttämätöntä elimistön paranemisproses-

seille, voisi terapeuttinen angiogeneesi parantaa verenkiertoa myös mm. mikrovaskulaarisissa ihokielekkeissä, diabeettisissa haavoissa, osteoporoottisissa ja avaskulaarisissa murtumissa sekä jännerekonstruktioissa.

* * *

Tutkimustamme ovat tukeneet merkittävästi Suomen Akatemia, Sigrid Juséliuksen säätiö, Emil Aaltosen säätiö, Suomen Sydäntutkimussäätiö, Maud Kuistilan säätiö, Suomen Lääketieteen säätiö, Paavo Nurmen säätiö, Arne Koskelon säätiö ja Suomen kulttuurirahaston Pohjois-Savon rahasto.

Kirjallisuutta

- Arsic N, Zentilin L, Zacchigna S, ym. Induction of functional neovascularization by combined VEGF and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors. *Mol Ther* 2003;7:450–9.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, ym. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–7.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, ym. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998;97:1114–23.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653–60.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint B, ym. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669–72.
- de la Chapelle A. Geeniterapia – utopia vai toteutuva hoitomuoto? *Duodecim* 1983;99:1319–21.
- Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, ym. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* 2002;21:1939–47.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrin Rev* 2004;25:581–611.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, ym. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439–42.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, ym. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275–88.
- Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, ym. One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol*. 2003;92:436–9.
- Grines CL, Watkins MW, Helmer G, ym. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002;105:1291–7.
- Hakkarainen T, Kanerva A, Hemminki A. Adenovirukset syövän hoidossa. *Duodecim* 2005;121:2195–203.
- Hedman M, Hartikainen J, Syväne M, ym. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 2003;107:2677–83.
- Henry TD, Annex BH, McKendall GR, ym. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation* 2003;107:1359–65.
- Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, ym. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005;111:2198–202.
- Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, ym. AdvH5V-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther* 2004;10:967–72.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, ym. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113–21.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, ym. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290–8.
- Jussila L, Alitalo K, Kaipainen A. Uutta imua lymfasuoniston biologiaan. *Duodecim* 1998;114:343–8.
- Kärkkäinen MJ, Haiko P, Sainio K, ym. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5:74–80.
- Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, ym. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:982–8.
- Koponen JK, Kankkonen H, Kannasto J, ym. Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Therapy* 2003;10:459–66.
- Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, ym. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther* 2000;11:263–70.
- Laitinen M, Mäkinen K, Manninen H, ym. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Hum Gene Ther* 1998;9:1481–6.
- Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, ym. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002;359:2053–8.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, ym. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306–9.
- Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, ym. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002;105:2012–8.
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, ym. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1199–209.
- Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, ym. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* 2002;6:127–33.
- Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, ym. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006;113:1287–94.
- O'Neill TJ, Wamhoff BR, Owens GK, ym. Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circ Res* 2005;97:1027–35.
- Petersson A, Nagy JA, Brown LF, ym. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2000;80:99–115.
- Petersson R, Palotie L. Geeniterapia. *Duodecim* 1988;104:1891–901.
- Rajagopalan S, Mohler ER, III, Lederman RJ, ym. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003;108:1933–8.
- Rehman J, Li J, Orschell CM, ym. Peripheral blood «endothelial progenitor cells» are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164–9.
- Rissanen TT. Gene transfer for blood and lymphatic vessel growth. Väitöskirja. Kuopion yliopisto 2003 (www.uku.fi/vaitokset/2003).

- Rissanen TT, Korpisalo P, Markkanen JE, ym. Blood flow remodels growing vasculature during vascular endothelial growth factor gene therapy and determines between capillary arterIALIZATION and sprouting angiogenesis. *Circulation* 2005;112:3937–46.
- Rissanen TT, Markkanen JE, Arve K, ym. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J* 2003(a);17:100–2.
- Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, ym. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003(b);92:1098–106.
- Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, ym. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR/Flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *Am J Pathol* 2002;160:1393–403.
- Rutanen J, Rissanen TT, Markkanen JE, ym. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor -D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation* 2004;109:1029–35.
- Saaristo A, Veikkola T, Tammela T, ym. Lymphangiogenic gene therapy with minimal blood vascular side effects. *J Exp Med* 2002;196:719–30.
- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143–51.
- Schächinger V, Erbs S, Elsasser A, ym. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210–21.
- Simons M, Annex BH, Laham RJ, ym. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002;105:788–93.
- Svet-Moldavsky GJ, Chimishkyan KL. Tumour angiogenesis factor for revascularisation in ischaemia and myocardial infarction. *Lancet* 1977;1:913.
- Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, ym. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000;6:460–3.
- Tuomisto TT, Rissanen TT, Korkeela A, ym. HIF-VEGF-VEGFR-2, TNF- α and IGF pathways are upregulated in critical human skeletal muscle ischemia as studied with DNA array. *Atherosclerosis* 2004;174:111–20.
- Vajanto I, Rissanen TT, Rutanen J, ym. Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. *J Gene Med* 2002;4:371–80.
- Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003;9:694–701.
- Zhang SW, Xiao SW, Liu CQ, ym. Treatment of head and neck squamous cell carcinoma by recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy: a phase II clinical trial of 42 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003;83:2023–8.

TUOMAS T. RISSANEN, LT

tuomas.rissanen@uku.fi

Kuopion yliopisto, A. I. Virtanen -instituutti, molekulaarisen lääketieteen tutkimusryhmä

PL 1627, 70210 Kuopio

SEPPÖ YLÄ-HERTTUALA, LT, akatemiaprofessori

Kuopion yliopisto, A. I. Virtanen -instituutti, molekulaarisen lääketieteen tutkimusryhmä

ja KYS:n sisätautiklinikka

PL 1627, 70210 Kuopio