

Solunulkoisen superoksididismutaasin vaikutukset lihaskudoksen
tulehdusreaktioon ja uudissuonitukseen rotan alaraajaiskemiamallissa

Satu Martikainen

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

ALKUSANAT

Työ suoritettiin keväällä 2006 Turun yliopiston, Medicityn lääketieteellisessä tutkimusyksikössä Dos. Mikko Laukkasen Soluterapia-ryhmässä.

Kiitos Dos. Mikko Laukkaselle mahdollisuudesta työskennellä hänen tutkimusryhmässään.

Tutkimusta tukivat Suomen akatemia ja Sigrid Juseliuksen säätiö.

Tekijä:	Satu Martikainen
Tutkielman nimi:	Solunulkoisen superoksididismutaasin vaikutukset lihaskudoksen tulehdusreaktioon ja uudissuonitukseen rotan alaraajaiskemia – mallissa
English title:	Role of extracellular superoxide dismutase in angiogenesis and inflammation in the rat hindlimb ischemia
Päivämäärä:	10.3.2008 Sivumäärä: 54
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	Dos. Mikko Laukkanen

Tiivistelmä

Soluhengityksen ja aineenvaihdunnan monivaiheisissa biokemiallisissa prosesseissa hapen pelkistyminen johtaa reaktiivisten välituotteiden syntyyn. Reaktiivisia happiyhdisteitä (ROS) ovat mm. O_2^- , $ONOO^-$, H_2O_2 sekä NO. Muodostuneiden ROS:n vaikutukset ovat kaksisuuntaisia; toisaalla ne pieninä pitoisuuksina toimivat signaalimolekyyleinä mutta korkeina pitoisuuksina ne voivat reagoida solun proteiinien ja DNA:n kanssa aiheuttaen niihin rakennemuutoksia. Elimistön antioksidantit, kuten tietyt vitamiinit ja antioksidatiiviset entsyymit poistavat normaalisti ylimääräiset ROS:t.

Teollisuusmaissa aivo- ja sydäninfarktit, diabetes ja syöpätaudit ovat yleisiä. Tauteja yhdistävä tekijä on happistressi, joka johtuu runsaasta ROS:n synnystä ja niiden tehottomasta poistosta. Epätasapaino voi syntyä voimakkaan tulehdusreaktion ja kudosisäurion aiheuttamana. Mahdollisista haittavaikutuksistaan huolimatta tulehdusreaktio on tärkeä kudoksen parantumisen edistäjä. Alueen valkosolut tuottavat ROS:n lisäksi sytokiinejä, jotka puolestaan edesauttavat kudoksen uudissuonitusta. Tärkeää tapahtuman onnistumisessa on kuitenkin osallistuvien molekyylien tasapainoinen hierarkia.

Tutkimukssamme tarkastelimme solunulkoisen superoksididismutaasin (EC-SOD) vaikutuksia rotan alaraajaiskemiamallissa, jossa reisivaltimo suljetaan kolmesta kohdasta. Koe-eläimille annettiin adenovirusvälitteisesti *ec-sod* geeninä vaurioalueen lähistön lihaksiin. Kontrollieläimille puolestaan injektoidiin vastaavalle alueelle *LacZ* geenin sisältämää adenovirusta. Seurantajakson jälkeen eläimistä eristettiin operoidun jalan lihaksia, joista valmistettiin jääleikkeitä. Kudoksen rakennetta ja EC-SOD:n terapeuttisia vaikutuksia tarkasteltiin lähinnä immunohistologisten värjäysten perusteella. Värjäysten perusteella havaitsimme, että EC-SOD vähentää vaurioalueen tulehdusreaktiota, muttei edesauta kudoksen uudissuonitusta.

Tutkimustyön tulokset ovat osa artikkelia, joka tullaan julkaisemaan alan lehdessä.

Avainsanat: EC-SOD, iskemia, tulehdusreaktio, uudissuonitus

Author: Satu Martikainen
Title of thesis: Role of extracellular superoxide dismutase in angiogenesis and inflammation in the rat hindlimb ischemia
Finnish title: Solunulkoisen superoksididismutaasin vaikutukset lihaskudoksen tulehdusreaktioon ja uudissuonitukseen rotan alaraajaiskemia – mallissa
Date: 10.3.2008 Pages: 54
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Dos. Mikko Laukkanen

Abstract

Many biochemical reactions and cellular functions in the cell produce reactive oxygen species (ROS). These highly reactive compounds include O_2^- , $ONOO^-$, H_2O_2 and NO . Under normal circumstances these compounds act as signalling molecules, facilitating basic functions of the cell. When cells are experience stress, for example due to a disease, cells produce plenty of ROS. These ROS can react with cellular components like proteins, lipids and DNA and this usually leads to damages and malfunctions in the cell. Antioxidants, including some vitamins and certain enzymes neutralize these ROS reducing their hazardous effects on cells. Various pathologic processes are able to disrupt this balance leading to oxidative stress.

Welfare diseases for example myocardial infarct, stroke, diabetes and cancer are common in developed countries. Even when these diseases seem quite different, they share at least one connecting element, the oxidative stress. Oxidative stress is usually a consequence of a strong inflammation. Although inflammation can lead to tissue damage, it also helps the target tissue to heal. One important feature in this is angiogenesis. Homing white blood cells secrete cytokines, which give rise to angiogenic signals. Also ROS, produced by homing white blood cells as well as endothelial and smooth muscle cells in the area, deliver their message to the tissue.

In this study we investigated the role of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) in angiogenesis and inflammation in the rat hindlimb ischemia. Animals were subjected to unilateral hindlimb surgery. After this, the rats were treated intramuscularly with adenovirus mediated *ec-sod* gene (test group) or *LacZ* gene (control group). After follow-up time muscles were isolated from the animals and cut into frozen sections. Effects of EC-SOD on tissue recover were analysed by immunohistochemical methods. We conclude that EC-SOD diminishes inflammation but it does not improve angiogenesis in the ischemic muscle.

The results presented above are part of a bigger study which will be published in the future.

Keywords: EC-SOD, ischemia, inflammation, angiogenesis

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	7
1.1 Superoksididismutaasit	7
1.2 Solunulkoinen superoksididismutaasi	8
1.2.1 Entsyymien rakenne geeni- ja proteiinitasolla	8
1.2.2 Entsyymien esiintyminen kudoksissa	10
1.2.3 Entsyymien ilmentymisen säätely	12
1.3 Erilaisten tautitilojen yhteys entsyymiin	12
1.3.1 Valtimonkovettumatauti	12
1.3.2 Iskemia	14
1.3.3 Tulehdustaudit	15
1.3.4 Syöpä	15
1.3.5 Muita tautitiloja	16
1.4 Reaktiiviset happiyhdisteet	17
1.4.1 Vetyperoksidi	18
1.4.2 Typpioksidi	19
1.5 Tulehdusreaktio	20
1.6 Uudissuonitus	22
1.7 Iskemiatutkimuksissa käytettyjä eläinmalleja	25
1.8 Geeninsiirto ja adenovirusvektorit	25
2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS	27
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	28
3.1 Adenoviruksen valmistus	28
3.2 Rotan alaraajaiskemia vaurio	28
3.3 Immunohistologiset värjäykset	29
3.4 LacZ-värjäys	29
3.5 DHE-värjäys	30
3.6 Tilastolliset analyysit	30
4. TULOKSET	31
4.1 Iskemia aiheuttaa lihaskudokseen tulehdusreaktion, jota AdEC-SOD hillitsee	31
4.2 Iskeemisen lihaksen uudissuonitus ei parane AdEC-SOD:n vaikutuksesta	32
4.3 Iskemia -vaurio aiheuttaa O ₂ ⁻ muodostumista lihaskudokseen	34
5. TULOSTEN TARKASTELU	35
6. LÄHDELUETTELO	41

LYHENTEET

Ang-II	angiotensiini-II
CuZn-SOD	kupari-sinkki superoksididismutaasi
EC-SOD	solunulkoisen superoksididismutaasi
eNOS	endoteliaalinen typpioksidisyntetaasi
GAG	glykosaminoglykaani
I/R-vaurio	iskemia-reperfuusio-vaurio
ROS	reaktiivinen happiyhdiste

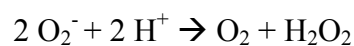
1. JOHDANTO

Ilmakehän happi (O₂) on reaktiivisuudestaan huolimatta elintärkeä molekyyli aerobisille eliöille. Lajit, jotka haluavat käyttää O₂:n tuomia mahdollisuuksia biologisissa prosesseissa, joutuvat mukautumaan O₂:n mukanaan tuomiin haasteisiin; aerobisille lajeille on syntynyt tarve antioksidatiivisille puolustukselle.

Happiradikaaleja muodostuu ympäristöön monien lähteiden kuten otsonin tai ionisoivan säteilyn vaikutuksesta. Samoin solun normaali aineenvaihdunta tuottaa happiradikaaleja, jotka ovat lyhytikäisiä, voimakkaita hapettimia, jotka pystyvät reagoimaan monien solun makromolekyylien kanssa. Soluihin on näin ollen kehittynyt antioksidatiivinen puolustusjärjestelmä, johon luetaan mm. C- ja E-vitamiinit ja erityiset antioksidatiiviset entsyymit.

1.1 Superoksididismutaasit

Superoksididismutaasit (SOD) ovat useimmissa aerobisissa eliöissä esiintyviä antioksidatiivisia metalloproteiineja. Entsyymit katalysoivat kahden superoksidi anionin (O₂⁻) dismutaatiota vetyperoksidiksi (H₂O₂) ja O₂. Katalyysireaktio on kaksiosainen, jossa entsyymien aktiivisten keskusten metallit vuoroin pelkistyvät ja hapettuvat luovuttaessaan ja vastaanottaessaan elektroneja. Dismutaatioreaktio ilman välivaiheita:



Aitotumallisista soluista löytyy kolmea SOD-isomuotoa; mangaani superoksididismutaasi (Mn-SOD), kupari-sinkki superoksididismutaasi (CuZn-SOD) ja solunulkoinen superoksididismutaasi (EC-SOD). Entsyymien isomuodot ovat jakautuneet solun eri osiin ja huolehtivat paikallisen O₂⁻ poistosta.

Ensimmäisenä löydetty SOD nimettiin CuZn-SOD:ksi, jonka alayksiköiden aktiiviset keskukset sisältävät yhden kupari- ja sinkki-ionin (McCord ja Fridovich, 1969). Tämä homodimeeri proteiini on paikannettu lähinnä sytosoliseksi entsyymiksi (Evans ym., 1974; Chang ym., 1988; Crapo ym., 1992). Geeni sijaitsee kromosomissa 21, segmenttissä 21q22 (Tan ym., 1973). Mitokondrioiden matriksissa sijaitseva mangaani superoksididismutaasi

(Mn-SOD) (Weisiger ja Fridovich, 1973a) koostuu aitotumallisilla eliöillä neljästä samanlaisesta alayksiköstä (Weisiger ja Fridovich 1973b; Borgstahl ym., 1992). Entsyymien geeni on paikallistettu puolestaan kromosomi 6:een (Church ym., 1992). Ihmisillä molempien entsyymien geneistä löytyy viisi eksonia ja neljä intronia (Levanon ym., 1985; Wan ym., 1994).

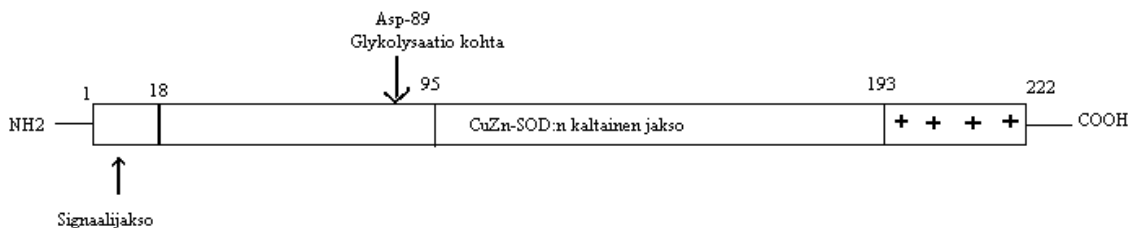
1.2 Solunulkoisen superoksididismutaasi

Stefan L. Marklund eristi ensimmäisen kerran SOD:n kolmannen isomuodon, EC-SOD:n, vuonna 1982 ihmisen keuhkokudoksesta (Marklund, 1982). Entsyymi on 135 000 Da:n kokoinen, glykolysoitu, hieman hydrofobinen proteiini, jonka neljä alayksikköä ovat kiinnittyneet toisiinsa heikkojen sidosten avulla (Marklund 1982; Tibell ym., 1987). Jokainen alayksikkö sisältää yhden kupari- ja yhden sinkkiatomin (Marklund 1982; Tibell ym., 1987). Entsyymi esiintyy tyypillisesti tetrameerinä, jossa kaksi dimeeriä stabiloituvat karboksyyli-terminaalisten päiden Cys-219 välisten disulfididistosten toimesta (Oury ym., 1996). Alayksikköiden aminoterminaalisten päiden α -kierteet ovat puolestaan tärkeitä proteiinin tetramerisoitumisessa (Tibell ym., 1996). Tetrameerisen rakenteen lisäksi EC-SOD:a tavataan myös vakaampana multimeerimuotona, oktameerina, jonka muodostumiseen vaikuttavat entsyymien karboksyyli-terminaalisten päiden rakenteet (Oury ym., 1996; Due ym., 2006).

1.2.1 Entsyymien rakenne geeni- ja proteiinitasolla

Ihmisen genomista löytyy vain yksi *ec-sod* geeni, joka on paikallistettu kromosomiin 4 (Hendrickson ym., 1990). Ihmisen *ec-sod* geeni käsittää 5900 emäsparia, jotka voidaan erottaa kolmeen eksoniin ja kahteen introniin (Folz ja Crapo, 1994). Proteiinia koodittava alue sijaitsee kolmannessa eksonissa ilman katkoja (Folz ja Crapo, 1994). Geenin promoottorialueelta transkription aloitusta ohjaavaa perinteistä TATA-laatikkoa ei ole havaittu mutta geenistä on paikallistettu useita säätelyelementtien sitoutumiskohtia, kuten aktivaattoriproteiini-1 (AP-1) ja antioksidatiivinen vaste-elementti (ARE) (Folz ja Crapo, 1994). Useat tulehdusreaktion sytokiinit lisäävät tuma faktori-kB:n (NF-kB) ilmentymistä ja tämän geeninsäätelyproteiinin sitoutumiskohta löytyy myös EC-SOD:n promoottorialueelta (Brady ym., 1997).

Aminohappojärjestyksen tasolla EC-SOD:ssa on homologinen alue CuZn-SOD:n kanssa, jonka pohjalta EC-SOD:n syntyhistoriaa on pohdittu CuZn-SOD lähtöiseksi (Hjalmarsson ym., 1987; Folz ja Crapo, 1994). Proteiinin aminoterminaaliosassa on 18 aminohapon pituinen signaaliptidi, joka johdosta EC-SOD on eritettävä proteiini (Hjalmarsson ym., 1987; Tibell, 1987). Entsyymi sisältää lisäksi yhden glykolysaatio kohdan, Asn-89 (Hjalmarsson ym., 1987; Folz ja Crapo, 1994). Vastaavasti karboksyyli-terminaaliosassa sisältää kuusi, lähekkäin asettautunutta, positiivisesti varautunutta aminohappoa (Lys-211, Lys-212, Arg-210 – Arg-215), joiden avulla EC-SOD voi sitoutua sulfatoituihin glykosaminoglykaaneihin (GAG) kuten hepariiniin ja heparaanisulfaatteihin (Hjalmarsson ym., 1987; Adachi, 1992; Sandstrom, 1992). (Kuva 1). Alayksiköiden välinen disulfidisisidos vahvistaa sitoutumista yhdistämällä kahden alayksikön GAG:n sitoutuvat domeenit (Oury ym., 1996). Vastakkaiset varaukset GAG:n ja aminohappojen välillä antavat sitoutumiselle elektrostaattisen luonteen (Karlsson ym., 1988). Petersen ym. (2004) laajentavat EC-SOD:n karboksyyli-terminaaliosan merkitystä havainnolla, jossa entsyymi sitoutuu myös tyypin I kollageeniin.



Kuva 1. Entsyymien rakenne proteiinitasolla. Entsyymien aminoterminaaliosassa on signaaliptidi EC-SOD:n eritystä varten. Aminohapot 95-193 ovat samankaltaisia CuZn-SOD:n kanssa, joita edeltää entsyymien glykolysaatio kohta. Proteiinin karboksyyli-terminaaliosassa on positiivisesti varautuneita aminohappoja, joiden avulla EC-SOD voi kiinnittyä mm. GAG:n. Kuva muokattu Folz, R.J., ja Crapo, J.D., (1994) pohjalta.

Toisaalta karboksyyli-terminaaliosassa on altis proteolyttiselle pilkkoutumiselle, jolloin entsyymi menettää sitoutumiskykensä GAG:hin (Karlsson ym., 1993). Proteolyttinen muokkaus Arg-213 ja Glu-209 kohdalta tapahtuu entsyymien biosynteesireitillä, Golgin laitteen ja entsyymien uloserityksen välisellä jaksolla (Enghild ym., 1999; Bowler ym., 2002). Solunsisäinen proteolyttinen prosessointi on kaksivaiheinen tapahtuma, jossa endoproteinaasi furiini aloittaa ja karboksipeptidaasi jatkaa karboksyyli-terminaaliosan muokkausta (Bowler ym., 2002; Olsen ym., 2004).

Sitoutumispyrkimyksensä mukaan EC-SOD voidaan jakaa kolmeen luokkaan; vähäinen affiniteetti (A-luokka), keskinkertainen affiniteetti (B-luokka) ja suuri affiniteetti (C-luokka) (Marklund, 1982; Karlsson ja Marklund, 1988). Tetrameerisen EC-SOD:n eri vahvuinen sitoutuminen katsotaan johtuvaksi eriasteisesta alayksiköiden pilkkoutumisesta; suuren affiniteetin omaavassa proteiinissa kaikki alayksiköt ovat C-muotoa (CCCC), keskinkertaisen affiniteetin omaavassa proteiinissa alayksiköt ovat puolestaan muotoa CCCA tai CCAA, alhaisimman affiniteetin proteiinille antaa alayksikkö koostumus CAAA tai AAAA (Sandstrom ym., 1992; Karlsson ym., 1993).

1.2.2 Entsyymien esiintyminen kudoksissa

Entsyymiä on havaittu vaihtelevin määrin kaikista tutkituista nisäkäslajien kudoksista (mm. keuhkot, munuainen, kohtu, istukka, sydän, luustonlihas ja verisuonisto) mutta vähemmän kuin CuZn-SOD:a tai mangaani superoksididismutaasia (Mn-SOD) (Marklund, 1984a; Marklund, 1984b; Folz ja Crapo, 1994). Puolestaan verisuonen seinämästä, jossa EC-SOD on kiinnittyneenä endoteelisolujen pinnan glykokalyksiin, löytyy runsaasti EC-SOD:a verrattuna muihin isoentsyymeihin (Karlsson ja Marklund, 1987; Karlsson ja Marklund, 1989; Stralin ym., 1995). Vallitsevana isoentsyyminä EC-SOD on myös solunulkoisissa nesteissä, kuten plasmassa, imunesteessä (Marklund ym., 1982) ja nivelnesteessä (Marklund ym., 1986a). Kuitenkin suurin osa EC-SOD:sta on sitoutuneena kudoksen soluvälitilaan ja vain pieni osa entsyymiä esiintyy solunulkoisissa nesteissä (Sandstrom ym., 1993; Karlsson ym., 1994). Kudoksessa harvat solutyypit, kuten sidekudossolut, gliasolut, epiteelisolut, hengitysepiteelin tyypin II-solut, makrofagit ja sileät lihassyöt syntetisoivat ja erittävät entsyymiä soluvälitilaan toisin kuin CuZn-SOD:n tai mangaani superoksididismutaasin (Mn-SOD) tapauksissa, joita useat solutyypit syntetisoivat (Marklund, 1990; Stralin ym., 1995; Su ym., 1997).

Kudokset syntetisoivat ja sitovat EC-SOD:n soluvälitilaan homotetrameerisena C-muotona (Sandstrom ym., 1993; Karlsson ym., 1994). Kiinnittyminen endoteelin pinnalle tai soluväliaineeseen suojaa EC-SOD:n karboksyyli-terminaalista proteolyttiseltä pilkkoutumiselta ohjaten entsyymien sijoittumista kudoksissa (Karlsson ym., 1993). Pitkälle edennyt karboksyyli-terminaalisenpään muokkaus johtaa EC-SOD:n heikentyneeseen sitoutumiseen, irrottaen entsyymiä solun pinnoilta ja soluväliaineesta, jolloin entsyymi

liukoisena proteiinina pystyy siirtymään mm. plasmaan (Sandstrom ym., 1993). Verisuonistossa EC-SOD on kiinnittyneenä endoteelisolujen pinnan glykokalyksiin (Karlsson ja Marklund, 1987; Karlsson ja Marklund, 1989) mutta pilkkoutumisen seurauksena suonenseinämän ja plasman välille muodostuu tasapaino C-muodon ja A- ja B-muotojen välillä (Karlsson ja Marklund, 1987; Karlsson ja Marklund, 1988; Karlsson ja Marklund, 1989). Proteolyysin voimistuessa esimerkiksi tulehdusreaktioiden yhteydessä, EC-SOD:n karboksyyli-terminaalisen päään pilkkoutuminen voi johtaa heikentyneeseen antioksidatiiviseen puolustukseen kyseisellä alueella mutta levittää entsyymiä laajemmalle (Karlsson ym., 1993). Liukoisuuden vaihtelujen on ajateltu turvaavan paikallisten solun pintojen lisäksi laajemmin soluvälialainta tai solunulkoisia nesteitä happiradikaalien aiheuttamilta vaurioilta (Karlsson ja Marklund, 1987; Karlsson ja Marklund, 1988).

Käsitykset EC-SOD:n sijainnista soluissa ja kudoksissa ovat laajentuneet tutkimusten nojalla, joissa entsyymi on todettu ilmentyvän myös solunsisäisesti (Ookawara ym., 2002). Havainto EC-SOD:n hepariiniin sitoutuvan alueen sisältämästä sekvenssijaksosta, joka muistuttaa tumakuljetussignaalia, mahdollistaa entsyymien siirtymisen hiiren alkion esiasteisiin rasvasoluihin (3T3-L1) *in vitro* että hiiren kateenkorvan ja kiveksen soluihin *in vivo*. Vastaavaa entsyymien siirtymistä, solun ulkopuolelta tumaan havaitaan altistamalla hiiren alkion esiasteisia rasvasoluja (3T3-L1) happistressille (Ookawara ym., 2003). Mainitut tutkimustulokset eivät ole yleistettävissä, koska eri solulinjat ilmentävät erivahvuista taipumusta ottaa entsyymiä sisälleen (Ookawara ym., 2002; Chu ym., 2006). Chu ym. (2006) hiiren endoteelisoluilla (MS-1) tehdyt kokeet eivät puolla ajatusta EC-SOD:n paikallistumisesta tumaan vaikkakin EC-SOD siirtyy soluun klatriini-välitteisen endosytoosin avulla.

1.2.3 Entsyimin ilmentymisen säätely

Tulehdussytokiinin vaikutuksia EC-SOD:n eritykseen on tutkittu valtimon seinämän sileissä lihassyissä sekä ihmisen ihon sidekudossoluilla *in vitro*. Interferoni-gamma (IFN- γ) sekä interleukiini-4 stimuloivat EC-SOD:n synteesiä sileissä lihassyissä mutta tuumori nekroosi faktori-alfa (TNF- α) alentaa entsyimin ilmentymistä (Stralin ja Marklund, 2000). Tulokset sidekudossoluilla ovat vastaavia mutta nämä solutyypit eivät reagoi sileiden lihassyiden tapaan interleukiini-4 ja niiden EC-SOD tuotanto alenee myös transformoiva kasvutekijä- β :n (TGF- β) toimesta (Marklund, 1992). Entsyimin ilmentymistä ja eritystä sileistä lihassyistä edesauttavat myös vasoaktiiviset aineet kuten angiotensiini-II (Ang-II) ja GAG:t mutteivät eräät kasvutekijät (mm. b-FGF, PDGF) (Stralin ja Marklund, 2001). Lisäksi, alhaisina pitoisuuksina signaalimolekyylinä toimiva typpioksidi (NO) tehostaa EC-SOD lähetti-RNA:n tuotantoa sekä *in vitro* että *in vivo* (Fukai ym., 2000).

1.3 Erilaisten tautitilojen yhteys entsyymiin

Happistressi liitetään monien tautien, kuten valtimonkovettumataudin, verenpainetaudin, sydän- ja alaraajaiskemian sekä diabeteksen taustalle (ks. yleiskatsaus Maulik ja Das, 2002). Liiallinen reaktiivisten happiyhdisteiden (ROS) esiintyminen altistaa kudosta myös syöpään johtaviin molekyyliinmuutoksiin. Soluvälitilassa ja verisuonten seinämässä EC-SOD vallitsevana isoentsyyminä (Karlsson ja Marklund, 1987; Karlsson ja Marklund, 1989; Sandstrom ym., 1993; Karlsson ym., 1994; Stralin ym., 1995) hillitsee toiminnallaan haitallisten ROS-yhdisteiden syntymistä dismuttoimalla O_2^- , joka muutoin nopeasti reagoisi solujen DNA:n ja proteiinien kanssa sekä NO:n kanssa muodostaen haitallista peroksinitriittiä (ONOO $^-$).

1.3.1 Valtimonkovettumatauti

Valtimonkovettumatauti on verenkiertoelimistön krooninen sairaus, jossa valtimoiden seinämiin kertyy kolesterolia, mikä alkaa häiritsemää veren virtausta. Erilaiset riskitekijät, kuten korkea alhaisen tiheyden lipoproteiini (LDL) -taso, korkea verenpaine, diabetes, tupakointi ja vähäinen liikunta lisäävät sairastumisriskiä. Herkimvät valtimonkovettumataudin esiintymispaikat ovat sepelvaltimot, aivovaltimot ja alaraajan

valtimot. Sepelvaltimossa suonen osittainen tukkeutuminen voi aiheuttaa mm. rasisrintakipua mutta täysi tukkeuma sydäninfarktin. Aivovaltimon tukkeuma johtaa aivoinfarktiin ja alaraajojen valtimoiden ahtaumat alaraajaiskemiaan.

Sydän- ja verisuonisairauksien taustalle liitetään usein lisääntynyt happistressi (ks. yleiskatsaus Maulik ja Das, 2002). Happistressi yhdessä tulehdusreaktion kanssa johtaakin valtimonkovettumataudin ensimmäisten patologisten piirteiden syntyyn, suonenseinämän ”rasvajuovien” kehittymiseen. Suuria määriä kolesterolia sisältävä verisuonenseinämä tuottaa normaalia suonenseinämää enemmän O_2^- :a (Ohara ym., 1993). Sepelvaltimotautia sairastavilla henkilöillä EC-SOD tuotanto on kuitenkin usein heikentynyt, mikä vähentää alueelle syntyneen O_2^- :n dismutaatiota (Landmesser ym., 2000; Tasaki ym., 2006). Lisääntynyt happistressi altistaa suonen rasvakertymiä hapetukselle, joista erityisesti alhaisen tiheyden lipoproteiinin (LDL) hapettuminen on valtimonkovettumataudin keskeisimpiä tapahtumia (Steinbrecher, 1988). *In vitro* kokeissa EC-SOD hillitsee tämän alhaisen tiheyden lipoproteiinin (LDL) hapettumista (Laukkanen ym., 2000; Takatsu ym., 2001). Solut pystyvät erittämään EC-SOD:a, jonka karboksyyli-terminaalinen pää on joko täyspitkä tai tyypistynyt riippuen entsyymien proteolyytisestä pilkkoutumisesta (Enghild ym., 1999; Bowler ym., 2002). Rakenteeltaan vastaavia entsyymien muotoja esiintyy valtimonkovettumataudin *in vivo* hiiri-mallissa, jossa suonenseinämän ”rasvajuovien” makrofagit ilmentävät kasvavassa määrin EC-SOD:a, jonka lähetti-RNA on tyypistynyt delettion seurauksena (Fukai ym., 1998). Havaintojen merkitys taudinkuvan edistymiseen jää nähtäväksi, koska *in vivo* kokeissa EC-SOD:n läsnäolo ei vaikuta tilastollisesti merkitsevällä tavalla suonen seinämän rasvakertymien kokoon lyhyen tai pitkän seurantajakson aikana (Laukkanen ym., 2001a; Sentman ym., 2001).

Korkea verenpaine lisää myös alttiutta valtimonkovettumataudin syntyyn. Reniini-angiotensiinijärjestelmän tärkeä komponentti Ang-II vaikuttaa mm. verenpaineen säätelyyn lisäämällä aldosteronin ja antidiureettisen hormonin eritystä sekä supistamalla verisuonia. Nostettaessa hiirien verenpainetta Ang-II:lla, EC-SOD:n lähetti-RNA:n ilmentyminen, proteiini määrä ja entsyymien aktiivisuus voimistuvat suhteessa hormonin määrään (Fukai ym., 1999). Toisaalla Ang-II vaikuttaa myös positiivisesti NADPH-oksidaasin toimintaan rotan aortan sileiden lihassyissä *in vitro* sekä *in vivo* (Griendling ym., 1994; Rajagopalan ym., 1996). Vaikka korkean verenpaineen tiedetään vaikuttavan valtimonkovettumataudin

kehitykseen, ei suonen homeostaasiin vaikuttavien tekijöiden ja happistressin suhteellista panosta taudin kehittymiselle tiedetä.

Lisäksi kolmannen valtimonkovettumataudin aiheuttajan, diabeteksen ja EC-SOD:n suhdetta on tutkittu runsaasti.

1.3.2 Iskemia

Vakavimmat valtimonkovettumataudin seuraukset kohdistuvat tärkeisiin valtimoihin, kuten sepelvaltimoihin, aivovaltimoihin sekä alaraajojen valtimoihin, joiden tukkeumat johtavat kohdekudoksen iskemiaan. Iskemiavaurioiden laajuutta ja EC-SOD:n välistä yhteyttä on tutkittu useissa eri eläinmalleissa, koska kudosisvauriot, jotka syntyvät iskemian johdosta katsotaan johtuvan ROS:n, kuten O_2^- ja $ONOO^-$ toiminnasta (Gursoy-Ozdemir ym., 2000; Park ym., 2005b).

Siirtogeenisillä hiirillä, jotka yli-ilmentävät EC-SOD:a, havaitaan pienempiä infarktialueita ja nopeampaa sydämentoiminnan palautumista (Chen ym., 1996). Samansuuntaisia tuloksia on saatu myös kani- ja rottamalleissa, joissa eläimet ovat saaneet ennen sydämen iskemia/reperfuusio-vauriota (I/R-vaurio) vektorivälitteisesti EC-SOD:a (Li ym., 2001; Agrawal ym., 2004). EC-SOD:n suhteen poistogeenisillä hiirillä luurankolihasen I/R-vaurio aiheuttaa voimakkaampia seurauksia kudokseen vertailtaessa tulehdusreaktiota, verenpurkaumia, turvotusta, hiussuonien kehitystä sekä verenvirtauksen palautumista operoituun jalkaan suhteessa villityypin hiiriin (Park ym., 2005a). Tutkimukset aivojen I/R-vaurioiden parissa tukevat edellä esitettyjä tutkimuksia EC-SOD:n vaikutuksista iskeemisissä kudoksissa. Hiirissä, jotka ilmentävät EC-SOD:a villityyppiä enemmän, havaitaan pienempi vaurioalue aivokudoksessa (Sheng ym., 1999a). Puolestaan poistogeenisillä hiirillä aivojen vaurioalue on huomattavasti suurempi ja eläimen halvautuminen voimakkaampaa verrattuna villityypin hiiriin (Sheng ym., 1999b). Aivokudoksen on todettu sisältävän suhteellisen vähän EC-SOD:a (Marklund, 1984b; Folz ja Crapo, 1994) mutta mielenkiintoinen havainto on, että aivojen I/R-vaurion jälkeen aivokuoren hermosolut ja endoteelisolut voimistavat EC-SOD tuotantoaan, mahdollisesti nostaakseen alueen antioksidatiivista puolustusta (Fukui ym., 2002). Maksa voi kärsiä iskemiasta trauman, kirurgisten toimenpiteiden sekä siirtoleikkausten yhteydessä. Hiirille suoritetun maksan I/R-vaurion yhteydessä on tutkittu EC-SOD:n, katalaasin sekä näiden yhdistelmän vaikutusta vaurion lopputulokseen. Eläimet, jotka saavat antioksidatiivisia

entsyymejä kärsivät pienemmistä I/R-vaurioista verrattaessa kontrollieläimiin (He ym., 2006).

1.3.3 Tulehdustaudit

Tulehdus on tärkeä kudusreaktio elimistöä vastaan tapahtuvalle hyökkäykselle. Nivelreuma on krooninen tulehdussairaus, jossa aktivoituneet valkosolut hyökkäävät nivelrakenteita vastaan johtaen nivelkalvon muutoksiin, liikakasvuun sekä alueen ruston että luun kulumiseen. Tutkimukset reuman ja EC-SOD:n suhteista ovat ristiriitaisia; entsyymiaktiivisuuden on havaittu olevan sekä alhainen että runsas reumaa sairastavien potilaiden nivelnesteissä, mikä vaikuttaa merkittävästi ROS:n aiheuttamiin seurauksiin (Marklund ym., 1986b; Shingu ym., 1987). Iyama ym. (2001) ovat tarkastelleet EC-SOD:n vaikutuksia reuman hiiri-mallissa, mutta lisätutkimuksia tarvitaan varmentamaan havaittuja entsyymien vaikutuksia.

Keuhkokudoksessa, jossa EC-SOD:a esiintyy luonnostaan runsaasti (Marklund, 1984a; Marklund, 1984b; Folz ja Crapo, 1994) on tutkittu keuhkotulehduksen ja EC-SOD:n suhdetta. Tulehdusta ja siitä seuraavia kudsvaurioita aiheuttavan bleomysiini-käsittelyn vaikutukset ovat pienemmät EC-SOD:a yli-ilmentävillä hiirillä verrattuna villityypin yksilöihin (Bowler ym., 2002). Poistamalla hiiriltä *ec-sod* geeni, keuhkovaurioiden on havaittu olevan voimakkaampia vertailtaessa näitä eläimiä villityypin eläimiin (Fattman ym., 2003). Poistogeenisillä eläimillä havaitaan enemmän kollageenin pilkkoutumista sekä voimakkaampaa tulehdusreaktiota (Fattman ym., 2003). Myös ihotulehdus, joka aiheutetaan 12-*O*-tetradekanoyyliforboli-3-asetaatilla (TPA), on lievempi EC-SOD:a yli-ilmentävillä hiirillä, jota puoltaa vähäisempi turvotus, happistressi sekä tulehdussolujen määrä (Ha ym., 2006).

1.3.4 Syöpä

Syöpä on yksi yleisimmistä kuolinsyistä ja merkittävä kansanterveydellinen ongelma hyvinvointivaltioissa. Ponnistelut syövän parantamiseksi ovatkin valtavat.

Syövän synnyn keskeisiä tekijöitä ovat DNA-vauriot ja siitä johtuva solujen hallitsematon kasvu. Ihon kaksivaiheisessa karsinogeeni-mallissa EC-SOD:n yli-ilmentyminen hillitsee hiiren orvaskeden epiteelisolujen jakautumista ja vähentää happistressistä johtuvia DNA-

vaurioita, mikä näkyy vähäisempänä kasvainten määränä seuranta-ajan aikana (Kim ym., 2005).

Vaikka säteilytys altistaa terveen kudoksen solu- ja kudosuutoksille, sitä käytetään yleisesti syövän hoidossa. Keuhkojen säteilytys aiheuttaa happistressiä johtaen tulehdusreaktioon ja lopulta sidekudosuutoksiin terveessä keuhkokudoksessa. Jos keuhkorakkulat ja hengitysteiden epiteelit yli-ilmentävät EC-SOD:a *in vivo*, säteilytyksen vaikutukset, kuten keuhkojen tulehdussolujen määrä, turvotus, tiivistyminen ja histologiset muutokset näyttävät olevan maltillisempia (Kang ym., 2003; Rabbani ym., 2005).

Mahdollisten etäpesäkkeiden muodostuminen, jotka saavat alkunsa alkuperäisestä kasvaimesta vaikeuttavat syövän hoitoa ja sairauden ennustettavuutta. Tutkimuksessa, jossa EC-SOD:a ilmentäviä sidekudossoluja siirrostetaan hiiriin, esiintyy vähemmän etäpesäkkeitä, koska entsyymi hillitsee syöpäsolujen O_2^- välitteistä liikumista. Positiiviset vaikutukset rajoittuvat kuitenkin vain uusiin etäpesäkkeisiin, ei ennen käsittelyä syntyneisiin etäpesäkkeisiin. Tulokset EC-SOD:n hillitsevästä vaikutuksesta syövän leviämiseen ovat lupaavia vaikka pelkän entsyymin ilmentyminen ei paranna tautia (Tanaka ym., 2001).

1.3.5 Muita tautitiloja

Valtimonkovettumataudin johdosta verisuonet saattavat alkaa tukkeutua. Tavallisimmat hoitomuodot ovat liuotushoito tai pallolaajennus, jotka avaavat tukkeutuneen verisuonen parantaen veren virtausta. Pallolaajennuksen yhteydessä suoneen saatetaan asentaa teräsverkkolieriö, joka ylläpitää suonen rakennetta mutta useimmiten ongelmaksi muodostuu valtimon uudelleen ahtautuminen. Pallolaajennus aiheuttaa myös runsaan O_2^- tuotannon (Shi ym., 2001). Vektorivälitteisesti siirretyn *ec-sod* geenin on todettu vähentävän suonen sisäpinnan liikakasvua, mikä juuri johtaa valtimon uudelleen ahtautumiseen (Laukkanen ym., 2002; Ozumi ym., 2005).

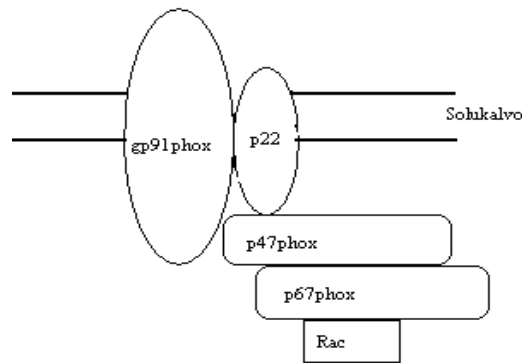
Hiirille tehdyssä parasetamolin yliannostus-kokeessa eläimissä, jotka saivat adenovirusvälitteisesti EC-SOD:a, ilmenee vähemmän maksasolujen kuoliota kuin kontrollihiirien maksassa (Laukkanen ym., 2001b).

1.4 Reaktiiviset happiyhdisteet

Reaktiivisiin happiyhdisteisiin luetaan radikaaleja ja niiden lähteitä, kuten peroksideja sekä hapen ioneja. Happiradikaaleihin luetaan esimerkiksi hydroksyyli-radikaali (OH^\cdot) ja hapen ioneihin puolestaan O_2^- ja ONOO^- . Peroksideihin luettava H_2O_2 on epästabiili yhdiste, samoin kuin NO , jonka reaktiivisuus johtuu typpi-atomien elektronivajauksesta. Näitä pieniä molekyylisiä ja hyvin reaktiivisia yhdisteitä syntyy erinäisten solutoimintojen sekä biokemiallisten reaktioiden johdosta. Yhdisteet ovat lyhytikäisiä mutta voimakkaasti ympäristönsä kanssa reagoivia, jonka takia solu pyrkii poistamaan ylimääräiset ROS:t. Antioksidatiiviset entsyymit ja eräät vitamiinit kykenevät reagoimaan vapaiden radikaalien kanssa ja neutralisoimaan ne.

Jos solun ROS:n tuotanto on epätasapainossa ROS:n poiston kanssa, syntyy soluun happistressi. Näin tapahtuu useissa tautitiloissa, kuten valtimonkovettumataudin, diabeteksen, verenpaine- ja sepelvaltimotaudin sekä iskemian yhteydessä (ks. yleiskatsaus Maulik ja Das, 2002; Tojo ym., 2005).

Nisäkäs soluissa mitokondrion elektroninsiirtoketjun entsyymit, sytokromi p450 ja ureakierron ksantiinioksidaasi sekä NAD(P)H-oksidaasi että typpioksidisyntaasi (NOS) ovat luontaisia ROS:n lähteitä. Verisuonten seinämien soluissa ja neutrofiilisissa valkosoluissa esiintyvä NAD(P)H-oksidaasi rakentuu useista alayksiköistä ja on tärkeä O_2^- tuottaja. Valkosolujen, esimerkiksi syöjäsolujen kohdatessa mikrobeja NAD(P)H-oksidaasi tuottaa paikallisesti runsaasti O_2^- :a solusyönnin avuksi. Verisuonten sileiden lihassyiden ja endoteelin NAD(P)H-oksidaasin rakenne on samankaltainen kuin neutrofiilien mutta näissä soluissa entsyymi tuottaa O_2^- jatkuvan tasaisesti (ks. yleiskatsaus Ushio-Fukai ja Alexander, 2004) (Kuva 2).



Kuva 2. Neutrofiilisen valkosolun aktivoitunut NAD(P)H-oksidaasi. Kompleksin solukalvon läpäisevät rakenteet ovat gp91phox ja p22. Solulimassa olevat osarakenteet p47phox ja p67phox siirtyvät NAD(P)H-oksidaasin aktivoituessa solulimasta solukalvolle. Rakenteiden yhdistymistä ohjaa Rac. Kompleksi kykenee siirtämään elektronin NAD(P)H:lta O_2 :lle, jolloin syntyy reaktiivista O_2^- . Kuva muokattu yleiskatsauksen Ushio-Fukai ja Alexander, (2004) pohjalta.

Verisuonten seinämän solujen NAD(P)H-oksidaasit aktivoituvat useiden kasvutekijöiden, sytokiinien, hormonien ja fysikaalisten tekijöiden välittämänä. Endoteelisolujen ja sileiden lihasyiden NAD(P)H-oksidaasi aktivoituu esimerkiksi tuumorinekroosi faktori- α (TNF- α), VEGF:n ja Ang-II välityksellä (De Keulenaer ym., 1998a; ks. yleiskatsaus Ushio-Fukai ja Alexander, 2004). Fysikaalista ärsytystä suonien seinämään aiheuttava epätasainen virtaus aktivoi ihmisen napalaskimon endoteelisolujen (HUVEC) NAD(P)H-oksidaasia *in vitro* virtaustutkimuksissa (De Keulenaer ym., 1998b). Al-Mehdi ym. (1998) tutkimukset rotan ja hiiren keuhkojen I/R-vauriomalleilla puoltavat iskemian positiivisia vaikutuksia NAD(P)H-oksidaasin aktiivisuuteen.

1.4.1 Vetyperoksidi

Muodostuttuaan O_2^- voi reagoida NO:n kanssa muodostaen $ONOO^-$ tai dismutoitua SOD:n johdosta, jolloin lopputuotteena syntyy H_2O_2 . Pienikokoisena, neutraalina ja suhteellisen pysyvänä yhdisteenä H_2O_2 on oiva signaalimolekyyli aktivoiden useita signaalinsiirtoreittejä, jotka vaikuttavat mm. endoteelisolujen jakautumiseen ja liikkumiseen. Ainostaan alhaiset H_2O_2 :n pitoisuudet palvelevat tätä vaikutusta (ks. yleiskatsaus Stone ja Collins, 2002). Useat sytokiinit ja kasvutekijät, kuten TNF- α , interleukiini-1, VEGF ja Ang-II stimuloivat endoteelisolujen H_2O_2 tuotantoa (ks. yleiskatsaus Stone ja Collins, 2002). Myös uudissuonitukseen vaikuttava angiopietiini-1

(Ang1) stimuloi ihmisen napalaskimon endoteelisolujen (HUVEC) H_2O_2 :n tuotantoa NAD(P)H-oksidaasin välityksellä (Kim ym., 2006).

Alhaiset H_2O_2 tasot edesauttavat uudissuonitukselle tärkeiden alkuvaiheiden tapahtumia *in vitro* (Shono ym., 1996; Yasuda ym., 1999). Esimerkiksi haavassa, jossa uudissuonituksella on keskeinen merkitys, syntyy paikallisesti pieniä määriä H_2O_2 :a edesauttaen paranemista (Roy ym., 2006). Alaraajaiskemia kokeessa glutationiperoksidaasia jäljittelevä Ebselen, joka poistaa H_2O_2 , heikentää vaurioalueen uudissuonitusta (Tojo ym., 2005). Rotan sydämen endoteelisoluviljelmässä (RHE) H_2O_2 voimistaa konsentraationsa mukaisesti VEGF:n ilmentymistä näissä soluissa (Chua ym., 1998), samoin kuin keratinosyytti viljelmässä (Sen ym., 2002). Viitteitä H_2O_2 mahdollisista vaikutuksista myös toiseen, keskeisesti uudissuonituksessa vaikuttavaan yhdisteeseen PDGF:ään, on saatu *in vitro* kokeista. Näissä tutkimuksissa havaitaan, että H_2O_2 aktivoi rotan aortan sileiden lihassyiden PDGF-reseptorin ja edelleen näiden solujen että naudan aortan endoteelisolujen PDGF:n lähetti-RNA:n ilmentymistä (Saito ym., 2002; Liu ym., 2006).

1.4.2 Typpioksidi

Liukoinen, vapaaksi radikaaliksi luokiteltu NO syntyy L-arginiinista typpioksidisyntaasin (NOS) katalysoimana. Tätä entsyymiä esiintyy kolmena eri isomuotona useissa kudosis- ja solutyypeissä, kuten esimerkiksi makrofageissa indusoituva NOS (iNOS), sileissä lihassyissä, hermosoluissa neuraalinen NOS (nNOS) sekä verisuonten endoteelisoluissa endotelialinen NOS (eNOS). Muodostunut NO vaikuttaa tulehdusreaktion ja suonenseinämän laajentumisen säätelyyn sekä verisuonenseinämän yhtenäisyyden ylläpitämiseen. Useissa kohdesoluissa NO sitoutuu solulimassa sijaitsevaan guanylaattisyklaasin aktiivisen keskuksen hemi-ryhmään aktivoiden syklisen guanosiinimonofosfaatin (cGMP) tuotannon ja mahdollistaen tiedonsiirron etenemisen solussa. Nopean puoliintumisaikansa vuoksi NO:n vaikutukset ovat paikallisia, välittömässä läheisyydessä oleviin soluihin kohdistuvia. Useiden vaikutusmekanismien ja tiedonsiirtoproteiineihin kohdistuvien vaikutusten takia NO tunnustetaan tärkeäksi toisiohjetiksi.

Uudissuonitukseen olennaisesti vaikuttavan VEGF:n ja NO:n välisiä suhteita on tutkittu runsaasti. Ihmisen endoteelisolujen *in vitro* käsittely VEGF:llä lisää NO:n tuotantoa ja

eNOS:n määrää näissä soluissa (Papapetropoulos ym., 1997; Hood ym., 1998). Alaraajaiskemia tutkimuksissa eNOS:n yli-ilmentyminen vaikuttaa positiivisesti vaurioalueen verisuonten kehittymiseen (Namba ym., 2003) ja vastaavasti *eNOS* geenin deleetio heikentää alueen uudissuonitusta (Murohara ym., 1998). Viitteitä siitä, että eNOS ja edelleen NO välittäisivät VEGF:n jakautumis- ja kulkeutumismuutoksia soluissa, on saatu sekä *in vitro* että *in vivo* tutkimuksista (Ziche ym., 1997; Murohara ym., 1998). Suoria todisteita NO:n mahdollisesta vaikutuksesta uudissuonituksen alkuvaiheisiin puoltavat endoteelisolujen jakautumis- ja kulkeutumismuutokset kyseiselle molekyylille (Ziche ym., 1994; Papapetropoulos ym., 1997). Väitteet NO:n ja VEGF:n toiminnallisista suhteista ovat kuitenkin ristiriitaisia. Tutkimuksia NO:n vaikutuksista VEGF tuotantoon löytyy sekä puolesta että vastaan. Aivo- ja alaraajaiskemia tutkimuksissa NO lisää vaurioalueen VEGF tuotantoa (Namba ym., 2003; Zhang ym., 2003), mutta *in vitro* kokeissa NO hillitsee VEGF:n ilmentymistä (Ghisso ym., 1999). Muutkin tekijät, kuten hapenvajaus ja epätasainen virtaus, ovat osoittautuneet muokkaavansa eNOS:n ilmentymistä endoteelisoluissa (Le Cras ym., 1996; Ziegler ym., 1998).

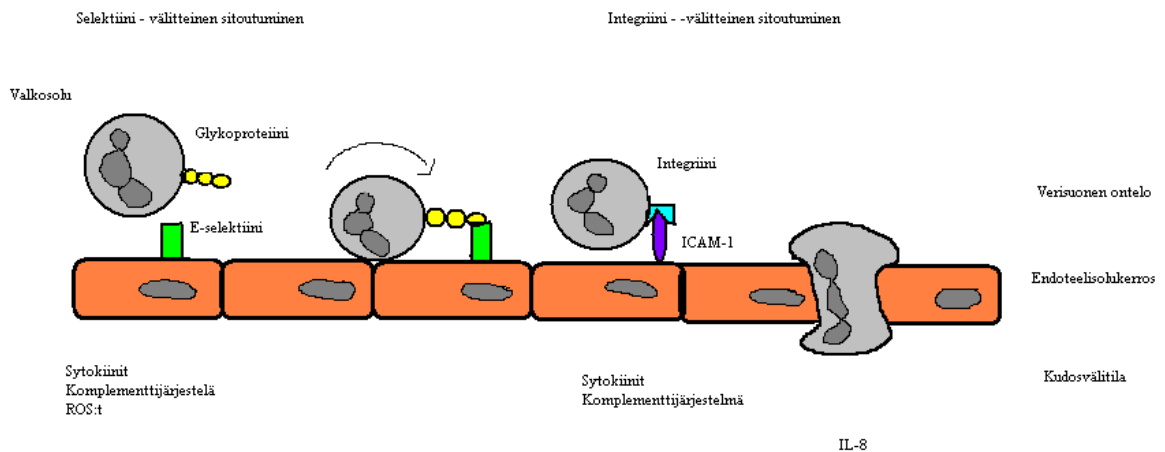
1.5 Tulehdusreaktio

Mikrobit, allergisoivat yhdisteet, myrkyt, mekaaninen vaurio ym. pystyvät aiheuttamaan elimistössä paikallisen tulehdusreaktion. Tulehdus onkin elimistön puolustusreaktio kudokseen kohdistuvaa vauriota vastaan ja se edesauttaa kudoksen paranemista poistamalla vaurion aiheuttajan sekä kuollutta kudosta. Tulehduksen histologisia piirteitä ovat tulehdussolujen kertyminen kudokseen sekä alueen verisuonimuutokset ja turvotus. Kun elimistön puolustusjärjestelmä saa viestin kudoksessa olevasta vauriosta, sen seurauksena alkaa monivaiheinen reaktiosarja, joka mahdollistaa valkosolujen siirtymisen verisuonesta kudokseen. Valkosolujen liikkeisiin vaikuttavat adheesiomolekyylit ja -ligandit sekä kemotaktiset sytokiinit reseptoreineen, joiden yhdistelmät saattavat vaihdella reaktioon osallistuvien tulehdussolujen ja kudostyyppien mukaisesti.

Sydän infarktista aiheutuvaa tulehdusreaktiota on tutkittu runsaasti. Yleistäen, soluvälitteinen tulehdusreaktio alkaa tulehdusalueen aktivoituneiden makrofagien tuottaessa sytokiineja (TNF- α ja interleukiini-1), mikä johtaa endoteelisolujen selektiinien ilmentymiseen. Palautuva sitoutuminen selektiinien (E- ja P-selektiini) ja hiilihydraatteja

sisältävien ligandien välillä hiljentää valkosolun liikettä verivirrassa, jolloin se alkaa kieriä suonenseinämää myöten. Sitoutuminen voimistuu endoteelisolun pinnalla ilmentyvien immunoglobuliinisupergeeniperheen jäsenien, kuten solunsisäisen adheesiomolekyylin-1:n (ICAM-1) ja valkosolun pinnalla ilmentyvien integriinien (Mac-1 ja LFA-1) toimesta. Valkosolut siirtyvät endoteelikerroksen läpi kudokseen seuraten kemotaktisten yhdisteiden (interleukiini-8) ainepitoisuutta kudoksessa. Kudokseen siirtyneet valkosolut tuottavat sytokiinejä ja kasvutekijöitä, jotka vaikuttavat tulehdusreaktion kulkuun. Sydänlihasiskemian yhteydessä esiintyvät aktiiviset sytokiinit, komplementtijärjestelmän proteiinit ja ROS:t vaikuttavat erinäisten adheesiomolekyylin ilmentymiseen solujen pinnalle vaikuttaen valkosolujen kotiutumiseen (ks. yleiskatsaus Frangogiannis ym., 2002) (Kuva 3).

Gaboury ym. (1993) suorittamassa rottakokeessa O_2^- voimistaa valkosolujen esitulehduksellista käyttäytymistä suonen seinämällä, jota SOD:n ja NO:n läsnäolo heikentävät. Edelleen *in vitro*, tulehdussolujen kotiutumiseen tärkeän solunsisäisen adheesiomolekyylin-1:n (ICAM-1) ja SOD:n läsnäolon suhdetta tarkastelevat kokeet, antavat viitteitä ensyymien negatiivisesta vaikutuksesta tämän adheesiomolekyylin ilmentymiseen (Mataki ym., 1994; Lin ym., 2005) vaikka entsyymi on osoittanut myös neutraalia vastetta Aoki ym. (1997) suorittamassa *in vitro* kokeessa.



Kuva 3. Valkosolun kotiutuminen tulehdusreaktion aktivoimana. Tulehdusreaktion synnyttämät sytokiinit ja ROS:t aktivoivat solujen adheesiomolekyylejä, joiden avulla valkosolu pääsee siirtymään verivirrasta endoteelikerroksen läpi vaurioalueelle. Valkosolu suunnistaa kudoksessa kemotaktisten yhdisteiden ajamana. Yleensä ensimmäisiä valkosoluja tulehdusalueella ovat neutrofiilit ja monosyytti/makrofagit. Kuva muokattu yleiskatsauksesta Frangogiannis ym. (2002) pohjalta.

1.6 Uudissuonitus

Uudissuonitus määritellään tapahtumaksi, jossa uusia hiussuonia alkaa muodostua olemassa olevista suonista. Aikuisen ihmisen verisuonisto on pääsääntöisesti pysyvä mutta monet biologiset prosessit hyödyntävät uudissuonitusta palauttaakseen tai ylläpitääkseen kudoksen normaalia toimintaa. Näitä ovat mm. haavan paraneminen tai kohdun limakalvon uusiutuminen. Verisuonien kasvun voimistuminen tai heikkeneminen liittyy myös moniin patologisiin tiloihin, kuten syöpään, psoriakseen, niveltulehdukseen, iskemiaan tai osteoporoosiin (ks. yleiskatsaus Carmeliet, 2000).

Kudoksen aineenvaihdunnan vaatimukset sekä kudossympäristö ohjaavat uudissuonitusta. Uusia hiussuonia alkaa kehittyä monimutkaisen tapahtumaketjun seurauksena. Ensimmäiset keskeiset vaiheet uudissuonituksessa ovat endoteelisolujen alla olevan tyvikalvon hajoaminen aktivoituneiden endoteelisolujen tuottamien proteaasien toimesta, suonenseinämän laajentuminen ja läpäisevyyden kasvu, johon vaikuttavat mm. NO ja VEGF. Integriinit, kadheriinit, selektiinit ja immunoglobuliinien supergeeniperheen jäsenet ovat solujen adheesiomolekyylejä, jotka välittävät sekä solu-solu että solu-soluväliaine vuorovaikutuksia. Uudissuonitukseen vaikuttavat kasvutekijät pystyvät lisäämään näiden molekyylien ilmentymistä endoteelisoluissa, jotka edelleen säätelevät endoteelisolujen liikkeitä ja elinkykyä eri vaiheissa suonien kehitystä yhdessä kasvutekijöiden kanssa. Mahdollisesti angiopoietiini-2 toimesta heikentyvät solujenväliset liitokset, edesauttavat endoteelisolujen siirtymistä kudossvälitilaan. Siirtymistä ohjaavat myös proteaasit, kuten matriksin metalloproteaasit (MMP), plasminogeenin aktivaattorit ja heparinaasit, jotka hajottavat soluväliainetta vapauttaen ja aktivoivat kasvutekijöitä (VEGF, FGF). Kasvutekijät lisäävät endoteelisolujen jakautumista, jotka lopulta järjestäytyvät tyvikalvon omaaviksi alustaviksi suoniksi. Suoni alkaa tasapainottua perisytyttien ja lihassolujen toimesta, koska ne tukevat endoteelisolun voittoista suonien pintaa. Tasapainotukseen vaikuttavat mm. PDGF ja angiopoietiini-1. Solujen erilaistuminen ja kypsyminen muokkaavat syntyneet suonet kudoksen tarpeita vastaavaksi verkostoksi (ks. yleiskatsaus Carmeliet, 2000).

Uusien verisuonien tasapainoinen kasvu ja kypsyminen ovat tarkasti säädeltyjä tapahtumia, joissa useilla solutyypeillä, kuten endoteelisoluilla, lihassoluilla, perisytyteillä ja sidekudossoluilla ja yhdisteillä (VEGF, PDGF, FGF, TGF- α , interleukiini-8, TNF- α ,

angiopoietiini-1 ja -2) on tärkeä merkitys (ks. yleiskatsaus Carmeliet, 2000). Sytokiinien ja kasvutekijöiden lisäksi, ROS:t vaikuttavat uudissuonitusta ohjaavien transkriptiofaktoreiden, kuten tuma faktori kB:n (NF-kB) ja hypoksia indusoitu faktori-1 α (HIF-1 α) ilmentymiseen sekä soluväliainetta hajottavien entsyymien, matriksin metalloproteaasien (MMP) aktivaatioon (ks. yleiskatsaus Ushio-Fukai ja Alexander, 2004). Erityisesti hepariiniin sitoutuvalla, homodimeerisellä VEGF:llä (VEGF-A) on tärkeä rooli uudissuonituksen kulussa. Molekyylä kuuluu VEGF-perheeseen, johon luetaan kuuluvaksi VEGF-B, -C, -D lisäksi myös istukkakasvutekijä (PIGF). Vaihtoehtoisesta lähetti-RNA:n pilkkoutumisesta johtuen VEGF esiintyy viitenä isomuotona, jotka omaavat erilaisia piirteitä (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ja VEGF₂₀₆). Kasvutekijälle löytyy kolme reseptoria, joihin eri VEGF -perheen muodot sitoutuvat vaihtelevasti. Endoteelisolujen solukalvoilla ilmentyvät tyrosiinikinaasireseptorit, endoteelikasvutekijäreseptori-1 (VEGFR-1) ja endoteelikasvutekijäreseptori-2 (VEGFR-2), joista erityisesti viimeksi mainitun katsotaan liittyvän suuremmin uudissuonituksen vaiheisiin (ks. yleiskatsaus Ferrara, 2004). Esimerkiksi H₂O₂ välittää endoteelikasvutekijäreseptori-2:n (VEGFR-2) aktivoitumista vieden eteenpäin VEGF:n viestiä (Colavitti ym., 2002; Ushio-Fukai ym., 2002). Sama reseptori kytkeytyy myös VEGF:n ja eNOS:n välisiin suhteisiin naudan lisämunuaisen kuoren hiussuonen endoteelisolun (ACE) -viljelmässä *in vitro* (Shen ym., 1999). Useat kudokset ja solutyypit ilmentävät VEGF:ä ja monet tekijät, kuten kasvutekijät, sytokiinit, hormonit ja alhainen happipitoisuus lisäävät sen ilmentymistä (ks. yleiskatsaus Ferrara, 2004). Useat *in vitro* ja *in vivo* kokeista saadut tulokset painottavatkin tämän kasvutekijän tärkeää roolia uudissuonituksessa; molekyylä lisää endoteelisolujen elinkykyä, stimuloi niiden jakautumista, kulkeutumista ja esisuoniksi asettautumista, vaikuttaen lisäksi suonenseinämän läpäisevyyteen. Soluihin kohdistuvien vaikutustensa lisäksi VEGF stimuloi endoteelisolujen NAD(P)H-oksidaasia *in vitro* (Ushio-Fukai ym., 2002) ja syntyneet ROS:t voimistavat edelleen uudissuonituksen tapahtumia (Abid ym., 2000; Ushio-Fukai ym., 2002).

Reniini-angiotensiinijärjestelmän peptidi, Ang-II:n vaikutuksista uudissuonitukseen on erinäisiä havaintoja. Peptidi vaikuttaa suonen sileiden lihassyiden ja endoteelisolujen kasvuun *in vitro* angiotensiini tyyppi 1 (AT1) -reseptorin välityksellä (Stoll ym., 1995). Vaikka Ang-II:n vaikutukset solujen kasvuun *in vitro* ovat vielä kiisteltyjä, on peptidin

vaikutuksista uudissuonitukseen *in vivo* tehty useita havaintoja. Peptidin suoria ja epäsuoria vaikutuksia uudissuonitukseen ovat esittäneet mm. Fernandez ym. (1985) ja Sasaki ym. (2002). Edelleen rotan alaraaja iskemia-mallissa Ang-II voimistaa iskemian jälkeistä uudissuonitusta lisäämällä VEGF:n määrää lihaksessa (Tamarat ym., 2002). Myös sydäninfarktialueelta eristetyissä myofibroblasteissa Ang-II lisää VEGF ja endoteelikasvutekijäreseptori-1 (VEGFR-1) määrää *in vitro* (Chintalgattu ym., 2003). Vaikutukset VEGF:n ilmentymiseen saattavat osaltaan selittää tämän oktapeptidin ominaisuuksia uudissuonituksessa NAD(P)H-oksidaasin stimulaation lisäksi (ks. yleiskatsaus Ushio-Fukai ja Alexander, 2004).

Tulehdusreaktiolla on tärkeä rooli iskemiavaurion jälkeen alkavassa verisuonten uusiutumisessa (Polverini ym., 1977; Arras ym., 1998; Sasaki ym., 2002). Aktivoituneet, iskemia-alueelle tunkeutuneet monosyytti/makrofagit ja T-lymfosyytit erittävät uudissuonitukseen vaikuttavia sytokiinejä sekä kasvutekijöitä kuten TNF- α , bFGF ja VEGF (Arras ym., 1998; Sasaki ym., 2002). Nämä yhdisteet vaikuttavat edelleen endoteelisolujen ja sileiden lihasyiden NAD(P)H-oksidaasin aktivaatioon (De Keulenaer ym., 1998a; ks. yleiskatsaus Ushio-Fukai ja Alexander, 2004). Kemiallisten viestien lisäksi, iskemia ja siitä johtuvat suonien seinämän fysikaalisten voimien muutokset vaikuttavat NAD(P)H-oksidaasin aktiivisuuteena (Al-Mehdi ym., 1998; De Keulenaer ym., 1998b; ks. yleiskatsaus Ushio-Fukai ja Alexander, 2004). Tojo ym. (2005) toteavat tutkimuksensa pohjalta, että alaraajaiskemiassa syntyy runsaasti ROS:ja, jotka vaikuttavat lihaksen patologiin vasteisiin.

Lisäksi iskeeminen alue kärsii hapenvajauksesta, joka lisää VEGF:n ilmentymistä proteiinin lähetti-RNA:n tasolla *in vitro* (Shweiki ym., 1992; Levy ym., 1995; Liu ym., 1995) sekä *in vivo* (Hashimoto ym., 1994; Li ym., 1996). Li ym. (1996) tekemässä sydänlihaksen iskemia tutkimuksessa itse VEGF:n lisäksi endoteelikasvutekijä reseptorit-1 ja -2 (VEGFR-1 ja VEGFR-2) ilmentyvät rotan iskeemisessä sydänlihaksessa. Edelleen rotan sidekudossoluilla tehdyssä *in vitro* tutkimuksessa, jossa soluja altistetaan vähähappisille olosuhteille yhdessä PDGF:n kanssa, voimistaa solujen VEGF tuotantoa (Petersen ym., 2003). Tutkittaessa ainoastaan PDGF:n vaikutuksia rotan korvanlehti-iskemiassa, havaitaan samansuuntaisia tuloksia koskien VEGF:n ilmentymistä (Wang ym., 2006).

1.7 Iskemiätutkimuksissa käytettyjä eläinmalleja

Monia tauteja voidaan luetella liittyväksi iskemiaan. Sydän- ja aivoinfarktut ovat yksi selkeimmistä tapauksista, joissa sepel- tai aivovaltimon tukkeutuminen johtaa alueen heikentyneeseen ravinnon ja hapen saantiin. Heikentyneen verenkierron syynä ovat usein valtimoiden kalkkiutumisen sekä veritulpat, jotka ovat akuutin iskemian yleisimmät aiheuttajat. Sokeritauti on alaraajaiskemialle altistava sairaus, jossa potilaan heikko jalkojen hoito saattaa johtaa krooniseen alaraajaiskemiaan ja pahimmillaan amputaatioon. Alaraajaiskemian hoidossa käytetään verisuonikirurgiaa mutta monissa tapauksissa hoito ei ole mahdollista. Lääkehoitoja, jotka parantaisivat alaraajaiskemian verenkiertoa, ei ole tällä hetkellä tiedossa. Uusien verisuonten muodostuminen iskemian-alueelle on tärkeää, jotta kudoksen aineenvaihdunta ja sitä kautta kudoksen toiminta normalisoituvat.

Paljon käytetty eläinmalli alaraajaiskemiamalleja tutkimuksissa on kanin alaraajaiskemiamalli (Pu ym., 1994) mutta myös hiiri- ja rottaeläimiä käytetään (Couffinhal ym., 1998; Mack ym., 1998), vaikka kohdesuonien koko onkin pienempi verrattaessa suurempiin eläimiin. Se kuinka iskemia aiheutetaan kudokseen, vaihtelee mallikohtaisesti. Voidaan joko poistaa kokonaisuudessaan reisivaltimo ja sulkea valtimosta jatkuvia ja haarautuvia suonia tai ainoastaan sulkea reisivaltimon pinnalliset osat. Ensimmäiseksi mainitussa mallissa syntyy voimakas, akuutti iskemia, jonka seurauksena operoituun jalkaan voi kehittyä jopa kuolio (Pu ym., 1994). Toisaalta, pelkän reisivaltimon sulkeminen ei johda pysyvään iskemiaan (Ito ym., 1997). Vaihtoehtoisissa iskemia-mallissa vain pinnallinen reisivaltimon alue poistetaan mutta kiertävä ja syvemmät reisivaltimon osat suljetaan, jolloin iskemia kehittyy pohkeeseen (Rissanen ym., 2003).

1.8 Geeninsiirto ja adenovirusvektorit

Geenitekniikan sovellutusten laajetessa katseet kohdistuvat geeniterapian mahdollisuuksiin korjata erilaisia tautitiloja. Geeniterapia perustuu yksinkertaisuudessaan villityypin geenin vientiin soluihin korvaamaan vaurioituneen geenituotteen. Geeninsiirto menetelmiä on useita. Geeni voidaan viedä soluun vektorilla (virusvälitteisesti, lipidipohjaiset rakenteet, plasmidi), kemiallisesti (CaCl_2) tai mekaanisesti (injektio, ”geenipyssy”). Geeninsiirron onnistuminen on verrannollinen siihen, kuinka tehokkaasti geeniä saadaan siirrettyä

kohdesoluihin, miten geeni ilmentyy proteiinitasolla ja kuinka pysyvä tämä ilmentyminen on. Lisäksi lopputulokseen vaikuttavat yksilössä ilmenevät mahdolliset tulehdus- ja immuunireaktiot siirtogeeniä ja/tai vektoria vastaan.

Virusvälitteisistä vektoreista adenovirukset ovat paljon käytettyjä. Rakenteeltaan adenovirukset ovat vaipattomia, ikosahedraalisia DNA-virusia, jotka aiheuttavat ihmisille lähinnä lieviä hengitysteiden infektioita. Infektoidessaan solun adenovirus kiinnittyy säieproteiinillaan solun pinnalla olevaan coxsackie virus-adenovirus (CAR) reseptoriin, mikä mahdollistaa sitoutumisen edelleen integriinien kanssa. Sitoutuminen laukaisee klatriinivälitteisen endosytoosin, jonka avulla virus siirtyy solun sisälle. Lopulta adenovirus vapautuu endosomista solulimaan kapsidin rakennemuutosten seurauksena. Matka jatkuu mikrotubulusten avustuksella kohti tumaa, jonne adenovirus vapauttaa noin 36 kiloemästä pitkän genominsa. Aluksi genomista syntetisoidaan DNA:n replikaatioon tarvittavat proteiinit ja myöhemmin proteiinisynteesissä puolestaan rakenneproteiinit. Kypsät viruspartikkelit vapautuvat solun hajotessa.

Geeninsiirtovektorina adenovirus omaa useita hyödyllisiä ominaisuuksia, kuten kykyä infektoida useita, jakautuvia että jakautumattomia solutyyppejä, ilmentää voimakkaasti siirtogeeniä ja mahdollisuutta siirtää vektoriin suuriakin genejä. Onnistuneesti adenovirusta on käytetty esimerkiksi sydäninfarkti-, maksa- ja valtimon sisäpinnan liikakasvun tutkimuksissa, joissa siirtogeeninä on EC-SOD (Laukkanen ym., 2001b; Li ym., 2001; Laukkanen ym., 2002; Ozumi ym., 2005). Varjopuolia adenoviruksen käytölle vektorina syntyy valppaan immuunipuolustuksen puitteissa. Ensimmäisen sukupolven vektorit sisältävät vielä viruksen omia proteiineja, jotka aiheuttavat immuunijärjestelmän aktivoitumisen vektoria vastaan. Tästä seuraa, ettei siirtogeeni ilmenny pitkäaikaisesti kohdesoluissa, eikä samaa serotyypin adenovirusta voida toistamiseen käyttää.

Usein geeniterapian tarkoituksena on saavuttaa pitkäaikainen, säädelty siirretyn geenin ilmentyminen kohdekudoksessa. Tämä tavoite asettaa moniulotteisia haasteita geeninsiirto menetelmien kehityksessä mutta se ei ole lannistanut jatkamasta geeniterapiamuotojen kehittelyä kohti kliinisiä sovellutuksia.

2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Kudos alkaa kärsiä iskemiasta, kun sen hapen saanti heikkenee. Alueelle syntyy happistressi erinäisten solutapahtumien seurauksena. Solujen antioksidantit pystyvät tasapainottamaan ja palauttamaan kudokseen syntyneitä ROS:ja, jotka alhaisina pitoisuuksina palvelevat useissa solun signaalinsiirto tapahtumissa.

Tutkimuksen tarkoituksena on tarkastella adenovirus-välitteisen EC-SOD:n vaikutuksia rotan alaraajaiskemiamallissa. Erityisesti keskitytään tarkastelemaan kudoksen tulehdusreaktiota ja uudissuonitusta vaurioalueella.

Hypoteeseina ovat

1. EC-SOD vähentää vaurioalueen tulehdusreaktiota
2. EC-SOD parantaa vaurioalueen uudissuonitusta

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Adenoviruksen valmistus

Adenovirusvektorit valmistettiin Dos. Mikko Laukkasen toimesta Turun yliopiston Biotekniikan keskuksen, BTK:n viruslaboratoriossa.

3.2 Rotan alaraajaiskemia vaurio

EC-SOD:n vaikutuksia alaraajaiskemiaan tutkittiin kolmen aikapisteen (3, 7 ja 10 vrk) eläinryhmillä (n = 8). Eläimet jaettiin satunnaisesti aikapisteisiin ja edelleen aikapisteen sisäisiin koe- tai kontrolliryhmiin.

4-5 viikon vanhoille urospuolisille Fisher-rotille (Harlan, Horst, Hollanti) suoritettiin nukutuksessa vasemman takajalan iskemia-vaurio. Eläimet punnittiin (g) ennen operointia. Nukutusaineena käytettiin 1:1 suhteella Hypnorm:a (0,315 mg fentanyylisitraatti + 10 mg fluanisoni / ml H₂O, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgia) ja Dormicum:a (5mg/ml, Roche, Basel, Sveitsi), joka injektoidiin vatsaonteloon (0,15 – 0,20 ml / 100 g). Tarvittaessa nukutusainetta lisättiin operaation aikana. Vasemman takajalan valtimot etsittiin avaamalla iho ja paljastamalla suonet lihaskalvojen ja lihassykimppujen alta. Reisivaltimo ja sen haarautumia (*circumflexa femoralis lateris*, *artery femoris*, *artery saphena* ja *artery poplitea*) suljettiin käyttämällä 6-0 silkkilankaa. Vaurion teon jälkeen lihakseen injektoidiin noin 50 µl AdLacZ tai 50 µl AdEC-SOD (pfu 0,5 x 10⁹). Haava suljettiin 5-0 vinyylilangalla, jonka jälkeen vaurioalue puhdistettiin vielä paikallisantiseptiliuoksella (Betadino, Leiras). Virkoamisen nopeuttamiseksi eläimet saivat operaation jälkeen 30-50 µl Narcanti:a (0,4mg/ml, Bristol-Myers Squibb AB, Anagni, Italia).

Kymmenen päivän aikapisteen eläinten vauriot suoritti MD PhD Antonia Curcio ja kolmen ja seitsemän päivän vaurion FM Juha Laurila. Haavan sulkemisesta huolehtivat tämän tutkielman tekijän lisäksi MD PhD Antonia Curcio ja Dos. Mikko Laukkanen.

Kaikkien aikapisteiden eläimet selviytyivät alaraajaiskemia-vaurion teosta ja toipuivat hyvin. Seuranta-ajan aikana eläimissä ei havaittu ulkoisia iskemian aiheuttamia vaurioita, kuten jalkaterän sinertävyyttä, kuoliota tai eläinten hyvinvoinnin heikentymistä. Ruumiinpainoissa ei havaittu eroja vaurion teon ja lopetuksen välillä.

Eläinkokeet on hyväksynyt Etelä-Suomen Eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen sosiaali- ja terveystieteiden osasto, koe-eläinlup numerolla 1547/05.

3.3 Immunohistologiset värjäykset

Seuranta-aikojen päätyttyä takajalasta eristettiin reisivaltimoa kohtisuoraan sijaitsevaa lihaskudosta kattaen vaurionvälisen alueen, jolloin lihasnäyte käsittää seuraavat lihasryhmät: *m. biceps femoris*, *m. semitendinosus*, *m. semimembranosus* ja *m. adductor*.

Lihaskudosta jäädytettiin nestetyössä ja siitä valmistettiin välittömästi 10 µm jääleikkeitä Micron HM 500 OM kryomikrotomilla (Microm, Walldorf, Saksa).

Lihaksen yleisrakenteen selvittämiseksi leikkeet värjättiin hematoksyliini-eosiinilla (HE) (Sigma, MI, USA). Leikkeille suoritettiin endoteeli-värjäys von Willebrand faktorilla (vWF), jossa primaari vasta-aineena Rabbit polyclonal to von Willebrand Factor 1:800 (Abcam, Cambridge, UK) ja sekundaari vasta-aineena Labelled polymer-HRP anti-rabbit (DakoCytomation, Glostrup, Tanska). Tulehdussolujen havaitsemiseksi tehtiin CD68-värjäys, jossa primaari vasta-aineena Mouse anti-rat CD68 1:100 (Serotec, Oxford, UK) ja sekundaari vasta-aineena Goat anti-mouse IgG:HRP 1:50 (Serotec, Oxford, UK).

Immunohistokemiallisten värjäyksen vaiheet: 10 µm jääleikkeitä huuhdeltiin 1 X PBS 10 minuuttia, jonka jälkeen leikkeitä inkuboitettiin 3 % H₂O₂:ssa 20 minuuttia. Viiden minuutin 1 X PBS huuhtelun jälkeen, leikkeille pipetoitiin FCR-blokkaria, joka vaikutti 30 minuuttia. Primaari vasta-ainetta inkuboitettiin tunnin ajan, jonka jälkeen leikkeitä pestiin 2 x 30 minuuttia 1 X TBS:llä. Sekundaa vasta-ainetta inkuboitettiin leikkeillä 30 minuuttia, jota seurasi 2 x 10 minuutin 1X PBS pesut. Leikkeille pipetoitiin substraatti-kromogeeni liuos (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Tanska), jonka annettiin vaikuttaa leikkeillä 3 minuuttia/tarvittava aika. Reaktio pysäytettiin laittamalla leikkeet veteen. Leikkeet vastavärjättiin hematoksyliini-eosiinilla (HE). Permount:n (Fisher Science, Pittsburgh, PA, USA) pedattujen leikkeiden annettiin kuivua vetokaapissa yön yli. Immunohistologiset värjäykset analysoitiin Leitz Aristoplan Wild MPS52 valomikroskoopilla 40X objektilla, jossa yhden laskentaruudun koko on 0,066 mm² (Leica, Heerbrugg, Switzerland).

3.4 LacZ-värjäys

Kontrollieläimille tehtiin LacZ-värjäys, jolla varmistettiin että lihasnäyte oli eristetty vaurioalueelta, johon injektio kohdistuivat. Värjäystä varten valmistettiin 1:50 laimennettu

käyttöliuos x-gal stokista (50 mg/ml, Promega, WI, USA) ja värjäysliuoksesta. Objektilaseille pipetoitiin käyttöliuosta ja ne asetettiin kosteaan, valolta suojattuun kammioon + 37 °C:n kuudeksi tunniksi. Leikkeet huuhdeltiin 1 X PBS:llä ja vastavärjättiin hematoksyliini-eosiinilla (HE).

3.5 DHE-värjäys

In situ muodotuneen O_2^- :n havaitsemiseksi 30 μm jääleikkeet värjättiin dihydroetidiumilla (DHE), joka reagoi spesifisesti solusisäisen O_2^- kanssa muuttuen punaiseksi, fluoresoivaksi yhdisteeksi (Zanetti ym., 2005). 1 M DHE laimennettiin asetonilla 0,2 μM ja pipetoitiin leikkeiden päälle. Leikkeitä inkuboitiin kosteassa kammiossa + 37 °C 30 minuuttia. Leikkeet pedattiin Aquamount:lla (Sigma, St. Louis MO, USA), jonka jälkeen mikroskojettiin Zeiss Wide-field mikroskoopilla, AxioVision Rel. 4.3 ohjelmalla käyttäen TRITC ja H/DIC- suodattimia (Zeiss, Jena, Saksa). Lopuksi leikkeet vastavärjättiin hematoksyliini-eosiinilla (HE).

Objektilasit, joissa kolmesta viiteen leikettä, valittiin satunnaisesti kaikkiin edellä mainittuihin värjäyksiin.

3.6 Tilastolliset analyysit

Tulokset esitettiin keskihajontana. Eroja kahden ryhmän välillä verrattiin T-testin avulla käyttäen kaksisuuntaista vastahypoteesiä. Tilastollinen merkitsevyys määritellään $P < 0.05$ mukaisesti.

4. TULOKSET

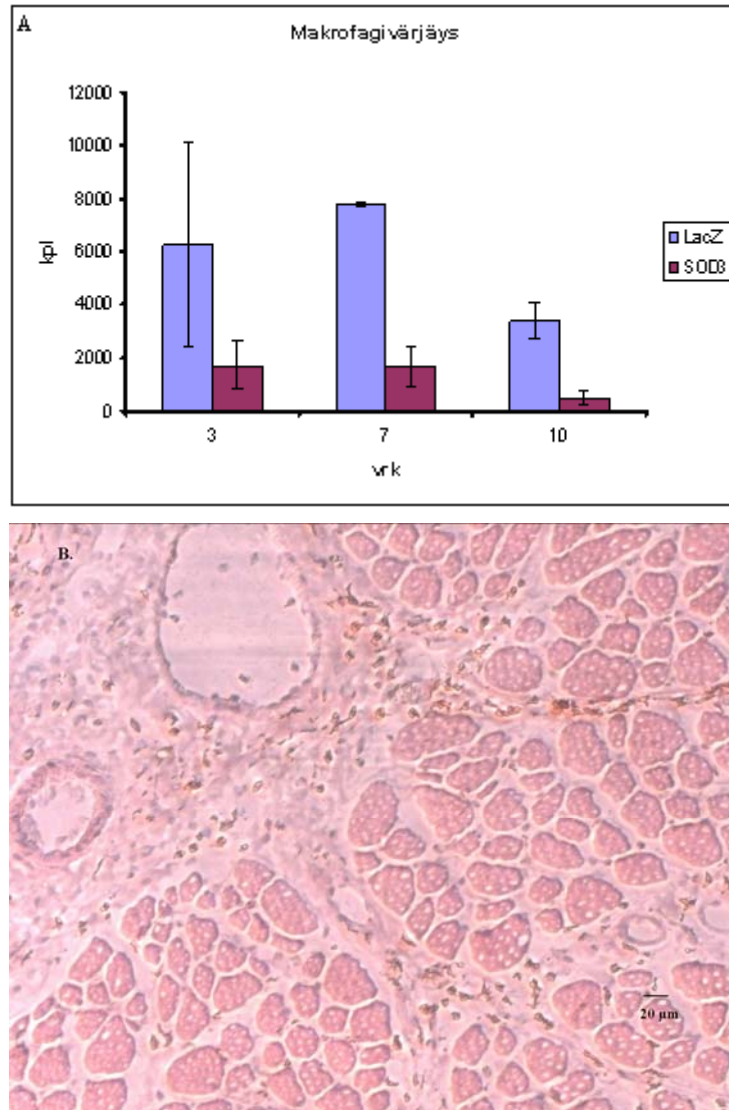
Seuranta-aikojen päätyttyä takajalasta eristettiin vaurioalueen käsittävää lihaskudosta. Valmistetuille leikkeille suoritettiin immunohistokemiallisia värjäyksiä, joiden pohjalta tarkasteltiin EC-SOD:n vaikutuksia alaraajaiskemiaan.

4.1 Iskemia aiheuttaa lihaskudokseen tulehdusreaktion, jota AdEC-SOD hillitsee

Tarkastelimme kuinka EC-SOD vaikuttaa iskemia-vaurion aiheuttamaan tulehdusreaktion kehittymiseen rotan alaraajassa. Oletuksena oli, että EC-SOD vähentäisi tulehdusta.

Tulehdussolujen, erityisesti makrofagien määrää lihaskudoksessa tarkasteltiin CD68-värjäyksellä. Makrofageja havaittiin sekä lihassykimppuja ympäröivillä sidekudoskalvoilla että lihaksen uloimmalla sidekudoskalvolla, kun koko leikepinta-ala otettiin huomioon laskettaessa CD68-positiivisten solujen määrää.

Kaikkien aikapisteiden kontrollieläimissä esiintyi enemmän tulehdussoluja verrattaessa koeryhmän eläimiin (Kuva 1). Ensimmäisen aikapisteen (3 vrk) kontrollieläimillä esiintyi neljä kertaa enemmän makrofageja verrattaessa koeryhmän eläimiin ($P = 0.014$). Toisen aikapisteen (7 vrk) kontrollieläimillä makrofagien määrä oli viisinkertainen verrattaessa saman aikapisteen koeryhmän ($P = 0.0061$). Viimeisen aikapisteen (10 vrk) kohdalla makrofagien lukumäärän ero oli seitsenkertainen ryhmien välillä ($P = 0.000009$). Voimakkaimmillaan tulehdus oli ensimmäisen ja toisen aikapisteen aikana, joka tukee aikaisempaa havaintoa monosyyttien kerääntymisestä iskeemiselle alueelle (Arras ym., 1998). Tulehdussolujen määrän voisi katsoa lisääntyvän AdLacZ ryhmässä ensimmäisen ja toisen aikapisteen välillä mutta AdEC-SOD ryhmässä kasvu vastaavilla aikapisteillä olisi maltillisempaa. Edelleen viimeisen aikapisteen havainnot tulehdussolujen määristä ilmentäisivät voimakkaampaa laskua AdEC-SOD ryhmässä verrattuna AdLacZ ryhmään. Hypoteesi, että EC-SOD vähentäisi lihaskudoksen tulehdusta, näyttäisi tämän tutkimustuloksen perusteella pitävän paikkaansa.



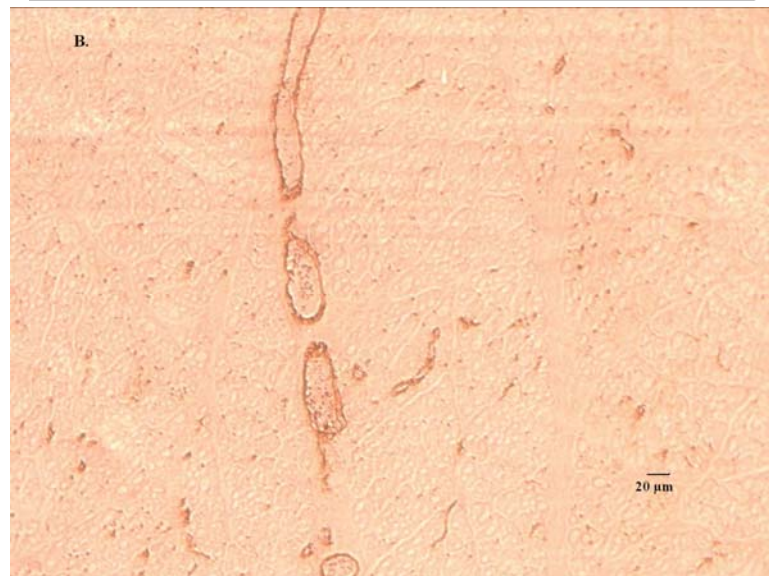
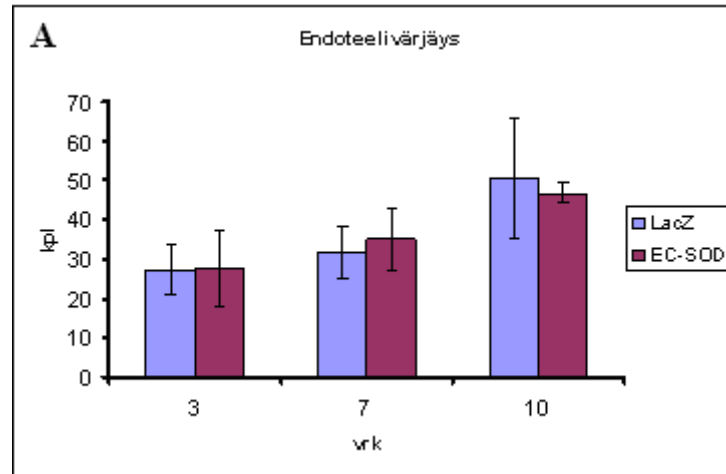
Kuva 1. A. Makrofagien lukumäärät iskeemisen takajalan luustonlihaksessa 3.vrk, 7.vrk ja 10.vrk operaatiosta AdLacZ- ja AdEC-SOD-ryhmissä (n = 8). Voimakkaimmillaan tulehdus oli 3. ja 7. vrk:na operaatiosta. B. Kudoksen makrofageja tarkasteltiin CD68-värjäyksen avulla. Esimerkkikuvassa 3.vrk kontrolliryhmän näyte, 40 X suurennos.

4.2 Iskeemisen lihaksen uudissuonitus ei parane AdEC-SOD:n vaikutuksesta

Uudissuonituksen esiintymistä arvioitiin eri aikapisteissä (3, 7 ja 10 vrk) von Willebrand faktori (vWF) -värjäyksellä laskemalla muodostuneita hiussuonia. Oletuksena oli, että EC-SOD parantaisi vaurioalueen uudissuonitusta. Laskenta suoritettiin koko leikepinta-alan kattavan 20 satunnaisotoksen pohjalta.

Kuten kuvasta 2. nähdään koe- ja kontrollieläinten välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja uudissuonituksen voimakkuudessa missään aikapisteessä. Lisäksi

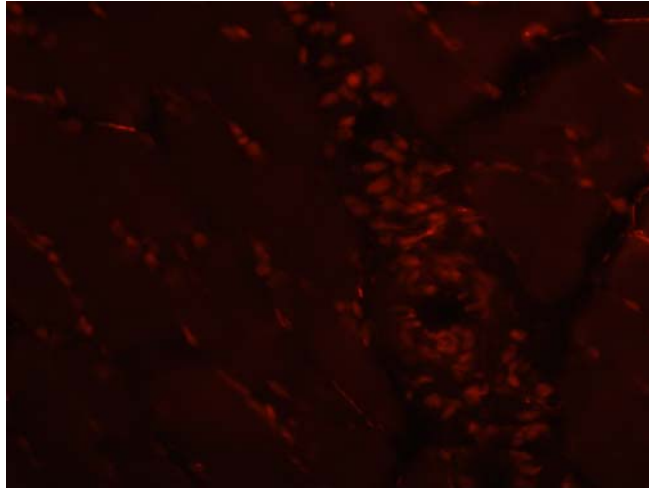
kummankin eläinryhmän hiussuonten määrissä näyttäisi olevan vähäistä kasvua seuranta-ajan edetessä. Hypoteesi, että EC-SOD parantaisi lihaskudoksen uudissuonitusta tasapainottamalla kudoksen happistressiä, ei tämän tutkimustuloksen perusteella siis pidä paikkaansa.



Kuva 2. A. Vaurioituneen lihaksen uudissuonitusta tarkasteltiin eri aikapisteissä endoteelivärjäyksen perusteella. Kaikissa aikapisteissä AdLacZ- ja AdEC-SOD-ryhmien (n = 8) väliset eroavaisuudet ovat tilastollisesti merkityksettömiä. B. Kudoksen uudissuonitusta tarkasteltiin von Willebrand faktori (vWF) -värjäyksen avulla. Esimerkkikuvassa 10.vrk kontrolliryhmän näyte, 40 X suurennos.

4.3 Iskemia -vaurio aiheuttaa O_2^- muodostumista lihaskudokseen

Arvioimme DHE-värjäyksellä aiheuttaako iskemiavaurio lihaskudokseen happipistressin. Tekemämme DHE-värjäys oli kvalitatiivinen, jonka perusteella osoitimme vaurioalueella olevan ROS:ja tuottavia soluja (Kuva 3).



Kuva 3. Lihaskudoksen solujen ROS tuotantoa tarkasteltiin DHE -värjäyksen avulla. Yhdisteen reagoiessa O_2^- :n kanssa se värjää O_2^- :a tuottavien solujen tumat punaiseksi, osoittaen ROS:n läsnäolon kudoksessa.

5. TULOSTEN TARKASTELU

Hyvinvointi valtioiden elintavat lisäävät riskiä sairastua tauteihin, joiden taustalla on iskemia. Iskemia johtuu yleensä heikentyneestä verenkierrosta, jolloin kohdekudos kärsii hapen vajauksesta. Kudokseen syntyy happistressi, jolloin ROS:n tuotanto solujen toimesta ja poisto antioksidanttien avulla on epätasapainossa. Tauteja jäljittelevillä eläinmalleilla pyritään täsmentämään antioksidatiivisten molekyylien roolia iskemia-vaurion monimutkaisessa verkostossa.

Tutkimuksessamme käytimme rotan alaraajaiskemiamallia, jonka pohjalta tarkastelimme EC-SOD:n vaikutuksia alueen tulehdusreaktioon sekä uusien verisuonten kehittymiseen. Päähavaintomme olivat, että EC-SOD alentaa iskeemisen alueen tulehdusreaktiota, muttei paranna iskemia-alueen uudissuonitusta.

Havaitimme, että alaraajaan tehty iskemia johti tulehdusreaktioon, joka oli voimakkaimmillaan kummassakin eläinryhmässä 3. ja 7. vuorokautena operaatiosta (Kuva1). Tämä tukee aikaisempia alaraajaiskemiamallia tutkivia tutkimuksia tulehduksen ajoittumisesta vaurioalueelle (Arras ym., 1998; Stabile ym., 2003; Tojo ym., 2005). Iskeemisen kudoksen geeniaktiivisuuksien tutkimukset DNA mikroarray-menetelmällä vahvistavat tulehduksen esiintymisen alueella (Paoni ym., 2002). Entsyymi alentaa tulehdusta tilastollisesti merkitsevällä voimakkuudella AdEC-SOD eläinryhmissä kaikissa aikapisteissä (3, 7 ja 10 vrk) verrattaessa AdLacZ kontrolliryhmiin (Kuva1). Tulos EC-SOD:n vaikutuksesta tulehdukseen rotan alaraajaiskemiamallissa puoltaa entsyymien mahdollisia suojaavia vaikutuksia kohdekudoksessa. Aikaisemmissa tutkimuksissa entsyymien on todettu hillitsevän kohdekudoksen tulehdusreaktiota ja siitä johtuvia kudonvaurioita esimerkiksi keuhkoissa (Bowler ym., 2002; Fattman ym., 2003; Bowler ym., 2004), ihossa (Ha ym., 2006), maksassa (Laukkanen ym., 2001b) sekä verisuonissa (Laukkanen ym., 2002; Ozumi ym., 2005).

Suoraa syytä siihen, miksi EC-SOD alentaa tulehdusreaktiota on vaikea sanoa mutta näkökulmia on useita. Tulehduksen ja EC-SOD:n välinen yhteys saattaa olla riippuvainen tulehdusreaktioon osallistuvista sytokiineistä. Ihmisen ihon sidekudossoluilla ja rotan hengitysepiteelin tyypin II (L2) -soluilla tehdyssä *in vitro* tutkimuksessa sekä rotan keuhkojen *in vivo* tarkastelussa todetaan esitulehduksellisten sytokiinien vaikuttavan

positiivisesti solujen EC-SOD tuotantoon (Marklund, 1992; Brady ym., 1997). Puolestaan keuhkoilla ja iholla tehdyssä tutkimuksessa EC-SOD:n hillitsee esitulehduksellisten sytokiinien ilmentymistä (Bowler ym., 2004; Ha ym., 2006). Tulehdukseen osallistuvien molekyylien ja EC-SOD:n väliset vuorovaikutukset ovat monimutkaisia mutta EC-SOD:n tulehdusta hillitsevä vaikutus voisi johtua edellä mainittujen tekijöiden muodostamasta vuorovaikutusjärjestelmästä. Tulehdusreaktioon osallistuvien sytokiinien positiiviset vaikutukset solujen EC-SOD tuotantoon ja edelleen itse entsyymien vaikutukset sytokiinien ilmentymiseen, hillitsee tulehdussolujen kotiutumista vaurioalueelle (Ha ym., 2006). Yhdisteiden välillä voisi ajatella olevan jonkinlainen negatiivinen takaisinkytkentä, mikä selittäisi tulehduksen lievempää ilmenemistä AdEC-SOD eläimissä. Myös tutkimukset entsyymien vaikutuksista solunsisäiseen adheesiomolekyyli-1:n (ICAM-1) antavat viitteitä, jotka voisivat selittää EC-SOD:n havaittuja vaikutuksia tulehdusreaktioon. Tutkimuksissaan Gaboury ym. (1993) ja Matakai ym. (1994) toteavat O_2^- :n vaikuttavan positiivisesti tulehdussolujen kotiutumiseen. Lisääntynyt EC-SOD:n ilmentyminen AdEC-SOD ryhmän eläimillä voisi hillitä edellä mainittua O_2^- :n vaikutusta tulehdussolujen kotiutumiseen, koska EC-SOD dismutoi vaurioalueen O_2^- :a vaikuttaen negatiivisesti solunsisäisen adheesiomolekyyli-1:n (ICAM-1) ilmentymiseen.

Adenovirusvälitteisen EC-SOD:n ilmentyminen ja tulehdussolujen kotiutumisen samanaikaisuus saattaa edelleen edesauttaa entsyymien havaittuja positiivisia vaikutuksia tulehdusreaktioon. Adenovirusvälitteinen geeni ilmentyy voimakkaimmillaan kolmantena vuorokautena injektioista (Laukkanen ym., 2001b) samoin kuin tulehdussolujen kertyminen vaurioalueelle (Arras ym., 1998; Tojo ym., 2005).

Aktivoituneet valkosolut tuottavat runsaasti ROS:ja, jotka liian suurina pitoisuuksina aiheuttavan soluvaurioita (Zweier ym., 1988). Voimakkaan tulehdusreaktion seurauksena on kudsvaurio, joka johtuu lisääntyneestä happistressistä vaurioalueella. Erityisesti painotetaan ROS johdannaisen, $ONOO^-$ vaikutusta kudsvaurion syntyyn (Gursoy-Ozdemir ym., 2000; Park ym., 2005b). Koeryhmän eläimissä yli-ilmentyvän EC-SOD:n voisi tulkita suojelevan kudosta vauriolta, koska se poistaa tehokkaasti O_2^- :a, jolloin se ei ehdi reagoida NO:n kanssa muodostaen haitallista $ONOO^-$. Kudsvaurioiden yhteydessä esiintyy sidekudoksen hajoamista, jossa mm. kollageeni I pilkkoutuu, aiheuttaen positiivisen kemosignalin, joka vetää puoleensa tulehdussoluja samalla aktivoiden niiden toimintaa (Chang ja Houck, 1970; Laskin ym., 1986; Monboisse ym., 1987).

Poistogeenisillä eläimillä havaitaan keuhkokudoksessa enemmän kollageenin pilkkoutumista sekä suurempia sidekudoksen muodostamia arpeutumia villityypin eläimiin verrattaessa (Fattman ym., 2003). Se, että tulehdusreaktio AdEC-SOD käsitellyillä eläimillä oli lievempi, saattaa johtua entsyymien kyvystä sitoutua ja suojata tyypin I kollageeniä happistressi välitteiseltä pilkkoutumiselta (Petersen ym., 2004). Mahdollisesti AdLacZ eläimillä vaurio aiheutti voimakkaamman kollageeni I pilkkoutumisen, johtuen alemmasta EC-SOD pitoisuudesta, johtaen kemotaksiaan. Kun kemotaktisia yhdisteitä esiintyy vaurioalueella vähemmän, on alueen tulehdusreaktio hillitympi, koska tulehdussoluja kotiutuu paikalle vähemmän, mikä puolestaan mahdollistaa tasapainoisemman ROS:n hallinnan ja edelleen siitä johtuvien kudosisvaurioiden lieventymisen.

Vaikka voimakas tulehdusreaktio voi olla potentiaalinen kudosta vaurioittava tapahtuma, se kuitenkin edesauttaa parantumista. Lihaskudoksen uusiutuminen ja uusien verisuonten muodostuminen iskemiasta kärsivälle alueelle on keskeinen sopeutumisreaktio, jonka tarkoituksena on palauttaa kudoksen toimintakyky normaalille tasolle.

Vaurioalueelle ilmestyvät tulehdussolut (monosyytti/makrofagi, T-lymfosyytit) vapauttavat bFGF, TNF- α ja VEGF yhdisteitä, jotka nopeuttavat uudissuonituksen alkamista (Arras ym., 1998; Sasaki ym., 2002; Stabile ym., 2003). Lisäksi kudoksen hapenvajaus lisää VEGF:n ilmentymistä sekä *in vitro* (Shweiki ym., 1992; Levy ym., 1995; Liu ym., 1995) että *in vivo* (Hashimoto ym., 1994; Li ym., 1996) kokeissa. Näiden uudissuonitukselle tärkeiden sytokiinien ja kasvutekijöiden ilmentyminen iskeemisessä kudoksessa antavat kemialliset lähtökohdat raajan toiminnan palautumiselle. Tulehdussolujen vaikutukset eivät rajoitu vain kudosisvaurion taustalle tai uudissuonituksen puitteisiin, vaan yltyvät myös lihaskudoksen uusiutumisen mekanismeihin (Merly ym., 1999).

Alaraajaiskemia aiheuttaa runsaan ROS tuotannon vaurioalueen endoteelisolujen ja tulehdussolujen NAD(P)H-oksidaasin toimesta (Tojo ym., 2005). Muodostuttuaan O_2^- voi reagoida kaikkialla läsnä olevan NO:n kanssa muodostaen ONOO $^-$ tai dismutoitua EC-SOD:n johdosta H_2O_2 :ksi. Näistä ROS yhdisteistä erityisesti alhaiset H_2O_2 tasot edesauttavat uudissuonitukselle tärkeiden tapahtumien, kuten endoteelisolujen muodostamien esisuonirakenteiden ilmentymistä *in vitro* (Shono ym., 1996; Yasuda ym., 1999). Lisäksi H_2O_2 :n positiivisia vaikutuksia havaitaan *in vivo* uudissuonituksissa (Tojo

ym., 2005; Roy ym., 2006). Mahdollisesti tärkeää ROS:n roolia iskeemisen kudoksen uudissuonituksessa puoltavat lisäksi tutkimukset, joissa NO:n lähteen, eNOS:n, yllilymentyminen stimuloi iskemia-alueen verisuonten kehitystä (Namba ym., 2003) ja vastaavasti *eNOS* poistogeeni heikentää vaurioalueen uudissuonitusta (Murohara ym., 1998).

Vaurioalueella esiintyy siis voimakasta happistressiä, johtuen sekä aktiivisista tulehdussoluista että endoteelisoluista (Tojo ym., 2005). Tutkimuksessa injektoimme koeryhmän vaurioalueelle adenovirusvälitteisesti EC-SOD:a, jonka tiedetään dismutoitavan tehokkaasti O_2^- :a. Teorian pohjalta, vaurioalueelle pitäisi kehittyä enenevässä määrin H_2O_2 , jolla edellä mainittuihin tutkimuksiin pohjautuen olisi positiivisia vaikutuksia vaurioalueen uudissuonituksen kannalta. Lisääntynyt EC-SOD:n pitoisuus ylläpitää myös NO:n toimintaa, koska se poistaa O_2^- :a, eivätkä yhdisteet pääse reagoimaan. Tällöin NO:n uudissuonitukseen vaikuttavat ominaisuudet olisivat teoriassa käytettävissä kudoksen hyvinvoinnin palauttamiseksi. Toisaalta NO:n ja EC-SOD:n suhde ei ole suoraviivainen. Suurina pitoisuuksina, kuten tulehdusreaktion aikana, NO sekä heikentää EC-SOD:n sitoutumista GAG:n että pilkkoo GAG:ja (Vilar ym., 1997; Yamamoto ym., 2001). Immunohistologiset värjäykset von Willebrand faktori (vWF) -vasta-aineella, jonka perusteella tarkastelimme hiussuonien esiintymistä, eivät puoltaneet hypoteesia, jonka mukaan EC-SOD parantaisi iskeemisen lihaksen uudissuonitusta tasapainottamalla ROS:n tuotantoa (Kuva2).

Syitä tähän ristiriitaiseen tulokseen voi olla lukemattomia ja monimutkainen biologinen prosessi uudissuonituksen taustalla on vaikeasti selitettävissä. Voimakas EC-SOD:n ilmentyminen 3. vuorokaudesta alkaen mahdollisesti alensi ROS-tasoa liian alhaisiksi. Siten aktivoituneiden tulehdussolujen ja endoteelisolujen tuottamien ROS:n suorat ja epäsuorat angiogeneettiset vaikutukset olisivat menettäneet merkityksensä. Antioksidatiivisten yhdisteiden negatiivisia vaikutuksia uudissuonitukseen puoltavat päätelmät *in vitro* kokeista sekä rotan sarveiskalvo- ja kasvaintutkimuksissa saadut tulokset (Koch ym., 1992; Monte ym., 1994; Polyarchou ja Papadimitriou, 2005). Tässä työssä tutkimme kudoksien ROS pitoisuutta DHE-värjäyksen avulla, koska iskemian tiedetään aiheuttavan vaurioalueella happistressiä (Tojo ym., 2005). Tuloksemme lihaskudoksen ROS pitoisuudesta oli kvalitatiivinen, emmekä määritelleet ROS:ja tuottavia solutyyppejä (Kuva3). Radikaalibiologia on haastava tutkimusalue, koska yhdisteet ovat hyvin

reaktiivisia ja lyhyt ikäisiä. Kenties luotettavampaa vaikkakin epäsuoraa tietoa kudoksen radikaali pitoisuudesta voisi saada tutkimalla proteiinien nitrotyrosiini ja karbonyyli-tasoa. Lisäksi EC-SOD:n tulehdusta rajoittavat vaikutukset selittäisivät vaurioalueella havaitun vähäisen uudissuonituksen, koska tulehdusreaktio on tärkeä uudissuonitusta stimuloiva tekijä iskeemisessä kudoksessa (Arras ym., 1998; Sasaki ym., 2002). Perustelut ROS:n ja sytokiinien vaikutuksista uudissuonitukseen eivät selitä miksi voimakkaampaa uudissuonitusta ei havaittu AdLacZ ryhmän eläimissä verrattaessa AdEC-SOD ryhmään. Periaatteessahan kontrollieläimissä pitäisi ilmentyä luonnollinen, akuutti iskemia seuraamuksineen, johon ei vaikuteta antioksidatiivisen entsyymin välityksellä. Suonien ilmentymisen havaittiin kuitenkin lisääntyvän sekä koe- että kontrolliryhmissä ajan kuluessa. Tämä aiheutuu todennäköisesti eläinten luonnollisesta toipumisesta, koska eläinten liikkuvuus parani jatkuvasti seurantajakson aikana eikä eläinten takajaloissa havaittu makroskooppisia iskemiaavurioita. Lisäksi CD68-värjäytyneet makrofagit sekä von Willebrand faktori (vWF) -värjäytyneet valtimon endoteelisolut näyttivät esiintyvän samalla alueella, tukien ajatusta tulehduksen ja uudissuonituksen yhteyksistä.

Selityksiä heikkoon uudissuonitukseen vaikeuttavat myös teoriat, jotka puoltavat ROS:n ja uudissuonitukseen liittyvien sytokiinien ja kasvutekijöiden välisiä vuorovaikutuksia. Nämä sytokiinit ja kasvutekijät vaikuttavat positiivisesti esimerkiksi endoteelisolujen H_2O_2 ja O_2^- tuotantoon (Matsubara ja Ziff, 1986; Stone ja Collins, 2002), joista H_2O_2 edelleen stimuloi konsentraationsa mukaisesti VEGF:n ilmentymistä rotan endoteelisoluista *in vitro* (Chua ym., 1998). Itse VEGF stimuloi endoteelisolujen NAD(P)H-oksidaasia *in vitro* (Ushio-Fukai ym., 2002). Lisäksi NO:n epäsuorat angiogeneettiset vaikutukset kietoutuvat osaksi VEGF:ä, joka voimistaa eNOS:n määrää ja NO:n tuotantoa endoteelisoluissa *in vitro* (Papapetropoulos ym., 1997; Hood ym., 1998). Näiden kahden molekyylin suhteita tarkasteltaessa on havaittu, että NO välittää VEGF:n jakautumis- ja kulkeutumissignaaleja soluissa sekä *in vitro* että *in vivo* tapauksissa (Ziche ym., 1997; Murohara ym., 1998). Samoin H_2O_2 välittää eteenpäin VEGF:n angiogeneettisiä signaaleja autofosforyloimalla endoteelikasvutekijäreseptori-2 (VEGFR2) (Colavitti ym., 2002; Ushio-Fukai ym., 2002). Iskemian aiheuttamat verenvirtauksen muutokset stimuloivat NAD(P)H-oksidaasia (De Keulenaer ym., 1998b; ks. yleiskatsaus Ushio-Fukai ja Alexander, R.W., 2004) sekä eNOS:sta (Ziegler ym., 1998) tuottamaan lisää ROS:ja tähän vaikutusten verkostoon.

Teoriassa vaurioalueella näyttäisi siis olevan yhteyksiä ROS:n, erilaisten sytokiinien ja fysikaalisten olosuhteiden välillä, jotka mahdollistaisivat alueen uudissuonituksen.

Lopputulokseen saattaa vaikuttaa kuitenkin myös itse adenovirusvektori, jonka tiedetään herättelevän immunipuolustusjärjestelmää. Mielenkiintoisen havainnon makrofagien vaikutuksesta geeninilmentymiseen tekivät (Worgall ym., 1997), jossa keuhkokudoksen makrofagit poistavat tehokkaasti adenovirusvektoria. Voisiko heikko uudissuonitus johtua EC-SOD:n nopeasta eliminoinnista, jolloin sen happistressiä tasapainottavat vaikutukset eivät pääsisi oikeuksiinsa? Uudissuonituksen samankaltaisuus koe- ja kontrolliryhmien välillä selittyisi sillä, että ryhmillä olisi samat olosuhteet kudoksessa. Ajatusta rajoittaa tietenkin havainnot EC-SOD:n vaikutuksesta tulehdusreaktioon (Kuva1).

Jotta EC-SOD:n vaikutuksia uudissuonitukseen rotan alaraajaiskemia-mallissa voidaan täsmentää, olisi hyvä suorittaa esimerkiksi immunohistologisia värjäyksiä mm. VEGF ja NOS vasta-aineilla sekä tutkia operoidun jalan veren virtauksen palautumista eläviltä eläimiltä kuvantamismenetelmillä, kuten Laser Doppler Blood flow (LDBF) -menetelmällä. Havainnot antaisivat lisäkuva kudoksessa vallitsevista olosuhteista, jolloin EC-SOD:n vaikutusta tähän kokonaisuuteen uudissuonituksen puitteissa voisi tarkastella. Varmistukset EC-SOD:n läsnäolosta ja ilmentymisestä lihaskudoksessa olisivat myös aiheellisia. Entsyymien ilmentymistä operoidun rotan alaraajassa voisi tarkastella immunohistologisten värjäysten ohella myös lähetti-RNA ja proteiini määrittämisillä, jolloin saataisiin varmistus, että AdEC-SOD ryhmä ilmentää todellakin enemmän antioksidatiivista entsyymiä kuin AdLacZ ryhmä.

Perehtyminen vauriomalliin ja rotan fysiologiaan ovat perusteita alaraajaiskemian täysivaltaiseen ymmärtämiseen tässä mallissa. Yhdessä histologisten menetelmien hallinnan kanssa, nämä edesauttavat täsmällisten ja luotettavien tulosten saantia. Tällöin esimerkiksi välttyttäisiin turhilta histologisilta artefakteilta ja eristettäisiin se lihasryhmä tai -ryhmät, joihin iskemia on vaikuttanut.

Pohjimmiltaan kudokset luovat edellytykset omalle palautumiselleen, jota värittävät monet tekijät, joiden on ilmennyttävä oikeassa suhteessa ja tietyssä järjestyksessä tavoitellun lopputuloksen takaamiseksi. Iskeemisessä kudoksessa esiintyvän uudissuonituksen ja tulehduksen väliset reaktiot ovat hyvin monimutkaisia ja kudokset, jopa tilannekohtaisia, eikä yhden molekyylin yleisluonnetta koko verkostossa ole helppo määrittää.

6. LÄHDELUETTELO

Abid, M.R., Z. Kachra, K.C. Spokes ja W.C. Aird. 2000. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett.* 486:252-256.

Adachi, T., T. Kodera, H. Ohta, K. Hayashi ja K. Hirano. 1992. The heparin binding site of human extracellular-superoxide dismutase. *Arch.Biochem.Biophys.* 297:155-161.

Agrawal, R.S., S. Muangman, M.D. Layne, L. Melo, M.A. Perrella, R.T. Lee, L. Zhang, M. Lopez-Illasaca ja V.J. Dzau. 2004. Pre-emptive gene therapy using recombinant adeno-associated virus delivery of extracellular superoxide dismutase protects heart against ischemic reperfusion injury, improves ventricular function and prolongs survival. *Gene Ther.* 11:962-969.

Al-Mehdi, A.B., G. Zhao, C. Dodia, K. Tozawa, K. Costa, V. Muzykantov, C. Ross, F. Blecha, M. Dinauer ja A.B. Fisher. 1998. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ.Res.* 83:730-737.

Aoki, T., Y. Suzuki, K. Nishio, K. Suzuki, A. Miyata, Y. Oyamada, M. Mori, H. Fujita ja K. Yamaguchi. 1997. Effect of antioxidants on hyperoxia-induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 411:503-511.

Arras, M., W.D. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper ja W. Schaper. 1998. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J.Clin.Invest.* 101:40-50.

Borgstahl, G.E., H.E. Parge, M.J. Hickey, W.F. Beyer Jr, R.A. Hallewell ja J.A. Tainer. 1992. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell.* 71:107-118.

Bowler, R.P., M. Nicks, D.A. Olsen, I.B. Thogersen, Z. Valnickova, P. Hojrup, A. Franzusoff, J.J. Enghild ja J.D. Crapo. 2002. Furin proteolytically processes the heparin-binding region of extracellular superoxide dismutase. *J.Biol.Chem.* 277:16505-16511.

Bowler, R.P., M. Nicks, K. Tran, G. Tanner, L.Y. Chang, S.K. Young ja G.S. Worthen. 2004. Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 31:432-439.

Bowler, R.P., M. Nicks, K. Warnick ja J.D. Crapo. 2002. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 282:L719-26.

Brady, T.C., L.Y. Chang, B.J. Day ja J.D. Crapo. 1997. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *Am.J.Physiol.* 273:L1002-6.

Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat.Med.* 6:389-395.

- Chang, C. ja J.C. Houck. 1970. Demonstration of the chemotactic properties of collagen. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 134:22-26.
- Chang, L.Y., J.W. Slot, H.J. Geuze ja J.D. Crapo. 1988. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J.Cell Biol.* 107:2169-2179.
- Chen, E.P., H.B. Bittner, R.D. Davis, R.J. Folz ja P. Van Trigt. 1996. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts. *Circulation.* 94:II412-7.
- Chintalgattu, V., D.M. Nair ja L.C. Katwa. 2003. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 35:277-286.
- Chu, Y., R. Piper, S. Richardson, Y. Watanabe, P. Patel ja D.D. Heistad. 2006. Endocytosis of extracellular superoxide dismutase into endothelial cells: role of the heparin-binding domain. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:1985-1990.
- Chua, C.C., R.C. Hamdy ja B.H. Chua. 1998. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 25:891-897.
- Church, S.L., J.W. Grant, E.U. Meese ja J.M. Trent. 1992. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics.* 14:823-825.
- Colavitti, R., G. Pani, B. Bedogni, R. Anzevino, S. Borrello, J. Waltenberger ja T. Galeotti. 2002. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J.Biol.Chem.* 277:3101-3108.
- Couffinhal, T., M. Silver, L.P. Zheng, M. Kearney, B. Witzenbichler ja J.M. Isner. 1998. Mouse model of angiogenesis. *Am.J.Pathol.* 152:1667-1679.
- Crapo, J.D., T. Oury, C. Rabouille, J.W. Slot ja L.Y. Chang. 1992. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:10405-10409.
- De Keulenaer, G.W., R.W. Alexander, M. Ushio-Fukai, N. Ishizaka ja K.K. Griendling. 1998a. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem.J.* 329 (Pt 3):653-657.
- De Keulenaer, G.W., D.C. Chappell, N. Ishizaka, R.M. Nerem, R.W. Alexander ja K.K. Griendling. 1998b. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ.Res.* 82:1094-1101.
- Due, A.V., S.V. Petersen, Z. Valnickova, L. Ostergaard, T.D. Oury, J.D. Crapo ja J.J. Enghild. 2006. Extracellular superoxide dismutase exists as an octamer. *FEBS Lett.* 580:1485-1489.

- Enghild, J.J., I.B. Thogersen, T.D. Oury, Z. Valnickova, P. Hojrup ja J.D. Crapo. 1999. The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 274:14818-14822.
- Evans, H.J., H.M. Steinman ja R.L. Hill. 1974. Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Isolation and characterization of tryptic, cyanogen bromide, and maleylated tryptic peptides. *J.Biol.Chem.* 249:7315-7325.
- Fattman, C.L., L.Y. Chang, T.A. Termin, L. Petersen, J.J. Enghild ja T.D. Oury. 2003. Enhanced bleomycin-induced pulmonary damage in mice lacking extracellular superoxide dismutase. *Free Radic.Biol.Med.* 35:763-771.
- Fernandez, L.A., J. Twickler ja A. Mead. 1985. Neovascularization produced by angiotensin II. *J.Lab.Clin.Med.* 105:141-145.
- Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr.Rev.* 25:581-611.
- Folz, R.J. ja J.D. Crapo. 1994. Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics.* 22:162-171.
- Frangogiannis, N.G., C.W. Smith ja M.L. Entman. 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* 53:31-47.
- Fukai, T., Z.S. Galis, X.P. Meng, S. Parthasarathy ja D.G. Harrison. 1998. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J.Clin.Invest.* 101:2101-2111.
- Fukai, T., M.R. Siegfried, M. Ushio-Fukai, Y. Cheng, G. Kojda ja D.G. Harrison. 2000. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J.Clin.Invest.* 105:1631-1639.
- Fukai, T., M.R. Siegfried, M. Ushio-Fukai, K.K. Griending ja D.G. Harrison. 1999. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ.Res.* 85:23-28.
- Fukui, S., T. Ookawara, H. Nawashiro, K. Suzuki ja K. Shima. 2002. Post-ischemic transcriptional and translational responses of EC-SOD in mouse brain and serum. *Free Radic.Biol.Med.* 32:289-298.
- Gaboury, J., R.C. Woodman, D.N. Granger, P. Reinhardt ja P. Kubes. 1993. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am.J.Physiol.* 265:H862-7.
- Ghiso, N., R.M. Rohan, S. Amano, R. Garland ja A.P. Adamis. 1999. Suppression of hypoxia-associated vascular endothelial growth factor gene expression by nitric oxide via cGMP. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 40:1033-1039.

- Griendling, K.K., C.A. Minieri, J.D. Ollerenshaw ja R.W. Alexander. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 74:1141-1148.
- Gursoy-Ozdemir, Y., H. Bolay, O. Saribas ja T. Dalkara. 2000. Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 31:1974-80; discussion 1981.
- Ha, H.Y., Y. Kim, Z.Y. Ryoo ja T.Y. Kim. 2006. Inhibition of the TPA-induced cutaneous inflammation and hyperplasia by EC-SOD. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 348:450-458.
- Hashimoto, E., T. Ogita, T. Nakaoka, R. Matsuoka, A. Takao ja Y. Kira. 1994. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am.J.Physiol.* 267:H1948-54.
- He, S.Q., Y.H. Zhang, S.K. Venugopal, C.W. Dicus, R.V. Perez, R. Ramsamooj, M.H. Nantz, M.A. Zern ja J. Wu. 2006. Delivery of antioxidative enzyme genes protects against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *Liver Transpl.* 12:1869-1879.
- Hendrickson, D.J., J.H. Fisher, C. Jones ja Y.S. Ho. 1990. Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21. *Genomics.* 8:736-738.
- Hjalmarsson, K., S.L. Marklund, A. Engstrom ja T. Edlund. 1987. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84:6340-6344.
- Hood, J.D., C.J. Meininger, M. Ziche ja H.J. Granger. 1998. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am.J.Physiol.* 274:H1054-8.
- Ito, W.D., M. Arras, D. Scholz, B. Winkler, P. Htun ja W. Schaper. 1997. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am.J.Physiol.* 273:H1255-65.
- Iyama, S., T. Okamoto, T. Sato, N. Yamauchi, Y. Sato, K. Sasaki, M. Takahashi, M. Tanaka, T. Adachi, K. Kogawa, J. Kato, S. Sakamaki ja Y. Niitsu. 2001. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Arthritis Rheum.* 44:2160-2167.
- Kang, S.K., Z.N. Rabbani, R.J. Folz, M.L. Golson, H. Huang, D. Yu, T.S. Samulski, M.W. Dewhirst, M.S. Anscher ja Z. Vujaskovic. 2003. Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 57:1056-1066.
- Karlsson, K., A. Edlund, J. Sandstrom ja S.L. Marklund. 1993. Proteolytic modification of the heparin-binding affinity of extracellular superoxide dismutase. *Biochem.J.* 290 (Pt 2):623-626.
- Karlsson, K., U. Lindahl ja S.L. Marklund. 1988. Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. *Biochem.J.* 256:29-33.

- Karlsson, K. ja S.L. Marklund. 1989. Binding of human extracellular-superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells. *Lab.Invest.* 60:659-666.
- Karlsson, K. ja S.L. Marklund. 1988. Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. *Biochem.J.* 255:223-228.
- Karlsson, K. ja S.L. Marklund. 1987. Heparin-induced release of extracellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem.J.* 242:55-59.
- Karlsson, K., J. Sandstrom, A. Edlund ja S.L. Marklund. 1994. Turnover of extracellular-superoxide dismutase in tissues. *Lab.Invest.* 70:705-710.
- Kim, S.H., M.O. Kim, P. Gao, C.A. Youm, H.R. Park, T.S. Lee, K.S. Kim, J.G. Suh, H.T. Lee, B.J. Park, Z.Y. Ryoo ja T.H. Lee. 2005. Overexpression of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) in mouse skin plays a protective role in DMBA/TPA-induced tumor formation. *Oncol.Res.* 15:333-341.
- Kim, Y.M., K.E. Kim, G.Y. Koh, Y.S. Ho ja K.J. Lee. 2006. Hydrogen peroxide produced by angiopoietin-1 mediates angiogenesis. *Cancer Res.* 66:6167-6174.
- Koch, A.E., M. Cho, J.C. Burrows, P.J. Polverini ja S.J. Leibovich. 1992. Inhibition of production of monocyte/macrophage-derived angiogenic activity by oxygen free-radical scavengers. *Cell Biol.Int.Rep.* 16:415-425.
- Landmesser, U., R. Merten, S. Spiekermann, K. Buttner, H. Drexler ja B. Hornig. 2000. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation.* 101:2264-2270.
- Laskin, D.L., T. Kimura, S. Sakakibara, D.J. Riley ja R.A. Berg. 1986. Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 39:255-266.
- Laukkanen, M.O., A. Kivela, T. Rissanen, J. Rutanen, M.K. Karkkainen, O. Leppanen, J.H. Brasen ja S. Yla-Herttuala. 2002. Adenovirus-mediated extracellular superoxide dismutase gene therapy reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation.* 106:1999-2003.
- Laukkanen, M.O., P. Lehtolainen, P. Turunen, S. Aittomaki, P. Oikari, S.L. Marklund ja S. Yla-Herttuala. 2000. Rabbit extracellular superoxide dismutase: expression and effect on LDL oxidation. *Gene.* 254:173-179.
- Laukkanen, M.O., P. Leppanen, P. Turunen, E. Porkkala-Sarataho, J.T. Salonen ja S. Yla-Herttuala. 2001a. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase to atherosclerotic mice. *Antioxid.Redox Signal.* 3:397-402.
- Laukkanen, M.O., P. Leppanen, P. Turunen, T. Tuomisto, J. Naarala ja S. Yla-Herttuala. 2001b. EC-SOD gene therapy reduces paracetamol-induced liver damage in mice. *J.Gene Med.* 3:321-325.

- Le Cras, T.D., C. Xue, A. Rengasamy ja R.A. Johns. 1996. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am.J.Physiol.* 270:L164-70.
- Levanon, D., J. Lieman-Hurwitz, N. Dafni, M. Wigderson, L. Sherman, Y. Bernstein, Z. Laver-Rudich, E. Danciger, O. Stein ja Y. Groner. 1985. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J.* 4:77-84.
- Levy, A.P., N.S. Levy, S. Wegner ja M.A. Goldberg. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J.Biol.Chem.* 270:13333-13340.
- Li, J., L.F. Brown, M.G. Hibberd, J.D. Grossman, J.P. Morgan ja M. Simons. 1996. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am.J.Physiol.* 270:H1803-11.
- Li, Q., R. Bolli, Y. Qiu, X.L. Tang, Y. Guo ja B.A. French. 2001. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation.* 103:1893-1898.
- Lin, S.J., S.K. Shyue, Y.Y. Hung, Y.H. Chen, H.H. Ku, J.W. Chen, K.B. Tam ja Y.L. Chen. 2005. Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:334-340.
- Liu, M.Y., M. Eyries, C. Zhang, F.S. Santiago ja L.M. Khachigian. 2006. Inducible platelet-derived growth factor D-chain expression by angiotensin II and hydrogen peroxide involves transcriptional regulation by Ets-1 and Sp1. *Blood.* 107:2322-2329.
- Liu, Y., S.R. Cox, T. Morita ja S. Kourembanas. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ.Res.* 77:638-643.
- Mack, C.A., C.J. Magovern, K.T. Budenbender, S.R. Patel, E.A. Schwarz, P. Zanzonico, B. Ferris, T. Sanborn, P. Isom, B. Ferris, T. Sanborn, O.W. Isom, R.G. Crystal ja T.K. Rosengart. 1998. Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *J.Vasc.Surg.* 27:699-709.
- Marklund, S.L. 1992. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 267:6696-6701.
- Marklund, S.L. 1990. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem.J.* 266:213-219.
- Marklund, S.L. 1984a. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem.J.* 222:649-655.

- Marklund, S.L. 1984b. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J.Clin.Invest.* 74:1398-1403.
- Marklund, S.L. 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79:7634-7638.
- Marklund, S.L., A. Bjelle ja L.G. Elmqvist. 1986a. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann.Rheum.Dis.* 45:847-851.
- Marklund, S.L., A. Bjelle ja L.G. Elmqvist. 1986b. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann.Rheum.Dis.* 45:847-851.
- Marklund, S.L., E. Holme ja L. Hellner. 1982. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin.Chim.Acta.* 126:41-51.
- Mataki, H., T. Inagaki, M. Yokoyama ja S. Maeda. 1994. ICAM-1 expression and cellular injury in cultured endothelial cells under hypoxia/reoxygenation. *Kobe J.Med.Sci.* 40:49-63.
- Matsubara, T. ja M. Ziff. 1986. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J.Immunol.* 137:3295-3298.
- Maulik, N. ja D.K. Das. 2002. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic.Biol.Med.* 33:1047-1060.
- McCord, J.M. ja I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J.Biol.Chem.* 244:6049-6055.
- Merly, F., L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin ja M.F. Gardahaut. 1999. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve.* 22:724-732.
- Monboisse, J.C., G. Bellon, J. Dufer, A. Randoux ja J.P. Borel. 1987. Collagen activates superoxide anion production by human polymorphonuclear neutrophils. *Biochem.J.* 246:599-603.
- Monte, M., L.E. Davel ja E.S. de Lustig. 1994. Inhibition of lymphocyte-induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radic.Biol.Med.* 17:259-266.
- Murohara, T., T. Asahara, M. Silver, C. Bauters, H. Masuda, C. Kalka, M. Kearney, D. Chen, J.F. Symes, M.C. Fishman, P.L. Huang ja J.M. Isner. 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J.Clin.Invest.* 101:2567-2578.
- Namba, T., H. Koike, K. Murakami, M. Aoki, H. Makino, N. Hashiya, T. Ogihara, Y. Kaneda, M. Kohno ja R. Morishita. 2003. Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation.* 108:2250-2257.

- Ohara, Y., T.E. Peterson ja D.G. Harrison. 1993. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J.Clin.Invest.* 91:2546-2551.
- Olsen, D.A., S.V. Petersen, T.D. Oury, Z. Valnickova, I.B. Thogersen, T. Kristensen, R.P. Bowler, J.D. Crapo ja J.J. Enghild. 2004. The intracellular proteolytic processing of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) is a two-step event. *J.Biol.Chem.* 279:22152-22157.
- Ookawara, T., H. Eguchi, M. Nishimura, T. Kizaki, T. Eiji, D. Saitoh, H. Ohno ja K. Suzuki. 2003. Effects of oxidative stress on the nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 303:914-919.
- Ookawara, T., T. Kizaki, E. Takayama, N. Imazeki, O. Matsubara, Y. Ikeda, K. Suzuki, L. Li Ji, T. Tadakuma, N. Taniguchi ja H. Ohno. 2002. Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 296:54-61.
- Oury, T.D., J.D. Crapo, Z. Valnickova ja J.J. Enghild. 1996. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem.J.* 317 (Pt 1):51-57.
- Ozumi, K., H. Tasaki, H. Takatsu, S. Nakata, T. Morishita, S. Koide, K. Yamashita, M. Tsutsui, M. Okazaki, Y. Sasaguri, T. Adachi ja Y. Nakashima. 2005. Extracellular superoxide dismutase overexpression reduces cuff-induced arterial neointimal formation. *Atherosclerosis.* 181:55-62.
- Paoni, N.F., F. Peale, F. Wang, C. Errett-Baroncini, H. Steinmetz, K. Toy, W. Bai, P.M. Williams, S. Bunting, M.E. Gerritsen ja L. Powell-Braxton. 2002. Time course of skeletal muscle repair and gene expression following acute hind limb ischemia in mice. *Physiol.Genomics.* 11:263-272.
- Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, J.A. Madri ja W.C. Sessa. 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 100:3131-3139.
- Park, J.W., W.N. Qi, Y. Cai, I. Zelko, J.Q. Liu, L.E. Chen, J.R. Urbaniak ja R.J. Folz. 2005a. Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 289:H181-7.
- Park, J.W., W.N. Qi, J.Q. Liu, J.R. Urbaniak, R.J. Folz ja L.E. Chen. 2005b. Inhibition of iNOS attenuates skeletal muscle reperfusion injury in extracellular superoxide dismutase knockout mice. *Microsurgery.* 25:606-613.
- Petersen, S.V., T.D. Oury, L. Ostergaard, Z. Valnickova, J. Wegrzyn, I.B. Thogersen, C. Jacobsen, R.P. Bowler, C.L. Fattman, J.D. Crapo ja J.J. Enghild. 2004. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J.Biol.Chem.* 279:13705-13710.
- Petersen, W., T. Pufe, T. Zantop, B. Tillmann ja R. Mentlein. 2003. Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide vascular

endothelial growth factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 123:485-488.

Polverini, P.J., P.S. Cotran, M.A. Gimbrone Jr. ja E.R. Unanue. 1977. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature.* 269:804-806.

Polytarchou, C. ja E. Papadimitriou. 2005. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur.J.Pharmacol.* 510:31-38.

Pu, L.Q., S. Jackson, K.J. Lachapelle, Z. Arekat, A.M. Graham, R. Lisbona, R. Brassard, S. Carpenter ja J.F. Symes. 1994. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J.Invest.Surg.* 7:49-60.

Rabbani, Z.N., M.S. Anscher, R.J. Folz, E. Archer, H. Huang, L. Chen, M.L. Golson, T.S. Samulski, M.W. Dewhirst ja Z. Vujaskovic. 2005. Overexpression of extracellular superoxide dismutase reduces acute radiation induced lung toxicity. *BMC Cancer.* 5:59.

Rajagopalan, S., S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B.A. Freeman, K.K. Griending ja D.G. Harrison. 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J.Clin.Invest.* 97:1916-1923.

Rissanen, T.T., J.E. Markkanen, K. Arve, J. Rutanen, M.I. Kettunen, I. Vajanto, S. Jauhiainen, L. Cashion, M. Gruchala, O. Narvanen, P. Taipale, R.A. Kauppinen, G.M. Rubanyi ja S. Yla-Herttuala. 2003. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *FASEB J.* 17:100-102.

Roy, S., S. Khanna, K. Nallu, T.K. Hunt ja C.K. Sen. 2006. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol.Ther.* 13:211-220.

Saito, S., G.D. Frank, M. Mifune, M. Ohba, H. Utsunomiya, E.D. Motley, T. Inagami ja S. Eguchi. 2002. Ligand-independent trans-activation of the platelet-derived growth factor receptor by reactive oxygen species requires protein kinase C-delta and c-Src. *J.Biol.Chem.* 277:44695-44700.

Sandstrom, J., L. Carlsson, S.L. Marklund ja T. Edlund. 1992. The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. *J.Biol.Chem.* 267:18205-18209.

Sandstrom, J., K. Karlsson, T. Edlund ja S.L. Marklund. 1993. Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues. *Biochem.J.* 294 (Pt 3):853-857.

Sasaki, K., T. Murohara, H. Ikeda, T. Sugaya, T. Shimada, S. Shintani ja T. Imaizumi. 2002. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J.Clin.Invest.* 109:603-611.

- Sen, C.K., S. Khanna, B.M. Babior, T.K. Hunt, E.C. Ellison ja S. Roy. 2002. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J.Biol.Chem.* 277:33284-33290.
- Sentman, M.L., T. Brannstrom, S. Westerlund, M.O. Laukkanen, S. Yla-Herttuala, S. Basu ja S.L. Marklund. 2001. Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:1477-1482.
- Shen, B.Q., D.Y. Lee ja T.F. Zioncheck. 1999. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 274:33057-33063.
- Sheng, H., R.D. Bart, T.D. Oury, R.D. Pearlstein, J.D. Crapo ja D.S. Warner. 1999a. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 88:185-191.
- Sheng, H., T.C. Brady, R.D. Pearlstein, J.D. Crapo ja D.S. Warner. 1999b. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. *Neurosci.Lett.* 267:13-16.
- Shi, Y., R. Niculescu, D. Wang, S. Patel, K.L. Davenpeck ja A. Zalewski. 2001. Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21:739-745.
- Shingu, M., T. Todoroki ja M. Nobunaga. 1987. Generation of superoxide by immunologically stimulated normal human neutrophils and possible modulation by intracellular and extracellular SOD and rheumatoid factors. *Inflammation.* 11:143-151.
- Shono, T., M. Ono, H. Izumi, S.I. Jimi, K. Matsushima, T. Okamoto, K. Kohno ja M. Kuwano. 1996. Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol.Cell.Biol.* 16:4231-4239.
- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer ja E. Keshet. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359:843-845.
- Stabile, E., M.S. Burnett, C. Watkins, T. Kinnaird, A. Bachis, A. la Sala, J.M. Miller, M. Shou, S.E. Epstein ja S. Fuchs. 2003. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation.* 108:205-210.
- Steinbrecher, U.P. 1988. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta.* 959:20-30.
- Stoll, M., U.M. Steckelings, M. Paul, S.P. Bottari, R. Metzger ja T. Unger. 1995. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J.Clin.Invest.* 95:651-657.
- Stone, J.R. ja T. Collins. 2002. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium.* 9:231-238.

- Stralin, P., K. Karlsson, B.O. Johansson ja S.L. Marklund. 1995. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15:2032-2036.
- Stralin, P. ja S.L. Marklund. 2001. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 281:H1621-9.
- Stralin, P. ja S.L. Marklund. 2000. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 151:433-441.
- Su, W.Y., R. Folz, J.S. Chen, J.D. Crapo ja L.Y. Chang. 1997. Extracellular superoxide dismutase mRNA expressions in the human lung by in situ hybridization. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 16:162-170.
- Takatsu, H., H. Tasaki, H.N. Kim, S. Ueda, M. Tsutsui, K. Yamashita, T. Toyokawa, Y. Morimoto, Y. Nakashima ja T. Adachi. 2001. Overexpression of EC-SOD suppresses endothelial-cell-mediated LDL oxidation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 285:84-91.
- Tamarat, R., J.S. Silvestre, N. Kubis, J. Benessiano, M. Duriez, M. deGasparo, D. Henrion ja B.I. Levy. 2002. Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb. *Hypertension.* 39:830-835.
- Tan, Y.H., J. Tischfield ja F.H. Ruddle. 1973. The linkage of genes for the human interferon-induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21. *J.Exp.Med.* 137:317-330.
- Tanaka, M., K. Kogawa, K. Nakamura, Y. Nishihori, K. Kuribayashi, S. Hagiwara, H. Muramatsu, S. Sakamaki ja Y. Niitsu. 2001. Anti-metastatic gene therapy utilizing subcutaneous inoculation of EC-SOD gene transduced autologous fibroblast suppressed lung metastasis of Meth-A cells and 3LL cells in mice. *Gene Ther.* 8:149-156.
- Tasaki, H., K. Yamashita, M. Tsutsui, F. Kamezaki, T. Kubara, S. Tanaka, Y. Sasaguri, T. Adachi ja Y. Nakashima. 2006. Heparin-released extracellular superoxide dismutase is reduced in patients with coronary artery atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 187:131-138.
- Tibell, L., K. Hjalmarsson, T. Edlund, G. Skogman, A. Engstrom ja S.L. Marklund. 1987. Expression of human extracellular superoxide dismutase in Chinese hamster ovary cells and characterization of the product. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84:6634-6638.
- Tibell, L.A., E. Skarfstad ja B.H. Jonsson. 1996. Determination of the structural role of the N-terminal domain of human extracellular superoxide dismutase by use of protein fusions. *Biochim.Biophys.Acta.* 1292:47-52.
- Tojo, T., M. Ushio-Fukai, M. Yamaoka-Tojo, S. Ikeda, N. Patrushev ja R.W. Alexander. 2005. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation.* 111:2347-2355.
- Ushio-Fukai, M. ja R.W. Alexander. 2004. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol.Cell.Biochem.* 264:85-97.

- Ushio-Fukai, M., Y. Tang, T. Fukai, S.I. Dikalov, Y. Ma, M. Fujimoto, M.T. Quinn, P.J. Pagano, C. Johnson ja R.W. Alexander. 2002. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ.Res.* 91:1160-1167.
- Vilar, R.E., D. Ghael, M. Li, D.D. Bhagat, L.M. Arrigo, M.K. Cowman, H.S. Dweck ja L. Rosenfeld. 1997. Nitric oxide degradation of heparin and heparan sulphate. *Biochem.J.* 324 (Pt 2):473-479.
- Wan, X.S., M.N. Devalaraja ja D.K. St Clair. 1994. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 13:1127-1136.
- Wang, X.T., P.Y. Liu ja J.B. Tang. 2006. PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-kappaB gene in signal pathways in ischemic flaps. *Plast.Reconstr.Surg.* 117:129-37; discussion 138-9.
- Weisiger, R.A. ja I. Fridovich. 1973a. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J.Biol.Chem.* 248:4793-4796.
- Weisiger, R.A. ja I. Fridovich. 1973b. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J.Biol.Chem.* 248:3582-3592.
- Worgall, S., P.L. Leopold, G. Wolff, B. Ferris, N. Van Roijen ja R.G. Crystal. 1997. Role of alveolar macrophages in rapid elimination of adenovirus vectors administered to the epithelial surface of the respiratory tract. *Hum.Gene Ther.* 8:1675-1684.
- Yamamoto, M., H. Hara ja T. Adachi. 2001. Nitric oxide and its decomposed derivatives decrease the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett.* 505:296-300.
- Yasuda, M., Y. Ohzeki, S. Shimizu, S. Naito, A. Ohtsuru, T. Yamamoto ja Y. Kuroiwa. 1999. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci.* 64:249-258.
- Zanetti, M., L.V. d'Uscio, T.E. Peterson, Z.S. Katusic ja T. O'Brien. 2005. Analysis of superoxide anion production in tissue. *Methods Mol.Med.* 108:65-72.
- Zhang, R., L. Wang, L. Zhang, J. Chen, Z. Zhu, Z. Zhang ja M. Chopp. 2003. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ.Res.* 92:308-313.
- Ziche, M., L. Morbidelli, R. Choudhuri, H.T. Zhang, S. Donnini, H.J. Granger ja R. Bicknell. 1997. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J.Clin.Invest.* 99:2625-2634.
- Ziche, M., L. Morbidelli, E. Masini, S. Amerini, H.J. Granger, C.A. Maggi, P. Geppetti ja F. Ledda. 1994. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J.Clin.Invest.* 94:2036-2044.

Ziegler, T., P. Silacci, V.J. Harrison ja D. Hayoz. 1998. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension*. 32:351-355.

Zweier, J.L., P. Kuppusamy ja G.A. Luty. 1988. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:4046-4050.