



MITEN KROONISEN MYELOOISEN LEUKEMIAN NYKYHOIDOT VAIKUTTAVAT POTILAAN IMMUNOGLOBULIINITASOIHIN?

Anniina Strömberg

Opinnäytetyö
Syyskuu 2010
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

STRÖMBERG, ANNIINA:

Miten kroonisen myelooiden leukemian nykyhoidot vaikuttavat potilaan immunoglobuliinitasoihin?

Opinnäytetyö 88 s., liitteet 9 s.
Syyskuu 2010

Krooninen myelooiden leukemia (KML) on pahanlaatuinen verisairaus, johon liittyy granulosyyttisarjan verisolujen lisääntynyt muodostuminen. Taudille on tunnusomaista niin sanottu Philadelphia-translokaatio, jolla tarkoitetaan kromosomien 9 ja 22 pitkien varsien siirtymän seurauksena syntynyttä bcr-abl-fuusiogeeniä. Krooniseen myelooiden leukemiaan sairastuu Suomessa vuosittain yhdestä kahteen potilasta väestön 100 000 asukasta kohti. Ilmaantuvuus maailmanlaajuisesti on sama. Tauti diagnosoidaan useimmiten sen oireettomassa vaiheessa poikkeavan verenkuvan jatkoselvittelyissä. Ensilinjan hoitona krooniseen myelooiden leukemiaan käytetään nykyään tyrosiinikinaasimestäjäälääkkeitä, yleisimmin imatinibia (Glivec®). Tyrosiinikinaasimestäjäälääkkeillä suurin osa potilaista saavuttaa hyvän hematologisen, syto- ja molekyylogeneettisen vasteen.

Immunoglobuliinitasojen mahdollista muuttumista oli ja on edelleen syytä tutkia, sillä hoidon pitkäaikaisvaikutuksista ei ole vielä tarpeeksi tietoa. Opinnäytetyössäni selvitettiin, miten kroonisen myelooiden leukemian hoito kolmella tyrosiinikinaasimestäjäälääkkeellä (imatinibi, dasatinibi ja nilotinibi) vaikuttaa potilaan immunoglobuliinitasoihin 1, 3, 6 ja 12 kuukauden kuluttua hoidon aloittamisen jälkeen diagnoosivaiheeseen verrattuna. Muutokset immunoglobuliinitasoissa määritettiin immunoturbidometriseen menetelmään perustuen. Opinnäytetyö toteutettiin kokeellisena tutkimuksena.

Tutkimusaineisto koostui 19 KML-potilaan viiden eri aikapisteen näytteistä. Tulokset esitetään kirjallisessa muodossa erilaisten viiva- ja pistekaavioiden avulla. Saadut tulokset osoittivat pientä laskua erityisesti imatinibia käyttävien potilaiden immunoglobuliinitasoissa ja lähinnä heidän IgG-pitoisuuksissaan. Yhdellä potilaalla sekä IgG-, IgA- että IgM-tasot putosivat hyvin matalalle hoidon edetessä.

Tällä hetkellä immunoglobuliinitasoja ei rutiinisti määritetä KML-potilailta. Tekemääni tutkimusta tulisikin jatkaa suuremmalla otannalla ja mahdollisesti KML-potilaiden immunoglobuliinitasojen määrittämisestä tulevaisuudessa olisi hyötyä. Opinnäytetyöni on suunnattu erityisesti Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön henkilökunnan käyttöön, mutta myös oheismateriaaliksi bioanalytiikan opiskelijoille ja muille kroonisesta myelooiden leukemiaa kiinnostuneille.

Avainsanat: krooninen myelooiden leukemia, Philadelphia-kromosomi, tyrosiinikinaasimestäjä, immunoglobuliini, immunoturbidometria

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

STRÖMBERG, ANNIINA:

How Does the Current Treatment of Chronic Myeloid Leukemia Affect the Immunoglobulin Levels?

Bachelor's thesis 88 pages, appendices 9 pages
September 2010

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant granulocytic disease which leads to an uncontrolled growth and greatly expanded total mass of granulocytic blood cells in peripheral blood as well as in bone marrow. The so-called Philadelphia-translocation is characteristic of CML. The translocation is formed as parts of chromosomes 9 and 22 switch their positions. As a consequence, an abnormal BCR-ABL fusion gene comes into existence. The annual incidence of chronic myeloid leukemia in Finland and worldwide is the same, about 1 to 2 new cases per 100,000 individuals. The disease is most likely diagnosed at the further investigations of an abnormal blood count. At that time, the disease is usually in a symptomless chronic phase. Tyrosine kinase inhibitors, such as imatinib (Glivec[®]), are nowadays used as a first-line treatment in chronic myeloid leukemia. With tyrosine kinase inhibitors, most patients will achieve proper hematological, cytogenetic, and molecular responses.

In this bachelor's thesis, the effects of the treatment of chronic myeloid leukemia with three tyrosine kinase inhibitors (imatinib, dasatinib, and nilotinib) on patients' immunoglobulin levels 1, 3, 6, and 12 months after the treatment compared to the situation at diagnosis have been examined. It is important to examine changes which may occur in immunoglobulin levels, because the long-term influences of the medicines are not yet fully understood. Measuring the changes in immunoglobulin levels was based on an immunoturbidometric method. The thesis was carried out as a quantitative study.

The research material consisted of the samples of 19 CML patients at five different points in time. The results are presented using different graphic figures. The results showed a reduction in immunoglobulins to some extent.

At the moment, the immunoglobulin levels of CML patients are not examined routinely. Accordingly, the research should be continued with a larger amount of patients. The examination of immunoglobulin levels of CML patients will potentially be reasonable in the future. This bachelor's thesis is primarily directed to the personnel at the Biomedicum Hematological Research Unit. However, it is also meant to be used as a study material among students in the Degree Programme in Biomedical Laboratory Science as well as others interested in chronic myeloid leukemia.

Keywords: chronic myeloid leukemia, Philadelphia-chromosome, tyrosine kinase inhibitor, immunoglobulin, immunoturbidometry

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
2 KROONINEN MYELOOINEN LEUKEMIA	8
2.1 Taudin syntymekanismi ja Philadelphia-kromosomi	9
2.2 Taudin vaiheet ja luokittelu	12
2.3 Oireet ja diagnoosi	13
3 KROONISEN MYELOOISEN LEUKEMIAN HOITO	19
3.1 Tyrosiinikinaasineestäjät	20
3.1.1 Imatinibi (Glivec®)	23
3.1.2 Dasatinibi (Sprycel®)	26
3.1.3 Nilotinibi (Tasigna®)	29
3.2 Muut hoitomuodot	31
3.3 Lääkehoitojen seuranta ja taudin ennuste	33
4 IMMUNOGLOBULIINIT	35
4.1 Immunoglobuliinien tehtävät ja rakenne	36
4.2 Immunoglobuliini G	37
4.3 Immunoglobuliini A	39
4.4 Immunoglobuliini M	40
4.5 Immunoglobuliinien määrittäminen immunoturbidometrisesti	42
5 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	45
6 TUTKIMUSTEHTÄVÄ, TARKOITUS JA TAVOITE	49
7 KOKEELLINEN TUTKIMUS	51
8 TUTKIMUKSEN VAIHEET	54
8.1 Tutkimusnäytteet	54
8.2 Eri työvaiheissa käytetyt välineet, laitteet, reagenssit ja kontrollit	55
8.3 Työvaiheet	56
8.4 Tulokset ja tulosten analysointi	58
8.4.1 Antikoagulanttien merkitys	58
8.4.2 Imatinibipotilaat	59
8.4.3 Dasatinibipotilaat	61
8.4.4 Nilotinibipotilaat	63
8.4.5 Immunoglobuliinitasot 12 kk kuluttua diagnoosivaiheesta	64
9 TUTKIMUSTULOKSISTA TEHDYT JOHTOPÄÄTÖKSET	67
10 POHDINTA	70
LÄHTEET	75
LIITTEET	80

1 JOHDANTO

Opinnäytetyöni liittyy krooniseen myelooiseen leukemiaan ja sen hoitoon tyrosiinikinaasineestäjälääkkeillä. Krooninen myeloinen leukemia (KML) on pahanlaatuinen verisairaus, jolle on tyypillistä luuytimen lisääntynyt granulosityttisarjan verisolujen tuotanto. Taudille on tunnusomaista kromosomien 9 ja 22 pitkien varsien välisen siirtymän seurauksena muodostunut bcr-abl-fuusiogeneeni, joka ilmenee kromosomitutkimuksessa niin sanottuna Philadelphia-translokaationa. Fuusiogeneeni tuottaa jatkuvasti aktiivisessa muodossa olevaa tyrosiinikinaasientsyymiä, jonka toiminnalla on keskeinen merkitys taudin synnyssä.

Koska taudin syntymekanismi tunnetaan molekyyllitasolla hyvin, on tautiin pystytty kehittämään juuri pahanlaatuiseen solukkoon kohdennettu hoitomuoto ensimmäisenä syöpätautien joukossa. Tyrosiinikinaasineestäjänä toimivaa imatinibia käytetään ensilinjan lääkkeenä Philadelphia-kromosomiposiitiivisen kroonisen myelooisen leukemian hoitoon. Käytössä on myös niin sanottuja imatinibia laajakirjoisempia toisen polven tyrosiinikinaasineestäjiä, kuten dasatinibi ja nilotinibi. Krooninen myeloinen leukemia on jatkuvan tutkimuksen alla oleva tauti, joten uuden tiedon löytyessä myös hoitolinjat muuttuvat. Tällä hetkellä hoidon tavoitteena pidetään potilaan normaalia elämänlaatua ja 100 % selviytymistä ilman taudin etenemistä.

Vaikka lääkkeet vaikuttavat pääasiallisesti syöpäsoluihin, voi niillä olla vaikutuksia myös terveisiin soluihin. In vitro -solututkimukset ovat osoittaneet, että lääkkeet voivat vaikuttaa muun muassa T-lymfosyyttien aktivoitumiseen ja jakautumiseen ja tällä voi olla merkitystä potilaiden puolustuskyvyssä. Helsingissä sijaitsevassa Biomedicum Hematologisessa tutkimusyksikössä tehtyjen tutkimusten pohjalta on havaittu, että osalla potilaista nähdäänkin muutoksia leukosyyttien aktivoitumisprofiilissa. Lisäksi on havaittu, että esimerkiksi B-lymfosyytit vähentyvät hoidon aikana ja tällä voi olla merkitystä vasta-aineiden tuotannossa ja rokotevasteiden kehittämisessä.

Sain aiheen opinnäytetyölleni Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön erikoislääkäri Satu Mustjoelta syyskuussa 2009. Opinnäytetyöni tavoite on tuottaa tietoa Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön käyttöön. Tarkoitus on selvittää, miten kroonisen myeloosin leukemian lääkehoidot kolmella eri tyrosiinikinaasineestäjälääkkeellä vaikuttavat potilaiden immunoglobuliinitasoihin ja siten ehkä puolustuskykyyn. Tehtäväni on tutkia immunoturbidometriseen menetelmään perustuen mahdolliset muutokset potilaiden immunoglobuliinitasoissa.

Kroonisen myeloosin leukemian hoitoon liittyvien tekijöiden tutkiminen on ajankohtaista sekä yleisesti että henkilökohtaisesti. Koska taudin hoitomuodot kehittyvät jatkuvasti, niiden kaikkia pitkäaikaisvaikutuksia ei vielä tarkkaan tiedetä. Aiheen henkilökohtainen ajankohtaisuus johtuu noin neljä vuotta sitten isälläni todetusta kroonisesta myeloosista leukemiasta. Tutkimusaihe on siis henkilökohtaisesti hyvin ajankohtainen sekä erittäin kiinnostava. Se on perusteltu myös ammattialan kannalta. Tutkimusta krooniseen myeloosiseen leukemiaan liittyen tehdään Suomessa ja muualla maailmassa koko ajan. Laboratoriohoitajien ja bioanalyttikoiden työpanos tutkimuksessa on tärkeä, sillä laboratoriohoitaja ottaa ja analysoi näytteet, ja saatuja tuloksia käytetään hyväksi potilaan hoidossa. Laboratoriohoitaja voi toimia myös tutkimusryhmän jäsenenä.

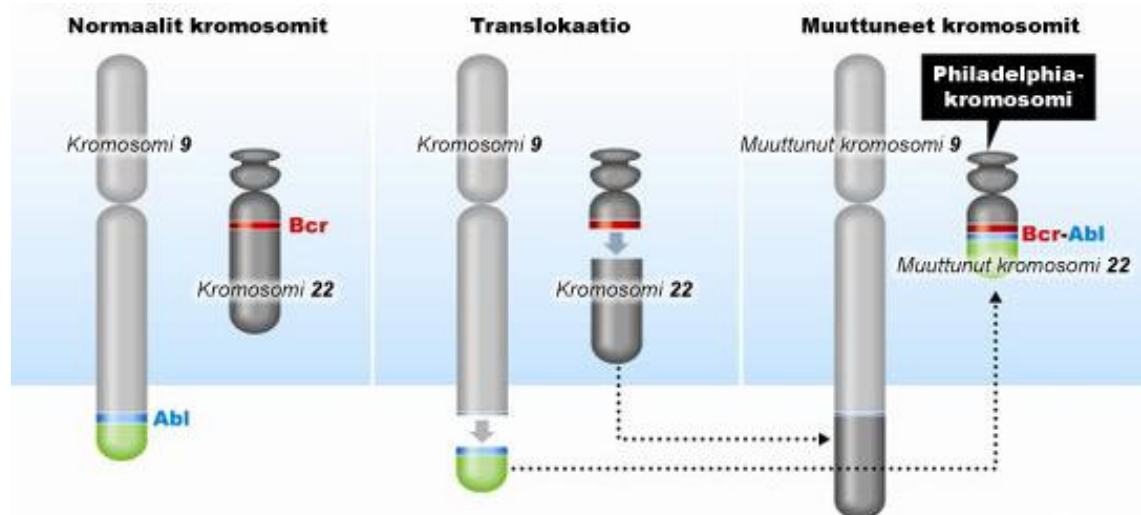
Tarkoitukseni ei ole laatia yksityiskohtaista selvitystä kroonisesta myeloosista leukemiasta, vaan keskittyä taudin hoidon vaikutuksiin potilaan immunoglobuliinitasoissa. Olen rajannut aiheeni koskemaan aikuispotilaiden hoitoja ja ainoastaan imatinibi-, dasatinibi- ja nilotinibilääkkeillä. Teoreettisessa viitekehysessä käsittelen kroonista myeloosista leukemiaa yleisesti, sen hoitomuotoja, erityisesti tyrosiinikinaasineestäjälääkkeillä, sekä immunoglobuliineja, joista käsittelen ainoastaan tutkimukseni kannalta oleellisia immunoglobuliiniluokkia IgG, IgA ja IgM.

Pirkanmaan ammattikorkeakoulussa on vuonna 2005 tehty opinnäytetyö kyseessä olevaan aiheeseen liittyen. Bioanalytiikan koulutusohjelman opiskelijat Hanna Koskenaho ja Terhi Lehtinen ovat tehneet opinnäytetyön ”Krooniseen myeloosiseen leukemiaan liittyvät kromosomaaliset muutokset Imatinibi -hoidon

aikana, Pirkanmaan sairaanhoitopiirissä”. Alustavaa tutkimusta läheisemmin juuri immunoglobuliinitasoihin liittyen on myös tehty. Esimerkiksi Juan Luis Steegmann tutkimusryhmänsä kanssa on julkaissut vuonna 2003 tutkimuksen, jonka tavoitteena on ollut selvittää imatinibihoidon vaikutuksia potilaiden immunoglobuliinitasoihin sekä lymfopoeesiin. Kirjallisen työni käsitteiden ymmärtämisen kannalta lukijalla tulisi olla pohjatietoa hematologiasta ja immunologiasta sekä laboratoriodiagnostiikasta ja kokeellisen tutkimuksen perusmenetelmistä.

2 KROONINEN MYELOOINEN LEUKEMIA

Krooninen myelooinen leukemia (KML) on pahanlaatuinen myeloproliferatiivinen verisairaus, jolle on luonteenomaista granulosyyttisarjan verisolujen lisääntynyt muodostuminen. Tämä johtaa sekä kypsien granylosyyttien että epäkypsiin solumuotojen lisääntyneeseen esiintymiseen perifeerisessä veressä. Tauti saa alkunsa epänormaalista monikykyisestä luuytimen kantasolusta. Lisäksi taudin taustalla on bcr-abl-fuusiogeenin (breakpoint cluster region, abelson) syntyminen, mikä ilmenee kromosomitutkimuksessa niin sanottuna Philadelphia-kromosomina, joka on esitetty alla olevassa kuvassa 1. (Vardiman, Melo, Baccarani & Thiele 2008, 32; Besa & Woermann 2010.)



KUVA 1. Kroonisen myelooinen leukemian kromosomimuutos (Novartis oncology 2010)

Krooninen myelooinen leukemia etenee joko kahdessa tai kolmessa vaiheessa; alun kroonisen vaiheen jälkeen seuraa joko akseleraatio- eli kiihtynyt vaihe tai blastikriisi eli akuutin leukemian kaltainen tila, joskus molemmat. Suomessa KML:aan sairastuu vuosittain noin 45–50 potilasta. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.) Maailmanlaajuisesti ilmaantuvuus on sama; 1-2 sairastunutta väestön 100 000 ihmistä kohti. Krooniseen myelooiseen leukemiaan voi sairastua minkä ikäisenä tahansa, mutta yleisimmin tauti todetaan 50–60 vuoden iässä. Tauti on hiukan yleisempi miehillä kuin naisilla. (Vardiman ym. 2008, 32.) Vuonna 2010 Suomessa on arviolta 500 KML:aa sairastavaa potilasta. Parantuneen hoidon

ansioista potilaiden määrä tulee kuitenkin lisääntymään vuosittain, sillä valtaosa potilaista elää sairautensa kanssa aikaisempaa pidempään. Vain pieni osa potilaista kuolee suoranaisesti krooniseen myelooiseen leukemiaan. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.) Kroonisen myelooisen leukemian osuus kaikista aikuisten leukemioista on noin 20 % (Besa & Woermann 2010).

2.1 Taudin syntymekanismi ja Philadelphia-kromosomi

Kroonisen myelooisen leukemian syntymekanismi tunnetaan molekyyllitasolla hyvin. Tämä onkin ollut edellytyksenä taudin hoitomuotojen kehittymiselle viime vuosina. (Porkka 2005.) Taudille on tunnusomaista niin sanottu Philadelphia-kromosomi (Ph-kromosomi). Philadelphia-kromosomilla tarkoitetaan translokaation seurauksena syntynyttä poikkeavaa kromosomia 22, joka on muodostunut kromosomien 9 ja 22 pitkien käsivarsien vaihtaessa paikkaa siten, että on syntynyt pidentynyt kromosomi 9 ja lyhentynyt kromosomi 22 (kuva 1 sivulla 8). Translokaatio johtaa rajakohdissa olevien geenien osumisen lähelle toisiaan tavalla, joka ei ole mahdollista terveessä elimistössä. Tutkimuksen edetessä huomattiin, että kromosomissa 9 olevan abl-geenin ja kromosomissa 22 olevan bcr-geenin osuminen vierekkäin muodostaa fuusiogeenin, joka tuottaa poikkeavaa bcr-abl-proteiinia normaalin c-abl-proteiinin sijaan. (Koskenvesa & Mustjoki 2010; MediFocus 2010, 16.)

Normaalin abl-geenin tuottaman proteiinin tehtävä on osallistua solujen proliferaatioon. Proteiinin toiminnalla on luultavasti vaikutusta myös lymfopoeesiin. (Steegmann ym. 2003, 762.) Proteiinin on todettu kulkevan solun tumän ja sytoplasman välillä niin sanottujen transduktioreittien osana osallistuen solujen toimintaa muokkaavien kemiallisten viestien välittämiseen. Proteiinia on tavattu erityisesti selkärankaisten hematopoeettisissa soluissa. Usein varsinainen transduktioreitti vaatii aktivoituakseen proteiinin fosforylaation. Normaalin bcr-geenin tuottaman proteiinin tehtäviä ei tarkkaan tiedetä. Fuusiogeenistä on olemassa ainakin neljä erilaista versiota riippuen bcr-geenin katkeamiskohdasta. Yleisimmin katkeaminen tapahtuu geenin keskivaiheilta, jolloin syntynyttä geeniä kutsutaan major-bcr-geeniksi. (Randoph 2005, 43-44.)

Taudille ominainen bcr-abl-fuusiogeeni syntyy kromosomialueelle 9q34 paikantuvan abl (abelson) –geenin ja kromosomialueelle 22q11 paikantuvan bcr (brakepoint cluster region) –geenin yhdistyessä (Vardiman ym. 2008, 35). Kyseistä fuusiogeeniä ja sen tuottamaa proteiinia (bcr-abl-tyrosiinikinaasia) ei ole terveissä ihmisissä lainkaan, minkä vuoksi se soveltuu hyvin sekä taudin tarkkaan seurantaan että hoidon kohdentamiseen ainoastaan pahanlaatuiseen solukkoon. Philadelphia-kromosomi on havaittavissa kaikissa myelooisen solulinjan soluissa, joskus myös B-lymfosyyteissä sekä harvoin T-lymfosyyteissä. Noin 10 % KML-potilaista translokaatio on monimutkaisempi, jolloin siihen osallistuu kromosomien 9 ja 22 lisäksi yksi tai kaksi muuta kromosomia. (Goldman & Mughal 2005, 605; Porkka 2005.)

Tällä hetkellä bcr-abl-fuusiogeenin rakenne, eli kromosomeissa 9 ja 22 tapahtunut translokaatio, ja toiminta tunnetaan jokseenkin hyvin. Kuitenkin on edelleen epäselvää, mikä aikaansaa kyseisten geenien katkeamisen ja siten fuusiogeenin syntymisen ja miksi tauti ilmenee granulosyyttien ja joskus myös trombosyyttien ja basofiilien määrän kasvuna veressä. (Goldman & Mughal 2005, 605; Porkka & Koistinen 2007, 324-325.) Epäillään, että altistumisella ionisoivalle säteilylle ja ehkä myös bentseenille on merkitystä taudin syntymiseen, mutta yleensä mitään selvää syytä ei voida osoittaa (Besa & Woermann 2010; MediFocus 2010, 16).

Lähes kaikki maligniteetit, tyypistä riippumatta, perustuvat DNA:ssa tapahtuvien mutaatioiden sarjaan, jolloin syöpä etenee pre-malignista maligniin mutaatioiden määrän lisääntyessä ja vaikuttaessa solujen kasvuun ja erilaistumiseen yhä enemmän. Krooninen myeloinen leukemia yhdessä akuutin myelooisen leukemian kanssa ovat kuitenkin poikkeuksia muihin maligniteetteihin verrattuna, sillä sekä kroonisessa että akuutissa myelooisessa leukemiassa yksi ainut mutaatio perimässä riittää aiheuttamaan leukeemisen muutoksen. Tosin akuuttiin myelooiseen leukemiaan liittyy yleensä useampia muutoksia. Kroonisen myelooisen leukemian kohdalla tätä muutosta nimitetään Philadelphia-kromosomiksi. Kroonisen myelooisen leukemian erilaisesta syntyvästä muihin syöpiin verrattuna on myös etua, sillä yhden mutaation ansiosta siihen on pystytty kehittämään hoitomuoto, joka kohdentuu suoraan taudin

syntymekanismiin, Philadelphia-kromosomiin ja translokaation seurauksena syntyneeseen bcr-abl-fuusiogeeniin. (Randolph 2005, 39.)

Philadelphia-kromosomilla ja siirtymän seurauksena syntyneellä bcr-abl-yhdistelmägeenillä on suurempi tyrosiinikinaasiaktiivisuus kuin normaalilla c-abl-geenillä, mikä puolestaan saa luuytimen tuottamaan leukemisia valkosoluja (Goldman & Mughal 2005, 606). Normaalisti elimistö säätelee solutuotantoaan hyvin tarkasti ja kontrolloidusti. Solut, joissa bcr-abl-yhdistelmägeeni esiintyy, lakkaavat kuitenkin noudattamasta elimistön säätelyjärjestelmiä, jolloin ne pystyvät jakautumaan ja tuottamaan uusia leukosyyttejä jatkuvasti. Taudin alkuvaiheessa luuytimen solumäärä lisääntyy huomattavasti, ja verenkiertoon pääsee myös varhaismuotoisia soluja merkinä solutuotannon kiihtymisestä. Kroonisessa vaiheessa solujen liikatuotanto rauhoittuu ja solujen kypsyminen on lähes normaalia, mutta mikäli tautia ei hoideta, syntyy perintöainekseen hiljalleen uusia muutoksia. Tällöin solutuotanto taas kiihtyy ja varhaismuotoiset solut pääsevät verenkiertoon aiheuttaen ongelmia, jotka johtavat taudin etene- miseen joko akseleraatiovaiheeseen tai jopa blastikriisiin. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

Tyrosiinikinaasien tehtävänä on lisätä fosfaattiryhmiä muihin proteiineihin. Fosforylaatio puolestaan edistää proliferaatiota. Näin ollen translokaatiossa syntyneen bcr-abl-fuusiogeenin tuottaman proteiinin lisääntynyt tyrosiini- kinaasiaktiivisuus johtaa muutoksin, joiden perusteella krooninen myeloinen leukemia diagnosoidaan. Fuusiogeenin tuottaman proteiinin ominaisuuksista nimenomaan sen lisääntynyt tyrosiinikinaasiaktiivisuus on merkittävin. (Randolph 2005, 44-45.)

Philadelphia-kromosomin löytymisellä on ollut käännteentekevä vaikutus kroonisen myelooisen leukemian hoitoon (Randolph 2005, 40). Philadelphia- kromosomi on saanut nimensä löytöpaikkansa mukaan. Vuonna 1960 Philadelphiassa sijaitsevassa Pennsylvanian yliopistossa tutkijat Peter Nowell ja David Hungerford löysivät leukemiapotilaiden verinäytteitä tutkiessaan kahdelta potilaalta minimaalisen pienen kromosomin. Aluksi kromosomin luultiin olevan poikkeava Y-kromosomi, sillä molemmat potilaat sattuiivat olemaan miehiä. Tutkimusten edetessä tultiin kuitenkin siihen tulokseen, että kyseinen

kromosomi syntyi kromosomin 22 menettäessä osan pitkästä käsivarresta. Vuonna 1973 tutkija Janet Rowley osoitti, että poikkeava kromosomi on todellisuudessa translokaation seurausta. (Koskenvesa & Mustjoki 2010; MediFocus 2010, 16.)

2.2 Taudin vaiheet ja luokittelu

Krooninen myeloinen leukemia etenee joko kahdessa tai kolmessa vaiheessa. Alun kroonista vaihetta seuraa noin 50 % tapauksista kiihtynyt eli akseleraatiovaihe, mikä lopulta johtaa blastikriisiin, akuutin leukemian kaltaiseen tilaan. Osa tapauksista etenee tehokkaasta lääkityksestä huolimatta suoraan blastikriisivaiheeseen. Hyvin lääkittynä krooninen vaihe voi kuitenkin kestää useita vuosia, joskus jopa loppuelämän. Tällöin eteneminen tapahtuu yleensä maltillisemmin. Akseleraatiovaiheen kesto on useimmiten muutamista kuukausista muutamiin vuosiin. Blastikriisi voi alkaa paikallisesti, mutta yleensä se yleistyy hyvin nopeasti, jolloin se on erittäin vaikeahoitoinen. (Goldman & Mughal 2005, 603-604; Besa & Woermann 2010; Mustjoki 2010c.)

Akseleraatiovaiheessa perintöaines jakautuu normaalia nopeammin, jolloin uusien mutaatioiden ja kromosomimuutosten riski lisääntyy. Tässä vaiheessa tauti etenee ilman hoitoa nopeasti blastikriisiin, mikä johtaa hoitamattomana kuolemaan usein viikoissa. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.) Taudin etenemiseen johtavia molekylaarisia syitä ei vielä tiedetä. Kuitenkin noin 80 % potilaista taudin etenemiseen akseleraatiovaiheeseen ja blastikriisiin liittyy Ph-kromosomin lisäksi muitakin sytogeneettisiä muutoksia. Näitä voivat olla esimerkiksi ylimääräinen Ph-kromosomi, trisomia 8, 9, 19 ja 21 sekä isokromosomi 17 tai Y-kromosomin deleetio. Tutkimus taudin etenemiseen liittyvien kromosomaalisten lisämuutosten suhteen on vielä kesken, mutta tässä vaiheessa uskotaan, että taudin etenemiseen liittyvät geneettiset muutokset olisivat havaittavissa ennen taudin varsinaista etenemistä. (Vardiman ym. 2008, 36; Besa & Woermann 2010.) Tauti diagnosoidaan kuitenkin lähes aina sen kroonisessa vaiheessa, jolloin hoidon nopealla aloituksella päästään hyviin tuloksiin. Vuosittain vain muutaman uuden potilaan tauti diagnosoidaan

akseleraatiovaiheessa, ja blastikriisivaiheessa olevia potilaita diagnosoidaan vuosittain vain yksittäisiä. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

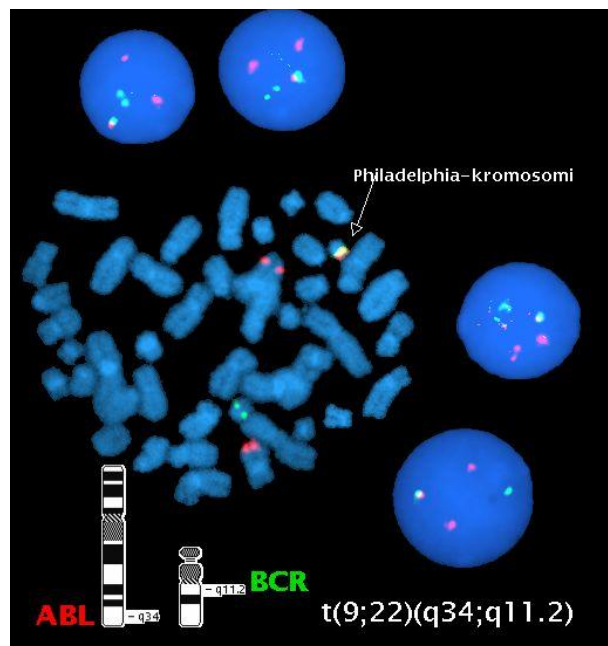
World Health Organization (WHO) määrittelee taudin vaiheet siten, että krooninen myeloinen leukemia on kroonisessa vaiheessa, kun blastien määrä perifeerisessä veressä ja luuytimessä on $< 10\%$. Akseleraatiovaiheessa KML on silloin, kun joku seuraavista edellytyksistä täyttyy: perifeerisessä veressä tai luuytimessä on blasteja $10\text{--}19\%$, perifeerisessä veressä on basofiilejä $\geq 20\%$, trombosyyttejä on $< 100 \times 10^9/l$ tai $> 1000 \times 10^9/l$, potilaalla on hoitoresistentti leukosytoosi ja splenomegalia tai klonaalisen evoluution merkit eli lisämuutokset kromosomitutkimuksessa. Blastikriisivaiheessa perifeerisessä veressä tai luuytimessä on $\geq 20\%$ blasteja tai luuytimen kristabiopsiassa esiintyy laajoja blastisaarekkeita. (Porkka 2007; Vardiman ym. 2008, 32-34.)

Kroonisen myelooisen leukemian kroonista vaihetta on yritetty jakaa erilaisiin alaluokkiin, jotta olisi helpompi ennustaa kroonisen vaiheen kestoa yksittäisten potilaiden kohdalla. Taudin etenemisnopeuden arviointiin onkin kehitetty erilaisia riskipisteluokituksia. Yleisimpiä näistä ovat Sokalin ja Hasfordin riskipisteet, joilla taudin ennustetta voidaan arvioida kohtalaisen hyvin. Riskipisteiden laskemiseen käytetään seuraavia diagnoosivaiheen muuttujia: potilaan ikä, veren trombosyyttien, basofiilien, eosinofiilien ja blastien määrä sekä pernan koko. (Goldman & Mughal 2005, 604.) Uusien tutkimusten myötä tärkeimpänä ennusteeseen vaikuttavana tekijänä pidetään kuitenkin lääkehoitoihin, kuten imatinibihoitoon saatua vastetta (Porkka & Koistinen 2007, 328).

2.3 Oireet ja diagnoosi

Useimmiten krooninen myeloinen leukemia todetaan taudin oireettomassa vaiheessa poikkeavan verenkuvan jatkoselvittelyissä tai havaittaessa suurentunut perna rutiinilääkärintarkastuksessa. Alkuvaiheen oireita saattavat olla poikkeava väsymys, lievä kuumeilu, hikoilu, painonlasku tai kipu vasemmalla puolen ylävatsaa. (Besa & Woermann 2010.) Kroonisen myelooisen leukemian diagnoosi perustuu pohjimmiltaan niin sanottuun G-raita-

kromosomitutkimukseen, jossa todetaan kromosomien 9 ja 22 muodostama Philadelphia-translokaatio noin 90 % potilaista. Tätä kutsutaan vakiotranslokaatioksi. Lisäksi noin 10 - 15 % potilaista esiintyy niin sanottuja varianttimuotoja, joissa joko kromosomin 9 sijaan translokaatioon osallistuu jokin toinen kromosomi tai kromosomien 9 ja 22 lisäksi translokaatiossa on jokin kolmas kromosomi. Tällöin puhutaan varianttitranslokaatiosta. Varianttimuodoilla ei tiedetä olevan vaikutusta taudin ennusteeseen. (Porkka & Koistinen 2007, 327; Koskenvesa & Mustjoki 2010.) Alla olevassa kuvassa 2 on esitetty KML-potilaan FISH-tulos. Kuvassa nähdään abl-geenistä peräisin olevan punaisen signaalin ja bcr-geenistä peräisin olevan vihreän signaalin fuusioituminen, jonka seurauksena on syntynyt taudille tunnusomainen Philadelphia-kromosomi (Porkka & Koistinen 2007, 122).



KUVA 2. Spesifinen FISH-kuva Philadelphia-kromosomista (Kähkönen 2010)

Noin 10 prosentilla potilaista Philadelphia-kromosomia ei pystytä osoittamaan. Kroonisen myeloisen leukemian diagnosoiminen edellyttää kuitenkin joko Philadelphia-kromosomin tai fuusiogeenin löytymistä. Tutkimiseen voidaan käyttää joko PCR- eli polymeraasiketjureaktiomenetelmää tai FISH-tutkimusta (fluorescence in situ hybridization). (Porkka 2007; MediFocus 2010, 17-19.) Fluorescence in situ hybridization –tutkimusta voidaan käyttää sekä taudin toteamisvaiheessa että hoitovasteen seurannassa. Tutkimus perustuu

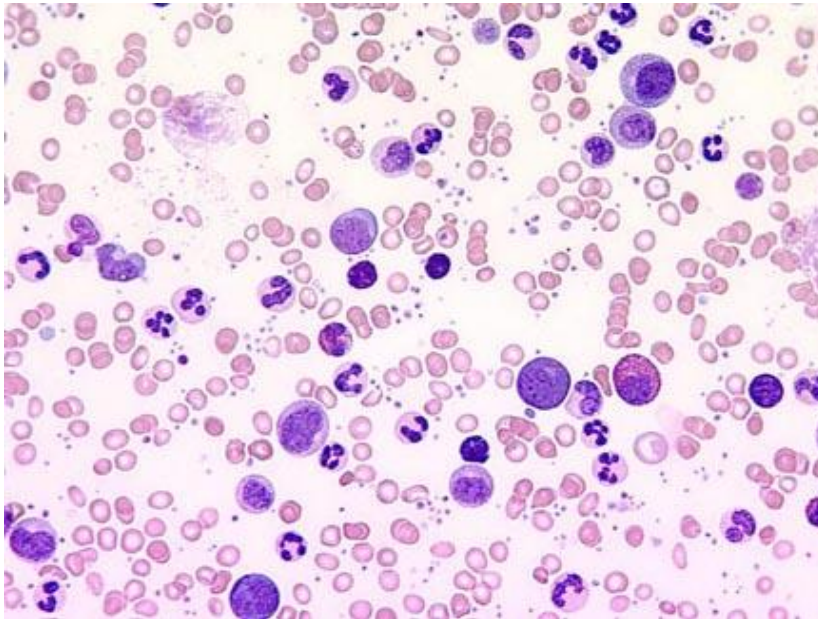
fluoresoivilla väriaineilla leimattuihin koettimiin, jotka sitoutuvat halutulla alueella oleviin geeneihin. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

Niin sanotussa G-raita-tutkimuksessa potilaan näytteestä tutkitaan useimmiten 20 solua, joista määritetään, kuinka monessa solussa Philadelphia-kromosomi esiintyy. Diagnoosivaiheessa Philadelphia-kromosomi esiintyy lähes jokaisessa tutkitussa solussa. Diagnoosivaiheessa kromosomitutkimukset tehdään aina luuydinnäytteestä, jolloin saadaan luotettavin tulos. Jatkossa, tai mikäli luuydintä ei saada, tutkimukset voidaan tehdä myös perifeerisestä verestä. Taudin seurantavaiheessa ja hoitovasteen arvioinnissa määritetään bcr-abl-fuusiogeenilähetti-RNA:n määrää verinäytteestä PCR-tekniikan avulla, sillä tämä on osoittautunut luotettavaksi ja herkäksi menetelmäksi tautitaakan arvioinnissa. Tällaisten tutkimusten avulla pystytään löytämään jopa yksi poikkeava leukemiasolu 100 000 terveen solun joukosta. (Porkka & Koistinen 2007, 327; Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

Taudin toteamisvaiheessa tehdään yleensä myös muutamia muita tutkimuksia, joilla varmistetaan esimerkiksi siitä, että potilaalle on turvallista aloittaa KML-taudin lääkehoito. Keuhkojen ja sydämen tilanteen arvioimiseksi tarkistetaan keuhkokuva. Harvinaisten sivuvaikutusmahdollisuuksien takia tarkistetaan myös sydänfilmi. Joskus luuytimen liiallinen solutuotanto aiheuttaa pernan suurentumista. Tämän takia uusille KML-potilaille tehdään yleensä ylävatsan ultraäänitutkimus, jossa tarkastellaan lähinnä pernan kokoa, mutta myös sydämen tilannetta voidaan arvioida ultraäänitutkimuksen perusteella. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

Kun verenkuvassa todetaan krooninen neutrofiilinen leukosytoosi ilman infektion merkkejä, on krooninen myeloinen leukemia poissuljettava (Porkka & Koistinen 2007, 326). Leukosyyttien määrä voi vaihdella taudin vaiheesta riippuen. Taudin diagnoosivaiheessa leukosyyttimäärä perifeerisessä veressä on yleensä $20\text{--}200 \times 10^9/l$. Oireettomilla potilailla arvo voi hyvinkin olla ainoastaan $10\text{--}20 \times 10^9/l$, mutta oireiden myötä leukosyyttimäärä voi nousta jopa $200\text{--}800 \times 10^9/l$ -tasolle. (Goldman & Mughal 2005, 608.) Tällöin myös lievä anemia on hyvin yleistä. Anemia johtuu alentuneesta erytrosyyttimuodostuksesta sekä lyhentyneestä erytrosyyttien eliniästä ja on

normokrominen sekä normosyyttinen (Porkka & Koistinen 2007, 326.) Suuresta määrästä leukosyyttejä useimmat ovat neutrofiilejä, jotka ovat valtaosin kypsiä tai lähes kypsiä sauva- tai liuskatumaisia muotoja. Erittelylaskennassa voidaan taudin vaiheesta riippuen todeta jonkin verran epäkypsiä neutrofiiliarjan soluja, kuten blasteja ja promyelosyyttejä, sekä etenkin myelosyyttejä ja metamyelosyyttejä. (Goldman & Mughal 2005, 608-609.) Taudin kroonisessa vaiheessa blastien osuus perifeerisessä veressä ei kuitenkaan nouse yli 10 % (Porkka 2007). Luonteenomaista taudille on myös basofilia ja joskus eosinofilia. Osalla potilaista todetaan trombosytoosi, mutta trombosyyttiarvo voi olla myös normaali tai jopa alentunut. (Goldman & Mughal 2005, 608-609.) Kuvassa 3 on esitetty tyypillinen perifeerisen veren sivelyvalmiste krooniseen myelooiseen leukemiaan liittyen valomikroskoopin 400-kertaisella suurennoksella. Kuvassa nähdään leukosytoosia sekä myelooisen solulinjan epäkypsiä soluja. Lisäksi kuvassa nähdään basofiliaa, eosinofiliaa ja trombosytoosia. (Besa & Woermann 2010.)

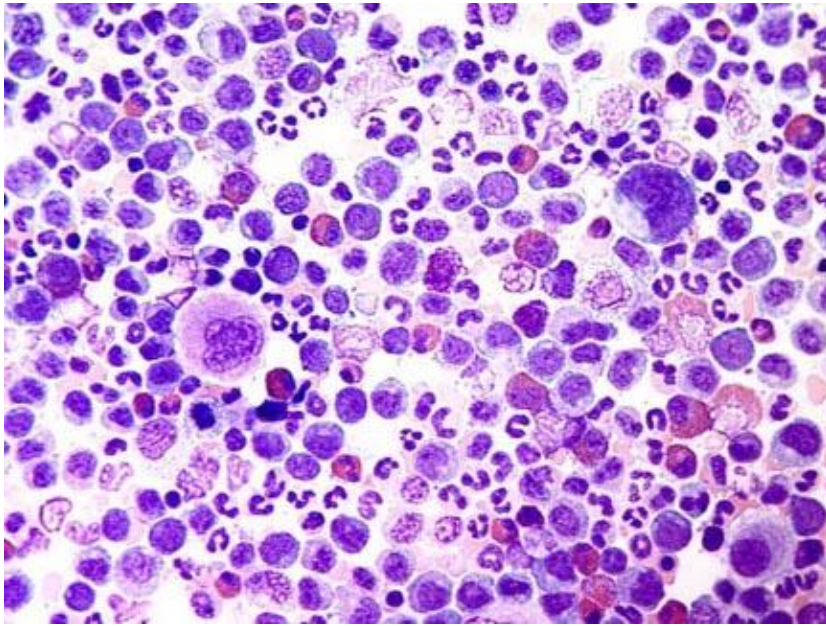


KUVA 3. Kroonista myelooista leukemiaa sairastavan potilaan perifeerisen veren sivelyvalmiste (Besa & Woermann 2010)

Taudin edetessä hematologiset löydökset voivat olla hyvinkin moninaisia. Usein verenkuvassa todetaan anemian kehittymistä, lisääntynyttä blastien ja promyelosyyttien määrää sekä korostunutta basofiliaa. Akseleraatiovaiheeseen voi liittyä joko voimakasta trombosytoosia tai trombosytopeniaa. (Goldman &

Mughal 2005, 609-610.) Taudin edetessä blastikriisiin, on blastien määrä sekä luuytimessä että perifeerisessä veressä yli 20 % (Porkka 2007). Useimmiten blastien määrä on kuitenkin paljon korkeampi, jopa 80 %. Morfologialtaan blastit voivat olla erilaisia, mutta noin 70 % potilaista ne luokitellaan myeloisen solusarjan blasteiksi, jolloin tauti on edennyt vaiheeseen, joka muistuttaa hyvin paljon akuuttia myeloista leukemiaa (AML). (Goldman & Mughal 2005, 609-610.)

Luuytimen aspiraationäytteessä nähdään tiiviitä myeloisen sarjan solurykelmiä. Luuydin on runsassoluinen ja biopsianäytteen rasvapitoisuus on huomattavasti alentunut. Myeloisten ja erytrooisten solujen suhde on noussut noin 5 – 10 -kertaiseksi. (Porkka & Koistinen 2007, 326.) Taudin kroonisessa vaiheessa luuytimessä olevien blastien määrä on alle 10 % ja basofiilien määrä alle 20 % (Porkka 2007). Luuydinnäytteessä myös megakaryosyyttien eli trombosyyttejä tuottavien esiastesolujen määrä on lisääntynyt. Ne ovat usein myös terveen henkilön vastaavia soluja pienempiä ja niiden tuma on erilainen. Usein uuden KML-potilaan luuydinnäytteen morfologiset muutokset ovat niin huomattavia, että diagnoosi voitaisiin tehdä jo pelkän luuydinnäytteen perusteella, mutta diagnoosi varmistetaan aina kuitenkin kromosomitutkimuksella. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.) Sivulla 18 olevassa kuvassa 4 on esitetty kroonista myeloista leukemiaa sairastavan potilaan luuytimen aspiraationäytteestä tehty sivelyvalmiste valomikroskoopin 400-kertaisella suurennoksella. Kuvasta voidaan nähdä granulopoieesin lisääntyminen sekä eosinofiilien ja megakaryosyyttien lisääntynyt määrä. (Besa & Woermann 2010.)



KUVA 4. Kroonista myeloista leukemiaa sairastavan potilaan luuytimen aspiraationäytteestä tehty sivelyvalmiste (Besa & Woermann 2010)

Muilla laboratoriolöydöksillä on vähäisempi merkitys kroonisen myeloisen leukemian diagnostiikassa. Yleensä seerumin alkalisen fosfataasin (AFOS) aktiivisuus on normaali tai hiukan noussut. Myös laktaattidehydrogenaasin (LD) määrä voi olla hiukan kohonnut. (Goldman & Mughal 2005, 610; Porkka & Koistinen 2007, 327.) Alkalisen fosfataasin ja laktaattidehydrogenaasin pitoisuuksien nousu johtuu mahdollisesti solukuorman vaikutuksista, mutta korkea AFOS-pitoisuus voi liittyä myös lääkitykseen (Mustjoki 2010a). Seerumin B₁₂-vitamiinipitoisuus on usein suuri, sillä leukosyytit tuottavat suuria määriä vitamiinin sitojaproteiinia. Tämän ei ole todettu aiheuttavan potilaalle haittaa. Perifeerisen veren suuresta uraattipitoisuudesta voi joskus seurata kihtioireita, mutta tätä voidaan hoitaa lääkkeillä. (Goldman & Mughal 2005, 610; Porkka & Koistinen 2007, 327.)

3 KROONISEN MYELOOISEN LEUKEMIAN HOITO

Krooninen myeloinen leukemia osattiin diagnosoida ensimmäisen kerran jo vuonna 1845, ja sitä pidetään yhtenä ensimmäisistä diagnosoitavissa olevista leukemian muodoista. Viimeisten kahdenkymmenen vuoden aikana krooniseen myelooiseen leukemiaan liittyvät tutkimukset ovat edenneet merkittävästi. Taudille on löydetty tarkoin kohdennettu hoito ensimmäisenä syöpätautien joukossa. Taudille ominaisen bcr-abl-fuusiogeenin tuottama tyrosiinikinaasi ei ole fysiologisen säätelyn alainen, joten sen aktivoimat solunsisäiset signaalivälitystiet toimivat lakkaamatta. Tästä seuraa bcr-abl-proteiinia ilmentävien solujen lisääntynyt proliferaatio, vähentynyt apoptoosi ja häiriintynyt solujen yhteys soluväliaineeseen. Edellä mainittuihin KML-solujen kasvuedun keskeisiin tekijöihin perustuu tyrosiinikinaasestäjien käyttö KML-taudin hoidossa. (Randoph 2005, 38-40; Porkka & Koistinen 2007, 325.) Lääkityksen avulla poikkeavan tyrosiinikinaasin toiminta pystytään täysin estämään (Mustjoki 1020c).

Krooniselle myelooiselle leukemialle ominaisen bcr-abl-fuusiogeenin löytyminen on mahdollistanut hoidon kehitystä siten, että hoito voidaan molekylaarisesti kohdentaa juuri tähän poikkeavaan proteiiniin. Tyrosiinikinaasestäjälääke imatinibi (Glivec[®]) kehitettiin fuusioproteiinin löytymisen seurauksena. Ensimmäisen kerran onnistuneet lääkevaikutukset raportoitiin eläinkokeiden perusteella vuonna 1996, ja jo kaksi vuotta myöhemmin, kesäkuussa 1998, lääkettä saivat ensimmäiset KML-tutkimuspotilaat. Lääkkeellä saavutettiin huomattavasti parempi hoitovaste kuin koskaan aikaisemmin, mutta ei kuitenkaan kaikilla potilailla. Potilaita, jotka eivät hyötäneet imatinibi-lääkkeestä, tutkittiin tarkemmin, jolloin huomattiin, että fuusiogeenissä tapahtuneet mutaatiot aiheuttivat lääkeresistenssin imatinibille. Lääkekehitys on nyt edennyt vaiheeseen, jossa niin sanotut toisen sukupolven tyrosiinikinaasestäjälääkkeet ovat tulleet käyttöön. Näiden lääkkeiden on todettu tehoavan hyvin potilaille, joille on kehittynyt imatinibiresistenssi. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

3.1 Tyrosiinikinaasineestäjät

Tyrosiinikinaasien keskeinen tehtävä on solun kasvun ja erilaistumisen säätely. Tyrosiinikinaasireseptorit toimivat sekä solukalvoilla että vapaana sytoplasmassa. Solukalvoilla tyrosiinikinaasireseptoreilla on solunulkoisen ligandin sitova osa ja sytoplaskan puolella häntä, jossa on adenosiniitriposfaattia (ATP) sitova kohta. Reseptorilla on kyky fosforyloida sekä itsensä että muita proteiineja. Tyrosiinikinaasineestäjien tehon uskotaan perustuvan siihen, että se kilpailee ATP:n kanssa sitoutumisesta bcr-abl-kinaasiin, jolloin se estää vapaan tyrosiinin fosforylaation. Fuusiogeenin lähettämän signaalin estäminen tällä tavoin estää leukeemisten solujen liiallisen tuotannon. (King & Robins 2006, 176; Vardiman ym. 2008, 36.)

Kroonisen myeloosin leukemian (KML) hoitoon on tällä hetkellä olemassa kolme eri tyrosiinikinaasineestäjälääkettä: imatinibi, dasatinibi ja nilotinibi. Imatinibi on KML:n hoidon mullistaneena lääkkeenä niin sanottu ensimmäisen sukupolven tyrosiinikinaasineestäjä, kun taas dasatinibi ja nilotinibi ovat myöhemmin kehitettyjä toisen sukupolven lääkkeitä. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.) Suomessa nilotinibia ja dasatinibia ei vielä käytetä ensilinjan hoitona KML-potilailla, mutta molemmat lääkkeet ovat käytössä sekä tutkimuspotilailla että potilailla, joille imatinibi ei sovellu (Mustjoki 2010a). Kroonisen myeloosin leukemian hoitoon käytettyinä kaikki edellä mainitut lääkkeet kuuluvat Kelan ylempään erityiskorvattavuusryhmään (100 %). Erityiskorvattavuuden saaminen edellyttää, että sosiaali- ja terveysministeriön yhteydessä toimiva lääkkeiden hintalautakunta on vahvistanut lääkkeelle erityiskorvattavuuden ja että potilaalla on voimassa oleva korvausoikeus kyseisen vaikean ja pitkäaikaisen sairauden hoidossa käytettävään lääkkeeseen. Erityiskorvattavuutta haetaan B-lääkärinlausunnolla, jonka on oltava Kelassa ennen kuin potilas saa erityiskorvausta. Erityiskorvaus myönnetään hoitosuunnitelman edellyttämäksi ajaksi tai enintään viideksi vuodeksi kerrallaan. (Kela 2010a; Kela 2010b.)

Imatinibia (Glivec[®]) käytetään ensilinjan lääkkeenä Philadelphia-kromosomipositiivisen kroonisen myeloosin leukemian hoitoon aikuis- ja lapsipotilaille, joiden sairaus on vasta diagnosoitu, mutta joille luuytimensiirtoa ei katsota ensisijaiseksi hoitomuodoksi. Imatinibia voidaan käyttää myös

akseleraatio- ja blastikriisivaiheisen kroonisen myeloosien leukemian hoitoon. Muita käyttöaiheita imatinibille ovat Philadelphia-kromosomipositiivinen akuutti lymfaattinen leukemia, myelodysplastinen syndrooma ja krooninen eosinofiilinen leukemia. (Kariaho ym. 2010, 1272.) Dasatinibia (Sprycel[®]) ja nilotinibia (Tasigna[®]) käytetään aikuisille sekä kroonisessa että akseleraatiovaiheessa olevan Philadelphia-kromosomipositiivisen kroonisen myeloosien leukemian hoitoon silloin, kun aikaisempi hoito, imatinibihoito mukaan lukien, on osoittautunut tehottomaksi tai potilas ei ole sietänyt sitä. Dasatinibia voidaan käyttää aikuisilla myös blastikriisivaiheessa olevan kroonisen myeloosien leukemian ja Philadelphia-kromosomipositiivisen akuutin lymfaattisen leukemian (ALL) ja lymfaattisen blastikriisivaiheisen KML:n hoitoon, kun aikaisempi hoito ei ole tuottanut tulosta tai potilas ei ole sietänyt sitä. Hoidon edellä mainituilla lääkkeillä saa aloittaa ainoastaan leukemian diagnosointiin ja hoitoon perehtynyt lääkäri. (Kariaho ym. 2010b, 2869, 2977.)

Lääkehoitojen tehosta on saatu näyttöä seuraamalla potilaiden hematologisten, sytogeneettisten ja molekyylogeneettisten vasteiden määrää sekä aikaa ilman merkkejä taudin etenemisestä. Hematologisen vasteen tavoite on perifeerisessä veressä olevien leukosyyttien määrän normalisoituminen. Kun myös trombosyyttien ja erytrosyyttien määrät ovat normaalit, voidaan puhua täydellisestä hematologisesta vasteesta. Tavoitteena pidetään seuraavia laboratoriotuloksia: leukosyytit $< 10 \times 10^9/l$, trombosyytit $< 450 \times 10^9/l$, myelosyyttien ja metamyelosyyttien määrä perifeerisessä veressä $< 5 \%$, ei blasteja eikä promyelosyyttejä perifeerisessä veressä ollenkaan, basofiilejä $< 20 \%$, eikä luuytimen ulkoista sairautta. (Kariaho ym. 2010a, 1272, 1276.) Täydellisessä hematologisessa vasteessa basofiilien määrä on normaali eli alle 1% , eikä myelosyyttejä ole perifeerisessä veressä ollenkaan (Mustjoki 2010c). Tällöin myöskään perna ei saa tuntua suurentuneena vasemmalla kylkikaaren alla (Koskenvesa & Mustjoki 2010).

Sytogeneettistä vastetta arvioitaessa lasketaan niiden solujen määrä, joissa Philadelphia-kromosomi esiintyy. Huomattava sytogeneettinen vaste saavutetaan, kun edellä mainittujen solujen määrä on alle 35% , täydellinen vaste saavutetaan vasta, kun Philadelphia-positiivisia soluja ei ole lainkaan. Molekyylogeneettisellä vasteella tarkoitetaan bcr-abl-geenin tuottaman proteiinin

määrän pienenemistä tai häviämistä KML:n hoidon aikana. Tutkimus tehdään PCR-menetelmällä. Täydellisessä molekyyligeneettisessä vasteessa ei pystytä osoittamaan poikkeavaa fuusiogeeniä ollenkaan. Tutkimus ei kuitenkaan ole absoluuttisen herkkä, joten tällöin fuusiogeenin sisältäviä soluja on yleensä vähemmän kuin yksi sataa tuhatta (1/100 000) solua kohden. Tosin harvoin päästään tällaiseen herkkyteen. Merkittävästä molekyyligeneettisestä vasteesta on kyse silloin, kun leukeemisia soluja on vähemmän kuin yksi tuhatta (1/1000) solua kohden. Tämä voidaan ilmoittaa logaritmisella asteikolla tuloksena -3,0 log tai IS-asteikolla tuloksena 0,1 %. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

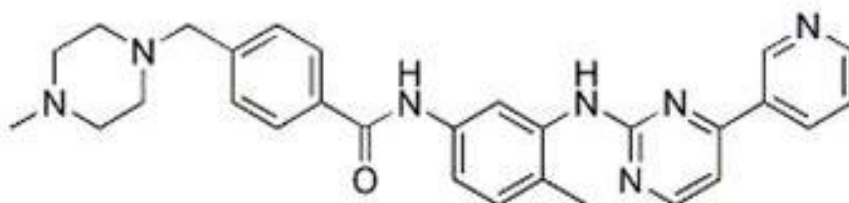
Nykytiedon mukaan kroonista myelooista leukemiaa ei pystytä lääkehoitojen avulla täysin parantamaan. Tämän hetkisillä lääkehoidoilla on kuitenkin päästy hyviin tuloksiin, eikä tauti juuri koskaan etene akseleraatiovaiheeseen tai blastikriisiin. Seitsemän vuoden seurannan aikana yli 90 prosentilla potilaista tauti ei imatinibihoidon aikana ole edennyt. (Koskenvesa & Mustjoki 2010.) Uusimpien hoitosuosituksen mukaan (American Society of Clinical Oncology 2009) tyrosiinikinaasilääkitystä ei pitäisi lopettaa missään vaiheessa. Myöskään annosta ei tulisi pienentää alle suositellun minimiannoksen (400 mg/vrk). (Baccarani ym. 2009, 6046.)

Philippe Rousselot (2007) tutkimusryhmänsä kanssa on kuitenkin tutkinut imatinibihoidon lopettamisen vaikutuksia täydellisen molekyyligeneettisen vasteen saavuttamisen jälkeen. Vuonna 2007 julkaistu tutkimus sisälsi 12 potilasta, jotka olivat saavuttaneet täydellisen molekyyligeneettisen vasteen ja joilla PCR-tutkimukseen perustuva jäännöstautimääritys oli vasteen saavuttamisen jälkeen pysynyt negatiivisena keskimäärin kahden vuoden ajan. Potilaista suurinta osaa oli aiemmin hoidettu alfainterferonilla ja sittemmin imatinibilla. Imatinibilääkitys lopetettiin ja jäännöstautimäärityksiä seurattiin ensimmäisen kuuden kuukauden aikana kuukausittain ja sen jälkeen kahden kuukauden välein. Taudin uusiutuessa imatinibilääkitystä jatkettiin välittömästi annoksella 400 mg/vrk. Potilaista kuudella tauti uusiutui viiden kuukauden sisällä hoidon lopettamisesta. Kuitenkin kuudella potilaalla (50 %) täydellinen molekyyligeneettinen vaste on säilynyt, kun jäännöstautimäärityksiä on tehty keskimäärin 18 kuukauden ajan lääkityksen lopettamisesta. Imatinibilääkityksen

lopettaminen täydellisen molekyylogeneettisen vasteen saavuttamisen jälkeen on siis mahdollista, eikä se automaattisesti johda taudin uusiutumiseen. On kuitenkin muistettava, että tämän tutkimuksen otos oli ainoastaan 12 potilasta, jolloin yleispäteviä johtopäätöksiä ei voida tehdä. Tämän tutkimuksen perusteella tutkimusryhmän jäsenet eivät suosittele imatinibilääkityksen lopettamista. Laajempaa tutkimusta asiaan liittyen tehdään parhaillaan. (Rousselot ym. 2007, 58-60.)

3.1.1 Imatinibi (Glivec®)

Imatinibi (Glivec®) on 2-fenyyliminopyrimidiini-yhdiste, joka toimii abl-tyrosiini-kinaasin estäjänä (Goldman & Mughal 2005, 611). Imatinibi on täsmälääke, sillä se estää suoraan Ph-kromosomissa olevan fuusiogeenin tuottaman bcr-abl-proteiinin toimintaa. Tämä perustuu imatinibin kykyyn estää selektiivisesti proliferaatiota ja indusoida apoptoosia nimenomaan bcr-abl-positiivisissa solulinjoissa. (Kariaho ym. 2010a, 1276.) Alla olevassa kuvassa 5 on esitetty imatinibin (C₂₉H₃₁N₇O) molekyylikaava.



KUVA 5. Imatinibin molekyylikaava (Celleck Chemicals 2010)

Yksi kalvopäällysteinen Glivec-tabletti sisältää 100 mg imatinibia. Suositeltu aloitusannos kroonisessa vaiheessa olevaa KML:aa sairastaville potilaille on 400 mg/vrk. Tarvittaessa annos voidaan nostaa 600 mg tai 800 mg vuorokaudessa. Annosmäärän nostamista voidaan harkita seuraavissa tapauksissa: tauti etenee, vähintään kolmen kuukauden hoito ei ole tuottanut tyydyttävää hematologista vastetta, 12 kuukauden hoidon aikana ei ole saavutettu sytogeneettistä vastetta tai aiemmin saavutettu hematologinen tai sytogeneettinen vaste häviää. Annosmäärän nostaminen edellyttää myös, ettei lääke aiheuta potilaalle vaikeita haittavaikutuksia ja ettei potilaalla ole vaikeaa leukemiaan liittymätöntä neutropeniaa tai trombosytopeniaa. Tabletit otetaan

suun kautta. Mikäli potilaalla on vaikeuksia niellä kalvopäällysteistä tablettia kokonaisena, on se mahdollista sekoittaa veteen tai omenamehuun. Tällöin nestettä laitetaan noin 50 ml yhtä 100 mg:n tablettia kohti. (Kariaho ym. 2010a, 1272-1273.)

Ruuansulatuskanavan ärsytyksen riskin minimoimiseksi määrätty annos on syytä ottaa aterian yhteydessä ison vesilasillisen kera. Yleensä lääke otetaan yhtenä annoksena kerran vuorokaudessa, mutta 800 mg annos tulisi jakaa kahteen annokseen ja ottaa 400 mg sekä aamulla että illalla. Annoskokoa nostettaessa potilasta on seurattava tarkasti ja on otettava huomioon myös mahdollisten sivuvaikutusten lisääntyminen. (Kariaho ym. 2010a, 1272-1273.) Suun kautta otettuna imatinibin pitoisuus perifeerisessä veressä on korkeimmillaan kahdesta neljään tunnin kuluttua. Imatinibi metaboloituu pääasiassa ulosteen mukana. (Besa & Woermann 2010.)

Imatinibin yleisimpiä haittavaikutuksia ovat muun muassa painon nousu tai lasku, neutropenia, trombosytopenia tai anemia, päänsärky tai huimaus, aistien heikkeneminen, hengenahdistus, nenäverenvuoto, silmän ympärysten tai säärien turvotus ja nesteen kertyminen, pahoinvointi ja oksentelu, ripuli, lihaskrampit, luusto- ja lihaskivut, unettomuus sekä ihottuma. Usein haittavaikutukset ovat kuitenkin lieviä ja tarpeen vaatiessa myös hoidettavissa. Joskus haittavaikutusten arviointi on vaikeaa. Potilailla, joilla on pitkälle edennyt syöpäsairaus, voi olla useita muita sairauksia. Perussairauteen liittyvät oireet, hoidon vaikutukset ja lääkkeiden yhteiskäyttö hankaloittavat haittavaikutusten syy-suhteiden arviointia. (Kariaho ym. 2010a, 1274-1275.)

Imatinibin käyttö saattaa vaikuttaa joihinkin laboratorioarvoihin. Hoito on keskeytettävä, mikäli bilirubiini nousee yli kolminkertaiseksi viitearvoon nähden tai transaminaasit (ASAT ja ALAT) nousevat yli viisinkertaisiksi viitearvoon nähden. Arvojen laskettua hoitoa voidaan jatkaa alennetuilla vuorokausiannoksilla. Vaikea neutropenia ja trombosytopenia ovat myös aiheita annoksen pienentämiseksi ja mahdollisesti hoidon keskeyttämiseksi. (Kariaho ym. 2010a, 1273.)

Imatinibi metaboloituu pääosin maksassa, joten maksan vajaatoimintaa sairastavilla potilailla on perifeeristä verenkuvaa ja maksaentsyymejä seurattava huolellisesti. Koska imatinibin munuaispuhdistuma on vähäinen (13 %), ei oleteta, että munuaisten vajaatoimintapotilailla vapaan imatinibin puhdistuma pienentyisi. Imatinibi saattaa aiheuttaa myös nestekertymiä, minkä takia potilaiden säännöllistä punnitsemista suositellaan. Punnitseminen on erityisen tärkeää, mikäli potilaalla on jonkinlainen sydämen toimintahäiriö. (Kariaho ym. 2010a, 1273-1274.)

Käytettäessä imatinibia samanaikaisesti muiden lääkkeiden kanssa on mahdolliset lääkkeiden yhteisvaikutukset otettava huomioon. Imatinibin käyttö samanaikaisesti esimerkiksi CYP3A4-entsyymiä indusoivien lääkkeiden kanssa saattaa lisätä imatinibin metaboliaa ja näin ollen pienentää sen plasmapitoisuutta, jolloin myös lääkkeen teho saattaa heikentyä. Imatinibi saattaa vaikuttaa myös P450-entsyymiperheen muiden isoentsyymien toimintaan, joten erityistä varovaisuutta on noudatettava myös levotyroksiinia, varfariinia ja parasetamolia käytettäessä samanaikaisesti imatinibin kanssa. (Kariaho ym. 2010a, 1274.)

Sytokromi P450 –entsyymiperheeseen kuuluvan entsyymin CYP3A4 arvioidaan osallistuvan tällä hetkellä käytössä olevista lääkkeistä noin 50 prosentin metaboliareitteihin. Lääkeaineita, jotka metaboloituvat CYP3A4-entsyymin välityksellä, kutsutaan CYP3A4-substraateiksi. Toisaalta monet lääkeaineet ovat CYP3A4-inhibiittoreita estäessään kyseisen entsyymin toimintaa. Lääkkeiden yhteiskäyttö voi aiheuttaa lisääntyntä toksisuutta, sillä CYP3A4-inhibiittoreiden syöminen yhtä aikaa CYP3A4-substraattien kanssa estää substraattina toimivien lääkeaineiden metaboloitumista. On olemassa myös CYP3A4-entsyymiä indusioivia lääkeaineita. Tällaisten lääkkeiden syöminen yhtä aikaa CYP3A4-substraattien kanssa puolestaan alentaa substraattina toimivien lääkkeiden plasmapitoisuutta, jolloin lääkkeen teho laskee. Tämä onkin luultavasti ajateltua yleisempää, sillä usein lääkkeen alentunut teho ajatellaan johtuvan potilaan huonosta vasteesta kyseiselle lääkeaineelle. Tyrosiinikinaasinestäjälääkkeet toimivat CYP3A4-substraatteina, sillä ne metaboloituvat muun muassa tämän entsyymin avulla. Greippimehun sekä lääkeaineista esimerkiksi ketokonatsolin ja erytromysiinin tiedetään olevan

CYP3A4-inhibiittoreita. Esimerkiksi levotyroksiini ja karbamatsepiini puolestaan ovat CYP3A4-entsyymiä indusoivia lääkeaineita. (Horn & Hansten 2008.)

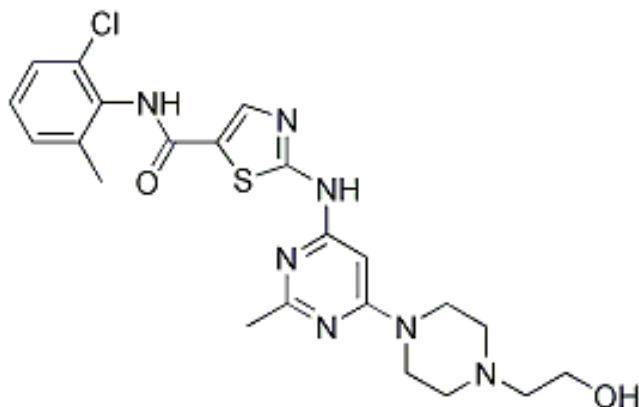
Imatinibin käytöstä raskaana oleville naisille ei ole olemassa tarkkoja tietoja (Kariaho ym. 2010a, 1273). On kuitenkin osoitettu, että sikiövaurioiden riski on lisääntynyt (Mustjoki 2010c). Myöskään imatinibin jakaantumisesta äidinmaitoon sekä lääkkeen mahdollisista vaikutuksista imeväiselle ei ole olemassa tarkkaa tietoa. Tämän takia imatinibia käyttävien naisten ei tule imettää lääkityksen aikana. Imatinibin mahdollisia vaikutuksia ajokykyyn tai koneiden käyttökykyyn ei ole tutkittu. (Kariaho ym. 2010a, 1273.) Hoidon keskeyttämistä raskaana olevalle potilaalle turvallisen raskauden varmistamiseksi voidaan harkita, mikäli potilas on saavuttanut merkittävän molekyylogeneettisen vasteen (Baccarani ym. 2009, 6043).

Tyrosiinikinaasineestäjä imatinibilla taudin kliininen ja hematologinen oirekuva parantuu nopeasti ja 80 % potilaista saavuttaa täydellisen sytogeneettisen vasteen (Goldman & Mughal 2005, 611). Joskus potilaalle saattaa kehittyä imatinibiresistenssi. Yhtenä imatinibiresistenssiin johtavana tekijänä pidetään lisämutaatioiden ilmenemistä. Toisen sukupolven tyrosiinikinaasineestäjillä, dasatinibilla ja nilotinibilla pystytään yleensä hoitamaan potilaita, joille on kehittynyt imatinibiresistenssi. (Vardiman ym. 2008, 36.)

3.1.2 Dasatinibi (Sprycel[®])

Dasatinibi on tyrosiinikinaasineestäjälääke, jota käytetään kroonisen myelooisen leukemian hoitoon silloin, kun potilaalle on kehittynyt imatinibiresistenssi tai potilas ei muusta syystä siedä hoitoa imatinibilla (Besa & Woermann 2010). Sivulla 27 olevassa kuvassa 6 on esitetty dasatinibin ($C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$) molekyylikaava. Mahdollisesti pelkkä bcr-abl-geenin toiminnan estäminen ei riitä tuhoamaan kaikkia leukeemisia soluja. Dasatinibin teho on 100–300-kertainen imatinibiin verrattuna. Lisäksi se estää myös muiden kinaasien toimintaa ja siten tehoa yleensä hyvin potilaille, joille on kehittynyt imatinibiresistenssi. (Quintás-Cardama 2006, 983.) On arvioitu, että 30-40 % imatinibipotilaista eivät saavuta täydellistä sytogeneettistä vastetta 12 kuukauden hoidon aikana. Tällaisissa

tapauksissa tehokkaamman tyrosiinikinaasinestäjän, kuten dasatinibin, arvellaan edistävän täydellisen sytogeneettisen vasteen saavuttamista ja siten parantavan potilaan pitkäaikaishoitotuloksia. (Kantarjian ym. 2010, 2261.)



KUVA 6. Dasatinibin molekyylikaava (Celleck Chemicals 2010)

Kalvopäällysteisiä dasatinibi-tabletteja on saatavilla 20 mg, 50 mg ja 70 mg vahvuisina. Kroonisen vaiheen KML-potilaille suositeltu aloitusannos on 100 mg dasatinibia kerran vuorokaudessa. Tabletit otetaan suun kautta joko aterian yhteydessä tai tyhjän mahaan. Tabletit on nieltävä kokonaisina ja ne tulisi ottaa johdonmukaisesti joko aamulla tai illalla. Annoskoko voidaan suurentaa tai pienentää lääkärin harkinnan ja potilaan hoitovasteen sekä sietokyvyn mukaan. Mikäli suositellulla aloitusannoksella ei saavuteta hematologista tai sytogeneettistä vastetta, nostetaan annosta kroonisen vaiheen KML-potilailla 140 mg vuorokaudessa ja edenneen vaiheen KML-potilailla ja Ph-kromosomiposiitivisilla akuuttia lymfaattista leukemiaa sairastavilla potilailla 180 mg vuorokaudessa. Haittavaikutusten takia annosta voidaan joskus joutua laskemaan tai hoidossa voidaan pitää tauko. Hoito keskeytetään aina, jos potilaalle kehittyy dasatinibihoidon yhteydessä vaikeita ei-hematologisia haittavaikutuksia. Kun haittavaikutus on saatu kuriin, voidaan hoitoa jatkaa pienennetyllä annoksella ottaen huomioon, kuinka vaikea haittavaikutus alun perin oli. Suun kautta otettu dasatinibi imeytyy elimistöön nopeasti, saavuttaen huippupitoisuutensa puolesta tunnista kolmeen tuntiin. Dasatinibi metaboloituu pääosin ulosteeseen. (Kariaho ym. 2010b, 2869.)

Kliiniset tutkimukset dasatinibin suhteen ovat vielä kesken. Näin ollen dasatinibin käyttöä ei suositella alle 18-vuotiaille lapsille ja nuorille. Iäkkäiden potilaiden kohdalla ei ole huomattu kliinisesti merkittäviä farmakokineettisiä eroavaisuuksia, joten annoksen muuttaminen iäkkäillä potilailla ei ole tarpeen. Kliinisissä tutkimuksissa olevien puutteiden vuoksi maksan tai munuaisten vajaatoimintaa sairastavien potilaiden kohdalla on dasatinibin käytön suhteen oltava varovaisia. Varsinaisena vasta-aiheena dasatinibilääkitykselle on ainoastaan yliherkkyys vaikuttavalle aineelle tai jollekin apuaineelle. (Kariaho ym. 2010b, 2870.)

Imatinibin tavoin dasatinibihoitoon saattaa liittyä anemiaa, neutropeniaa ja trombosytopeniaa. Usein edellä mainittuja oireita ilmenee kuitenkin vasta edenneen vaiheen KML-potilailla. Lääkitystä aloitettaessa on täydellinen verenkuvaa syytä ottaa viikoittain kahden ensimmäisen kuukauden ajan ja sen jälkeen kuukausittain tai kliinisen tarpeen mukaan. Dasatinibin käyttöön saattaa liittyä myös muita haittavaikutuksia. Yleisimpiä niistä ovat muun muassa infektiot, päänsärky, hengenahdistus ja yskä, ripuli, oksentelu, pahoinvointi ja mahakipu, ihottumat, lihas- ja luustokipu sekä nesteiden kertyminen elimistöön, väsymys ja kuume. Joillakin voi esiintyä myös ruokahaluttomuutta, depressiota ja unettomuutta, näön häiriöitä ja tinnitusta sekä muutoksia painossa. (Kariaho ym. 2010b, 2870-2871.)

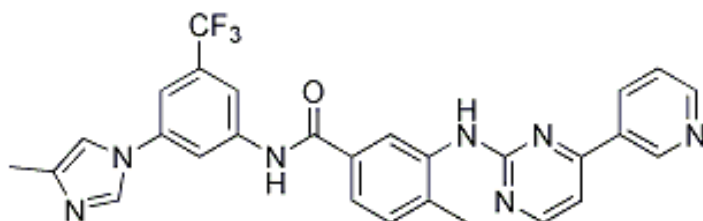
Dasatinibin käyttöä raskaana oleville naisille ei suositella, sillä lääkkeen mahdollisista vaikutuksista sikiöön ei ole olemassa tarkkoja tietoja. Tiedot ovat rajalliset myös dasatinibin erittymisestä äidinmaitoon. On mahdollista, että dasatinibi erittyy rintamaitoon, eikä riskiä imeväiselle voida poissulkea, joten imetys on syytä lopettaa dasatinibilääkityksen ajaksi. Dasatinibin vaikutuksia spermaan ei tunneta. Myöskään tutkimuksia valmisteen vaikutuksista ajokykyyn tai koneiden käyttökykyyn ei ole tehty. Ensimmäisistä dasatinibin kliinisistä tutkimuksista rajattiin pois potilaat, jotka käyttivät trombosyyttien toimintaa estäviä lääkevalmisteita tai antikoagulantteja. Näin ollen antikoagulanttien, asetyylisalisyylihapon ja ei-steroidisten tulehduskipulääkkeiden käytön suhteen samanaikaisesti dasatinibin kanssa tulee olla varovaisia. In vitro -tutkimukset ovat osoittaneet, että dasatinibi on CYP3A4-entsyymin substraatti, jolloin dasatinibin ja voimakkaiden CYP3A4-inhibiittoreiden (esim. ketokonatsoli,

erytromysiini) käyttö samanaikaisesti saattaa lisätä dasatinibialtistusta. On todettu myös, että dasatinibi sitoutuu noin 96-prosenttisesti plasman proteiineihin. Yhteisvaikutuksia muiden proteiineihin sitoutuvien lääkevalmisteiden kanssa ei ole kuitenkaan vielä tutkittu. (Kariaho ym. 2010b, 2870.)

Dasatinibilääkityksellä arvellaan voivan hidastaa taudin etenemistä. Dasatinibin parempaa tehoa imatinibiin verrattuna perustellaan korkeammalla ja nopeammin saavutetulla täydellisellä sytogeneettisellä vasteella sekä merkittäväällä molekyylligenettisellä vasteella. Dasatinibi ei ole niin herkkä DNA:ssa tapahtuville lisämutaatioille kuin imatinibi. (Kantarjian ym. 2010, 2261, 2268.) On olemassa mutaatioita, joille dasatinibi on resistentti, mutta niitä on vain muutamia ja ongelmana se on erityisesti KML:n edenneen vaiheen potilailla (Mustjoki 2010c).

3.1.3 Nilotinibi (Tasigna[®])

Nilotinibi on abl-tyrosiinikinaasin estäjä bcr-abl-fuusioproteiinin sisältävissä Philadelphia-positiivisissa leukemiasoluissa. Nilotinibi on erittäin tehokas sitoutumaan ATP:n sitoutumiskohtiin, jolloin se estää voimakkaasti bcr-abl-fuusioproteiinin toimintaa. Nilotinibin on todettu tehoavan suurimpaan osaan imatinibiresistenteistä bcr-abl-mutaatiotyypeistä. Muiden tyrosiinikinaasien tavoin nilotinibi estää selektiivisesti leukemiasolujen lisääntymistä ja indusoi apoptoosia leukemiasoluissa. (Baccarani ym. 2010, 6044; Kariaho ym. 2010b, 2979.) Nilotinibin ($C_{28}H_{22}F_3N_7O$) molekyylikaava on esitetty alla olevassa kuvassa 7.



KUVA 7. Nilotinibin molekyylikaava (Celleck Chemicals 2010)

Yksi kova nilotinibi-kapseli sisältää nilotinibia 200 mg. Suositeltu aloitusannos kroonisen vaiheen KML-potilailla on 400 mg kahdesti vuorokaudessa 12 tunnin välein. Kapselit nielaistaan kokonaisina veden kera tyhjään mahaan. Ruoka vaikuttaa nilotinibin vaikutukseen lisäämällä sen biologista hyötyosuutta. Tämän takia potilaan tulee olla syömättä kaksi tuntia ennen lääkkeen ottoa ja vähintään tunti annoksen ottamisen jälkeen. Suun kautta otetun nilotinibin huippupitoisuus saavutetaan kolme tuntia annostuksen jälkeen. In vitro -kokeiden perusteella se sitoutuu plasman proteiineihin noin 98-prosenttisesti. Nilotinibi metaboloituu enimmäkseen maksassa ja eliminoituu pääasiassa ulosteeseen. Terveille vapaaehtoisille tehtyjen tutkimusten mukaan kerta-annos nilotinibia eliminoitui 90-prosenttisesti seitsemän vuorokauden kuluessa. Vasta-aiheena nilotinibilääkitykselle on yliherkkyys vaikuttavalle aineelle tai jollekin apuaineista. (Kariaho ym. 2010b, 2977-2980.)

Haittavaikutusten takia nilotinibilääkitys voidaan joutua keskeyttämään, mutta yleensä vain tilapäisesti. Hoitoon voi liittyä sekä hematologista (neutropenia, trombosytopenia) että ei-hematologista toksisuutta, mikä aiheuttaa hoidon tilapäiseen keskeyttämiseen tai annoskoon pienentämiseen. Nilotinibilääkitys saattaa aiheuttaa seerumin lipaasiarvojen tai bilirubiiniarvojen ja maksan transaminaasiarvojen suurenemista. Tällöin annostusta pienennetään ja kyseisiä laboratorioarvoja on seurattava kuukauden välein tai kliinisen tarpeen mukaan. Trombosytopenian ja neutropenian lisäksi nilotinibihoito voi aiheuttaa anemiaa, mutta yleensä nämä liittyvät vasta KML:n edenneeseen vaiheeseen. Potilailta on kuitenkin tutkittava täydellinen verenkuva säännöllisesti. Ensimmäisten kahden kuukauden ajan verenkuva kontrolloidaan kahden viikon välein, minkä jälkeen kerran kuukaudessa tai kliinisen tarpeen mukaan. (Kariaho ym. 2010b, 2977.)

Nilotinibilääkityksen on osoitettu pidentävän sydämen kammioiden repolarisaatioaikaa (QT-aikaa) lääkepitoisuuksista riippuvaisella tavalla. Rytmihäiriöitä ei ole tavattu, mutta QT-ajan piteneminen voi aiheuttaa potilaalle kuolemaan johtavien tapahtumien riskin. Tämän takia potilasta on seurattava tarkoin etenkin, jos hänellä on todettu merkittäviä sydän- ja verisuonisairauksia. Ennen nilotinibihoidon aloittamista potilaalle suositellaan tehtäväksi

elektrokardiografia- eli EKG-tutkimus, jatkossa tutkimusta suositellaan kliinisen tarpeen mukaan. (Kariaho ym. 2010b, 2977.)

Imatinibin ja dasatinibin tavoin nilotinibi on CYP3A4-entsyymien substraatti, jolloin nilotinibin ja voimakkaiden CYP3A4-inhibiittoreiden yhteiskäyttöä tulee välttää. Toisaalta nilotinibin ja voimakkaiden CYP3A4-entsyymiä indusoivien lääkeaineiden käyttöä on myös vältettävä, sillä yhteiskäyttö saattaa pienentää nilotinibialtistusta kliinisesti merkitsevässä määrin. Myös mahahapon erityksen estyminen voi pienentää nilotinibialtistusta, joten samanaikainen käyttö antasidien tai protonipumpun estäjien kanssa ei ole suositeltavaa. (Kariaho ym. 2010b, 2977.)

Kliiniset tutkimukset nilotinibin osalta ovat vielä kesken. Näin ollen tiedot nilotinibin tehosta ja turvallisuudesta erityisryhmiä koskien ovat vielä puutteelliset. Käytettäessä nilotinibia lapsille, vanhuksille, raskaana oleville tai munuaisten tai maksan vajaatoimintaa sairastaville potilaille, onkin noudatettava samanlaista varovaisuutta kuin dasatinibilääkitykseenkin liittyen. Nilotinibin käyttöön liittyviä haittavaikutuksia ovat muun muassa sydämentykytys, hengenahdistus, ilmavaivat, öinen hikoilu, ihottuma, lihaskivut, kuumeilu ja unettomuus. Useimmat haittavaikutukset ovat kuitenkin tutkimusten mukaan olleet lieviä tai kohtalaisia sekä hoidettavissa. (Kariaho ym. 2010b, 2977–2979.)

3.2 Muut hoitomuodot

Koska opinnäytetyöni liittyy keskeisesti tyrosiinikinaasin estäjälääkkeisiin, käsittelen tässä työssä kroonisen myelooiden leukemian muita hoitomuotoja vain lyhyesti. Ennen imatinibihoidon käyttöönottoa on KML-potilaiden hoitona käytetty hydroksiureaa ja alfainterferonia. Hydroksiurea on solunsalpaajalääke, jonka on todettu olevan erittäin tehokas normalisoimaan perifeerisen verenkuvan muutoksia ja estämään splenomegaliaa eli pernan suurenemistä. Hydroksiurealla ei kuitenkaan päästä vaikuttamaan taudin varsinaiseen aiheuttajaan, jolloin syto- ja molekyylogeneettistä vastetta ei saavuteta juuri ollenkaan. (MediFocus 2010, 20–21.) Nykyään hydroksiureaa on mahdollista käyttää lyhytaikaisesti, esimerkiksi odottaessa kelakorvattavuutta

tyrosiinikinaasineestäjälääkkeelle. Toisaalta hydroksiurea on varsin hyvin siedetty myös pitkäaikaiskäytössä. (Baccarani ym. 2009, 6046; Koskenvesa & Mustjoki 2010.)

Alfainterferonia voidaan käyttää KML:n kroonisen vaiheen hoitoon, mutta edenneiden vaiheiden hoitoon sen ei ole todettu tehoavan. Alfainterferonilla saavutetaan yleensä hyvä hematologinen vaste, mutta vain 5-25 % potilaista saavuttaa täydellisen sytogeneettisen vasteen. Interferonihoito toteutetaan yleensä päivittäisinä ihonalaisina pistoksina. Sen suurena haittapuolena ovat kuitenkin sen runsaat sivuvaikutukset, kuten pahoinvointi, kuumeilu, painon lasku, masennus sekä lihas- ja nivelkivut. (MediFocus 2010, 20–21.) Koska tyrosiinikinaasineestäjälääkitystä ei suositella käytettävän raskauden aikana, voidaan raskaana olevalle potilaalle käyttää alfainterferonihoitoa väliaikaisesti (Baccarani ym. 2009, 6046).

Ainoa hoito, jolla taudista voi parantua kokonaan on HLA-kudosityhteensopivalta (Human Leukocyte Antigen) luovuttajalta saatu allogeeninen kantasolujen siirto. Ongelmaksi muodostuu kuitenkin sopivan luovuttajan löytyminen. Kantasolujen siirtoon liittyy lisäksi vakavia riskejä, kuten käänteishyljintäreaktiot. Allogeeninen kantasolujen siirto tehdään mieluiten alle 40-vuotiaille potilaille, joilla on kudosityhteensopiva sisarus. Hoitoa suositellaan tehtäväksi vuoden sisällä taudin diagnosoimisesta, sillä sen ei ole todettu olevan tehokas taudin edenneiden muotojen hoidossa. (MediFocus 2010, 24–26.)

Kantasolujen siirron ongelmana on usein hoidon ajoitus. Kuolleisuus allogeeniseen kantasolujen siirtoon ja taudin relapsiriski ovat melko suuria, vaikka siirto tehtäisiin taudin varhaisessa kroonisessa vaiheessa. Allogeenisiä kantasolusiirtoja saaneiden potilaiden hoitotulokset ovat olleet kuitenkin suhteellisen hyviä; Suomessa siirron saavista potilaista 70–80 % paranee. Autologisen kantasolujen siirron vaikutuksista tutkimukset ovat vielä kesken. Kuitenkin jo nyt tiedetään, että sillä saattaisi olla merkitystä potilaille, joille on kehittynyt imatinibiresistenssi. (Quintás-Cardama 2006, 978–979; Porkka & Koistinen 2007, 332–333.)

Erikoislääkäri Satu Mustjoen (2010) mukaan kantasolujen siirtoja tehdään käytännössä nykyään todella harvoin taudin kroonisessa vaiheessa. Koska krooniseen myelooiseen leukemiaan sairastutaan useimmiten 50-60 vuoden iässä ja kantasolusiirtoja tehdään mieluiten alle 40-vuotiaille potilaille, ei kyseinen hoitomuoto tule useinkaan kysymykseen. Lisäksi kantasolusiirtoihin liittyvät riskit, kuten hyljintäreaktiot, ovat niin suuria, ettei hoito ole yleensä edes mielekästä, sillä nykyisten lääkehoitojen avulla päästään useimmiten hyviin tuloksiin. Akseleraatio- ja blastikriisivaiheessa kantasolusiirtoja tehdään edelleen. (Mustjoki 2010c.)

3.3 Lääkehoitojen seuranta ja taudin ennuste

Krooninen myeloinen leukemia on jatkuvan tutkimuksen alla oleva tauti, joten uuden tiedon löytyessä myös hoitolinjat muuttuvat. Ennen tehokasta lääkehoitoa KML:n ennusteena pidettiin kahdesta kolmeen vuotta. Uudet tyrosiinikinaasineestäjälääkkeet ovat kuitenkin mullistaneet KML:n hoidon. Tärkeimpänä elinajanennusteeseen liittyvänä tekijänä pidetään hematologista, sytogeneettistä ja molekylaarista vastetta hoitoon liittyen. (Vardiman ym. 2008, 37.)

Lääkehoidoista saatua vastetta seurataan säännöllisten veri- ja luuydin- näytteiden avulla. Lääkitystä aloitettaessa on täydellinen verenkuvaa syytä ottaa viikoittain kahden ensimmäisen kuukauden ajan ja sen jälkeen kuukausittain tai kliinisen tarpeen mukaan. Laboratoriokokeiden tarkoituksena on lääkehoitoihin saadun vasteen arvioinnin lisäksi kontrolloida mahdollisia haittavaikutuksia, kuten bilirubiini-, lipaasi- ja transaminaasiarvojen nousua. Luuydintutkimukset otetaan alkuvaiheessa yleensä 3, 6, 12 ja 18 kuukauden jälkeen hoidon aloittamisesta. Seurantavaiheessa potilaasta otetaan luuydinnäyte kerran tai kaksi kertaa vuodessa, jotta mahdolliset taudin etenemiseen liittyvät lisämuutokset voidaan todeta ajoissa. (Porkka 2005; Kariaho ym. 2010a, 1274; Kariaho ym. 2010b, 2870, 2977.)

Pääasiallisesti taudin seurannassa ja hoitovasteen arvioinnissa käytetään joko perifeerisestä verestä tai luuytimestä PCR-menetelmällä määritettävää bcr-abl-

geenituotteen määrää. Määrityksessä arvioidaan tautitaakan kertaluokkavähenemää diagnoosivaiheeseen verrattuna. Hoitovasteen seuraamiseksi määritys on hyvä tehdä kolmesta kuuteen kuukauden välein. Suositeltavampi näytemuoto tutkimukselle on perifeerinen veri, sillä se on yksinkertaisempi ottaa. Seurannan vertailukelpoisuuden vuoksi seuranta tulisi aina tutkia samasta näytetyypistä. (Porkka 2005; Pirkanmaan sairaanhoitopiiri 2009.) Viimeaikaisten tutkimusten perusteella tyrosiinikinaasestäjälääkkeille saatu vaste on ollut niin hyvä ja kestävä, että odotukset potilaiden hoitovasteille ovat nyt korkealla. Tavoitteena hoidolle pidetäänkin nykyään 100 prosentin selviytymistä ilman taudin etenemistä sekä potilaan normaalia elämänlaatua. (Baccarani ym. 2009, 6041.)

4 IMMUNOGLOBULIINIT

Ihmisen puolustusjärjestelmä perustuu pohjimmiltaan kahteen tekijään: vieraan aineksen, patogeenin, tunnistamiseen sekä sen tuhoamiseen. Tavallisimpia patogeeneja ovat virukset, bakteerit ja sienet. Jokaiselle patogeenille on elimistössä olemassa omanlaisensa puolustusmekanismit. Immuunijärjestelmä voidaan jakaa luonnolliseen eli synnynnäiseen immunitettiin ja opittuun eli adaptiiviseen immunitettiin. Luonnollinen immunitetti toimii nopeasti, kun taas adaptiivinen immunitetti vaatii enemmän aikaa käynnistyäkseen, mutta on tehokkaampi. Parhaan mahdollisen puolustautumisen saavuttamiseksi luonnollinen ja adaptiivinen immunitetti toimivat yhdessä. (Todd & Spickett 2010, 4-8.)

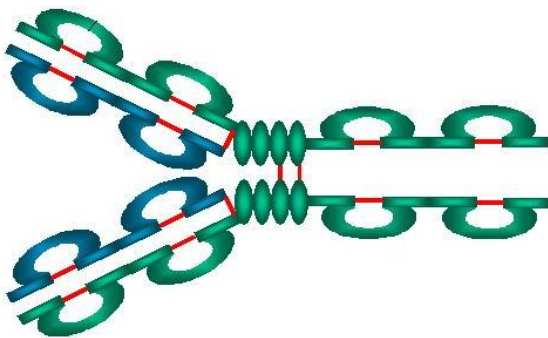
Luonnollisen immunitetin tehtävä on estää patogeenin proliferaatiota ja leviämistä elimistössä. Luonnollinen immunitetti toimii nopeasti, samalla tehokkuudella kerrasta toiseen. (Todd & Spickett 2010, 6-7.) Luonnolliseen immunitettiin kuuluvia puolustusmekanismeja ovat fyysikaaliset ja kemialliset esteet, esimerkiksi iho, ja elimistön erilaiset eritteet, kuten kyneleet sekä fagosytoivat solut (neutrofiilit ja makrofagit) ja niin sanotut NK-solut (natural killer cells). Myös komplementtireaktio ja sytokiineiksi kutsutut proteiinit, solujen välisen viestinnän välittäjäaineet, kuuluvat luonnolliseen immunitettiin. Komplementtireaktiolla tarkoitetaan tapahtumaa, jossa useiden plasmaproteiinien muodostama ryhmä toinen toistaan aktivoimalla käynnistää tulehdusreaktion. (Abbas & Lichtman 2005, 4, 293.)

Adaptiivisen immunitetin T- ja B-lymfosyytit tunnistavat antigeeninä toimivan patogeenin ja B-lymfosyytit rupeavat tuottamaan immunoglobuliineja eli vastaaineita. Adaptiivinen immunitetti käynnistyy luonnollista immunitettia hitaammin, mutta on nopeampi ja tehokkaampi saman patogeenin hyökätessä uudestaan. (Todd & Spickett 2010, 6-7.) Adaptiivinen immunitetti jaetaan humoraaliseen ja soluvälitteiseen immunitettiin. Humoraalisella immunitetilla tarkoitetaan B-lymfosyyttien tuottamien immunoglobuliinien toimintaa. Soluvälitteisestä immunitetista puolestaan vastaavat T-lymfosyytit, joiden

tehtävä on tunnistaa patogeeni ja aktivoida luonnollisen immunitetin fagosyytit tuhoamaan se. (Abbas & Lichtman 2005, 4, 298.)

4.1 Immunoglobuliinien tehtävät ja rakenne

Immunoglobuliinit ovat plasmasolujen tuottamia glykoproteiineja, jotka toimivat elimistössä vasta-aineina (Mayer 2009). Vasta-aineiden keskeisin tehtävä on tunnistaa vieras antigeeni ja tarttua siihen, jotta muu immuunipuolustus voi tuhota vieraan aineksen ja poistaa sen elimistöstä. Vasta-aineet ovat antigeeneille spesifisiä, joten yksi vasta-aine pystyy tarttumaan vain yhteen tietynlaiseen antigeeniin. Mikäli immuunipuolustus tuottaa immunoglobuliineja liian vähän, on riskinä toistuvat infektiot. Joissakin tapauksissa immunoglobuliinitasot ovat matalia synnynnäisesti (esim. synnynnäinen IgA-puutos), mutta useimmiten matalien immunoglobuliinitasojen syynä on jokin tauti, kuten syöpä. (Essig 2008.)



KUVA 8. Immunoglobuliinien perusrakenne (mukaillen Mayer 2009)

Immunoglobuliinit muodostuvat tyypillisesti neljästä polypeptidiketjusta, joista kaksi on toisilleen identtistä raskasketjua ja kaksi samoin toisilleen identtistä kevytketjua. Polypeptidiketjut ovat kiinni toisissaan rikkisiltojen välityksellä. Kuvassa 8 on esitetty immunoglobuliinien perusrakenne. Kuvassa vihreät osat ovat raskasketjuja ja siniset osat kevytketjuja. Punaiset sidokset ketjuissa esittävät rikkisiltoja. Immunoglobuliinit ovat Y:n muotoisia, jolloin niissä on kaksi antigeenin sitoutumiskohtaa. Polypeptidiketjut muodostuvat pienemmistä yksiköistä, domeeneista. Yksi domeeni koostuu noin 110 aminohaposta. Kevytketjut koostuvat yhdestä vakiodomeenista ja yhdestä variaabelista

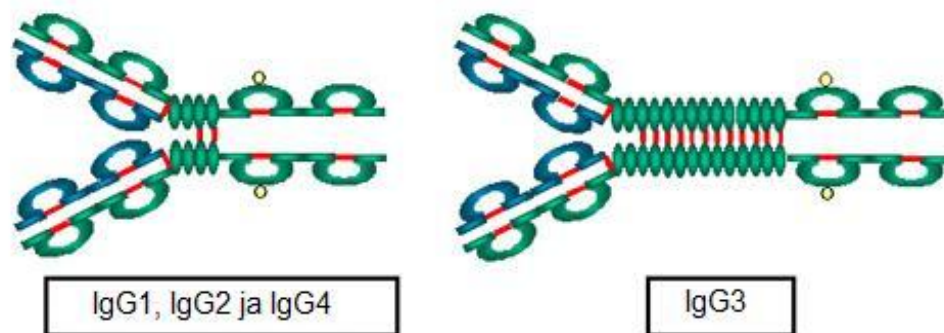
domeenista. Raskasketjut puolestaan koostuvat yhdestä variaabelista domeenista ja kolmesta tai neljästä vakiodomeenista immunoglobuliiniluokasta riippuen. Variaabelit domeenit vastaavat antigeenien tunnistuksesta. (Todd & Spickett 2010, 55-57.)

Ihmiselimistössä on viisi eri immunoglobuliiniluokaa: IgG, IgA, IgM, IgD, ja IgE. Eri immunoglobuliiniluokat eroavat toisistaan erilaisten raskasketjunsensa ja eri tehtäviensä ansiosta. Osalla immunoglobuliineista, IgG- ja IgA-luokan immunoglobuliineilla, on myös alaluokkia. Normaalisti ihmisellä on immunoglobuliineja jokaisesta luokasta. Kaikki yksittäiset immunoglobuliinit koostuvat neljästä ketju-rakenteesta. Monomeereinä esiintyvät yleensä IgG-, IgE- ja IgD-luokkien immunoglobuliinit, kun IgA-luokan immunoglobuliinit esiintyvät usein dimeereinä ja IgM-luokan immunoglobuliinit puolestaan pentameereinä. Eri polypeptidiketjut nimetään kreikkalaisin kirjaimin. Raskasketjuja on viittä eri laatua, vastaten eri immunoglobuliiniryhmiä: myy (μ) luokan IgM-, delta (δ) luokan IgD-, gamma (γ) luokan IgG-, alpha (α) luokan IgA- ja epsilon (ϵ) luokan IgE-immunoglobuliineilla. (Goldsby, Kindt, Osborne & Kuby 2003, 79; Mayer 2009.) Kevytkejuja voi olla ainoastaan kahdenlaisia: kappa (κ) ja lambda (λ). Molemmat polymeeriset muodot, IgA ja IgM, sisältävät ylimääräisen peptidin, nimeltä J-ketju, jonka tarkoituksena on pitää monomeeriset yksiköt yhdessä. Dimeerinen IgA sisältää myös sekretorisen komponentin. Sekretorinen komponentti on peräisin limakalvojen epiteelisoluilta, joiden läpi IgA kulkeutuu. (Todd & Spickett 2010, 58-59.) Immunoglobuliinien tarkemman käsittelyn rajaan ainoastaan tämän työn kannalta olennaisiin immunoglobuliiniluokkiin eli IgG-, IgA- ja IgM-luokkien immunoglobuliineihin.

4.2 Immunoglobuliini G

Suurin osa, noin 80 %, ihmiselimistön immunoglobuliineista ovat IgG-luokkaa. Kemiallisesti IgG-molekyylit koostuvat kahdesta γ -raskasketjusta ja joko kahdesta κ - tai kahdesta λ -kevytketjusta. Ne ovat immunoglobuliineista pienimpiä, mutta myös yleisimpiä ja niitä esiintyy kaikissa elimistön nesteissä. (Essig 2008.) Ihmiselimistössä IgG-luokan immunoglobuliinit esiintyvät ainoastaan monomeerimuodossa. Tärkein IgG-luokan immunoglobuliinien

tehtävä on suojella elimistöä mikro-organismeilta, kuten bakteereilta, viruksilta ja sieniltä. Lisäksi IgG-luokan immunoglobuliinit opsonisoivat bakteereja tarttumalla niiden pintaan helpottamalla siten bakteereiden fagosytointia ja käynnistävät komplementtireaktion. Immunoglobuliineista IgG on ainoa, joka läpäisee istukan, jolloin äidin vasta-aineet suojaavat sikiötä ja vastasyntyntä kunnes vauvan oma immunoglobuliinituotanto käynnistyy. (Mahon & Tice 2006, 45-49.)



KUVA 9. Immunoglobuliini G:n rakenteet (mukaillen Mayer 2009)

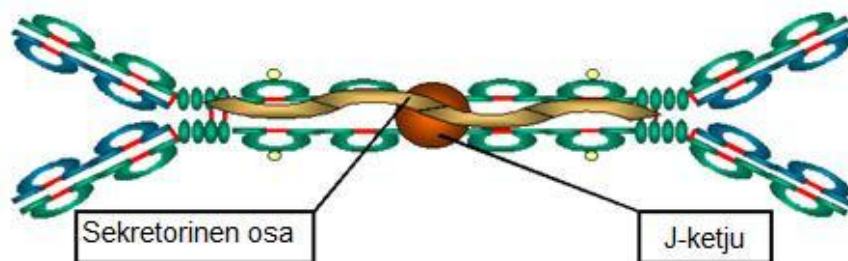
Seerumissa esiintyvän määränsä perusteella IgG-luokan immunoglobuliinit jaetaan neljään alaluokkaan, IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4 siten, että IgG1:tä on seerumissa eniten ja IgG4:ta vähiten. Alaluokat eroavat toisistaan myös rakenteellisesti. Raskasketjuissa on vain vähän eroja, suuremmat erot ovat rikkisiltojen määrässä ja paikassa raskasketjujen välillä. Kuvassa 9 on esitetty IgG-luokan immunoglobuliinien rakenteet. Joitakin eroja on myös alaluokkien biologisessa aktiivisuudessa. Alaluokista IgG1 ja IgG3 läpäisevät istukan ja aktivoivat komplementtia sekä opsonisoivat bakteereja hyvin. Puolestaan IgG2 läpäisee istukan vain erittäin vähäisissä määrissä, eikä opsonisoiminen ja komplementin aktivoiminen ole kovin tehokasta. Viimeisenä IgG4 läpäisee istukan, mutta opsonisoi paljon heikommin kuin muut alaluokat, eikä aktivoi komplementtia ollenkaan. (Goldsby ym. 2003, 88-89.)

Plasman IgG-määritystä käytetään muun muassa immuunisairauksien sekä eräiden infektioiden ja kasvaimien diagnostiikassa. Plasman IgG-pitoisuus voi olla geneettisesti matala, mutta se voi liittyä myös muun muassa yleiseen proteiinien menetykseen tai maligniteetteihin, mahdollisesti myös krooniseen myeloosiseen leukemiaan, sekä sytostaatti- tai kortisonihoitoihin. Vaikka IgG:n

kokonaispitoisuus olisi normaali, se ei sulje pois jonkin alaluokan puutosta, johon voi liittyä lisääntynyttä infektiokerkkyyttä. Korkeat IgG-pitoisuudet voivat liittyä muun muassa kroonisiin infektioihin, maksakirroosiin, nivelreumaan, luuydinmetastaaseihin tai myeloomaan. Aikuisten IgG-pitoisuuden viitearvot ovat 6,8 - 15 g/l. (LeFever Kee 2005, 220; Huslab 2009.)

4.3 Immunoglobuliini A

Noin 10 - 15 % ihmisen kokonaisimmunoglobuliinimäärästä on IgA:ta. Seerumin IgA esiintyy yleensä monomeerisena, sisältäen kaksi α -raskasketjua ja joko kaksi κ - tai kaksi λ -kevytketjua. On mahdollista, että IgA esiintyisi myös dimeerinä, trimeerinä sekä tetrameerinä. Myös IgA-luokan immunoglobuliinit jaetaan kahteen alaluokkaan: IgA1 ja IgA2, jotka eroavat toisistaan rakenteellisesti. Immunoglobuliineista IgA on vallitseva luokka ulkoisissa eritteissä, kuten rintamaidossa, syljessä ja kyynel nesteessä sekä keuhkojen, virtsa- ja sukupuolitehyeiden sekä ruuansulatuskanavan limakalvoilla. Tällöin sitä kutsutaan sekretoriseksi IgA:ksi. (Mahon & Tice 2006, 49.)



KUVA 10. Sekretorisen immunoglobuliini A:n rakenne (mukailen Mayer 2009)

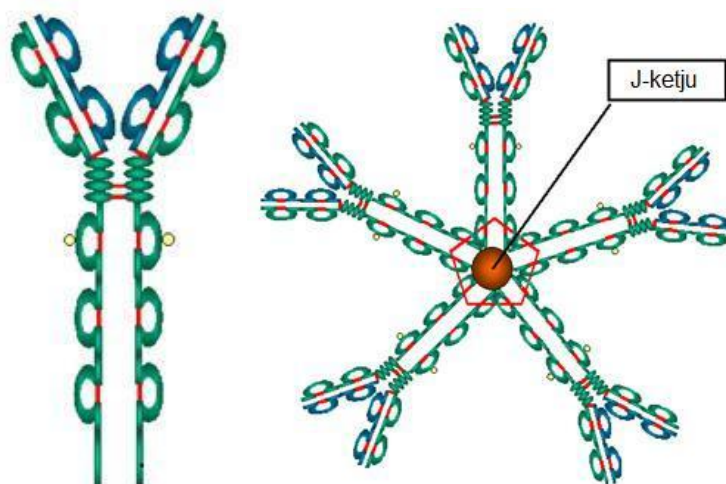
Sekretorinen IgA esiintyy dimeerinä tai tetrameerinä koostuen joko kahdesta tai neljästä identtisestä monomeerista, jotka ovat kiinnittyneinä toisiinsa J-ketjun avulla. Lisäksi sekretorisessa IgA:ssa on ylimääräinen polypeptidiketju, sekretorinen komponentti, joka suojaa IgA:ta eritteissä olevilta proteolyttisiltä entsyymeiltä ja auttaa IgA:ta kulkeutumaan solumembraanien läpi. Kuvassa 10 on esitetty dimeeri-muotoisen sekretorisen IgA:n rakenne. Tärkein sekretorisen IgA:n tehtävä on sitoutua virus- ja bakteerimolekyylien pintaan, estäen viruksia ja bakteereja kiinnittymästä solumembraaneihin ja siten aiheuttamasta

infektioita. (Mahon & Tice 2006, 49.) Äidinmaitoon erittyessään sekretorinen IgA suojaa myös rintamaitoa saavaa lasta, jonka oma immuniteetti ei ole vielä täysin kehittynyt. Elimistö tuottaa sekretorista IgA:ta päivittäin enemmän kuin minkään muun luokan immunoglobuliinia. Tämä on tärkeää, sillä toimiessaan nimenomaan limakalvoilla, IgA torjuu tehokkaasti elimistöön tunkeutuvia patogeeneja. (Goldsby ym. 2003, 90-92.)

Alentuneita IgA-pitoisuuksia esiintyy immunoglobuliinien yleisen puutteen yhteydessä. Tällöin taustalla voi olla muun muassa malignit taudit, diabetes, proteiinien menetystilat sekä sytostaatti- ja kortisonihoidot. Myös IgA:n selektiivinen puutos on mahdollista, ja sillä on merkitystä lähinnä verensiirtoreaktioiden kannalta. Kohonneita IgA-pitoisuuksia tavataan muun muassa maksakirroosin, kroonisten infektioiden, nivelreuman, suolisto- ja keuhkoinfektioiden sekä myelooman yhteydessä. Aikuisten IgA-pitoisuuden viitearvot ovat miehille 0,88 - 4,84 g/l ja naisille 0,52 - 4,02 g/l. (LeFever Kee 2005, 220; Huslab 2009.)

4.4 Immunoglobuliini M

Kolmanneksi suurimman immunoglobuliiniryhmän seerumissa muodostavat IgM-luokan immunoglobuliinit, joiden osuus seerumin kokonaisimmunoglobuliinimäärästä on 5 - 10 %. Monomeerinä esiintyviä IgM-luokan immunoglobuliineja on kypsien B-lymfosyyttien pinnalla membraaniin sitoutuneina. Myös IgM-luokan immunoglobuliinit muodostuvat joko kahdesta kappa tai kahdesta lambda-kevytketjusta, mutta raskasketjuina niissä on kaksi mu-raskasketjua. Seerumissa IgM-molekyylit esiintyvät pentameereinä, jolloin ne koostuvat viidestä monomeerista, jotka ovat kiinni toisissaan J-ketjun ja rikkisiltojen välityksellä. Pentameerimuotoisilla IgM-immunoglobuliineilla on kymmenen antigeenin sitomiskohtaa. (Mahon & Tice 2006, 49.) Kuvassa 11 sivulla 41 on esitetty immunoglobuliini M:n rakenteet monomeeri- ja pentameerimuodoissa.



KUVA 11. Immunoglobuliini M:n rakenteet (mukaiillen Mayer 2009)

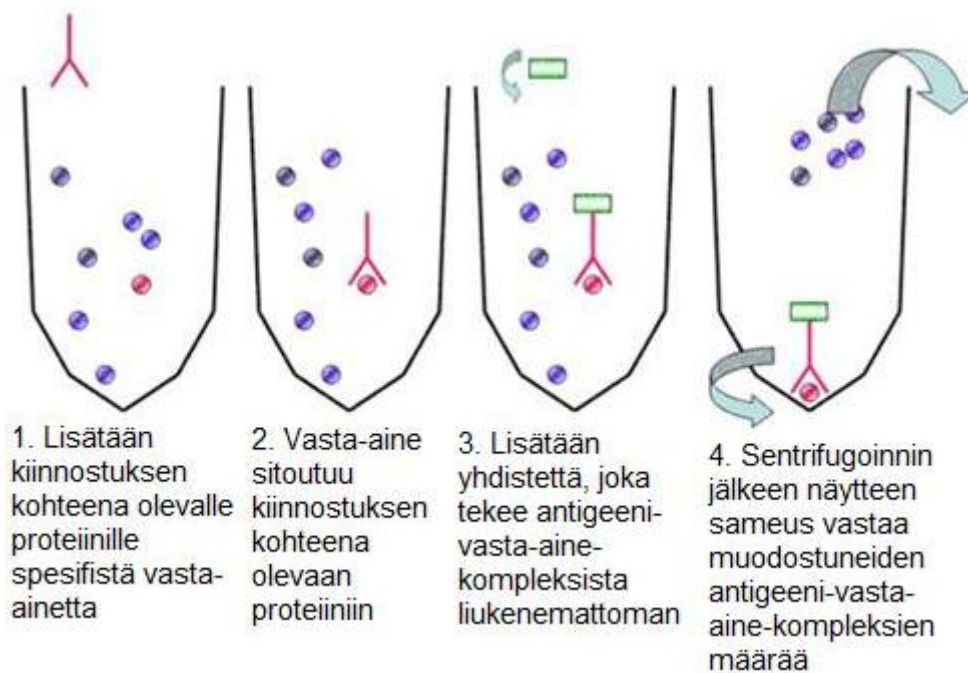
Erytyspiirteiltään IgM-luokan immunoglobuliinit ovat ensimmäinen immunoglobuliiniluokka, joka syntetisoituu vastasyntyneessä. Ne ovat myös ainoita, jotka syntyvät primäärivasteessa antigeeniä kohtaan. Näin ollen tuoreessa infektiossa koholla ovat ensimmäiseksi IgM-luokan vasta-aineet ja vasta myöhemmin IgG-luokan vasta-aineet. Myös IgM-luokan immunoglobuliineja tavataan elimistön ulkoisissa eritteissä, mutta ei niin paljon kuin IgA-luokan immunoglobuliineja. Koska IgM-molekyyleillä on kymmenen antigeenin sitomiskohtaa ja koska ne ovat kooltaan suuria, ovat ne muita immunoglobuliineja tehokkaampia agglutinoimaan antigeenejä. Ne ovat myös tehokkaampia aktivoimaan komplementtia. (Goldsby ym. 2003, 90; Mahon & Tice 2006, 49-50.)

Plasman tai seerumin IgM-määritystä käytetään muun muassa immuunisairauksien, infektioiden ja kasvaimien diagnostiikassa. Muiden immunoglobuliiniluokkien tavoin alentuneita IgM-pitoisuuksia tavataan proteiinien yleisen menetyksen, maligniteettien, kortisoni- ja sytostaattihoidojen sekä myelooman yhteydessä. Lisäksi tunnetaan periytyvä spesifinen IgM:n puutos, mutta se on harvinainen. Kohonneita IgM-pitoisuuksia tavataan muun muassa trooppisissa infektioiden, kuten malaria, sekä mykoplasma- ja virus-infektioissa, etenkin A-hepatiitti ja mononukleoosi. Aikuiden IgM-pitoisuuden viitearvot ovat miehille 0,36 - 2,59 g/l ja naisille 0,47 - 2,84 g/l. (LeFever Kee 2005, 220; Huslab 2009.)

4.5 Immunoglobuliinien määrittäminen immunoturbidometrisesti

Eräs tapa määrittää immunoglobuliinitasoa on käyttää immunoturbidometristä menetelmää, jossa immunoglobuliinit määritetään immunopresipitaation perusteella (Huslab 2009). Immunoturbidometria kuuluu fotometriin menetelmiin. Fotometrialla tarkoitetaan valon, aaltomaisesti etenevän sähkömagneettisen energian, mittaamista. Sovelluksesta riippuen voidaan mitata säteilleen eli emittoituneen, läpäisseen eli transmittoituneen, imeytyneen eli absorboituneen sekä siroutuneen, fluoresoituneen tai heijastuneen valon määrää. (Halonen 2003, 66.)

Turbidometriassa on kyse liukenemattomien partikkelien pitoisuuden määrittämisestä. Liukenemattomia partikkeleita sisältävät suspensiot saavat valon siroamaan, jolloin suspensiot näyttävät sameilta. Turbidometrillä mitataan siroamisesta, heijastumisesta tai absorptiosta aiheutuvaa läpäisseen valon voimakkuuden vähenemistä. Läpäisseen valon voimakkuuteen vaikuttavat muun muassa yhdisteen pitoisuus ja partikkelikoko. (Halonen 2003, 71-72.) Immunopresipitaation perusajatus on esitetty alla olevassa kuvassa 12.



KUVA 12. Immunopresipitaation perusajatus (mukaillen Molecular Station 2008)

Suurikokoisilla proteiinimolekyyleillä, kuten vasta-aineilla (immunoglobuliineilla), on kyky saostaa antigeeneja liuoksessa. Sitoutuessaan toisiinsa vasta-aine ja antigeeni muodostavat liukenemattoman kompleksin, mikä ilmenee liuoksessa sameutena. Kompleksin muodostuminen on riippuvainen sekä vasta-aineen että antigeenin pitoisuuksista, joiden on oltava tarkoin määriteltyjen rajojen sisällä. Muutoin liuoksessa vallitsee vasta-aine- tai antigeeniylimäärä, jolloin presipitaatio eli saostuminen ei ole mitattavissa. (Thorpe & Thorpe 2005, 315.) Menetelmä perustuu monokromaattisen valon ohjaamiseen näytteen ja reagenssien muodostamaan seokseen. Valo ei absorboidukaan seoksen sisältämiin aineisiin, vaan siroaa pois kulkusuunnastaan, kun se osuu seoksessa muodostuneisiin antigeeni-vasta-aine-komplekseihin. Turbidometrisessä mittauksessa mitataan näytteen läpi kulkeneen valon määrän vähenemistä. (Åkerman 2010, 83-85.)

Tässä työssä immunoglobuliinien määrittäminen tapahtuu immunoturbidometrialla perustuen Roche Modular Analytics SWA -analysaattorilla. Roche Modular Analytics SWA (serum work area) -analysaattori on kliinisten laboratorioden käyttöön tarkoitettu analysaattori, johon voidaan liittää jopa neljä erillistä moduulia, integroiden kliinisen kemian ja immunokemian tutkimukset yhden analysaattorin tehtäväksi. Näytemuodoiksi käyvät seerumi, plasma, virtsa sekä likvori eli aivo-selkäydinneste. Modular Analytics SWA -analysaattorilla voidaan määrittää jopa 10 000 testiä tunnissa. (Roche Diagnostics 2010.) Tässä työssä näytemuotona käytetään plasmaa. Muutamaa hepariini- ja EDTA-plasmanäytettä (etyleenidiamiinotetraetikkahappo) lukuun ottamatta näytteet ovat ACD-plasmaa (acid citrate dextrose). Hepariinin tarkoitus on estää näytteen hyytyminen estämällä fibriinin muodostumista, EDTA puolestaan sitoo plasman kalsiumin. On todettu, että ACD pitää veren punasolut elinkelpoisina pisimpään (14 vuorokautta). Sen sisältämä sitraatti sitoo veren kalsiumin ja dekstroosi toimii säilytysaineena sekä punasolujen ravinnon lähteenä. (Makkonen & Tuokko 1996, 69; Flynn 2005, 75-76.)

Varsinaisessa määrittämisessä natriumkloridiin (NaCl) laimennettuun ja TRIS-puskuriin (Tris(hydroksimetyyli)aminometaani) puskuroituun näytteeseen lisätään ylimäärä IgG-, IgA- tai IgM-antiseerumia, jolloin immunopresipitaatiosta syntyneen sameuden voimakkuus on verrannollinen näytteen IgG-, IgA- tai IgM-

pitoisuuteen. Absorbanssin muutos mitataan pääaallonpituuden 340 nm ja sivuaallonpituuden 700 nm erotuksena. (Huslab 2009.) Immunglobuliinimäärityksissä analysaattori esilaimentaa näytteet automaattisesti ennen määrittystä. Mikäli mitattu pitoisuus ylittää tai alittaa analysaattorille asetetut tekniset rajat, suorittaa analysaattori mittauksen automaattisesti uudestaan käyttämällä tilanteesta riippuen joko suurempaa tai pienempää esilaimennosta (uusinta- eli rerun-määritys). Modular Analytics SWA -analysaattorin näytekuppeista käytetään laboratorioissa vakiintunutta nimitystä Cobas-kippo. (Helin 2010.)

Menetelmälle on määritelty mittausalueet erikseen kullekin immunglobuliiniluokalle. Mittausalue IgG-määrityksissä ensimmäisellä mittauskerralla on 2,0 - 42,0 g/l ja uusintamäärityksessä 0,4 - 100 g/l. Puolestaan IgA-määrityksissä mittausalue on ensimmäisellä mittauskerralla 0,5 - 8,0 g/l ja uusintamäärityksessä 0,05 - 45 g/l ja IgM-määrityksissä ensimmäisellä mittauskerralla 0,25 - 6,5 g/l ja uusintamäärityksessä 0,03 - 37 g/l. Immunglobuliini G -määrityksissä menetelmän kvantitointiraja on 0,5 g/l ja immunglobuliini A sekä M -määrityksissä kvantitointiraja on 0,1 g/l. Alle kvantitointirajan olevat tulokset ilmoitetaan muodossa A0,5 g/l IgG-määrityksissä ja A0,1 g/l IgA- ja IgM-määrityksissä. Jotta tulokset voidaan hyväksyä, on niiden oltava selkeästi mittausalueella. Lisäksi kontroleista saatujen tulosten on oltava niille asetetuissa rajoissa. Kontrollinäytteinä käytetään laitevalmistajan (Roche Diagnostics) suosittelemia kontroleja. Mikäli näytteestä on jouduttu tekemään uusintamääritys, on uusintamääritysten tulosten oltava suhteessa uusinnan aiheuttajaan. Epäselvissä tapauksissa näyte tulee laimentaa manuaalisesti, jolloin lopullinen tulos saadaan kertomalla laimennuksesta saatu tulos laimennuskertoimella. Sameat näytteet on sentrifugoitava (2000 G, 10 min) ennen määrittystä, mutta hemolyysi tai lipemia eivät häiritse menetelmää. (Huslab 2009.)

5 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Imatinibin vaikutuksia immunoglobuliinitasoihin on tutkittu aikaisemminkin. Juan Luis Steegmannin ja hänen tutkimusryhmänsä vuonna 2003 julkaisemat tutkimustulokset osoittavat alentuneita immunoglobuliinitasoja kroonista myelooista leukemiaa sairastavilla potilailla. Aikaisempien tutkimusten perusteella myös potilaiden lymfopoieesissa on todettu olevan muutoksia. Tutkimukset ovat osoittaneet suurimman osan kroonista myelooista leukemiaa sairastavien potilaiden B-lymfosyyteistä ja kypsistä T-lymfosyyteistä olevan Ph-negatiivisia. Kuitenkin noin 25 prosentilla potilaista B-lymfosyytit ovat lähinnä Ph-positiivisia tai sekoitus Ph-positiivisia ja Ph-negatiivisia B-lymfosyyttejä. Steegmannin ym. (2003) mukaan muutokset lymfopoieesissa voivat liittyä myös kroonisen myelooisen leukemian hoitoihin. Lääkehoitojen vaikutuksia immunoglobuliinitasoihin ja lymfopoieesiin halutaan tutkia, sillä lääkehoidot kestävät yleensä pitkään, mahdollisesti koko loppuelämän. (Steegmann ym. 2003, 762.)

Steegmannin ym. (2003) tutkimukseen osallistui 36 potilasta, joita hoidettiin tutkimuksen aikana imatinibilla, sillä he olivat aikaisemmalle alfainterferonihoidolle resistenttejä tai eivät muuten sietäneet sitä. Tutkimuspotilaiden keski-ikä oli 50 vuotta. Heistä 24 oli miehiä ja 12 naisia. Seitsemälle heistä oli tehty luuydinsiirto. Aika diagnoosihetkestä imatinibihoidon alkuun oli keskimäärin 1323 päivää (noin 3 v 7 kk) ja alfainterferonihoidon kesto oli keskimäärin 1116 päivää (noin 3 v). Analyysiä tehtäessä potilaita oli seurattu imatinibihoidon aikana keskimäärin 507 päivän (noin 1 v 5 kk) ajan. (Steegmann ym. 2003, 762-763.)

Steegmannin ym. (2003) tutkimukseen osallistuneista potilaista 97 % saavutti täydellisen hematologisen vasteen kolmen kuukauden hoidon jälkeen. Keskimäärin täydellinen hematologinen vaste saavutettiin 21 päivässä. Joillakin potilailla todettiin hoidon aikana anemiaa (1 potilas), neutropeniaa (12 potilasta) ja trombosytopeniaa (5 potilasta). Ennen imatinibihoidon aloittamista IgG-tasot olivat normaalin rajoissa, lukuun ottamatta kolmea potilasta, joiden IgG-pitoisuuksia ennen imatinibihoidon aloittamista ei ollut saatavilla. Yhden potilaan IgA-pitoisuus oli jo ennen imatinibihoidon aloittamista matala ja IgM-pitoisuudet

olivat matalia 17 potilaalla. Potilaiden lähtötilanteen immunoglobuliinipitoisuuksilla ei havaittu olevan riippuvuussuhdetta taudin tai alfainterferonihoidon keston nähden. Myöskään luuydinsiirroilla ei havaittu olevan vaikutusta lähtötilanteen immunoglobuliinipitoisuuksiin. (Steegmann ym. 2003, 763-764.)

Tutkimuksesta saadut tulokset osoittavat, että immunoglobuliinitasot laskivat merkittävästi imatinibihoidon aikana. Prosentteina ilmaistu immunoglobuliinitasojen lasku 6 kuukauden hoidon jälkeen oli IgG-pitoisuuksissa $24,8 \pm 16,7$ %, IgA-pitoisuuksissa $23,8 \pm 24,5$ % ja IgM-pitoisuuksissa $36,3 \pm 36,6$ %. Muutokset IgG-, IgA-, ja IgM-pitoisuuksien keskiarvoissa 6 ja 9 kuukauden hoidon jälkeen olivat Steegmannin ym. (2003) mukaan merkittäviä lähtötilanteen arvoihin verrattuna p-arvon ollessa $<0,05$ (p-arvo -käsite on määritelty kappaleessa 7 sivuilla 52-53). Potilailla, joilla immunoglobuliinipitoisuudet olivat lähtötilanteessa normaalit, IgG-pitoisuus laski hoidon aikana 28 %, IgA-pitoisuus 14 % ja IgM-pitoisuus 22 %. Myös lymfosyyttiarvot laskivat merkittävästi hoidon aikana. Immunoglobuliinitasojen ja lymfosyyttimäärien välillä ei havaittu riippuvuussuhdetta. (Steegmann ym. 2003, 764.)

Steegmannin ym. (2003) tutkimuksessa immunoglobuliinitasojen laskun ei havaittu aiheuttavan kliinisiä seuraamuksia, mutta on otettava huomioon, että tutkimuksen otos oli melko pieni ja seuranta-aika suhteellisen lyhyt. Tutkimuksesta saatujen tulosten perusteella on tarkoituksenmukaista selvittää imatinibihoidon merkitys potilaiden muuttuneisiin immuunivasteisiin hoidon aikana. Tulosten perusteella voidaan myös olettaa, että imatinibihoidolla, jonka tarkoitus on estää fysiologisen abl-tyrosiinikinaasin toimintaa, voi olla ratkaiseva merkitys alentuneisiin immunoglobuliinitasoihin. Yleispätevien johtopäätösten tekeminen vaatii kuitenkin jatkotutkimuksia. Vaikka immunoglobuliinitasojen laskun kliiniset seuraamukset näyttävät tämän tutkimuksen perusteella olevan vähäisiä, tulisi potilaiden immunoglobuliinitasoja kuitenkin seurata, kunnes ilmiön syille löydetään tarkka selitys. (Steegmann ym. 2003, 767-768.)

Vuonna 2008 myös Rita Santachiara tutkimusryhmänsä kanssa tutki muun muassa kroonista myelooista leukemiaa sairastavien potilaiden imatinibihoidon

aikaisia immunologisia ja hematologisia vaikutuksia. Kyseiseen tutkimukseen osallistui 72 KML-potilasta, ja immunoglobuliinitasot määritettiin heidän seeruminäytteistään. Tutkimuksesta julkaistut tulokset osoittavat merkittävää laskua potilaiden immunoglobuliinipitoisuuksissa. Santachiaran ym. (2008) mukaan immunoglobuliinipitoisuuksien lasku oli merkittävä jopa 10 prosentilla potilaista ja näin ollen imatinibin yhteyttä potilaiden humoraaliseen immunitettiin pidetään selvänä. Saman tutkimuksen mukaan tyrosiini-kinaasineestäjillä on merkitystä sekä T- että B-lymfosyyttien toimintaan liittyen. (Santachiara 2008, 1252.)

Jo vuonna 2004 Masayuki Nagasawa ja Shuki Mizutani julkaisivat *International Journal of Hematology* -lehdessä artikkelin, jossa he esittävät erään potilaan IgM-pitoisuuksien laskeneen merkittävästi hänen saamansa imatinibihoidon aikana. Kyseisellä potilaalla IgA- ja IgG-pitoisuudet pysyivät kuitenkin normaalilla tasolla. Syytä nimenomaan IgM-pitoisuuksien laskuun ei tarkkaan osata sanoa, mutta Nagasawan ja Mizutanin mukaan imatinibin vaikutuksia varsinkin nuorten potilaiden immunoglobuliinitasoihin on syytä tutkia. Heidän mukaansa humoraalinen immunitetti on paljon riippuvaisempi IgM-luokan immunoglobuliineista kuin IgA- tai IgG-luokan immunoglobuliineista. (Nagasawa & Mizutani 2004, 381.)

Tutkimuksia on tehty myös tyrosiinikinaasineestäjälääkkeiden vaikutuksista T- ja B-lymfosyyttien toimintaan. Vuonna 2008 tutkija Ralf Weichsel julkaisi tutkimusryhmänsä kanssa tulokset tutkimuksesta, jonka tarkoituksena oli selvittää dasatinibin vaikutuksia T-lymfosyyttien toimintaan. Jo aikaisemmin on osoitettu, että imatinibilla on vaikutusta T-lymfosyyttien toimintaan. Toisen sukupolven tyrosiinikinaasineestäjät ovat laajakirjoisempia kuin imatinibi, estäen useamman tyrosiinikinaasin toimintaa. Vaikka näiden lääkkeiden on osoitettu olevan hyvin tehokkaita, Weichselin ym. (2008) mukaan niiden vaikutukset T-lymfosyyttien toimintaan voivat olla huolestuttavia. Dasatinibi on tyrosiinikinaasineestäjä, jonka vaikutus perustuu bcr-abl-tyrosiinikinaasin lisäksi muihin tyrosiinikinaaseihin, kuten scr-kinaasiperheen kinaaseihin lck ja fyn. Näillä puolestaan on osoitettu olevan merkitystä T-lymfosyyttien syntyyn, kehitykseen ja toimintaan. Tämän takia voidaan olettaa dasatinibilla olevan imatinibia enemmän vaikutuksia potilaan immunoglobuliinitasoihin. Kyseinen tutkimus osoitti dasatinibilla olevan

vaikutusta T-lymfosyyttien proliferaatioon ja aktivaatioon. Dasatinibin vaikutuksen T-lymfosyyteistä muodostuneisiin muistisoluihin osoitettiin olevan vähäisempi kuin naiiveihin T-lymfosyytteihin, eikä dasatinibilla todettu olevan kliinistä vaikutusta T-lymfosyyttien apoptoosiin. (Weichsel ym. 2008, 2484-2487.)

Hugues de Lavallade (2009) tutkimusryhmänsä kanssa on puolestaan tutkinut tyrosiinikinaasineestäjien vaikutuksia potilaiden rokotevasteisiin. Heidän tutkimuksensa mukaan dasatinibi vaikuttaa T-lymfosyyttien lisäksi myös B-lymfosyyttien toimintaan, mikä takia sillä saattaa olla merkitystä rokotevasteiden kannalta. Kyseisen tutkimuksen tuloksia ei ole kokonaisuudessaan vielä julkaistu, mutta tutkimuksesta julkaistussa abstraktissa esitettyjen alustavien tulosten mukaan tyrosiini-kinaasineestäjälääkitystä saavien kroonista myelooista leukemiaa sairastavien potilaiden rokotevasteet olivat huomattavasti heikompia terveiden verrokkipotilaiden rokotevasteisiin verrattuna. (Lavallade ym. 2009.)

6 TUTKIMUSTEHTÄVÄ, TARKOITUS JA TAVOITE

Opinnäytetyöni on osa Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön suurempaa tutkimusprojektia, jossa tutkitaan kroonisen myelooisen leukemian hoidossa käytettävien lääkkeiden immunologisia vaikutuksia. Oman työni tarkoitus on selvittää, miten KML-taudin hoito imatinibilla, dasatinibilla ja nilotinibilla vaikuttaa potilaan immunoglobuliinitasoihin 1, 3, 6 ja 12 kuukauden kuluttua hoidon jälkeen diagnoosivaiheeseen verrattuna. Opinnäytetyöni tehtävänä on tutkia immunoturbidometriseen menetelmään perustuen mahdolliset muutokset potilaiden immunoglobuliinitasoissa. Tämän lisäksi tehtävänä on selvittää eri antikoagulanttien sopivuutta immunoglobuliinimäärityksiin. Immunoglobuliinitasojen mahdollista muuttumista on syytä tutkia, sillä hoidon pitkäaikaisvaikutuksista ei vielä ole tarpeeksi tietoa. On osoitettu, että KML:n hoitoon käytetyt lääkkeet estävät myös tyrosiinikinaaseja, jotka ovat tärkeitä T- ja B-lymfosyyttien aktivoitumisessa, minkä takia immunoglobuliinitasojen mahdollista muuttumista on tarkoituksenmukaista tutkia (Mustjoki 2010c). Lisäksi on tärkeää tietää, onko hoidolla mahdollisesti merkitystä esimerkiksi potilaiden puolustuskykyyn.

Immunoglobuliinitasojen määrittäminen ei kuulu kroonista myelooista leukemiaa sairastavan potilaan rutiinikokeisiin. Koska näyttöä immunoglobuliinitasojen mahdollisesta laskusta tyrosiinikinaasestäjälääkitykseen liittyen on kuitenkin olemassa, on Biomedicum Hematologisessa tutkimusyksikössä haluttu selvittää asiaa tarkemmin. Niinpä opinnäytetyöni aiheeksi muodostui nykyhoitojen vaikutusten selvittäminen kroonista myelooista leukemiaa sairastavien potilaiden immunoglobuliinitasoihin.

Opinnäytetyöni on työelämälähtöinen, joten tutkimukseni rajaus on tehty yhteistyössä työelämän edustajan, erikoislääkäri Satu Mustjoen, kanssa. Näytteitä on kerätty valmiiksi 4.10.2005 lähtien siten, että potilaat ovat ennen näytteiden ottamista antaneet kirjallisen suostumuksensa heidän näytteidensä käyttämiseen tutkimustarkoitukseen. Tarvitsemiani potilasnäytteitä tulen tutkimaan nimettöminä näytekoodinumeroiden avulla, joten yksittäinen potilas ei

tule olemaan kokeen suorituksen missään vaiheessa tunnistettavissa. Potilasnäytteiden lisäksi tulen analysoimaan 10 terveen verrokin näytettä.

Opinnäytetyöni liittyy Hematologisessa tutkimusyksikössä tehtävään tutkimukseen, jonka tavoitteena on selvittää kroonisen myelooisen leukemian hoidon vaikutuksia potilaiden puolustuskykyyn. Näin ollen tavoitteena omalle opinnäytetyölleni on, että siitä tulisi olemaan hyötyä Biomedicum Hematologisessa tutkimusyksikössä tehtävässä suuremmassa tutkimuksessa ja siten potilaiden hoidossa. Tavoitteenani on myös tuottaa tietoa, josta on hyötyä tällä hetkellä kroonista myelooista leukemiaa sairastavien ja siihen myöhemmin sairastuvien hoidossa. Henkilökohtaisiin tavoitteisiini kuuluu edellisten lisäksi tutkimustyön periaatteisiin ja Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön toimintaan tutustuminen. Tarkoitukseni on saada tietoa ja omakohtaista kokemusta tieteellisen tutkimuksen tekemisestä, koska mielenkiinto tutkijan työtä kohtaan on opiskelun kuluessa koko ajan vahvistunut.

7 KOKEELLINEN TUTKIMUS

Erilaiset tutkimukset jaotellaan yleisesti joko teoreettisiin tai empiirisiin tutkimuksiin. Teoreettisessa tutkimuksessa käytetään hyväksi jo olemassa olevaa tietoa. Empiirisessä tutkimuksessa puolestaan perehdytään kokemusperäisesti tutkittavaan ilmiöön. Empiirisen tutkimuksen tavoitteena voi olla esimerkiksi ilmiön kuvaaminen, selittäminen tai toiminnan arvioiminen ja kehittäminen. Kokeellinen tutkimus kuuluu empiirisiin tutkimuksiin. Kokeellisessa tutkimuksessa tutkimusaineisto kerätään mittaamalla. Mittaukset tehdään täsmällisesti määritellyistä ilmiöistä ja tarkasti kontrolloiduissa olosuhteissa, usein laboratorioissa. Tutkimus koostuu yleensä useista havaintoyksiköistä, joita mitataan kvantitatiivisesti. Kvantitatiiviselle tutkimukselle ominaisesti aineisto ja tulokset pyritään esittämään numeerisessa muodossa. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa aineisto voi olla verbaalista tai visuaalista. Kvantitatiiviselle tutkimukselle on luonteenomaista korkea reliabiliteetti eli luotettavuus sekä validiteetti eli menetelmän kyky mitata juuri sitä, mitä tutkimuksen halutaankin mittaavan. (Teirilä & Jyväsjärvi 2001, 12-14; Vilkkä 2007, 13-14.)

Kokeellisen menetelmän tavoitteena on tutkia ilmiön reaktiota tai vaikutusta johonkin. Kokeellisen tutkimuksen tulisi olla mahdollisimman systemaattista ja kontrolloitua havaintojen tekoa. Tutkimukseen liittyvät mittaukset on tehtävä sellaisin tieteellisesti hyväksytyin instrumentein ja menetelmin, että tutkimuksen toistaminen uudelleen on mahdollista. Kokeellinen tutkimus edellyttää myös asianmukaista raportointia tutkimuksen kulusta. (Anttila 2005, 183-184.) Opinnäytetyöni on empiirinen tutkimus, jonka suoritan kokeellisin kvantitatiivisin menetelmin. Työn tavoitteena on tutkia kroonisen myeloosin leukemian nykyhoitojen vaikutusta potilaan immunoglobuliinitasoihin. Tutkimusaineisto ja tulokset esitetään numeerisessa muodossa.

Keskeisiä tekijöitä kvantitatiivisen tutkimuksen suhteen ovat aiemmista tutkimuksista tehdyt johtopäätökset ja aiemmat teoriat sekä käsitteiden määrittely. Oleellisia ovat myös asianmukaiset koejärjestelyt ja tutkittavien henkilöiden tarkoituksenmukainen valinta sekä päätelmien teko

havaintoaineiston tilastolliseen analysointiin perustuen. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 139-140.) Tutkimuksen luotettavuuteen liittyvät olennaisesti toteutunut otos ja kato. Mittauksen kohteena eivät yleensä ole kaikki otokseen valitut yksilöt. Kato tarkoittaa tietojen puuttumista. Tutkijan on varauduttava jonkinasteiseen katoon tutkimuksen otosta suunniteltaessa. Toteutuneella otoksella tarkoitetaan sitä, mitä varsinaisesta otoksesta on jäänyt jäljelle, kun kato on otettu huomioon. (Vilkkä 2007, 59.)

Kvantitatiivisen tutkimuksen oletetaan tuottavan tietoa, joka on yleistettävissä. Tietoa käsitellään tilastollisina yksiköinä, jolloin tutkimus perustuu käsitteisiin tilastoyksikkö, otos ja näyte. Tilastoyksiköllä tarkoitetaan kvantitatiivisen tutkimuksen mittauksen kohdetta. (Anttila 2005, 236.) Opinnäytetyössäni mittaushetkinä ovat kroonista myeloidista leukemiaa sairastavat potilaat. Anttilan (2005) mukaan useinkaan ei ole mahdollista tutkia koko perusjoukkoa, joten siitä on valittava näyte tai otos. Kun osa perusjoukosta on valittu satunnaisesti, puhutaan otoksesta. Otoksen tulisi olla ominaisuuksiltaan samanlainen kuin perusjoukko, toisin sanoen sen tulisi edustaa perusjoukkoa mahdollisimman hyvin. Mikäli osa perusjoukosta on valittu tietyin perustein, puhutaan niin sanotusta harkinnanvaraisesta näytteestä. Valinnan perusteet on tällöin esitettävä tutkimuksen raportissa. (Anttila 2005, 239-240; Vilkkä 2007, 51.) Opinnäytetyössäni kyseessä on näyte, sillä tutkimuspotilaat on valittu siten, että heistä olisi mahdollisimman monen eri aikapisteen eri näyte saatavilla eli tallennettuna pakastimeen. Muita valintakriteerejä ei ole käytetty. Mustjoen mukaan tutkimuspotilaat kuuluvat käytännössä myös muihin joko tämänhetkisiin tai aikaisempiin Hematologisessa tutkimusyksikössä tehtäviin tutkimuksiin (Mustjoki 2010b).

Kvantitatiivisen tutkimuksen aineistoa käsitellään tilastollis-matemaattisin keinoin. Empiirisen tutkimuksen tutkimusasetelma muodostuu muuttujista. (Anttila 2005, 236-237.) Opinnäytetyössäni muuttujina ovat muun muassa potilaiden käyttämä lääkitys sekä näytteenottoajankohta ja mitattava immunoglobuliinitaso. Anttilan (2005) mukaan muuttujat muodostavat erilaisia ryhmiä. Empiirisessä tutkimuksessa halutaan tavallisesti tietää, ovatko tutkimusaineistossa olevien ryhmien väliset erot todellisia vai näennäisiä. (Anttila 2005, 236-237.) Tutkimusaineiston tilastolliseen testaukseen on

olemassa erilaisia menetelmiä. Yksi tapa testata tuloksia on laskea niin sanottu p-arvo, joka osoittaa keskiarvojen erojen merkitsevyyden. (Anttila 2005, 248-250.) Opinnäytetyössäni p-arvo on laskettu mediaaniarvoista, sillä kyseessä on pieni otoskoko. Anttilan (2005) mukaan tutkimusaineiston testimenetelmien tarkoituksena on osoittaa, millä todennäköisyydellä muuttujien välillä vallitsee eroja. Näille eroille puolestaan lasketaan riskitasot, jolloin erot ovat helposti tulkittavissa. Riskiä mitataan prosentteina kokonaisvaihtelusta. (Anttila 2005, 248-250.) Käytännössä riskitasolla tarkoitetaan sitä, kuinka todennäköistä on, että otos vastaa perusjoukkoa (Vilkkä 2007, 132). Alla olevassa taulukossa 1 on esitetty muuttujien väliset erojen merkitsevyyksien riskitasot.

TAULUKKO 1. Muuttujien väliset erojen merkitsevyyksien riskitasot (mukaillen Kananen 2008, 49)

Prosenttimäärä kokonaisvaihtelusta	Ilmaistuna desi-maalilukuna (p-arvo)	Ero on käytännössä	Merkitsevyys osoitetaan
> 5 %	> 0,05	ei merkitsevä	-
≤ 5 %	≤ 0,05	melkein merkitsevä	*
≤ 1 %	≤ 0,01	merkitsevä	**
≤ 0,1 %	≤ 0,001	erittäin merkitsevä	***

Kvantitatiivisen tutkimuksen tulosten tarkasteluun soveltuu esimerkiksi varianssin tarkastelu. Varianssilla tarkoitetaan vaihtelua. Varianssianalyysin avulla tarkastellaan, onko ryhmien välisessä vaihtelussa merkitseviä eroja. Mikäli merkitseviä eroja esiintyy, tarkoittaa se sitä, että ryhmien väliset erot johtuvat jostakin systemaattisesti vaikuttavasta tekijästä, eikä satunnaisvaihtelusta. Käytännössä mitä pienempi riskitason prosenttimäärä saadaan, sitä todennäköisemmin ero ryhmien välillä johtuu jostakin systemaattisesti vaikuttavasta tekijästä. (Anttila 2005, 251-252.) Varianssianalyysistä käytetään myös nimitystä ANOVA (analysis of variance). Varianssianalyysia pidetään yhtenä kokeellisen analyysin perusmenetelmistä ja sen käyttö onkin yleistä esimerkiksi lääketieteessä. Varianssianalyysista on olemassa useita sovelluksia. (Mattila 2002.) Tässä työssä keskityn ainoastaan yksisuuntaiseen varianssianalyysiin, jonka avulla analysoin tuloksiani.

8 TUTKIMUKSEN VAIHEET

Ensimmäisen kerran tapasin työelämän edustajan, erikoislääkäri Satu Mustjoen 18.9.2009. Silloin keskustelimme opinnäytetyön aiheesta ja sisällöstä alustavasti. Lopullisen aiheen sain syyskuun loppupuolella samana vuonna. Syksyllä 12.-13.10.2009 olin tutustumassa Biomedicum laboratorioon toisen työelämän edustajan, laboratoriohoitaja Minna Pajuportin ohjauksessa. Tutustuin Biomedicum tutkimuslaboratorion tiloihin ja välineisiin sekä näytteenkäsittelytekniikoihin.

Varsinainen opinnäytetyöprosessi alkoi opinnäytetyön suunnitelman tekemisellä. Suunnitelma valmistui helmikuussa 2010. Tutkimusluvan ja sopimuksen opinnäytetyöstä allekirjoitti erikoislääkäri Satu Mustjoki 25.3.2010. Opinnäytetyöni kokeellisen osuuden suoritin 7.-11.6.2010 Biomedicum Hematologisessa tutkimusyksikössä ja HUSLAB, Meilahden sairaalan laboratoriossa (jäljempänä käytän nimeä Meilahden sairaalan laboratorio). Kokeellisen osuuden suorittamisen aikana opinnäytetyöni aihe muotoutui lopulliseen muotoonsa.

8.1 Tutkimusnäytteet

Tutkimukseni koostuu 19 KML-potilaan plasmanäytteistä diagnoosivaiheessa sekä 1, 3, 6 ja 12 kuukauden jälkeen hoidon aloittamisesta. Tutkimukseen valituista potilaista 10 käytti tutkimushetkellä lääkkeenään imatinibia. Viisi potilasta käytti dasatinibia ja neljä nilotinibia. Lisäksi 10 näytteistä oli terveiden verrokeiden näytteitä. Kaksi viimeistä näytettä olivat yhden imatinibia käyttävän potilaan (KLM-numero 793) 6 kuukauden näytteet EDTA- ja hepariiniplasmana. Liitteenä 1 olevassa taulukossa 2 on esitetty, mitä näytteitä kustakin potilaasta analysoitiin. Taulukosta ilmenee myös käyttämäni juokseva numerointi, sekä kunkin potilaan KML-numero ja hänen käyttämänsä tyrosiinikinaasintäjä-lääke. Potilaat eivät itse tiedä KML-numeroansa.

Tutkimusnäytteitä on kerätty potilaista heidän diagnosoimishetkestään alkaen. Näytteet on otettu 7 ml ACD-putkiin, joista plasma on eroteltu sentrifugoimalla putket Hettich Universal 320 -sentrifugilla ensin 300 G, 10 minuutin ajan ja sen jälkeen uudestaan 1300 G, 10 minuutin ajan. Täten eroteltuja plasmanäytteitä käytin tutkimusnäytteinäni. Käyttämäni tutkimusnäytteet oli varastoitu Heraus HERAfreeze -pakastimeen -70°C:een 1,5 ml Eppendorf-mikrosentrifugiputkiin.

8.2 Eri työvaiheissa käytetyt välineet, laitteet, reagenssit ja kontrollit

Tutkimusnäytteiden sentrifugoimiseen käytin Eppendorf Centrifuge 5415 D -sentrifugia. Näytteet pipetoin FinnpiPETTE® 200-1000 µl ilmamäntäpipettejä ja 200-1000 µl Biohit FilterTip –kärkiä käyttäen. Näytteiden analysointia varten siirsin näytteet Kartell:n Cobas-kippoihin. Varsinaisen immunoglobuliinitasojen määrittämisen suoritin Meilahden sairaalan laboratorion tiloissa kulloinkin vuorossa olevan laboratoriohoitajan avustuksella. Määrittämisen suoritimme Roche Modular Analytics SWA -analysaattorilla immunoturbidometriseen menetelmään perustuen.

Analyysiin tarvittava näytemäärä on 20 µl, mutta miniminäytetilavuus on 300 µl Cobas-kipossa. Määrittäminen tapahtuu Roche Modular Analytics SWA -analysaattorin P2/P5-moduuleilla. Reagensseina käytetään kullekin immunoglobuliiniluokalle omia reagensseja. Immunoglobuliini G:n mittaukseen reagensseina käytetään Roche Diagnostics IgG-2, Tina.quant a IgG Gen.2 -reagensseja. Pakkaus sisältää 6 x 53 ml reagenssia 1 ja 6 x 20 ml reagenssia 2. Reagenssi 1 sisältää TRIS-puskuria (pH 8,0) 20 mmol/l, NaCl 200 mmol/l, PEG 3,6 % ja lisäksi säilöntäaineita sekä stabilisaattoreita. Reagenssi 2 sisältää voihessa tuotettuja antihumaani IgG-vasta-aineita, TRIS-puskuria (pH 8,0) 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l ja säilöntäaineita. Immunoglobuliini A:lle ja M:lle reagenssit ovat muuten samat, mutta IgA-määrittämisessä reagenssi 2 sisältää vasta-aineina voihessa tuotettuja antihumaani IgA-vasta-aineita, ja IgM-määrittämisessä reagenssi 2 puolestaan sisältää voihessa tuotettuja antihumaani IgM-vasta-aineita. Reagenssit ovat käyttövalmiita, mutta ennen reagenssikasettien asettamista analysaattorin reagenssitilaan niitä on sekoitettava varovasti. Avatut reagenssit säilyvät laitteen jäähdytetyssä

reagenssitilassa 90 vuorokautta. Avaamattomat pakkaukset säilytetään jääkaapissa, jolloin ne säilyvät pakkauksessa ilmoitettuun erääntymispäivään saakka. (Huslab 2009.)

Vakiona määrityksissä käytettiin Roche Diagnostics C.f.a.s Proteins -vakiota, joka on varovaisen sekoittamisen jälkeen käyttövalmis sellaisenaan. Vakiota säilytetään jääkaapissa, jossa se säilyy avaamattomana pakkauksessa ilmoitettuun erääntymispäivään saakka ja avaamisen jälkeen neljä viikkoa. Vakiointi suoritetaan reagenssierän vaihtuessa ja muutoin tarvittaessa, eli tulostason muutoksen yhteydessä, huoltojen jälkeen, sekä lampun tai kyvettien vaihdon yhteydessä. Vakiointi on onnistunut, mikäli vakiointitulosten yhteydessä ei esiinny hälytyksiä. (Huslab 2009.) Tutkimukseeni liittyvien määritysten kohdalla vakiointia ei tarvinnut tehdä.

Kontrolleina immunoglobuliinimäärityksiin käytetään Meilahden sairaalan laboratoriossa seuraavia kahta eri laaduntarkkailunäytettä: BIO-RAD Liquichek 1 eli HUS 1 ja BIO-RAD Liquichek 2 eli HUS 2. Kyseiset laaduntarkkailunäytteet ovat valmiita liukoisia humaanipohjaisia kontrolliseerumeita. Kontrollinäytteet analysoidaan kerran päivässä ja muutoin niitä säilytetään pakastimessa (-20°C). Kontrollitulokset siirtyvät analysaattorilta suoraan laadunvalvontaohjelmistoon, jolloin potilas- ja tutkimusnäytteiden analysointi on mahdollista vain, kun kontrollitulokset ovat niille laadittujen raja-arvojen sisällä. (Huslab 2009.)

8.3 Työvaiheet

Käytin kokeellisen osuuden suorittamiseen kesäkuussa 2010 viisi työpäivää. Ensimmäisenä päivänä olin katsomassa Meilahden sairaalan hematologian poliklinikalla, kun erikoislääkäri Satu Mustjoki otti luuytimen aspiraationäytettä eräältä KML-potilaalta. Seurasin myös Biomedicum tutkimuslaboratoriossa laboratoriohoitaja Minna Pajuportin työskentelyä uuden KML-potilaan näytteiden parissa. Uudelta KML-potilaalta otetaan ensikäynnin yhteydessä niin sanottu KML-paketti, joka sisältää seuraavat näytteet: perifeerisestä verestä 3 x 7 ml ACD-putki ja 1 x 10 ml hepariiniputki sekä luuytimestä 1 ampulli, jossa on noin

2 ml luuydintä 10 ml:ssa ravintonestettä. Tässä työssä käsittelen kuitenkin vain tutkimukseeni liittyviä näytteitä ja niiden käsittelyä. Lisäksi keskustelin erikoislääkäri Satu Mustjoen kanssa opinnäytetyöni kokeellisen osuuden suoritukseen liittyvistä käytännön asioista.

Tutkimusnäytteitä oli yhteensä 96 kappaletta. Koska näytteet analysoitiin Meilahden sairaalan laboratoriossa normaaleiden rutiininäytteiden joukossa, vein omat tutkittavat näytteeni analysoitaviksi kolmessa osassa kolmena eri päivänä. Meilahden sairaalan laboratoriossa valmiiksi laittamani näytteet analysoi kulloinkin vuorossa oleva laboratoriohoitaja. Etsin -70 °C Heraus HERAfreeze -pakastimesta ensimmäisen osan tarvitsemistani tutkimusnäytteistä näytekoodien ja näytteiden kirjanpito-ohjelmaan (FileMaker) merkittyjen paikkakoodien avulla. Sulatin näytteet 37 °C vesihauteessa huoneenlämpöisiksi. Koska näytteet eivät saa mittausteknisistä syistä olla sameita, sentrifugoin näytteet 2800 G, 10 minuutin ajan Eppendorf Centrifuge 5415 D -sentrifugia käyttäen, jotta sain mahdollisen sakan eppendorf-putken pohjalle. Sentrifugoinnin jälkeen pipetoin 450 µl jokaista näytettä Cobas-kippeihin, joissa näytteiden analysointi tapahtui Rochen Modular Analytics SWA -analysaattorilla. Näytteet identifioin juoksevin numeroin Meilahden sairaalan laboratorion saamillani valmiiksi numeroiduilla viivakoodilla varustetuilla tutkimusnäytetarroilla. Ensimmäiseen määrityserään etsin ja valmistelin näytteet 1-44. Analysointivaihetta odottaessa säilytin näytteitä jääkaapissa. Olin myös tutustumassa Meilahden sairaalan laboratorion tiloihin ja Rochen Modular Analytics SWA -analysaattorin toimintaperiaatteisiin kemisti Aija Helinin ohjauksessa.

Seuraavana päivänä olin Meilahden sairaalan laboratoriossa seuraamassa näytteideni (1-44) analysointia. Iltapäivällä etsin ja valmistelin näytteet 45-84 samoin kuin edellisenä päivänä. Seuraavaksi seurasin jälleen näytteideni analysointia. Rochen Modular Analytics SWA -analysaattori siirtää tulokset automaattisesti päätteelle, josta ne voi halutessaan tulostaa paperille. Sain tutkimusnäytteideni tulokset itselleni paperiversioina. Siirsin saamani tulokset tulosliuskoista Microsoft Excel -taulukkoon (taulukko 3 liitteenä 2). Lopuksi etsin ja valmistelin vielä näytteet 85-96 ja vein ne Meilahden sairaalan laboratorion analysoitaviksi. Näytteet 95 ja 96 liittyivät eri antikoagulanttien vertailuun.

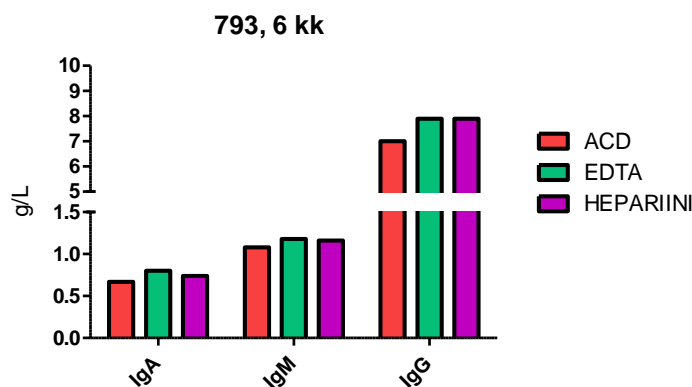
Näiden näytteiden kohdalla toimittiin samoin kuin muidenkin näytteiden kohdalla.

8.4 Tulokset ja tulosten analysointi

Analysaattori ilmoitti tulokset yksikössä g/l. Sain tulokset kaikista tutkimusnäytteistäni ilman uusintamäärytyksiä, eikä yhtään tulosta tarvinnut hylätä. Osa näytteiden tuloksista jäi kuitenkin uusintamittauksen jälkeenkin alle kvantitointirajan, jolloin analysaattori ilmoitti tulokseksi IgG:n osalta A0,5 g/l ja IgA:n ja IgM:n osalta A0,1 g/l. Kuvaajien ja taulukoiden piirtämisen helpottamiseksi kyseiset tulokset yksinkertaistettiin muotoon 0,5 g/l ja 0,1 g/l.

Näytteiden analysoimisen jälkeen piirsin saatujen tulosten pohjalta erilaisia kuvaajia ja taulukoita GraphPad Prism -ohjelman avulla. GraphPad Prism -ohjelman avulla analysoin saamiani tuloksia Kruskal-Wallis -testiä ja Dunn's Multiple Comparison -testiä apuna käyttäen. Havainnollistin kokeellisen osuuden tuloksia erilaisten kaksikulotteisten viiva- ja pistekaavioiden sekä yhden pylväsdiagrammin avulla. Kokeellisessa osuudessa määritin KML-potilaiden immunoglobuliinitasoja eri aikapisteissä: diagnoosihetkellä, sekä 1, 3, 6 ja 12 kuukautta diagnoosihetken jälkeen. Kaikilla potilailla ei ollut näytettä jokaisen aikapisteen kohdalta. Liitteenä 2 olevassa taulukossa 3 on esitetty saamani tulokset Microsoft Excel -taulukossa.

8.4.1 Antikoagulanttien merkitys

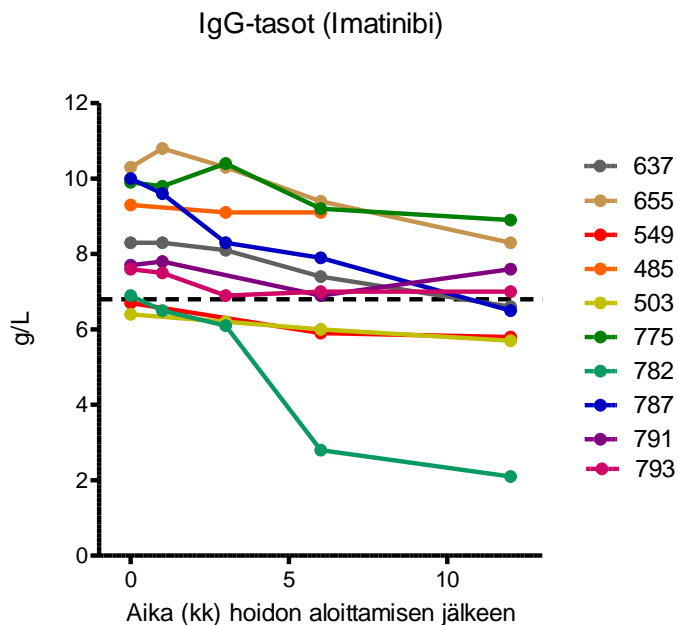


KUVIO 1. Immunoglobuliinitasojen vertailu eri antikoagulantteja käyttäen

Suurin osa näytteistä oli ACD-plasmaa, mutta mukana oli myös joitakin EDTA- ja joitakin hepariiniplasmanäytteitä. Eri antikoagulantteja vertaillakseni määritin saman potilaan (KML-numero 793) saman aikapisteen (6 kk) näytteet kaikilla kolmella eri antikoagulantilla. Saamani tulos on esitettyinä kuviossa 1 sivulla 58. Eri antikoagulanttien vertailu osoitti, että immunoglobuliinitasot ovat korkeimpia, kun määrittäminen tehdään EDTA-plasmanäytteestä. Immunoglobuliinitasot ovat hieman matalampia hepariiniplasmanäytteistä tehdyissä määrittäyksissä ja matalimmat tulokset saadaan, kun näytemuotona on ACD-plasma.

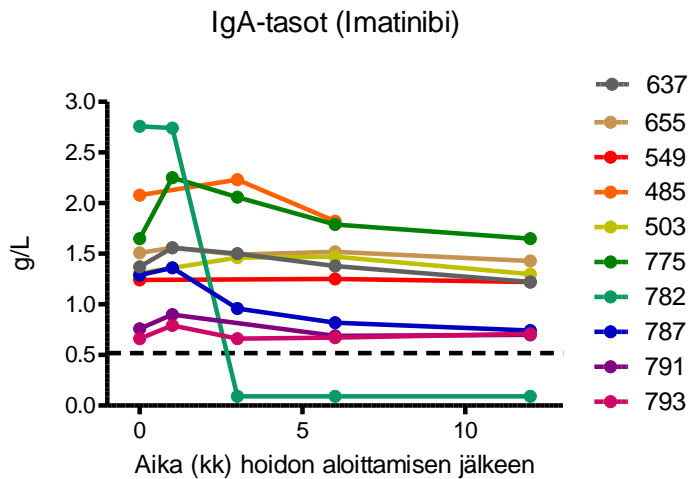
8.4.2 Imatinibipotilaat

Suurimmat muutokset immunoglobuliinitasoissa tulivat esille imatinibia käyttävien potilaiden kohdalla. Alla olevissa kuvioissa 2, 3 ja 4 on esitetty imatinibia käyttävien potilaiden immunoglobuliinitasot siten, että x-akselilla on aika (kuukausina) hoidon aloittamisen jälkeen ja y-akselilla saatu immunoglobuliinin määrä (g/l). Oikealla olevat värikoodit vastaavat eri potilaita ja numerot potilaiden KML-numeroita. Mustalla katkoviivalla kuvioissa on esitetty kunkin immunoglobuliiniluokan viitearvojen alaraja.



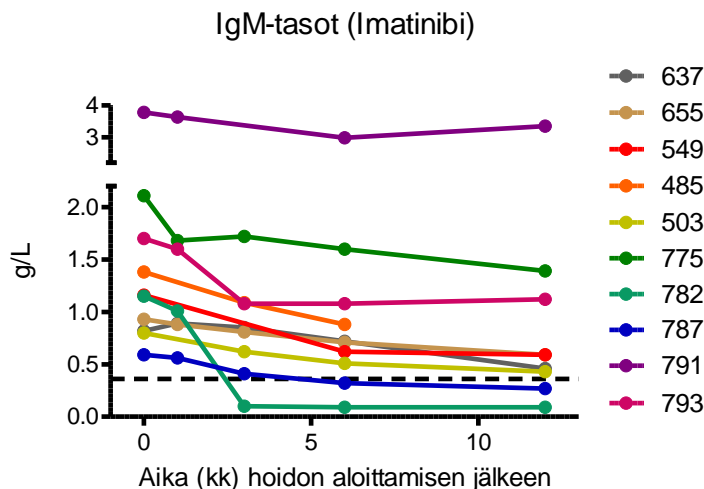
KUVIO 2. Imatinibipotilaiden IgG-tasot potilaittain

Immunoglobuliini G:n viitearvojen alaraja on 6,8 g/l. Kuviosta 2 (sivulla 59) nähdään, että kolmen potilaan kohdalla IgG-pitoisuus on jo diagnoosihetkellä lähellä viitearvojen alarajaa. Kaikilla potilailla nähdään IgG-pitoisuuden laskeneen jonkin verran hoidon aloittamisen jälkeen diagnoosihetkeen verrattuna. Yhdellä potilaalla (782) IgG-pitoisuus on laskenut arvosta 6,9 g/l arvoon 2,1 g/l.



KUVIO 3. Imatinibipotilaiden IgA-tasot potilaittäin

Immunoglobuliini A:n viitearvojen alaraja on 0,52 g/l. Kuviosta 3 nähdään, ettei IgA-pitoisuuksissa ole yhtä potilasta lukuun ottamatta tapahtunut suuria muutoksia. Yhdellä potilaalla (782) IgA-pitoisuus on pudonnut hoidon aikana arvosta 2,76 g/l arvoon 0,10 g/l. Kolmen kuukauden kohdalla IgA-pitoisuudet ovat usealla potilaalla jopa hieman nousseet, mutta pitoisuudet ovat kuitenkin palanneet hoidon jatkuessa lähelle lähtötilannetta.

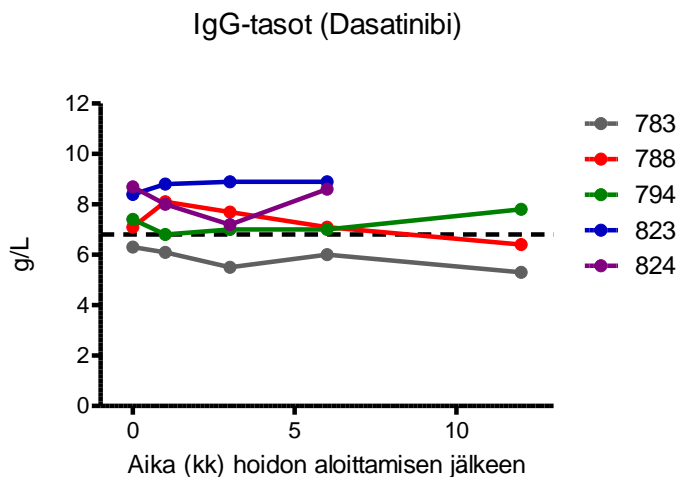


KUVIO 4. Imatinibipotilaiden IgM-tasot potilaittäin

Immunoglobuliini M:n viitearvojen alaraja on 0,36 g/l. Kuviosta 4 (sivulla 60) nähdään potilaiden IgM-pitoisuuksien jonkin verran laskeneen hoidon aikana. Yhdellä potilaalla (791) IgM-pitoisuus on diagnoosihetkellä ollut melko korkea (3,78 g/l), jopa yli viitearvojen ylärajan (2,84 g/l), ja pysynyt 12 kuukauden hoidon jälkeenkin arvossa 3,35 g/l. Potilaalla 782 IgM-pitoisuus on puolestaan pudonnut arvosta 1,15 g/l arvoon 0,10 g/l.

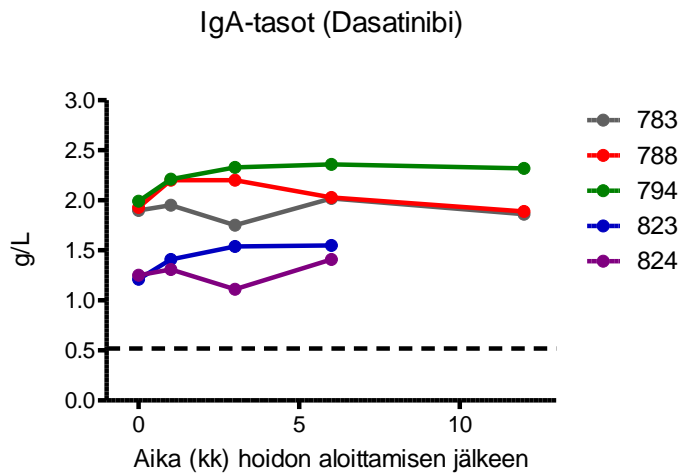
8.4.3 Dasatinibipotilaat

Alla olevissa kuvioissa 5, 6 ja 7 on esitetty dasatinibia käyttävien potilaiden immunoglobuliinitasot siten, että x-akselilla on aika (kuukausina) hoidon aloittamisen jälkeen ja y-akselilla saatu immunoglobuliinin määrä (g/l). Oikealla olevat värikoodit vastaavat eri potilaita ja numerot potilaiden KML-numeroita. Mustalla katkoviivalla kuvioissa on esitetty kunkin immunoglobuliiniluokan viitearvojen alaraja.



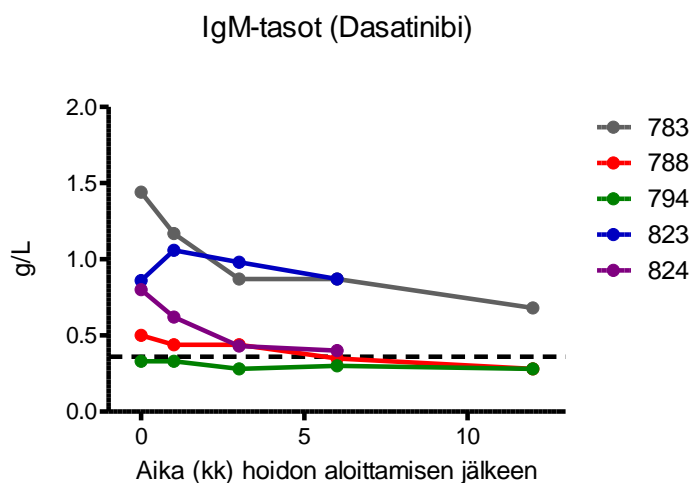
KUVIO 5. Dasatinibipotilaiden IgG-tasot potilaittain

Dasatinibipotilaiden IgG-pitoisuuksissa ei havaita 12 kk hoidon aikana suuria muutoksia (kuvio 5). Yhdellä potilaalla (783) IgG-pitoisuudet ovat sekä diagnoosihetkellä että 12 kuukauden hoidon jälkeen alle viitearvojen alarajan.



KUVIO 6. Dasatinibipotilaiden IgA-tasot potilaittain

Kuviosta 6 nähdään, että myöskään IgA-pitoisuuksissa ei dasatinibipotilailla havaita suuria muutoksia hoidon aikana. Kaikilla potilailla IgA-pitoisuudet pysyvät hyvin viitearvojen alarajan yläpuolella.

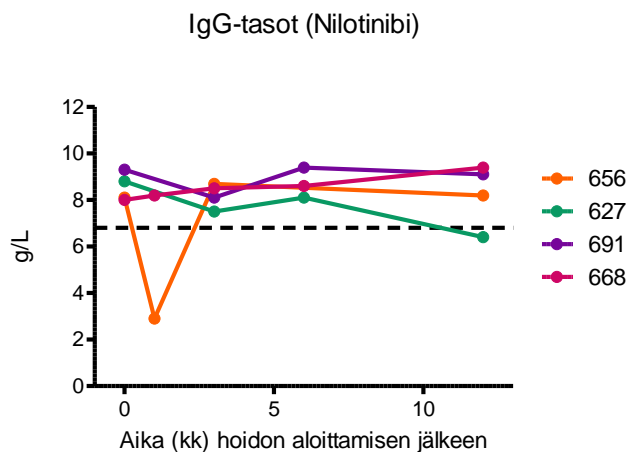


KUVIO 7. Dasatinibipotilaiden IgM-tasot potilaittain

Dasatinibipotilaiden IgM-pitoisuuksissa esiintyy jonkin verran laskua 12 kuukauden hoidon aikana (kuvio 7). Potilaalla 783 IgM-pitoisuus laskee diagnoosihetken arvosta 1,44 g/l arvoon 0,68 g/l 12 kuukautta hoidon aloittamisen jälkeen. Potilaalla 794 IgM-pitoisuus on sekä diagnoosihetkellä että hoidon edetessä hiukan alle viitearvojen alarajan.

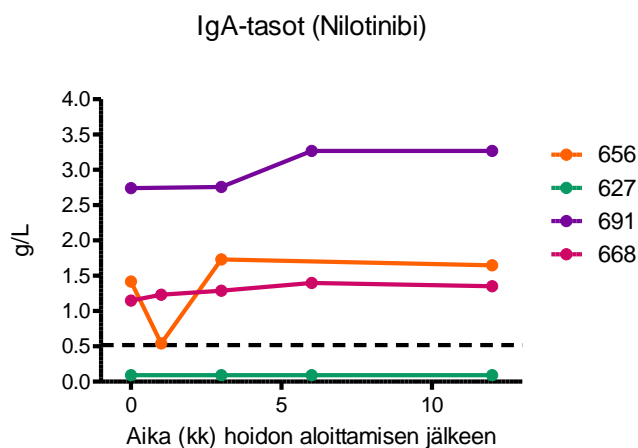
8.4.4 Nilotinibipotilaat

Alla olevissa kuvioissa 8, 9 ja 10 on esitetty nilotinibia käyttävien potilaiden immunoglobuliinitasot siten, että x-akselilla on aika (kuukausina) hoidon aloittamisen jälkeen ja y-akselilla saatu immunoglobuliinin määrä (g/l). Oikealla olevat värikoodit vastaavat eri potilaita ja numerot potilaiden KML-numeroita. Mustalla katkoviivalla kuvioissa on esitetty kunkin immunoglobuliiniluokan viitearvojen alaraja.



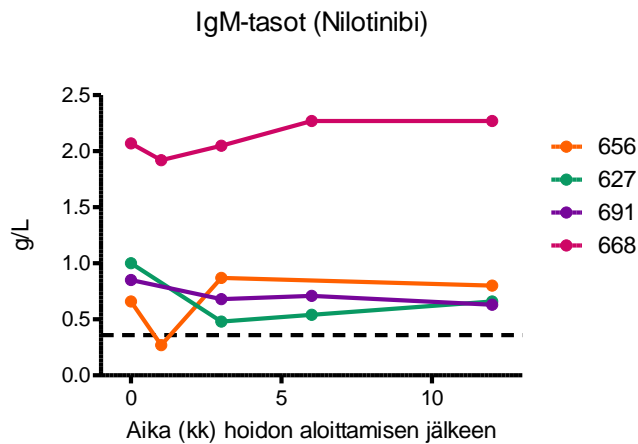
KUVIO 8. Nilotinibipotilaiden IgG-tasot potilaittain

Kuviosta 8 nähdään, etteivät nilotinibipotilaiden IgG-pitoisuudet ole juurikaan laskeneet 12 kuukauden hoidon aikana. Yhdellä potilaalla (656) IgG-pitoisuus on kolmen kuukauden kohdalla käynyt viitearvojen alarajan alapuolella, mutta palannut pian entiselle tasolle. Sen sijaan potilaalla 627 IgG-pitoisuus on laskenut diagnoosihetken arvosta 8,8 g/l arvoon 6,4 g/l 12 kuukauden hoidon jälkeen.



KUVIO 9. Nilotinibipotilaiden IgA-tasot potilaittain

Nilotinibipotilaiden IgA-pitoisuuksissa nähdään suurta vaihtelua yksittäisten potilaiden kohdalla (kuvio 9 sivulla 63). Kuitenkaan yksittäisen potilaan omassa IgA-pitoisuuksissa ei havaita suuria eroja diagnoosihetken pitoisuuden ja 12 kuukautta hoidon jälkeen määritetyn pitoisuuden välillä. Kolmella potilaalla IgA-pitoisuus pysyy viitearvojen alarajan yläpuolella 12 kuukauden hoidon aikana koko ajan, mutta yhdellä potilaalla (627) IgA-pitoisuus on arvossa 0,10 g/l jokaisessa mittausvaiheessa.

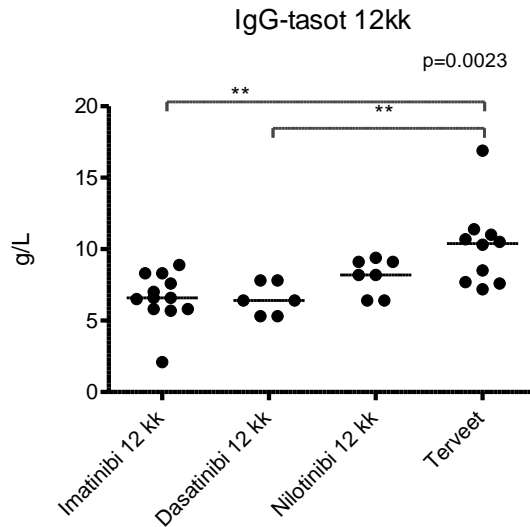


KUVIO 10. Nilotinibipotilaiden IgM-tasot potilaittain

Kuviosta 10 nähdään, että immunoglobuliini M:n pitoisuuksissa ei nilotinibipotilailla havaita suuria eroja 12 kuukauden hoidon aikana. Yhdellä potilaalla (668) IgM-pitoisuus on sekä diagnoosihetkellä että hoidon edetessä selvästi muiden potilaiden arvoja korkeampi, mutta silti viitearvojen rajoissa.

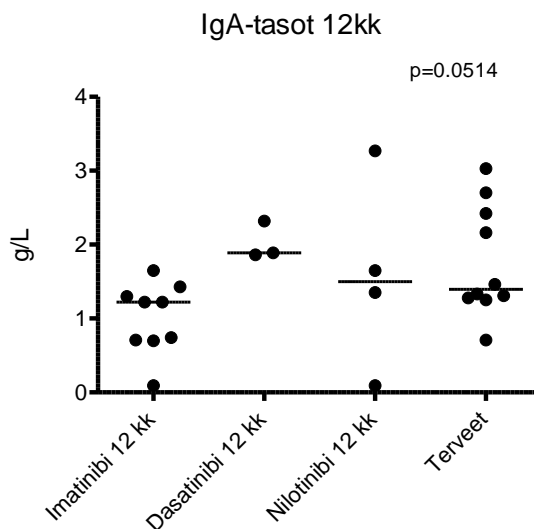
8.4.5 Immunoglobuliinitasot 12 kk kuluttua diagnoosivaiheesta

Alla olevissa kuvioissa 11-13 on 12 kuukautta hoidon aloittamisen jälkeen otettujen näytteiden immunoglobuliinitasot lääkeryhmittäin. Kuviot on esitetty pistekaavioina siten, että x-akselilla on potilaiden 12 kuukauden näytteet lääkeryhmittäin sekä terveiden verrokkipotilaiden näytteet omana ryhmänään ja y-akselilla on saatu immunoglobuliinin määrä (g/l).



KUVIO 11. IgG-tasot 12 kk kuluttua diagnoosivaiheesta.

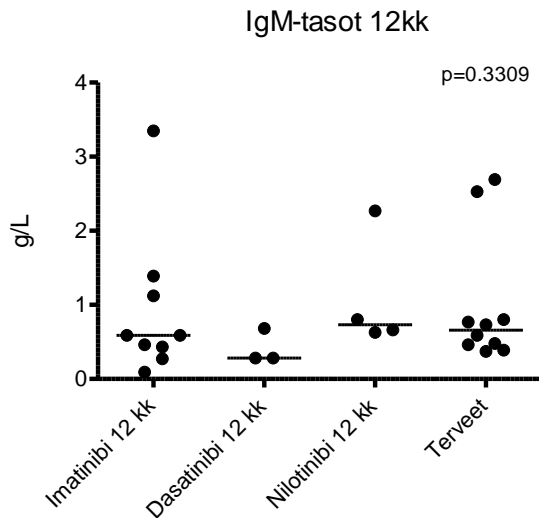
Kuviosta 11 nähdään, että keskiarvojen erojen merkitsevyyttä kuvaavaksi p-arvoksi on saatu 0,0023. Käytännössä tämä tarkoittaa merkitsevää eroa 5 % riskitasolla. Merkitsevää eroa on saatu esille verrattaessa sekä imatinibipotilaiden että dasatinibipotilaiden 12 kuukauden IgG-pitoisuuksia terveiden verrokkipotilaiden IgG-pitoisuuksiin.



KUVIO 12. IgA-tasot 12 kk kuluttua diagnoosivaiheesta.

Immunoglobuliini A -pitoisuuksien kohdalla (kuvio 12) p-arvoksi on saatu 0,0514. Todellisuudessa tämä tarkoittaa, ettei merkitsevää eroa minkään

ryhmän välille ole saatu esille, mutta käytännössä arvo on hyvin lähellä melkein merkitsevän raja-arvoa 0,05.



KUVIO 13. IgM-tasot 12 kk kuluttua diagnoosivaiheesta.

Kuviosta 13 nähdään, että myöskään IgM-pitoisuuksissa ei ole saatu esille merkitseviä eroja minkään ryhmän välille p-arvon ollessa 0,3309.

Pistekaaviokuviot immunoglobuliinitasoista 1, 3 ja 6 kuukauden kuluttua diagnoosivaiheesta ovat liitteenä 3 (kuviot 14-22). Kuvioissa on esitetty p-arvot. Merkittäviä eroja ei tuloksissa enempää saatu. Kuuden kuukauden näytteiden kohdalla saatiin melkein merkitsevä ero imatinibipotilaiden ja terveiden verrokkipotilaiden välille, p-arvon ollessa 0,0319.

9 TUTKIMUSTULOKSISTA TEHDYT JOHTOPÄÄTÖKSET

Kokeellisesta osuudesta tekemäni viiva- ja pistekaaviot havainnollistanevat hyvin saamiani tuloksia. Kuviossa 1 (sivulla 58) on esitetty immunoglobuliinitasojen vertailu eri antikoagulantteja käyttäen. Meilahden sairaalan laboratoriossa immunoglobuliinipitoisuusmittaukset tehdään normaalisti hepariini- tai EDTA-plasma- tai seeruminäytteistä. Tutkimuksessani käytin kuitenkin lähinnä ACD-plasmanäytteitä, sillä Biomedicumin Hematologisessa tutkimusyksikössä on todettu, että ACD-näytteet sopivat parhaiten suurimpaan osaan heillä tehtävistä tutkimuksista. Niinpä näytteet tutkimuspotilaista on hyvä ottaa juuri ACD-putkiin. (Mustjoki 2010c.) Kuvio 1 (sivulla 58) osoittaa, että ACD-näytteistä saatiin matalimmat immunoglobuliinipitoisuudet. Tavanomaisilla hepariini- ja EDTA-näytteillä pitoisuudet olivat jonkin verran korkeammalla. Pitoisuuserot olivat kuitenkin suhteellisen pieniä; IgG-pitoisuuden kohdalla 0,9 g/l, IgA-pitoisuuden kohdalla 0,13 g/l ja IgM-pitoisuuden kohdalla 0,1 g/l. Eri antikoagulanteista johtuvat erot olisi kuitenkin hyvä ottaa huomioon tuloksia tulkitessa.

Saamieni tulosten ja niistä piirrettyjen kuvioden mukaan näyttää siltä, että immunoglobuliinipitoisuudet laskisivat hoidon edetessä. Dunn's multiple comparison -testi osoittaa merkitsevää tulosta IgG-pitoisuuksissa, kun imatinibi- ja dasatinibipotilaiden 12 kuukauden näytteitä verrataan terveiden verrokkipotilaiden näytteisiin (kuvio 11 sivulla 65). Melkein merkitsevä tulos IgG-pitoisuuksissa näkyy jo imatinibipotilaiden 6 kuukauden näytteissä (kuvio 20 sivulla 88). Huomattavaa on, etteivät laajakirjoisemmat toisen polven lääkkeet, dasatinibi ja nilotinibi, laskeneet immunoglobuliinipitoisuuksia imatinibia enempää, vaan oikeastaan päinvastoin. Olisi voinut olettaa, että tulos olisi ollut juuri toisin päin. Myös Ralf Weichsel (2003) tutkimusryhmänsä kanssa oletti laajakirjoisempien toisen polven lääkkeiden vaikuttavan potilaiden immunoglobuliinitasoihin imatinibia enemmän. Huomion arvoista on myös se, että vaikka nilotinibi ja erityisesti dasatinibi estävät abl-kinaasia moninkertaisesti imatinibia tehokkaammin, ei niiden silti todettu aiheuttavat suuria immunoglobuliinitasojen laskuja. Näin ollen imatinibin vaikutukset eivät Mustjoen (2010c) mukaan varmaankaan johdu abl-kinaasin estosta.

Immunoglobuliinipitoisuuksien lasku saattaa liittyä sairauteen, jolloin potilaan immunoglobuliinipitoisuudet eivät ole korjautuneet hoidon aikana. Toisaalta ilmiö saattaa liittyä myös nimenomaan lääkitykseen. Tätä ajatusta puoltaisi se, että suurimmalla osalla potilaista immunoglobuliinitasot olivat normaalirajoissa diagnoosihetkellä otetuissa näytteissä. On myös huomioitava, että tutkimukseen osallistuneet potilaat ovat saavuttaneet lääkkeillä hyvän hoitovasteen, jolloin tutkimusnäytteet sisälsivät lähinnä niin sanotusti terveitä soluja. Mustjoen mukaan tämän perusteella voidaan ajatella, ettei immunoglobuliinipitoisuuksien lasku varmaankaan johdu KML-taudista (Mustjoki 2010c). Immunoglobuliinipitoisuuksien laskulla saattaa olla merkitystä esimerkiksi rokotevasteisiin, jotka perustuvat vasta-ainetuotantoon.

Masayuki Nagasawan ja Shuki Mizutanin (2008) tutkimuksessa havaittiin ainoastaan IgM-luokan immunoglobuliinien laskevan merkittävästi imatinibihoidon aikana IgA- ja IgG-luokkien immunoglobuliinitasojen pysyessä normaaleina. Heidän mukaan juuri IgM-luokan immunoglobuliinien pitoisuus onkin merkittävin. Steegmann ym. (2003) tutki kaikkien kolmen edellä mainitun immunoglobuliiniluokan pitoisuuksien muuttumista imatinibihoidon aikana. Kuuden kuukauden hoidon jälkeen immunoglobuliinipitoisuuksien lasku oli merkittävien IgM-luokan immunoglobuliinien kohdalla. Tutkimuksen koko seuranta-ajan (keskimäärin 507 päivää) jälkeen merkittävin lasku havaittiin kuitenkin IgG-luokan immunoglobuliinien kohdalla. Omat tutkimustulokseni osoittivat IgG-luokan immunoglobuliinien laskun olevan merkittävin, mutta myös muiden immunoglobuliiniluokkien pitoisuuksien laskua on havaittavissa. Tutkimustulokseni näyttäisivät olevan samansuuntaisia aiheesta tehtyjen aikaisempien tutkimusten kanssa. Vaikka otos oli opinnäytetyöhöni liittyvässä tutkimuksessa melko pieni (19 potilasta), eikä immunoglobuliinipitoisuuksien lasku ollut yhtä huomattavaa kuin aikaisemmin julkaistuissa tutkimuksissa, olivat saamani tulokset samansuuntaisia aikaisempiin tutkimustuloksiin nähden. Aikaisemmista tutkimuksista poiketen, omassa tutkimuksessani oli mukana myös nilotinibipotilaita.

Steegmannin ym. (2003) tutkimukseen osallistuneita potilaita oli aiemmin hoidettu alfainterferonilla ja osalle potilaista oli tehty myös luuydinsiirto. Näillä saattaa olla vaikutusta potilaiden immunoglobuliinitasoihin. Omaan tutki-

mukseeni osallistuneita potilaita on heti heidän diagnosoimishetkestään lähtien hoidettu tyrosiinikinaasineestäjälääkkeillä. Kenellekään heistä ei myöskään ole tehty luuydinsiirtoa. Tästä huolimatta immunoglobuliinitasot laskivat, kuten aikaisemmissakin tutkimuksissa. Näin ollen voidaan ajatella, että nimenomaan tyrosiinikinaasillääkityksellä on vaikutusta potilaiden immunoglobuliinipitoisuuksien laskuun.

Yksittäiselle potilaalle matalilla immunoglobuliinipitoisuuksilla on suurta merkitystä. Kun potilaan immunoglobuliinipitoisuudet laskevat kovin matalalle, on hän esimerkiksi herkkä saamaan erilaisia infektioita. Tutkimuksessani yhdellä potilaalla (KML-nro 782) kaikkien tutkimieni immunoglobuliiniluokkien pitoisuudet laskivat hyvin matalalle hoidon aikana. Hänen kohdallaan on jo ryhdytty jatkotoimenpiteisiin. Hän on tällä hetkellä myös tarkemmassa seurannassa muun muassa immunoglobuliinipitoisuuksiensa suhteen. (Mustjoki 2010a.) Eräällä potilaalla, KML-nro 627, IgA-pitoisuus oli hyvin matala hänen kaikissa näytteissään. Tämä johtuu todennäköisesti selektiivisestä IgA-puutoksesta, eikä sillä näin ollen ole mitään tekemistä kroonisen myelooisen leukemian tai sen hoidon suhteen (Mustjoki 2010c).

10 POHDINTA

Opinnäytetyöni tarkoitus oli selvittää, miten kroonisen myeloisen leukemian lääkehoidot kolmella eri tyrosiinikinaasineestäjälääkkeellä vaikuttavat potilaiden immunoglobuliinitasoihin. Tehtäväni oli tutkia immunoturbidometriseen menetelmään perustuen mahdolliset muutokset potilaiden immunoglobuliinitasoissa. Opinnäytetyöni tavoitteena oli tuottaa tietoa Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön käyttöön. Onnistuin tavoitteessani mielestäni hyvin. Alkuperäisen tutkimussuunnitelman mukaan potilaita piti olla 15 ja heidän lääkityksinään imatinibi ja dasatinibi. Alun perin myös immunoglobuliinipitoisuudet oli tarkoitus määrittää ainoastaan neljässä eri aikapisteessä. Aiheeni muoto ja rajaus tarkentuivat kuitenkin kokeellista osuutta suorittaessani siten, että mukaan tuli kolmantena lääkeryhmänä nilotinibi ja aikapisteet lisääntyivät viiteen, jolloin potilaiden määrä nousi yhdeksääntoista (19). Jonkin verran suuremmasta työmäärästä huolimatta otoskoon kasvattaminen oli mielestäni ainoastaan hyvä asia. Suuremman otoskoon myötä sain tutkimuksestani laajemman ja sen myötä luotettavamman.

Opinnäytetyöhöni liittyvä teoretinen tieto perustuu alan kirjallisuuteen sekä kroonista myeloista leukemiaa koskeviin uusimpiin julkaistuihin artikkeleihin. Yhtä kirjaa lukuun ottamatta lähteeni ovat peräisin 2000-luvulta. Suuri osa lähteistä on jopa 2010-vuoden julkaisuja. Eri lääkkeitä koskevat tiedot perustuvat suurelta osin uusimpaan Pharmaca Fennicaan vuodelta 2010. Immunoglobuliinien kohdalla olen yksinkertaistanut viitearvoja siten, että vaikka IgA- ja IgG-pitoisuuksille on olemassa omat rajansa naisille ja miehille, olen työssäni käyttänyt yhteistä alinta viitearvoa. Lisäksi lapsia koskevat viitearvot olen jättänyt kokonaan pois, sillä työni on rajattu ainoastaan aikuisiin.

Oli alusta asti selvää, että kokeellinen tutkimus oli opinnäytetyöni suorittamiselle ainoa oikea vaihtoehto. Luonteelleni sopii systemaattinen ja kontrolloitu havaintojenteko sekä ohjeistusten ja määräysten tarkka noudattaminen. Kokeellisen tutkimuksen luotettavuutta arvioidaan käsitteillä reliabiliteetti ja validiteetti. Lisäksi on otettava huomioon tutkimuksen eettiset näkökohdat. Saamani tutkimusnäytteet olivat asianmukaisesti otettuja, käsiteltyjä ja

säilytettyjä. Näytteiden otossa ja käsittelyssä oli noudatettu niille tarkoitettuja ohjeita. Säilytyksen asianmukaisuutta arvioin sillä, että näytteet oli ohjeiden mukaisesti pakastettu mahdollisimman nopeasti käsittelyn jälkeen, ja pakastimien lämpötiloja seurataan säännöllisin väliajoin. Ennen tutkimusnäytteiden immunoglobuliinipitoisuuksien määrittämistä sentrifugoin näytteistä mahdollisen menetelmää häiritsevän sakan pois, joten tutkimusnäytteet eivät olleet määrittäyshetkellä sameita. Varsinaisessa immunoglobuliinien määrittämisessä toimittiin myös hyväksytyjen ohjeiden mukaisesti. Ennen tutkimusnäytteideni analysointia oli kyseessä olevalla analysaattorilla määritetty rutiininäytteisiin liittyvät kontrollit, joiden tulokset olivat hyväksytyjä. Määrittysten kontrollitulosten arvoja en saanut itselleni, sillä kontrollitulokset menevät Meilahden sairaalan laboratoriossa suoraan laadunvalvontaohjelmistoon. Määrittysteni kohdalla analysaattori hyväksyi kontrollinäytteiden tulokset ilman huomautuksia, joten voin olettaa niiden olleen niille asetettujen rajojen sisäpuolella.

Sekä Steegmannin ym. (2003), Santachiaran ym. (2008) että Nagasawan ja Mizutanin (2004) tutkimuksissa immunoglobuliinitasot määritettiin seeruminäytteistä, kuten useimmiten on tapana. Meilahden sairaalan laboratorion menetelmäohjeiden mukaan kuitenkin myös plasmanäytteet soveltuvat immunoglobuliinimäärittäykseen seeruminäytteiden ohella. Vaikka tutkimustulokseni osoittivatkin pieniä muutoksia plasmanäytteissä käytettävien eri antikoagulanttien suhteen, ei käytetyllä antikoagulantilla ole Satu Mustjoen mukaan varmaankaan juuri immunoglobuliinimäärittysten suhteen kovin suurta merkitystä. Asiaa olisi pohdittava tarkemmin esimerkiksi hyytymistutkimusten kohdalla. Antikoagulanttien tarkoitus on estää näytteen hyytyminen. Hyytymistutkimuksissa ollaan kiinnostuneita nimenomaan näytteen hyytymisajasta, jolloin antikoagulantin valinta on paljon merkityksellisempää.

Kokeellisen osuuden suoritus on työssäni esitetty siten, että tutkimus olisi mahdollista toistaa samalla tavalla, samoja välineitä, laitteita ja reagensseja käyttäen. Tämä lisää työn luotettavuutta. Satu Mustjoen mukaan tuloksia selventävät kuviot näyttävät johdonmukaisilta ja tulokset loogisilta. Potilas, jolla immunoglobuliinipitoisuudet laskivat hoidon aikana hyvin matalalle, on sittemmin tutkimukseni kokeellisen osuuden suorittamisen jälkeen ollut

Biomedicum Hématologisessa tutkimusyksikössä 15 kuukauden kontrollikäynnillä. Hänen immunoglobuliinipitoisuutensa on määritetty silloin uudestaan. Mustjoen kertoman mukaan tulokset vastaavat potilaasta saamiani tuloksia 12 kuukauden näytteestä. Tämä osoittaa, että tutkimukseni on toistettavissa, eikä matalan tuloksen saaminen ole johtunut tutkijasta. Osoituksena eettisyyden huomioon ottamisesta tutkimuksessani on muun muassa se, että olen käyttänyt ainoastaan potilaiden KML-numeroita identifioimaan näytteitä. En siis itsekään tiedä potilaiden nimiä, eivätkä potilaat itse tiedä KML-numeroansa. Tutkimusta tehdessäni olen myös toiminut salassapito- ja vaitiolovelvollisuuksia noudattaen.

Opinnäytetyöni aihe oli aidosti mielenkiintoinen. Tämä johtunee aiemmasta mielenkiinnostani hematologiaa kohtaan sekä isälläni noin neljä vuotta sitten, eli bioanalyttikko-opiskelujeni alkuvaiheessa, todetusta kroonisesta myelooisesta leukemiasta. Isälläni todettu sairaus ei ole tehnyt opinnäytetyöni tekemisestä sen rankempaa kuin muutoinkaan. Päinvastoin, krooniseen myelooiseen leukemiaan kohdistuvat tutkimukset ovat osoittaneet positiivisia tuloksia taudin hoitoa kohtaan. Tutkimusta tehdään jatkuvasti ja jo kymmenessä vuodessa on hoidon tavoitteeksi muodostunut parantavan hoitomuodon löytyminen ensimmäisenä syöpätautien joukossa. Vaikka opinnäytetyöni on vain pieni asia arvostettujen tutkijoiden tekemien suurten tutkimusten rinnalla, tunnen itseni tärkeäksi voidessani osallistua tällaisen tutkimustyön edistämiseen.

Opinnäytetyötä tehdessäni onnistuin yhdistämään teorian tietoa sekä käytännön taitoja ja kokemuksia. Työn teoriaosuutta kirjoittaessani sain valtavasti uutta tietoa sekä krooniseen myelooiseen leukemiaan ja sen lääkehoitoihin että immunoglobuliineihin ja kokeellisen tutkimuksen suorittamiseen liittyen. Aivan erityistä kokemusta sain tehdessäni opinnäytetyön kokeellista osuutta Biomedicum Hématologisessa tutkimusyksikössä. Pääsin käyttämään tutkimuslaboratorion tiloja ja välineitä, minkä ansiosta käytännön taitoni tutkimustyöhön liittyen lisääntyivät. Tutkijan ura on kiinnostanut minua opiskelujeni alkua ajoista lähtien, sillä olen luonteeltani tarkka, järjestelmällinen ja pitkäjänteinen, ja pidän käsillä tekemisestä sen kaikissa muodoissaan. Nämä ominaisuudet yhdistyvät mielestäni tutkijan työssä oikein hyvin. Opinnäytetyön tekemisen aikana mielenkiinto tutkijan uraa kohtaan on vain vahvistunut.

Olen tyytyväinen opinnäytetyöprosessiini kokonaisuudessaan. Ainoastaan aikataulujen suhteen toimin tulevaisuudessa toisin. Pyrkisin kirjoittamaan teoriaosuuden valmiiksi ennen kokeellisen osuuden suorittamista. Aikatauluihin liittyvänä hankaluutena koin myös sen, ettei opinnäytetyöni keväällä 2010 maalais-toukokuun aikana edistynyt ollenkaan ollessani suorittamassa vaihtoehtoisia ammattiopintoja ulkomailla. Opinnäytetyöni on aiheeltaan sellainen, että siihen liittyvä tieto on jatkuvasti muuttuvaa ja uudistuvaa. Jäin miettimään, olisiko työstäni tullut erilainen, jos olisin tehnyt sen vuosi sitten tai ehkä vasta ensi vuonna.

Opinnäytetyössäni esitettyjen tulosten ja aikaisempien tutkimusten perusteella näyttää siltä, että KML-potilaiden immunoglobuliinitasoja olisi tulevaisuudessa mahdollisesti syytä seurata. Voisin ajatella, että uusilta KML-potilailta olisi hyvä määrittää immunoglobuliinipitoisuudet taudin diagnosoimishetkellä ja sen jälkeen tarpeen mukaan. Ainakin jatkuvat infektio-oireet voisivat olla aihe immunoglobuliinipitoisuuksien seuraamiselle. Opinnäytetyöstäni onkin jo ollut hyötyä käytännössä. Tutkimukseni osoitti immunoglobuliinipitoisuuksien laskeneen selvästi muutamilla tutkimuspotilaistani. Heidän immunoglobuliinipitoisuuksiaan seurataan nyt tarkemmin. Tällä hetkellä minkään erityisen immunoglobuliiniluokan ei tiedetä olevan muita luokkia merkityksellisempi. Mustjoen mukaan varmasti ainakin IgG- ja IgM-luokkien immunoglobuliinit ovat tärkeitä. Tietenkin, jos immunoglobuliinipitoisuuksien lasku on laaja-alaisempaa, on merkitys suurempi. Yhdellä tutkimuspotilaistani kaikkien tutkimieni immunoglobuliiniluokkien pitoisuudet laskivat hoidon aikana hyvin matalalle. Aivan varmaa ei vielä ole, johtuiko immunoglobuliinien lasku hänen saamastaan imatinibilääkityksestä, mutta hänen lääkityksensä vaihdettiin kesällä dasatinibiin ja lisäksi potilas saa immunoglobuliinikorvaushoitoa. Hänen tilannettaan seurataan ja immunoglobuliinitasojen toivotaan nousevan takaisin viitearvojen mukaisiksi. ”Lopputyöstäsi on ollut jo selvää hyötyä potilaille”, kertoo erikoislääkäri Satu Mustjoki sähköpostiviestissään 27.8.2010.

Jatkotutkimusaiheeksi ehdotan immunoglobuliinipitoisuuksien määrittämistä suuremmalla otoksella sekä pidemmältä aikaväliltä. Tämä olisi tärkeää, sillä kroonisen myeloosin leukemian hoito jatkuu yleensä vuosia, jopa kymmeniä vuosia. Opinnäytetyössäni esitettyjen tulosten lisäksi KML-potilaiden

immunoglobuliinipitoisuuksien laskusta hoidon aikana on näyttöä kansainvälisestikin. Mustjoen mukaan opinnäytetyöhöni liittyvää tutkimusta tullaan varmasti jatkamaan Biomedicum Hematologisessa tutkimusyksikössä.

Erityiskiitoksen opinnäytetyöhön saamastani aiheesta ja hyvästä ohjauksesta haluan osoittaa työelämän ohjaajalleni, Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön erikoislääkäri Satu Mustjoelle. Yhteistyö hänen kanssaan on ollut erittäin antoisaa, helppoa ja mutkatonta. Satu Mustjoki on osoittanut aitoa kiinnostusta opinnäytetyötäni, sen kokeellisen osuuden suorittamista ja erityisesti siitä saatuja tuloksia kohtaan. Haluan myös kiittää Biomedicum Hematologisen tutkimusyksikön muuta henkilökuntaa sekä Meilahden sairaalan laboratorion kemisti Aija Heliniä ja laboratoriohoitajia, jotka auttoivat minua tutkimusnäytteideni analysoimisessa. Lämmin kiitos kaikille, jotka ovat myötävaikuttaneet opinnäytetyöni valmistumiseen.

LÄHTEET

Abbas, A. & Lichtman, A. 2005. Cellular and Molecular Immunology. 5. uudistettu painos. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders.

Anttila, P. 2005. Ilmaisu, teos, tekeminen ja tutkiva toiminta. Hamina: AKATIIMI Oy.

Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., Saglio, G., Apperley, J., Cervantes, F., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Hochhaus, A., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Radich, J., Simonsson, B., Silver, R., Goldman, J. & Hehlmann, R. 2009. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology* 27 (35), 6041-6051.

Besa, E. & Woermann, U. 2010. Chronic Myelogenous Leukemia. eMedicine from WebMD. Päivitetty 16.3.2010. Tulostettu 21.7.2010. <http://emedicine.medscape.com/article/199425>

Celleck Chemicals. 2010. Novel Kinase Inhibitors. Päivitetty 2010. Tulostettu 9.9.2010. <http://www.selleckchem.com/products>

Essig, M. 2008. Information and resources. Immunoglobulins. WebMD®. Päivitetty 19.8.2008. Tulostettu 21.8.2010. <http://www.webmd.com/a-to-z-guides/immunoglobulins>

Flynn, J. 2005. Procedures in Phlebotomy. 3. painos. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Goldman, J. & Mughal, T. 2005. Chronic myeloid leukaemia. Teoksessa Hoffbrand, A., Catovsky, D. & Tuddenham, E. (toim.) Postgraduate Haematology. 5. painos. Ljubljana: Blackwell Publishing, 603-617.

Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B. & Kuby, J. 2003. Immunology. 5. painos. New York: W. H. Freeman and Company.

Halonen, T. 2003. Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY.

Helin, A. 2010. Kemisti. HUSLAB, Meilahden sairaalan laboratorio. Henkilökohtainen sähköpostiviesti. 8.9.2010.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15., uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Horn, J. & Hansten, P. 2008. Get to Know an Enzyme: CYP3A4. Päivitetty 1.9.2008. Tulostettu 9.9.2010. <http://www.pharmacytimes.com/issue/pharmacy/2008/2008-09/2008-09-8687>

Huslab. 2009. Kliinisen kemian ja hematologian vastuualue. Immunoglobuliini A. Menetelmäohje. Versio 9. Päivitetty 27.11.2009.

Huslab. 2009. Kliinisen kemian ja hematologian vastuualue. Immunoglobuliini G. Menetelmäohje. Versio 6. Päivitetty 27.11.2009.

Huslab. 2009. Kliinisen kemian ja hematologian vastuualue. Immunoglobuliini M. Menetelmäohje. Versio 6. Päivitetty 27.11.2009.

Kananen, J. 2008. Kvantti. Kvantitatiivinen tutkimus alusta loppuun. Jyväskylä: Jyväskylän ammattikorkeakoulun julkaisuja 89.

Kantarjian, H., Shah, N., Hochhaus, A., Cortes, J., Shah, S., Ayala, M., Moiraghi, B., Shen, Z., Mayer, J., Pasquini, R., Nakamae, H., Huguet, F., Boqué, C., Chuah, C., Bleickardt, E., Bradley-Garelik, M., Zhu, C., Szatrowski, T., Shapiro, D. & Baccarani, M. 2010. Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 24 (362), 2260-2270.

Kariaho, E., Juuti, H., Hannula, K., Hednäs, P., Ruponen, M. & Tuderman, P. (toim.) 2010a. Pharmaca Fennica® III. Tuoteselosteet G-O. Helsinki: Lääketietokeskus Oy, 1272-1280.

Kariaho, E., Juuti, H., Hannula, K., Hednäs, P., Ruponen, M. & Tuderman, P. (toim.) 2010b. Pharmaca Fennica® IV. Tuoteselosteet P-Ö. Helsinki: Lääketietokeskus Oy, 2869-2875, 2977-2980.

Kela. 2010a. Erityiskorvaus. Päivitetty 18.8.2010. Tulostettu 27.8.2010. <http://www.kela.fi/in/internet/suomi.nsf/NET/040610150348KA?OpenDocument>

Kela. 2010b. Erityiskorvausoikeuden edellytykset. 117 Leukemiat, muut pahanlaatuiset veri- ja luuydintaudit sekä pahanlaatuiset imukudostaudit. Päivitetty 1.8.2010. Tulostettu 27.8.2010 <http://www.kela.fi/in/internet/suomi.nsf/alias/laake117>

King, R. & Robins, M. 2006. *Cancer biology*. 3. painos. Harlow: Pearson Education Limited.

Koskenaho, H. & Lehtinen, T. 2005. Krooniseen myelooiseen leukemiaan liittyvät kromosomaaliset muutokset imatinibi-hoidon aikana. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö.

Koskenvesa, P. & Mustjoki, S. 2010. Lisää tietoa KML:sta. Tulostettu 7.6.2010. Löytyy myös verkosta: Suomen Syöpäpotilaat ry. Lisää tietoa KML:sta. <http://www.syopapotilaat.fi/kmltietoa/index.php>

Kähkönen, M. 2010. Vastaava geneetikko, dosentti. Laboratoriokeskus, Kliinisen genetiikan laboratorio. Henkilökohtainen tiedonanto. 13.9.2010.

Lavallade, H., Hart, M., Gabriel, I., Kelleher, P., Alsuliman, A., Khoder, A., Milojkovic, D., Forono, L., Bua, M., Apperley, J., Goldman, J., Martin, D. & Rezvani, K. 2009. T-Cell and B-Cell Responses After Vaccination against Influenza Virus and Pneumococcus in Chronic Phase CML Patients Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors. *Blood*. Abstract 2214.

LeFever Kee, J. 2005. Handbook of Laboratory & Diagnostic Tests with Nursing Implications. 5. painos. Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Prentice Hall.

Mahon, C. & Tice, D. 2006. Clinical laboratory immunology. Upper Saddle River: Pearson Education, Inc.

Makkonen, S. & Tuokko, S. 1996. Näytteenotto. 4.-5. painos. Helsinki: Opetushallitus

Mattila, M. 2002. Varianssianalyysi. Kvantitatiivisten menetelmien tietovaranto. Päivitetty 12.3.2002. Tulostettu 10.9.2010.
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/varienssi/anova.html>.

Mayer, G. 2009. Microbiology and Immunology On-line. University of South Carolina School of Medicine. Päivitetty 6.11.2009. Tulostettu 22.8.2010.
<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgStruct2000.htm>

MediFocus. 2010. Chronic myelogenous leukemia. A comprehensive guide to symptoms, treatment, research and support. Silver Springs: Medifocus.com, Inc.

Molecular Station. 2008. Immunoprecipitation. Päivitetty 2008. Tulostettu 27.9.2010. <http://www.molecularstation.com/protein/immunoprecipitation/>

Mustjoki, S. 2010a. Erikoislääkäri. Biomedicum Hematologinen tutkimusyksikkö. Henkilökohtainen sähköpostiviesti. 27.8.2010.

Mustjoki, S. 2010b. Erikoislääkäri. Biomedicum Hematologinen tutkimusyksikkö. Henkilökohtainen sähköpostiviesti. 13-14.9.2010.

Mustjoki, S. 2010c. Erikoislääkäri. Biomedicum Hematologinen tutkimusyksikkö. Henkilökohtainen tiedonanto. 7.9.2010.

Nagasawa, M. & Mizutani, S. 2004. Selective Effect of Imatinib on Serum IgM in a Patient with CML. International Journal of Hematology. 80, 381-382.

Novartis oncology. 2010. Philadelphia-kromosomi. Päivitetty 2.6.2010. Tulostettu 2.9.2010.
<http://www.mynewsdesk.com/fi/pressroom/novartisoncology>

Åkerman, K. 2010. Immunokemialliset analysaattorit. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) LABORATORIOLÄÄKETIEDE Kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy, 83-85.

Pirkanmaan sairaanhoitopiiri. Laboratoriokeskus. 2009. BCR/ABL-GEENIEN FUUSIO-RNA, t(9:22), (kvantitatiivinen), JÄÄNNÖSTAUTIMÄÄRITYS. Päivitetty 1.10.2009. Tulostettu 9.8.2010.
<http://www.laboratorio.fi/lake/laboratoriotutkimukset>

Porkka, K. 2005. Krooninen myeloinen leukemia. Potilasohje. Päivitetty 9.4.2005. Tulostettu 26.11.2009. http://www.cml.fi/info/hoito_ohje/Potilasohje

Porkka, K. 2007. Krooninen myelooinen leukemia. Hematologian käsikirja. Päivitetty 5.10.2007. Tulostettu 25.9.2010.
http://veri.fi/index.php?title=Krooninen_myelooinen_leukemia

Porkka, K. & Koistinen, P. 2007. Krooninen myelooinen leukemia. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim.) Veritaudit. 3. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 324-334.

Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. 2006. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* 81 (7), 973-988.

Randolph, T. 2005. Chronic Myelocytic Leukemia – Part I: History, Clinical presentation, and Molecular biology. *Clinical laboratory science* 1 (18), 38-48.

Roche Diagnostics. 2010. Modular Analytics SWA. Päivitetty 2010. Tulostettu 29.8.2010. <http://www.roche-diagnostics.co.in>.

Rousselot, P., Huguet, F., Rea, D., Legros, L., Cayuela, J., Maarek, O., Blanchet, O., Marit, G., Gluckman, E., Reiffers, J., Gardembas, M. & Mahon, F. 2007. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* 1 (109), 58-60.

Santachiara, R., Maffei, R., Martinelli, S., Arcari, A., Piacentini, F., Trabacchi, E., Alfieri, P., Ferrari, A., Leonardi, G., Luppi, G., Longo, G., Vallisa, D., Marasca, R. & Torelli, G. 2008. Development of hypogammaglobulinemia in patients treated with imatinib for chronic myeloid leukemia or gastrointestinal stromal tumors. *Haematologica* 93 (8), 1252-1255.

Stegmann, J., Moreno, G., Aláez, C., Osorio, S., Granda, A., Cámara, R., Arranz, E., Reino, F., Salvanéz, F., Fernández-Rañada, J. & Muñoz, C. 2003. Chronic myeloid leukemia patients resistant to or intolerant of interferon α and subsequently treated with imatinib show reduced immunoglobulin levels and hypogammaglobulinemia. *Haematologia* 88 (7), 762-768.

Teirilä, M. & Jyväsjärvi, E. 2001. Tutkielmantekijän työkirja. Helsinki: Oy Finn Lectura Ab.

Thorpe, R. & Thorpe, S. 2005. Immunochemical techniques. Teoksessa Wilson, K. & Walker, J. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. 6. painos. New York: Cambridge University Press. 292-348.

Todd, I. & Spickett, G. 2010. *Immunology*. 6. painos. New Delhi, India: Wiley-Blackwell.

Vardiman, J., Melo, J., Baccarani, M. & Thiele, J. 2008. Chronic myelogenous leukaemia, BCR-ABL1 positive. Teoksessa Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J. & Vardiman, J. (toim.) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4. painos. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 32-37.

Vilkkä, H. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Weichsel, R., Dix, C., Wooldridge, L., Clement, M., Fenton-May, A., Sewell, A., Zezula, J., Greiner, E., Gostick, E., Price, D., Einsele, H. & Seggewiss, R. 2008. Profound Inhibition of Antigen-Specific T-Cell Effector Functions by Dasatinib. *Clinical Cancer Research* 14 (8), 2484-2491.

LIITTEET

TUTKIMUSNÄYTTEET

TAULUKKO 2. Kokeellisessa osuudessa käytetyt tutkimusnäytteet.

Näytenumero	KML-numero	Aikapiste	Lääke
1	637	0-näyte	Imatinibi
2	637	1 kk	Imatinibi
3	637	3 kk	Imatinibi
4	637	6 kk	Imatinibi
5	637	12 kk	Imatinibi
6	655	0-näyte	Imatinibi
7	655	1 kk	Imatinibi
8	655	3 kk	Imatinibi
9	655	6 kk	Imatinibi
10	655	12 kk	Imatinibi
11	549	0-näyte	Imatinibi
12	549	6 kk	Imatinibi
13	549	12 kk	Imatinibi
14	485	0-näyte	Imatinibi
15	485	3 kk	Imatinibi
16	485	6 kk	Imatinibi
17	503	0-näyte	Imatinibi
18	503	3 kk (=4 kk)	Imatinibi
19	503	6 kk	Imatinibi
20	503	12 kk	Imatinibi
21	775	0-näyte	Imatinibi
22	775	1 kk	Imatinibi
23	775	3 kk	Imatinibi
24	775	6 kk	Imatinibi
25	775	12 kk	Imatinibi
26	782	0-näyte	Imatinibi
27	782	1 kk	Imatinibi
28	782	3 kk (hep.)	Imatinibi
29	782	6 kk	Imatinibi
30	782	12 kk	Imatinibi
31	787	0-näyte	Imatinibi
32	787	1 kk	Imatinibi
33	787	3 kk	Imatinibi
34	787	6 kk	Imatinibi
35	787	12 kk	Imatinibi
36	791	0-näyte	Imatinibi
37	791	1 kk	Imatinibi
38	791	6 kk	Imatinibi
39	791	12 kk	Imatinibi

(jatkuu)

LIITE 1: 2 (3)

Näytenumero	KML-numero	Aikapiste	Lääke
40	793	0-näyte	Imatinibi
41	793	1 kk	Imatinibi
42	793	3 kk	Imatinibi
43	793	6 kk	Imatinibi
44	793	12 kk	Imatinibi
45	783	0-näyte	Dasatinibi
46	783	1 kk	Dasatinibi
47	783	3 kk	Dasatinibi
48	783	6 kk	Dasatinibi
49	783	12 kk	Dasatinibi
50	788	0-näyte	Dasatinibi
51	788	1 kk	Dasatinibi
52	788	3 kk	Dasatinibi
53	788	6 kk	Dasatinibi
54	788	12 kk	Dasatinibi
55	794	0-näyte	Dasatinibi
56	794	1 kk	Dasatinibi
57	794	3 kk	Dasatinibi
58	794	6 kk	Dasatinibi
59	794	12 kk	Dasatinibi
60	823	0-näyte	Dasatinibi
61	823	1 kk	Dasatinibi
62	823	3 kk	Dasatinibi
63	823	6 kk	Dasatinibi
64	824	0-näyte	Dasatinibi
65	824	1 kk	Dasatinibi
66	824	3 kk	Dasatinibi
67	824	6 kk	Dasatinibi
68	656	0-näyte	Nilotinibi
69	656	1 kk	Nilotinibi
70	656	3 kk	Nilotinibi
71	656	12 kk	Nilotinibi
72	627	0-näyte	Nilotinibi
73	627	3 kk	Nilotinibi
74	627	6 kk	Nilotinibi
75	627	12 kk	Nilotinibi
76	691	0-näyte	Nilotinibi
77	691	3 kk	Nilotinibi
78	691	6 kk	Nilotinibi
79	691	12 kk	Nilotinibi
80	668	0-näyte	Nilotinibi
81	668	1 kk	Nilotinibi
82	668	3 kk	Nilotinibi
83	668	6 kk	Nilotinibi
84	668	12 kk	Nilotinibi

(jatkuu)

LIITE 1: 3 (3)

Näytenumero	KML-numero	Aikapiste	Lääke
85	615	terve kont.	-
86	675	terve kont.	-
87	773	terve kont.	-
88	795	terve kont.	-
89	616	terve kont. (hep.)	-
90	661	terve kont. (hep.)	-
91	665	terve kont. (hep.)	-
92	786	terve kont. (edta)	-
93	808	terve kont. (edta)	-
94	811	terve kont. (edta)	-
95	793	6 kk (edta)	Imatinibi
96	793	6 kk (hep.)	Imatinibi

TULOKSET

TAULUKKO 3. Immunoglobuliinimäärittysten tulokset.

Näyttenro	KML-nro	Aikapiste	Lääke	Tulokset (viitearvot)		
				IgG (g/l) (6,8-15)	IgA (g/l) (0,52-4,84)	IgM (g/l) (0,36-2,84)
1	637	0-näyte	Imatinibi	8,3	1,37	0,82
2	637	1 kk	Imatinibi	8,3	1,56	0,89
3	637	3 kk	Imatinibi	8,1	1,50	0,85
4	637	6 kk	Imatinibi	7,4	1,38	0,72
5	637	12 kk	Imatinibi	6,6	1,22	0,46
6	655	0-näyte	Imatinibi	10,3	1,51	0,93
7	655	1 kk	Imatinibi	10,8	1,56	0,88
8	655	3 kk	Imatinibi	10,3	1,49	0,81
9	655	6 kk	Imatinibi	9,4	1,52	0,71
10	655	12 kk	Imatinibi	8,3	1,43	0,59
11	549	0-näyte	Imatinibi	6,7	1,24	1,16
12	549	6 kk	Imatinibi	5,9	1,25	0,62
13	549	12 kk	Imatinibi	5,8	1,22	0,59
14	485	0-näyte	Imatinibi	9,3	2,08	1,38
15	485	3 kk	Imatinibi	9,1	2,23	1,09
16	485	6 kk	Imatinibi	9,1	1,82	0,88
17	503	0-näyte	Imatinibi	6,4	1,31	0,80
18	503	3 kk	Imatinibi	6,2	1,46	0,62
19	503	6 kk	Imatinibi	6,0	1,47	0,51
20	503	12 kk	Imatinibi	5,7	1,30	0,43
21	775	0-näyte	Imatinibi	9,9	1,65	2,11
22	775	1 kk	Imatinibi	9,8	2,25	1,68
23	775	3 kk	Imatinibi	10,4	2,06	1,72
24	775	6 kk	Imatinibi	9,2	1,79	1,60
25	775	12 kk	Imatinibi	8,9	1,65	1,39
26	782	0-näyte	Imatinibi	6,9	2,76	1,15
27	782	1 kk	Imatinibi	6,5	2,74	1,01
28	782	3 kk	Imatinibi	6,1	0,09	0,10
29	782	6 kk	Imatinibi	2,8	0,09	0,09
30	782	12 kk	Imatinibi	2,1	0,09	0,09

(jatkuu)

LIITE 2: 2 (3)

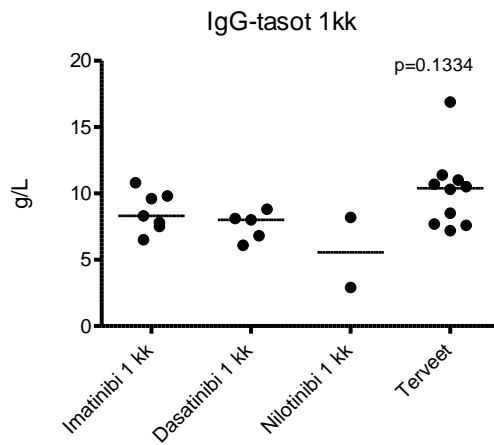
Näyttenro	KML-nro	Aikapiste	Lääke	Tulokset (viitearvot)		
				IgG (g/l) (6,8-15)	IgA (g/l) (0,52-4,84)	IgM (g/l) (0,36-2,84)
31	787	0-näyte	Imatinibi	10,0	1,29	0,59
32	787	1 kk	Imatinibi	9,6	1,36	0,56
33	787	3 kk	Imatinibi	8,3	0,96	0,41
34	787	6 kk	Imatinibi	7,9	0,82	0,32
35	787	12 kk	Imatinibi	6,5	0,74	0,27
36	791	0-näyte	Imatinibi	7,7	0,76	3,78
37	791	1 kk	Imatinibi	7,8	0,90	3,63
38	791	6 kk	Imatinibi	6,9	0,69	2,98
39	791	12 kk	Imatinibi	7,6	0,70	3,35
40	793	0-näyte	Imatinibi	7,6	0,66	1,70
41	793	1 kk	Imatinibi	7,5	0,79	1,60
42	793	3 kk	Imatinibi	6,9	0,66	1,08
43	793	6 kk	Imatinibi	7,0	0,67	1,08
44	793	12 kk	Imatinibi	7,0	0,71	1,12
45	783	0-näyte	Dasatinibi	6,3	1,90	1,44
46	783	1 kk	Dasatinibi	6,1	1,95	1,17
47	783	3 kk	Dasatinibi	5,5	1,75	0,87
48	783	6 kk	Dasatinibi	6,0	2,02	0,87
49	783	12 kk	Dasatinibi	5,3	1,86	0,68
50	788	0-näyte	Dasatinibi	7,1	1,93	0,50
51	788	1 kk	Dasatinibi	8,1	2,20	0,44
52	788	3 kk	Dasatinibi	7,7	2,20	0,44
53	788	6 kk	Dasatinibi	7,1	2,03	0,35
54	788	12 kk	Dasatinibi	6,4	1,89	0,28
55	794	0-näyte	Dasatinibi	7,4	1,99	0,33
56	794	1 kk	Dasatinibi	6,8	2,21	0,33
57	794	3 kk	Dasatinibi	7,0	2,33	0,28
58	794	6 kk	Dasatinibi	7,0	2,36	0,30
59	794	12 kk	Dasatinibi	7,8	2,32	0,28
60	823	0-näyte	Dasatinibi	8,4	1,21	0,86
61	823	1 kk	Dasatinibi	8,8	1,41	1,06
62	823	3 kk	Dasatinibi	8,9	1,54	0,98
63	823	6 kk	Dasatinibi	8,9	1,55	0,87

(jatkuu)

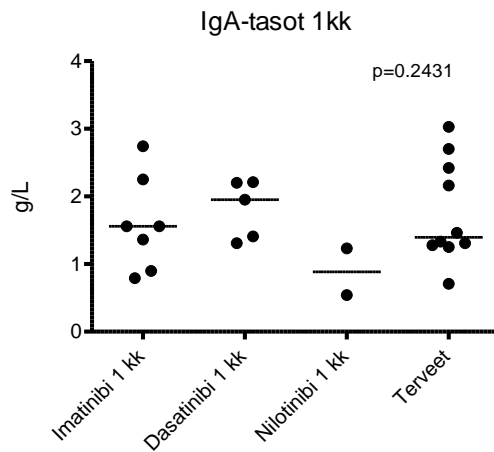
LIITE 2: 3 (3)

Näyttenro	KML-nro	Aikapiste	Lääke	Tulokset (viitearvot)		
				IgG (g/l) (6,8-15)	IgA (g/l) (0,52-4,84)	IgM (g/l) (0,36-2,84)
64	824	0-näyte	Dasatinibi	8,7	1,25	0,80
65	824	1 kk	Dasatinibi	8,0	1,31	0,62
66	824	3 kk	Dasatinibi	7,2	1,11	0,43
67	824	6 kk	Dasatinibi	8,6	1,41	0,40
68	656	0-näyte	Nilotinibi	8,1	1,42	0,66
69	656	1 kk	Nilotinibi	2,9	0,54	0,27
70	656	3 kk	Nilotinibi	8,7	1,73	0,87
71	656	12 kk	Nilotinibi	8,2	1,65	0,80
72	627	0-näyte	Nilotinibi	8,8	0,09	1,00
73	627	3 kk	Nilotinibi	7,5	0,09	0,48
74	627	6 kk	Nilotinibi	8,1	0,09	0,54
75	627	12 kk	Nilotinibi	6,4	0,09	0,66
76	691	0-näyte	Nilotinibi	9,3	2,74	0,85
77	691	3 kk	Nilotinibi	8,1	2,76	0,68
78	691	6 kk	Nilotinibi	9,4	3,27	0,71
79	691	12 kk	Nilotinibi	9,1	3,27	0,63
80	668	0-näyte	Nilotinibi	8,0	1,15	2,07
81	668	1 kk	Nilotinibi	8,2	1,23	1,92
82	668	3 kk	Nilotinibi	8,5	1,29	2,05
83	668	6 kk	Nilotinibi	8,6	1,40	2,27
84	668	12 kk	Nilotinibi	9,4	1,35	2,27
85	615			7,2	1,33	0,77
86	675			16,9	2,16	2,53
87	773			11,4	1,28	0,73
88	795			7,7	1,25	0,59
89	616			10,5	2,42	0,80
90	661			7,6	0,71	0,48
91	665			8,5	3,03	0,39
92	786			10,3	2,70	0,37
93	808			11,0	1,31	2,69
94	811			10,7	1,46	0,46
95	793	6 kk (edta)	Imatinibi	7,9	0,80	1,18
96	793	6 kk (hep.)	Imatinibi	7,9	0,74	1,16

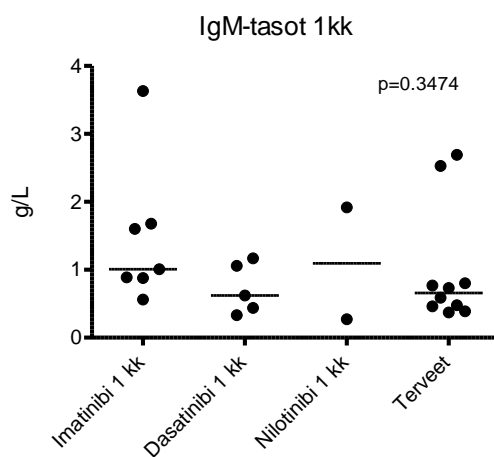
1, 3, JA 6 KUUKAUDEN TULOKSET PISTEKAAVIOKUVIINA



KUVIO 14. IgG-tasot 1 kk kuluttua diagnoosivaiheesta

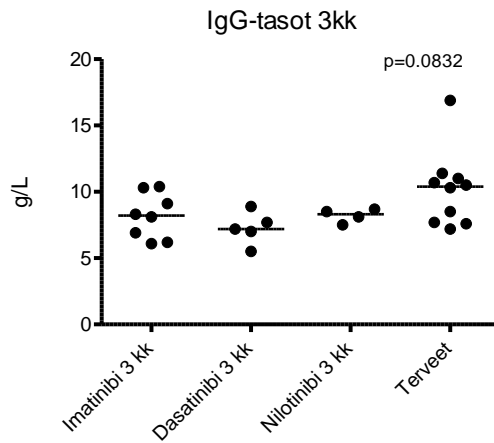


KUVIO 15. IgA-tasot 1 kk kuluttua diagnoosivaiheesta

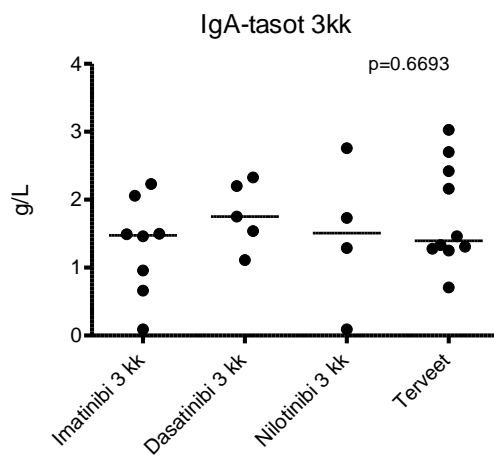


KUVIO 16. IgM-tasot 1 kk kuluttua diagnoosivaiheesta

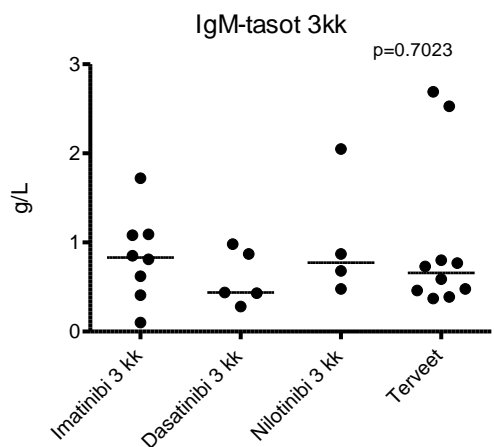
(jatkuu)



KUVIO 17. IgG-tasot 3 kk kuluttua diagnoosivaiheesta

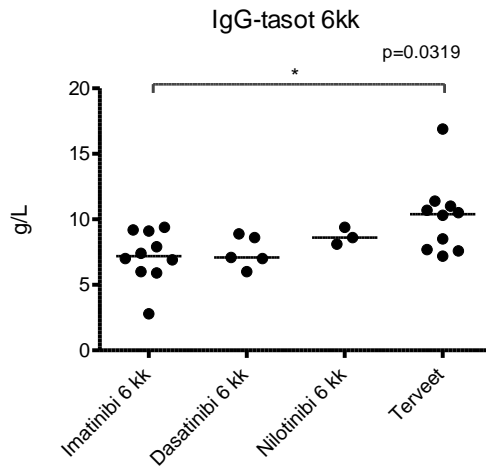


KUVIO 18. IgA-tasot 3 kk kuluttua diagnoosivaiheesta

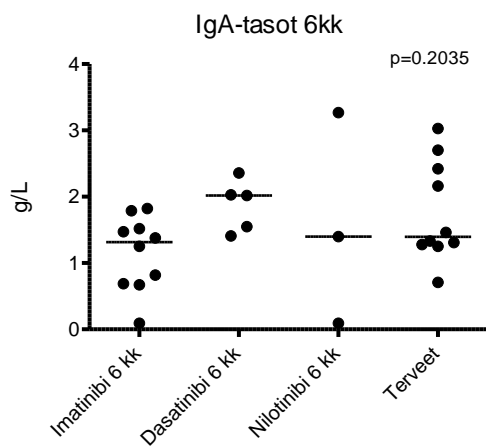


KUVIO 19. IgM-tasot 3 kk kuluttua diagnoosivaiheesta

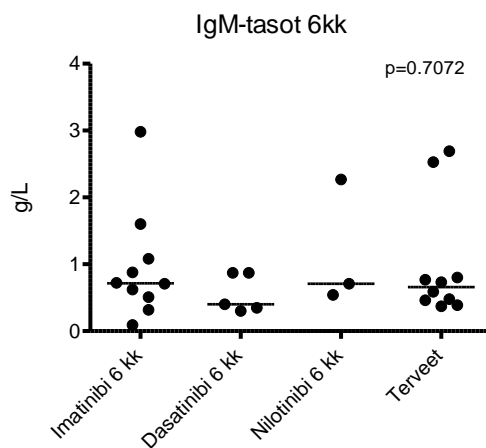
(jatkuu)



KUVIO 20. IgG-tasot 6 kk kuluttua diagnoosivaiheesta



KUVIO 21. IgA-tasot 6 kk kuluttua diagnoosivaiheesta



KUVIO 22. IgM-tasot 6 kk kuluttua diagnoosivaiheesta