

GLUTAMAATTIRESEPTORIT ALKOHOLISTIEN AIVOISSA

Eero Rantala
Tutkielma
Lääketieteen koulutusohjelma
Itä-Suomen yliopisto
Terveystieteiden tiedekunta
Oikeuspsykiatrian klinikka
Toukokuu 2014

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta
Lääketieteen laitos
Lääketieteen koulutusohjelma
RANTALA, EERO M.: Glutamaattireseptorit alkoholistien aivoissa
Opinnäytetutkielma, 32 sivua
Tutkielman ohjaajat: dos. Markus Storvik ja professori Jari Tiihonen
Toukokuu 2014

Avainsanat: alkoholismi, glutamaatti

Alkoholismi on laaja-alaisesti yksilöä ja tämän ympäristöä vahingoittava tila. Ytimenä on sairaus, jossa sairastunut kokee pakonomaista tarvetta juoda alkoholia. Alkoholismiin johtavista syistä on julkaistu lukematon määrä tutkimuksia, mikä kuvastaa hyvin sitä, ettei alkoholismin kehittymiselle voida osoittaa selvää etiologista ketjua. Aiheuttajista osa on perinnöllisiä ja osa ympäristöstä johtuvia.

Neurobiologisesti alkoholilla on vaikutuksia useisiin aivojen välittäjäaineisiin, ja nämä vaikutukset kaskadimaisesti edesauttavat alkoholiriippuvuuden kehittymistä. Tässä tutkielmassa esitellään välittäjäaineista glutamaatti, joka eksitatorisena välittäjäaineena sitoutuu aivoissa kolmeen erilaiseen reseptoriin: AMPA-, NMDA- ja kainaatireseptoreihin.

Tutkielman kokeellisessa osassa määritettiin reseptoriautoradiografia-menetelmällä eri glutamaattireseptorien tiheyksiä alkoholistien ja verrokkihenkilöiden aivoissa. Tiheyksiä määritettiin autoradiografiakuvista useilta olennaisilta aivoalueilta, myös nucleus accumbensista, alueelta, jossa aiemmissa tutkimuksissa löydettiin reseptoritiheyksien eroja tutkittaessa toisia välittäjäaineita. Tämän tutkielman tulokset olivat aiempien tutkimusten suuntaisia, mutta merkittävät erot puuttuivat, jotta todellisia johtopäätöksiä olisi voitu tehdä.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences
School of Medicine
Medicine
RANTALA, EERO M. : Glutamate receptors in brains of alcoholics
Thesis, 32 pages,
Tutors: Markus Storvik, docent, Jari Tiihonen, professor
May 2014

Keywords: alcoholism, glutamate

Alcoholism is a state that greatly harms an individual and his environment. The core of the disease is the urge to consume alcohol. There have been countless of studies published about the factors that lead to alcoholism, which means that the etiology of the disease is not completely established. Some of the causes are genetical and some are caused by the environment.

Neurobiologically alcohol has effects on many neurotransmitters, and these effects further the development of alcohol dependency. Glutamate from the neurotransmitters is introduced in this thesis. It binds to three types of neuroreceptors in the brain: NMDA-, AMPA- and kainate receptors.

The practical part of this thesis consists of quantifying densities of different types of glutamate receptors in the brains of alcoholics versus control group brains. Densities were specified with receptor autoradiography from various brain regions, also from nucleus accumbens, the region that has previously presented differences in receptor densities. The results of the practical part were in line with previous studies, but the results weren't statistically significant, therefore new solid conclusions could not be made.

SISÄLTÖ

1. JOHDANTO.....	4
2. ALKOHOLISMI.....	5
2.1. ALKOHOLISMIN EPIDEMIOLOGIAA	5
2.2. ALKOHOLISMIN DIAGNOSOINTI.....	6
2.3. ALKOHOLISMIN ETIOLOGIAA	7
2.3.1. Riippuvuuden syntymisen neurobiologia.....	8
2.3.2. Alkoholistien luokittelusta	9
2.4. ALKOHOLISMIN HOIDOSTA.....	10
2.4.1. Alkoholismin hoidosta yleisesti Suomessa.....	10
2.4.2. Alkoholismin lääkehoidoista	11
3. GLUTAMAATTIJÄRJESTELMIEN TOIMINTA ALKOHOLISMISSA.....	14
3.1. NMDA-RESEPTORIT	14
3.2. NOPEAT GLUTAMINERGISET RESEPTORIT	16
3.3. TUTKIMUKSESSA KÄSITELLYT AIVOALUEET	17
4. KOKEELLINEN OSA: GLUTAMAATTIRESEPTORIEN TIHEYS ALKOHOLISMISSA, MÄÄRITYS RESEPTORIAUTORADIOGRAFIAN AVULLA	19
4.1. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	19
4.2. MENETELMÄT JA AINEISTO	19
4.2.1. Aineisto.....	19
4.2.2. Reseptoriautoradiografia	20
4.2.3. Autoradiografiakuvien kvantitointi	21
4.2.4. Tilastolliset menetelmät.....	23
4.3. TULOKSET.....	24
5. POHDINTA.....	27
LÄHTEET.....	28

1. Johdanto

Alkoholismi on Suomessa merkittävä kansanterveydellinen ongelma. Tällä hetkellä alkoholinkäytön seurauksena Suomessa kuolee vuosittain noin 2500 henkilöä eli 6 % kaikista kuolemantapauksista liittyy alkoholiin. Alkoholisairauksiin kuolee noin 2000 henkeä ja tapaturman tai väkivallan takia päihtyneenä noin 500 henkeä (THL 2013). Koska alkoholistit ovat heterogeeninen ryhmä, heitä on jo kauan luokiteltu eri ryhmiin. Tässä tutkielmassa päädyttiin käyttämään C. Robert Cloningerin määrittelemää mallia, jotta saadut tulokset olisivat vertailukelpoisia aiempien tutkimusten kanssa. Cloninger jakaa alkoholistit kahteen ryhmään. Näiden kahden alkoholismityypin ilmeneminen on erilaista; tyyppin I ilmenemiseen tarvitaan perimän lisäksi ympäristön vaikutus. Tätä tyyppiä voidaankin nimittää ympäristöstä riippuvaiseksi alkoholismiksi erotuksena tyyppin II alkoholismiin, jonka ilmeneminen on periytyvää ja sukupuolesta riippuvaista, se periytyy vain isältä pojalle ja manifestoituu ympäristötekijöistä riippumatta (Cloninger 1995).

Neurobiologisesti alkoholilla on vaikutuksia useisiin aivojen välittäjäaineisiin, ja nämä vaikutukset kaskadimaisesti edesauttavat alkoholiriippuvuuden kehittymistä. Tässä tutkielmassa keskitytään välittäjäaineista glutamaattiin, joka eksitatorisena välittäjäaineena sitoutuu aivoissa kolmeen erilaiseen reseptoriin: AMPA-, NMDA- ja kainaatireseptoreihin. Alkoholiriippuvuuden hoitoon käytetyn lääkkeen akamprosaatin vaikutuskohde on NMDA-reseptorit. Jo ennenkin on tiedetty, että kaikilla alkoholisteilla akamprosaatti ei auta, Cloningerin tyyppin 1 ja 2 alkoholisteilla on erilainen vaste akamprosaattiin siten, että se vaikuttaa tehokkaammin tyyppin 2 alkoholisteihin (Kiefer 2005). Näin olleen NMDA-reseptorit ovat olennainen mielenkiinnon kohde alkoholismia tutkittaessa.

Ifenprodili on selektiivinen NMDA-reseptorien NR2B-alayksikön inhibiittori (Reynolds ym. 1989). Tämän tutkielman kokeellisessa osassa mittasin, onko ifenprodilin sitoutuminen NMDA-reseptorien NR2B-alayksiköihin muuttunut verrattaessa tyyppin 1 ja 2 alkoholisteja kontrolleihin.

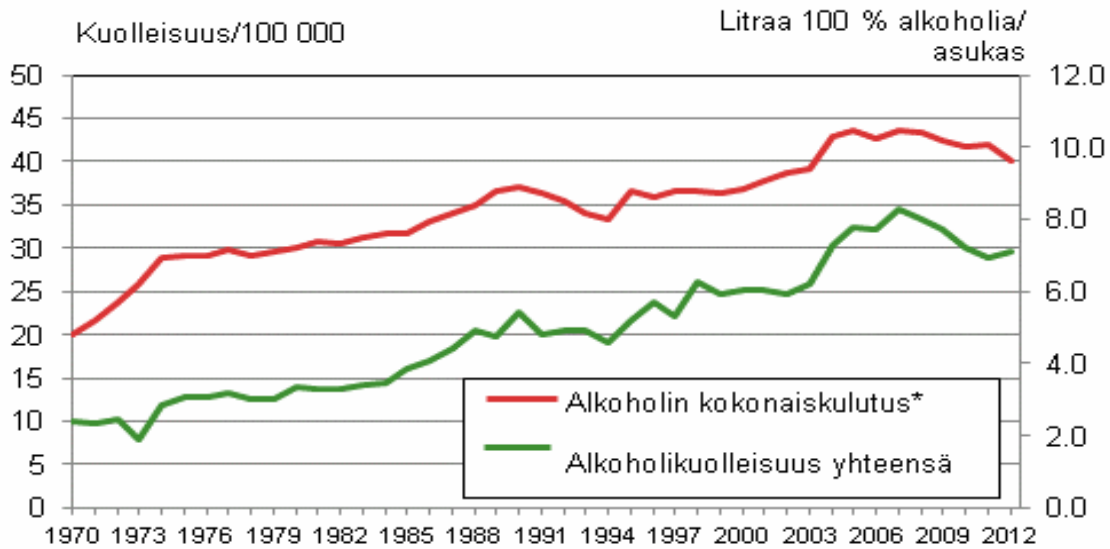
2. Alkoholismi

2.1. Alkoholismin epidemiologiaa

Alkoholismi on Suomessa merkittävä kansanterveydellinen ongelma. Tällä hetkellä alkoholinkäytön seurauksena Suomessa kuolee vuosittain noin 2500 henkilöä eli 6 % kaikista kuolemantapauksista liittyy alkoholiin. Heistä alkoholisairauksiin kuolee noin 2000 henkeä ja tapaturman tai väkivallan takia päihtyneenä noin 500 henkeä (THL 2013). Akuuttiin alkoholimyrkytykseen kuolee nykyään n. 400 henkilöä vuosittain. Suomen lääkäri-lehdessä esitetyn katsauksen mukaan etanolin yliannostuksesta aiheutuneiden myrkytyskuolemien lukumäärä kasvoi uuteen ennätykseen vuonna 2004: 544 kuolemaa vuoden aikana (Vuori ym. 2006). Tämän jälkeen vuodesta 2007 alkaen on nähty kuitenkin alkoholinkulutuksessa laskusuuntaisuutta, ja tämä suoran yhteyden kautta näkyi myönteisesti myös alkoholikuolleisuuden laskuna.

Alkoholismiin liittyvien sairaalahoitokertojen ja kuolemantapausten tarkoista määristä ei ole helppo saada tietoa, koska alkoholin tai alkoholismin osuutta potilaan tauteihin tai vammoihin on vaikeaa erottaa muista tekijöistä. Vuonna 2012 alkoholisairaus oli päädiagnoosina 21 076 hoitajaksossa ja pää- tai sivudiagnoosina 31 362 hoitajaksossa (THL 2013). On lisäksi huomattava, että hoitokertojen lukumäärät kuvaavat vain hoitoon hakeutuneiden tilannetta. Heidän osuutensa kaikista alkoholiriippuvaisista on ehkä vain murto-osa. Alkoholismi on siis Suomessa varsin merkittävä tauti kansanterveydellisesti ja yksilötasolla.

Ensimmäisen kerran vuoden 1969 vapaamielisemmän alkoholilain jälkeen nähtiin laskua alkoholikulutuksessa ja -kuolleisuudessa vuonna 2007. Viimeisimpien tilastojen perusteella ei kuitenkaan ole varmuutta positiivisen kehityksen jatkumisesta, sillä alkoholikuolleisuus kääntyi uudelleen neljän prosentin nousuun vuonna 2012 (Kuva 1, THL 2013). Alkoholin tilastoitu kulutus oli vuonna 2012 sataprosenttiseksi alkoholiksi muutettuna 7,7 litraa jokaista suomalaista kohden (THL 2013).



*Lähde: THL 2013.

Kuva 1. Alkoholin kokonaiskulutus sekä ikävakioitu alkoholikuolleisuus. (THL, 2013).

2.2. Alkoholismin diagnosointi

Suomessa on noudatettu virallisissa yhteyksissä jo vuoden 1996 alusta WHO:n julkaisemaa yleismaailmallisessa käytössä olevaa ICD-10-tautiluokitusjärjestelmää. ICD-10 sisältää myös kriteeristön alkoholismin diagnosoimiseen. Sama kriteeristö soveltuu myös muiden päihderiippuvuuksien kuin alkoholismin luokitteluun. Peruseriaatteeltaan päihdediagnoosien osalta ICD-10 on 6-kohtainen kriteeristö, jonka kriteereistä kolmen tai useamman on täytyttävä, jotta potilaalle voidaan diagnosoida päihderiippuvuus (Taulukko 1, Stakes 1999).

Taulukko 1. Riippuvuusoireyhtymän kriteerit ICD-10:n mukaan (ICD-10 ja Stakes 1999).

RIIPPUVUUSOIREYHTYMÄN KRITERIT ICD-10:N MUKAAN
Diagnostiset kriteerit: Vähintään kolme seuraavista on todettu yhtäaikaisesti vähintään kuukauden ajan tai, mikäli yhtämittaiset jaksot kuukautta lyhempiä, toistuvasti viimeisen vuoden aikana:
1. voimakas halu tai pakonomainen tarve käyttää alkoholia
2. heikentynyt kyky kontrolloida aloittamista ja lopettamista sekä käyttöannoksia
3. vieroitusoireyhtymä (F10.3 ja F10.4) aineen käytön vähentyessä tai lopetuksen yhteydessä
4. osoitus sietokyvyn (toleranssi) kasvusta
5. keskittyminen alkoholin käyttöön niin, että muut mielihyvän lähteet ja kiinnostuksen kohteet jäävät sivuun ja aika kuluu alkoholin käyttöön ja vaikutuksista toipumiseen
6. alkoholin jatkuva käyttö haitoista huolimatta.

Yleensä tutkimustyössä ja tieteellisissä artikkeleissa käytetään yhdysvaltalaisperäistä DSM-IV-kriteeristöä. ICD-10 ja DSM-IV ovat päihderiippuvuuden osalta melko samankaltaisia, mutta huomattavia erojakin löytyy: Vaikka itse kriteerit ovat samansuuntaisia, alkoholisti täyttää DSM-IV-kriteeristön herkemmin kuin ICD-10:n, koska ICD-10:ssä vaaditaan kolmen tai useamman kriteerin samanaikainen esiintyminen tutkittavan jakson aikana. Sen sijaan DSM-IV:ssä kriteerien ei tarvitse esiintyä samaan aikaan. Lisäksi ICD-10:ssä on kriteereitä yksi vähemmän (6 vs. 7), jolloin kolmen kriteerin täytyminen on todennäköisempää DSM-IV:ssä (Poikolainen 2003).

Suomessa perusterveydenhuollossa työskentelevät klinikot joutuvat tekemisiin alkoholismien kanssa päivittäin. Perusterveydenhuollossa sekä erikoissairaanhoidossa tehtyjen selvitysten mukaan 20 % miespotilaista ja 10 % naispotilaista on alkoholin suurkuluttajia (Seppä 2003). Näiden lukujen valossa on selvää, että potilaan alkoholinkäyttö on hyvä ottaa esille lähes jokaisessa uudessa potilaskohtauksessa. Diagnoosit tehdäänkin usein potilaan tullessa jonkin liitännäissairauden takia vastaanotolle (Seppä 2003).

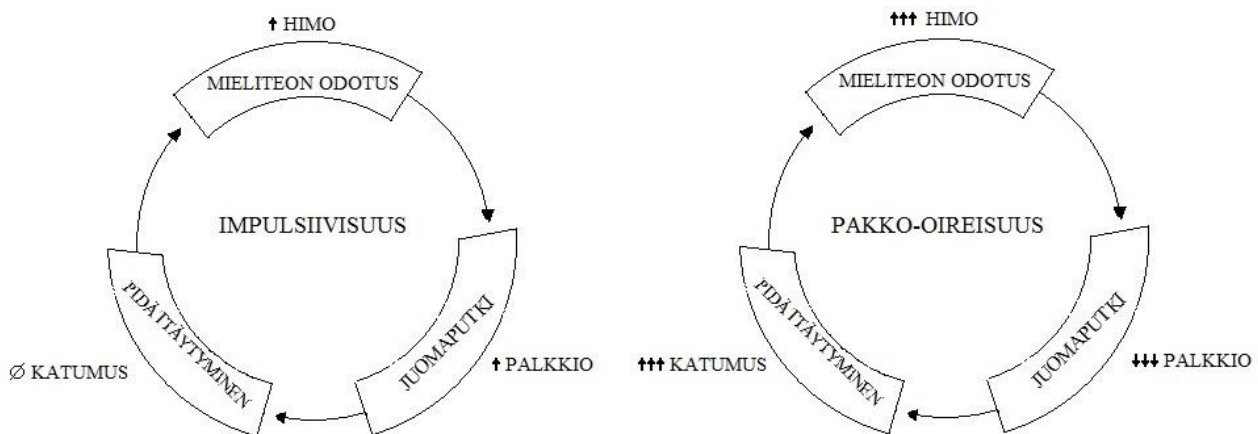
2.3. Alkoholismien etiologiaa

Alkoholismien taustalla on usein monia tekijöitä, joiden yhteisvaikutuksena tauti manifestoituu. Kulttuuriset ja rodulliset erot alkoholismien esiintyvyydessä ovat myös merkittäviä. Vuonna 2000 julkaistussa suomalaisessa tapaus-verrokkitutkimuksessa löydettiin merkittävä positiivinen korrelaatio alkoholismien ja vanhempien alkoholismien, antisosiaalisen käyttäytymisen, levottomuuden, impulsiivisuuden ja vaihteluhakuisuuden välillä. Vastaavasti merkittävä negatiivinen korrelaatio alkoholismilla oli kasvojen herkän punastumisen ja läheisten antaman tuen kanssa (Poikolainen 2000).

2.3.1. Riippuvuuden syntymisen neurobiologiaa

Riippuvuuden syntymistä selittämään on käytetty neurobiologisia malleja. Riippuvuuden kehittymistä on selitetty aivojen mielihyvä-motivaatiosysteemin toiminnan syklinomaisena heikkenemisenä ja samalla antimielihyvä-motivaatiosysteemin jatkuvana voimistumisena, joka johtaa pakonomaiseen päihteiden käyttämiseen. Liika päihteiden käyttö ei johtaisi siis pelkästään lyhytaikaiseen motivaatiosysteemin vahvistumiseen, vaan myös antimotivaatio-mielihyväsysteemin voimistumiseen. Päihteiden käytön jatkuessa on huomattu näiden häiriöiden saavuttavan uuden tasapainotilan, jolloin alkuperäinen häiriötila (dopamiinin ja endorfiinien vähentynyt aktiviteetti, kortikotropiinin kohonnut aktiviteetti) muodostaa uuden neurobiologisen tasapainotilan. Näiden järjestelmien herkistymiseen voi liittyä geneettistä komorbiditeettiä ja molekyyli-, solu- tai neuropiiritason muutoksia jo keskushermoston kypsymisvaiheessa (Koob ym. 2008).

Kuvassa 2 on motivaatiojärjestelmä Koobian ja Le Moalian mukailleen (2008).



Kuva 2. Motivaatiojärjestelmän kaksoissykli.

2.3.2. Alkoholistien luokittelusta

Alkoholistien voidaan todeta olevan varsin heterogeeninen ryhmä. Tästä syystä alkoholisteja on yritetty ryhmitellä eri tavoin, jotta saataisiin kullekin ryhmälle määrättyä spesifit hoitokeinot. Tässä tutkielmassa päädyttiin käyttämään C. Robert Cloningerin määrittelemää mallia, jotta saadut tulokset olisivat vertailukelpoisia aiempien tutkimusten kanssa.

Perusajatuksena Cloningerin neurobiologisessa persoonallisuusmallissa on, että yksilön perimä vaikuttaa hänen luonteeseensa, luonne vaikuttaa edelleen hänen sosiaaliin ominaisuuksiinsa ja sosiaaliset ominaisuudet edelleen siihen, onko henkilö altis alkoholismille, ja jos on, niin minkä tyyppiselle (Cloninger ym. 1993). Cloningerin persoonallisuusmalli koostuu arvioitavista luonteenpiirteistä, joiden yhdistelmästä muotoutuu henkilön persoona. Eri luonteenpiirteitä ovat elämishakuisuus (novelty seeking), haittojen välttäminen (harm avoidance), riippuvuus palkkioista (reward dependency), itsepintaisuus (persistence), itsestäänmääräämiskyky (self-directedness), kyky yhteistyöhön (co-operativeness) ja itsensä ylittäminen (self-transcendence) (Cloninger ym. 1993).

Cloningerin suorittamien kaksos- ja adoptiotutkimusten, joissa tutkittiin ruotsalaisia ja yhdysvaltalaisia alkoholistivanhemmistaan erotettuja lapsia, ja hänen luomansa neurobiologisen persoonallisuusmallin mukaan alkoholistit voidaan jakaa kahteen ryhmään: tyyppi 2 alkoholisteihin ja tyyppi 1 alkoholisteihin (Cloninger 1995). Adoptiotutkimusten luotettavuudesta tässä tapauksessa voidaan esittää kritiikkiä, sillä jo raskaudenaikaisella äidin alkoholikäytöllä on tutkittu olevan yhteys lapsen myöhempään alkoholismiin (Baer ym. 2003). Näiden kahden alkoholismityypin ilmeneminen on erilaista; tyyppi 1 ilmenemiseen tarvitaan perimän lisäksi ympäristön vaikutus. Tätä tyyppiä voidaan nimittää ympäristöstä riippuvaiseksi alkoholismiksi erotuksena tyyppi 2 alkoholismiin, jonka ilmeneminen on periytyvää ja sukupuolesta riippuvaista, se periytyy vain isältä pojalle ja manifestoituu ympäristötekijöistä riippumatta (Cloninger 1995). Tyyppi 1 alkoholistit alkoholisoituvat vasta aikuisiässä, ympäristötekijöiden vaikutuksesta ja pitkän altistumisajan jälkeen. He ovat luonteeltaan huolehtivaisia ja varovaisia. He ovat sosiaalisesti riippuvaisia muista henkilöistä ja muiden mielipiteet vaikuttavat heidän käyttäytymiseensä. Hallitsevia luonteenpiirteitä heillä on harmien välttäminen ja riippuvuus palkkioista. Heiltä puuttuu elämishakuisuus.

Humalassa tyyppin 1 alkoholistit ovat yleensä rauhallisia (Cloninger 1995). Sen sijaan tyyppin 2 alkoholistit aloittavat alkoholin suurkulutuksen jo alle 25-vuotiaana, he ovat lähes kaikki miehiä, ja he käyttävät usein myös muita päihteitä. Hallitsevana luonteenpiirteenä heillä on elämishakuisuus, ja heiltä puuttuu yhteistyökyky ja halu harmien välttämiseen. Päihteitä he käyttävät mielihyvän saavuttamiseen. He ovat luonteeltaan hedonisteja, joille nautinnon saavuttaminen on tärkeintä, vaikka muiden kustannuksella. Impulsiivisina, sosiaalisesti riippumattomina ja muista piittaamattomina he ajautuvat usein konflikteihin yhteiskunnan kanssa. Tyyppin 2 alkoholistien ennuste on suurimmassa osassa tapauksista huonompi kuin tyyppin 1 alkoholisteilla (Cloninger 1995).

Alkoholisteilla nucleus accumbensin dopamiinijärjestelmä on heikentynyt. Tätä havaintoa tukevat myös reseptoriautoradiografiat tyyppin 1 ja tyyppin 2 alkoholisteilla, niissä dopamiinitransporterien määrä on vähentynyt, varsinkin tyyppin 1 alkoholisteilla (Tupala ym. 2000).

Diana Martinez tutkimusryhmineen on tutkinut myös dopamiinijärjestelmän D2-reseptoreiden määrää alkoholiriippuvaisten ja terveiden verrokkien välillä. Alkoholiriippuvaisilla todettiin merkitsevästi vähäisemmät D2-reseptorien tiheydet kaikilla striataalisilla aivoalueilla (Martinez ym. 2005). Toisaalta myös serotoniinireseptorien määrän on todettu olevan vähäisempi alkoholisteilla verrokkeihin verrattuna. Tämä on todettu sekä tyyppin 1 että 2 alkoholisteilla (Mantere ym. 2002). Tyyppin 2 alkoholistien impulsiivisuutta ja aggressiivisuutta on selitetty sillä, että heillä on serotonergisen järjestelmän häiriötä prefrontaalisen korteksin lisäksi tyyppin 1 alkoholisteista poiketen laajasti myös kaikilla muilla limbisillä alueilla (Storvik ym. 2008).

2.4. Alkoholismin hoidosta

2.4.1. Alkoholismin hoidosta yleisesti Suomessa

Alkoholismille on yritetty pitkään kehittää toimivaa hoitoa, mutta todellista läpimurtoa taudin hoitamiseen ei ole vielä löydetty. Nykyiset hoitomuodot voidaan karkeasti jakaa hoitoihin, joissa ei käytetä lääkitystä, ja hoitoihin, joita avustetaan lääkityksellä. Alkoholismia hoidetaan nykyään Suomessa sosiaali- ja terveystoimen yhteistyönä. Akuutit katkaisuhoidot ja alkoholimyrkytykset hoidetaan yleissairaaloiden poliklinikoilla, lievemmät näistä tapauksista hoidetaan terveyskeskuksissa. Vaikeusasteen arvioinnissa ja alkoholimyrkytyksen erotusdiagnostiikassa tulee

kuitenkin olla huolellinen, kliinisen tutkimuksen lisäksi perusverikokeita suositellaan otettavan. Alkoholimyrkytyksen hoito on pääasiallisesti seurantaan perustuvaa. Tajunnan astetta ja perusverikokeita seuraamalla halutaan nähdä tilanteen korjaantuminen 3–4 tunnissa (Alkoholiongelman hoito, Käypä hoito 2011).

Akuutti katkaisuhoido toteutetaan useimmiten terveyskeskuksen vuodeosastolla. Vieroitusoireiden vaikeusasteen arvioinnissa voi käyttää CIWA-Ar-asteikkoa (Sullivan ym. 1989). Mikäli potilas oireiden perusteella saa yli 20 pistettä, on sedatoiva lääkitys indisoitu. Käytännössä alemmillakin pisteillä voi kliinisen harkinnan perusteella aloittaa sedatoivan hoidon (Käypä hoito 2011).

Lievemmissä riippuvuustapauksissa kierteeseen pyritään puuttumaan terveydenhuollossa varhaisvaiheen lyhyillä, pienillä toimenpiteillä. Tälle toimintatavalle on Suomessa annettu nimeksi mini-interventio (Käypä hoito 2011). Kantavana ajatuksena on katkaista alkoholismien vaikeutuminen mahdollisimman aikaisin. Potilasta informoidaan alkoholinkäytön haittavaikutuksista, häntä pyritään motivoimaan kulutustottumustensa muuttamiseen ja pyritään suunnittelemaan henkilökohtainen juomiskatto. Ohjeet annetaan suullisesti ja kirjallisesti ja sovitaan muutama kontrollikäynti (Käypä hoito 2011). Mini-intervention on todettu olevan tehokasta, kun se kohdennetaan oikeisiin potilaisiin (Wilk ym. 1997). Kuitenkin, jos tarkastellaan Cloningerin mallia alkoholismista (Cloninger, 1995), voidaan olettaa, että tyypin 2 alkoholistit eivät hyödy neuvonnasta. Erilaiset psykososiaaliset hoitomuodot perustuvat potilaan kanssa keskustelemiseen ja alkoholistin läheisten ottamiseen mukaan hoitoon. Menetelmät perustuvat usein moniin teorioihin, joita yhdistellään terapiassa tarpeen mukaan. Psykososiaalisten hoitomuotojen on todettu olevan tehokkaampia kuin hoitamatta jättäminen (Andreasson ym. 2003).

2.4.2. Alkoholismien lääkehoidoista

Alkoholismia hoidettaessa lääkeaineilla voidaan saada tulosta lähestymällä ongelmaa monista eri suunnista: voidaan vaikuttaa esimerkiksi alkoholin aineenvaihduntaprosessiin, pyrkiä vähentämään vieroitusoireita tai vaikuttamaan aivojen mielihyväjärjestelmään. Lääkehoitoon valitut tuotteet ja annoskoot on valittava tarkasti, muuten vain korvataan yksi riippuvuus toisella.

Katkaisuhoitossa käytetään yleisesti bentsodiatsepaamikyllästyshoitoa. Bentsodiatsepiinien vaikutus perustuu niiden sitoutumiseen GABA-reseptorien spesifisiin sitoutumiskohtiin. GABA eli gamma-aminovoihappo on alkoholivaikutusten kannalta keskeinen välittäjäaine, se vähentää hermosolujen aktiivisuutta sitoutumalla solukalvojen GABA-reseptoreihin. Bentsodiatsepiinit sitoutuvat samaan reseptoriin ja näin hidastavat hermoimpulssien kulkua (Kiianmaa 2003). Sedatoivaksi hoidoksi on Suomessa vakiintunut ns. diatsepaamikyllästyshoito, jossa potilaalle annetaan 10–20 mg diatsepaamia 1–2 tunnin välein kunnes potilas nukkuu. Kaikille katkaisuhoitoon otetuille annetaan myös tiamiinia 250 mg intramuskulaarisesti kolmena peräkkäisenä päivänä, minkä tarkoituksena on ehkäistä mahdollista Wernicken enkefalopatiaa (Käypä hoito 2011).

Aversio- eli inhotushoidossa disulfiraamia – kaupanimeltään Antabus – käytetään vieroitettun alkoholistin tukemiseen raittiuspyrkimyksessään. Disulfiraami lisää asetaldehydinin määrää elimistössä inhiboimalla sitä jatkokäsittelyä aldehydidehydrogenaasin toimintaa. Näin nautittu alkoholi jää elimistössä asetaldehydiksi, joka aiheuttaa tyypilliset antabusoireet: sydämentykytystä, kasvojen ja ylävartalon punoitusta, päänsärkyä, huimausta ja pahoinvointia (Salaspuro 2003). Merkittävä ongelma Antabus- hoidon onnistumisessa on lääkkeenoton jatkuvan valvonnan tarve. Hiljattain on esitetty disulfiraamin olevan maksalle haitallista myös ilman samanaikaista alkoholin nauttimista ja lääkkeen käytössä onkin tärkeää noudattaa määrättyjä rajoituksia (Molander ym. 2007).

Naltreksoni vaikuttaa mesolimbis-hypotalaamisen dopaminergisen mielihyväjärjestelmän toimintaan opioidireseptorien kautta. Opioidireseptorien kautta välittyvät todennäköisesti mielihyvän tunteet alkoholin nauttimisen yhteydessä. Naltreksoni toimii antagonistina kilpaillen endo- ja eksogeenisten opioidien kanssa sitoutumisesta opioidireseptoreihin, se vähentää näin opioidien aiheuttamaa mielihyvän tunnetta (Alho 2003). Kiefer on tutkinut Naltreksonin tehokkuutta eri alkoholistiryhmien hoidossa ja todennut, että eniten naltreksonihoidosta hyötyvät tyypin 2 alkoholistit (Kiefer ym. 2007).

Akamprosaatti on naltreksonin ohella toinen lääke, jonka voidaan katsoa vaikuttavan alkoholin himoa vähentävään lääkeryhmään. Akamprosaatti on aminohappo tauriinin kalsiumsuola. Sen vaikutukset alkoholismien hoidossa syntyvät kahdella tavalla: Akamprosaatilla on vaikutuksia aivojen glutamiinihappo-välitteiseen eksitatoriseen järjestelmään eli glutaminergiseen

hermojärjestelmään. Se toimii toisaalta myös GABA-reseptorien agonistina bentsodiatsepiinien tapaan (Alho 2003). Myös akamprosaattia tutkiessaan Kiefer löysi eroavaisuuksia sen tehokkuuden suhteen hoidettaessa erityyppisiä alkoholisteja. Akamprosaatin havaittiin tehoavan erityisesti alkoholisteihin, joiden oli diagnosoitu olevan vain vähäisesti ahdistuneita alkoholisoitumisestaan (Kiefer ym. 2005). Akamprosaatista on hiljattain esitetty yllättävä teoria, etteivät sen vaikutukset syntyisikään glutaminergisen järjestelmän kautta vaan kalsium-suolojen välityksellä (Spanagel ym. 2014). Koska naltreksonin ja akamprosaatin tehossa eri alkoholistityyppien hoidossa havaittiin eroja, voidaan olettaa, että eri alkoholistityyppien aivoista on löydettävissä eroja näiden lääkeaineiden vaikutusalueilta. Tässä tutkielmassa juuri näitä eroja yritettiin saada esille arvioimalla lääkeaineiden vaikutuksille alttiita reseptoreita aivojen eri alueilla. Mikäli eroja löydetään, voidaan tuloksiin perustuen pohtia kunkin alkoholistiryhmän lääkitsemisestä kullekin ryhmälle parhaan vasteen antavalla lääkityksellä.

Pääasiallisesti epilepsialääkkeenä käytettävä topiramaatti vähentää dopamiinin vapautumista mesolimbisella alueella. Lisäksi akamprosaatin tapaan se sitoutuu GABA-reseptoriin ja tätä kautta syntyy osa loppuvaikutuksesta. Sen hyödyntämisestä alkoholismien hoidossa on saatu kannustavia tuloksia (Bankole ym. 2007). Tutkimusten asetelmat ja tulokset eivät kuitenkaan vielä ole niin yksimielisiä, että topiramaatin viralliseksi käyttöaiheeksi Suomessa lisättäisiin alkoholismien hoito. Todettakoon kuitenkin, että Käypä hoito -artikkelissa hoito mainitaan, joten ainakin rajatusti lääke on meillä käytössä.

3. Glutamaattijärjestelmien toiminta alkoholismissa

Tämän tutkielman kokeellisessa osassa pyrittiin selvittämään keskushermoston glutaminergisen järjestelmän muutoksia eri alkoholistityyppien ja kontrollihenkilöiden välillä. Tämä luku keskittyy käsittelemään glutamaattijärjestelmien yleistä rakennetta ja toimintaa sekä valaisemaan mahdollisia kohteita, joissa saattaisi olla muutoksia verrattaessa alkoholisteja ja kontrollihenkilöitä.

Glutamaatti on aivojen pääasiallinen eksitatorinen välittäjäaine. Glutamaattia ja muita eksitatorisia aminohappoja sisältävät hermoradat kulkevat koko aivokorteksin alueelta kohti syvempiä tumakkeita pysyen samassa hemisfäärissä. Tärkeimmät aivotumakkeet, joihin nämä eksitatoriset radat päätyvät, ovat nucleus accumbens ja striatumin nucleus caudatus ja putamen. Hippokampukseen kulkevat radat saavat alkunsa frontaalikorteksilta (Koulu ym. 2001).

Glutamaatti pystyy sitoutumaan moniin erilaisiin reseptoreihin aivoissa. Glutamaatin lisäksi monet muut aineet ja lääkeaineet kykenevät sitoutumaan näihin samoihin reseptoreihin. Jotkin lääkeaineet sitoutuvat spesifisesti tiettyyn reseptorialalajiin eivätkä vaikuta muuntyyppisten reseptorien toimintaan mitenkään. Erilaisia glutamaattireseptorien alalajeja onkin löydetty spesifisten agonistien, eli reseptoreihin ensisijaisesti vaikuttavien aineiden avulla. Glutamaattireseptorien alalajeja tunnetaan kolme: AMPA-reseptorit, NMDA-reseptorit ja kainaatireseptorit (Bear ym. 2006). Useilla aivoalueilla esiintyy monia eri reseptorityyppejä, mutta on olemassa myös alueita, joiden postsynaptisista neuroneista löydetään vain yhden tyyppistä reseptorilajia.

3.1. NMDA-reseptorit

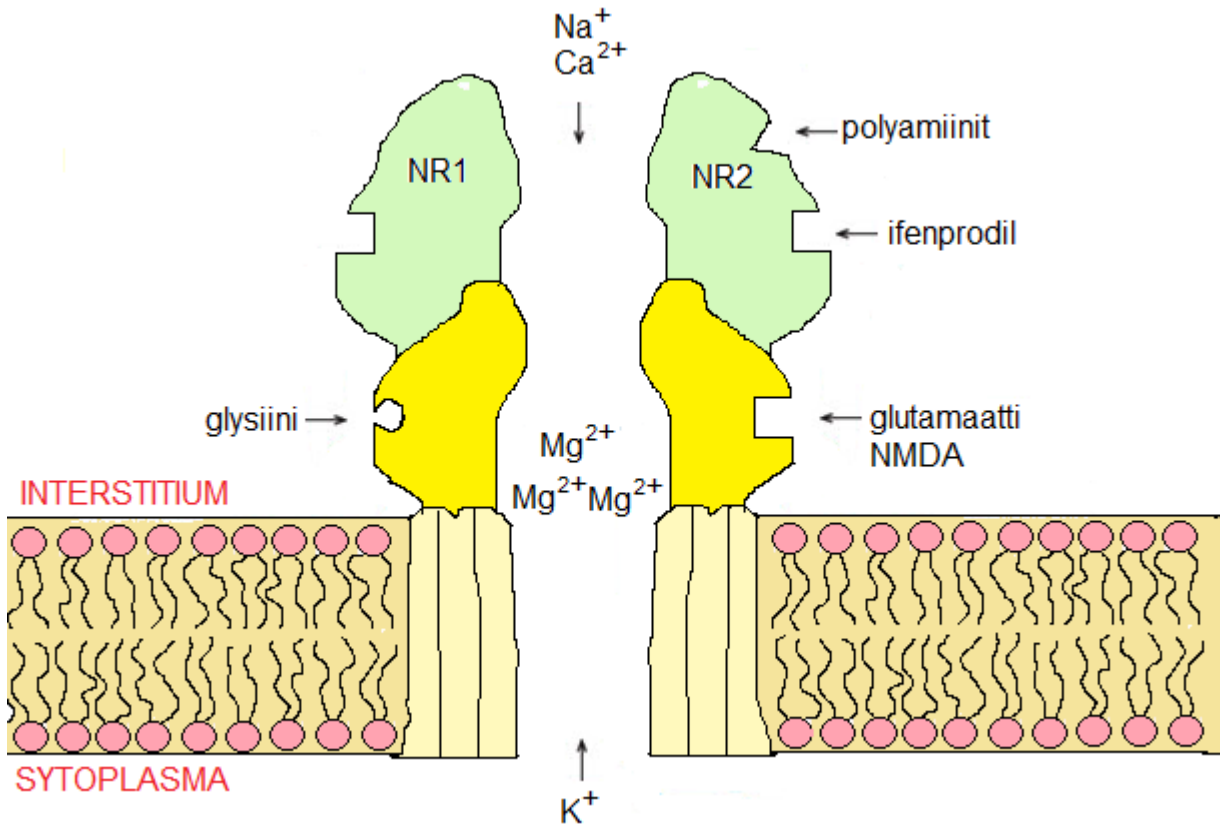
NMDA-reseptorit ovat glutamaattireseptorien alaryhmä, joka saa nimensä siitä, että siihen voi sitoutua spesifisesti N-metyyli-D-aspartaatti (NMDA) -molekyyli. NMDA-reseptori on glutamaatin

ohjaama ionikanava. Glutamaatin erittyessä synapsirakoon ja sen sitoutuessa samanaikaisesti glysiinin kanssa NMDA-reseptoriin se saa aikaan ionikanavan aukeamisen ja Na⁺ ja Ca²⁺ -ionien virtaamiseen postsynaptisen solun sisälle ja K⁺-ionien virtaamisen solusta ulos (Koulu ym. 2001). NMDA-reseptori on muista glutamaattireseptoreista poikkeava myös sillä tavalla, että sen toiminta on riippuvaista vallitsevasta solun kalvopotentiaalista: mikäli solussa vallitsee normaali negatiivinen lepopotentiaali, Mg²⁺-ionit tukkivat kanavan. Magnesium-tulppa poistuu kanavasta vasta kun solun membraanipotentiali depolarisoituu, yleensä ympäröivien AMPA-reseptorien vaikutuksesta, joiden toiminta ei ole riippuvaista solun kalvopotentiaalista (Bear ym. 2006). Rakenteeltaan NMDA-reseptorit ovat heteromeerisiä, solukalvossa kiinteästi sijaitsevia kalvoproteiineja. Reseptori muodostuu kahdesta alarakenteesta, jotka on nimetty NR1 ja NR2. NR1- osassa on sitoutumiskohta glysiinille ja NR2-osassa on sitoutumiskohta glutamaatille (Stephenson 2006).

Alkoholin tiedetään sitoutuvan NMDA-reseptoreihin antagonistina näin heikentäen aivojen luonnollisen glutaminergisen järjestelmän eksitatorista toimintaa (Olney 2002). Alkoholismin hoidossa käytetty akamprosaatti sitoutuu NMDA-reseptorin spermidiini-sensitiiviseen alueeseen eli polyamiinien sitoutumispaikkaan, joka ohjaa reseptorin toimintaa monimutkaisella tavalla (Naassila ym. 1998). Polyamiinien sitoutumispaikka on NR2-alaosassa. Anestesiassa käytetty ketamiini, hallusinaatioita aiheuttavat fensyklidiini (PCP) ja ditsosilpiini (MK-801) salpaavat NMDA-reseptorin toiminnan (Koulu ja Tuomisto, 2001).

Ifenprodili on potentti selektiivisesti NR2B-alaosaan sitoutuva inhibiittori (Gallagher ym. 1996). Ifenprodilia on aiemmin käytetty tutkittaessa alkoholin motorisia vaikutuksia rotilla. Ifenprodilin huomattiin estävän toleranssin kehittymistä alkoholille (Ramirez ym. 2011). Tämän tutkielman kokeellisessa osassa sitä käytettiin ligandina tutkittaessa eri aivoalueiden NMDA-reseptoritiheyksiä.

Kuva 3 NMDA-reseptorista Kempfiä ja McKernania mukaillen (2002)



Kuva 3. NMDA-reseptori

3.2. Nopeat glutaminergiset reseptorit

AMPA-reseptorit ovat toinen kolmesta reseptorityypistä, jotka ovat herkkiä aivojen välittäjäaineelle glutamaatille. Lisäksi nimensä mukaisesti ne ovat spesifisti herkkiä 1-amino-3-hydroksi-5-metyyli-iso-oksatsoli-4-propionaatille eli lyhyemmin AMPA:lle. Näiden reseptorien toiminta ei ole riippuvaista niiden kalvopotentialista. AMPA-reseptorin aktivaatio johtaa pääasiassa Na⁺ -ionien virtaukseen solun sisään (Bear ym. 2006).

Kainaattireseptorit ovat kolmas glutamaatille herkkä reseptorityyppi. Rakenteeltaan kainaattireseptorit ovat NMDA-reseptorien kaltaisia integraalisia membraaniproteiineja. Kainaattireseptorit ovat neliosaisia tetrameerejä, jotka koostuvat viidestä mahdollisesta eri alayksiköstä, GluR5, GluR6, GluR7, KA1 ja KA2 (Lerma 2006). Alayksiköt GluR5, GluR6 ja GluR7 voivat muodostaa homomeerisia reseptoreita, jotka koostuvat vain yhden tyyppisistä yksiköistä, kun taas KA1 ja KA2 -yksiköt ilmentyvät vain muiden kanssa osana reseptoria (Chittajallu ym. 1999). Alayksikköjen suhteellinen osuus kainaattireseptorien rakenteessa vaihtelee eri aivoalueilla (Chittajallu ym. 1999). Aktivoituessaan kainaattireseptorin permeabiliteetti eri ionien suhteen muuttuu. Reseptorin kautta solun sisään virtaa natriumia ja solusta ulos virtaa kaliumia (Lerma 2006). Kainaattireseptorien aktivointi glutamaatilla vaatii, että solun ulkopuolisessa ekstrasellulaaritulassa on Na⁺ ja Cl⁻ -ioneja. Näiden ionien poissaollessa kainaattireseptoriaktiivisuus lakkaa. Cl⁻ -ionilla on sitoutumispaikka reseptorikanavan sisällä, jossa se stabiloi kanavan rakennetta (Plested ja Mayer 2007).

3.3. Tutkimuksessa käsitellyt aivoalueet

Frontaalikorteksilla tarkoitetaan isoaivojen otsalohkon ulommaista, kuuden neuronikerroksen muodostamaa pintaosaa. Tässä tutkimuksessa valittiin kvantitoitavaksi prefrontaalikorteksi eli frontaalikorteksin etuosa. Tällä aivojen alueella on merkitystä työmuistin käyttöön liittyvissä toiminnoissa, ja se vaikuttaa myös ihmisen persoonallisuuteen (Bear ym. 2006). Se on tärkeä esimerkiksi sellaisille persoonallisuuden piirteille kuin tavoitehakuisuus, peräänantamattomuus sekä impulsiivisuus. Se siis liittyy toiminnan ohjaamiseen ja kontrolloimiseen.

Perigenual cingulate -korteksi on anteriorisen pihtipoimun osa, ja se sijaitsee aivojen keskilinjan molemmiin puolin ympäröiden *corpus callosumia*. Saapuvia hermoyhteyksiä pihtipoimulle tulee enimmäkseen etummaisesta talamustumakkeesta. Pihtipoimulta lähtee myös takaisin aksoniyhteyksiä kohti etummaista talamustumaketta (Bear ym. 2006). Pihtipoimu on limbisen järjestelmän osa, joka osallistuu tunteiden muodostuksen ja käsittelyn, oppimisen ja muistin toimintoihin. Pihtipoimu onkin olennainen aivoalue motivaatiojärjestelmän toiminnan kannalta (Hayden ym. 2010).

Parillinen amygdala sijaitsee temporaalilohkon syvässä, mediaalisessa osassa, ja se on nimensä mukaisesti mantelinmuotoinen. Amygdalaan tulee hermoyhteyksiä laajalta alueelta keskushermostoa, kuten kaikkien aivolohkojen neokorteksilta, hippokampuksesta ja cingulate gyruksesta. Amygdalaan saapuu myös yhteyksiä kaikista sensorisista järjestelmistä. Amygdala kuuluu limbiseen järjestelmää, joka on autonomisten toimintojen, motivaation ja mielentilojen säätelyyn osallistuvien aivoalueiden joukko (Bear ym. 2006).

Hippokampus on aivojen lateraalisten kammioiden alasarveen työntyvä kaareva kohouma. Se muodostuu kahdesta ohuesta neuronikerroksesta, jotka taittavat muodostaen kaksi liuskaa. Toinen liuska on nimeltään dentate gyrus ja toinen ammoninsarvi. Hippokampuksessa tapahtuu muistamiseen liittyviä toimintoja (Bear ym. 2006). Hippokampus osallistuu lisäksi toimintoihin, joilla ihminen kykenee hahmottamaan yhteyttään ympäristöönsä (Moser ym. 2008).

Nucleus accumbens muodostaa pääosan ventraalista striatumia. Se on aivojen mielihyväjärjestelmän keskeinen toiminta-alue. Nucleus accumbensin aktivoituminen aiheuttaa mielihyvän tuntemuksen syntymistä ja sen yhdistämistä tiettyyn toimeen. Tämä edesauttaa niiden toimien tekemistä toistuvasti, koska ne koetaan miellyttäväiksi. Tärkein välittäjäaine tässä tapahtumassa on dopamiini, joka vapautuu nucleus accumbensissa miellyttävien signaalien tai päihteitten vaikutuksesta. Serotoniinitransportterien määrä nucleus accumbensin alueella on hieman lisääntynyt tyypin 1 alkoholisteilla, mutta muutoksia ei ole havaittu tyypin 2 alkoholisteilla (Storvik ym. 2006).

4. Kokeellinen osa: glutamaattireseptorien tiheys alkoholismissa, määrittäminen reseptoriautoradiografian avulla

4.1. Tutkimuksen tavoitteet

Akamprosaatti, joka sitoutuu NMDA-reseptoreihin on alkoholiriippuvuuden hoitoon käytetty lääke. Jo ennenkin on tiedetty, että kaikilla alkoholisteilla akamprosaatti ei auta, Cloningerin tyyppin 1 ja 2 alkoholisteilla on erilainen vaste akamprosaattiin siten, että se vaikuttaa tehokkaammin tyyppin 2 alkoholisteihin (Kiefer 2005). Näin olleen NMDA-reseptorit ovat olennainen mielenkiinnon kohde alkoholismia tutkittaessa.

Ifenprodili on selektiivinen NMDA-reseptorien NR2B-alayksikön inhibiittori (Reynolds ym. 1989). Mittasimme onko ifenprodilin sitoutuminen NMDA-reseptorien NR2B-alayksiköihin muuttunut verrattaessa tyyppin 1 ja 2 alkoholisteja kontrolleihin. Nolla-hypoteesin mukaan ifenprodilin sitoutumisen määrä ei ole muuttunut tyyppin 1 tai 2 alkoholisteilla kontrolleihin verrattuna. Analogisesti mittasimme GCP-39653-ligandin sitoutumista NMDA-reseptoreihin sekä kainaattiligandin sitoutumista kainaattireseptoreihin kvantitoimalla autoradiografiakokeiden kuvia.

4.2. Menetelmät ja aineisto

Kuolleilta alkoholisteilta saaduista aivoista oli valmistettu leikkeitä, joihin oli sitoutettu ifenprodilia, GCP-39653-ligandia ja kainaattiligandia. Nämä aineet oli leimattu radioaktiiviseksi, ja ne sitoutuvat spesifisesti NMDA- ja kainaattireseptoreihin. Radioaktiiviset leikkeet valottivat säteilylle herkkiä filmejä joista oli saatu selville reseptorien määrät eri aivoalueilla eri alkoholistityypeissä.

4.2.1. Aineisto

Samaa aineistokokoonpanoa oli käytetty jo muutamassa aikaisemmassa tutkimuksessa Itä-Suomen yliopistossa oikeuspsykiatrian laitoksella (Storvik ym. 2007, 2006; Tupala ym. 2001, 2000; Mantere ym. 2002), ja kerron tässä menetelmän pääpiirteet. Tutkimuksessa käytetyistä aivoista 25 oli saatu Oulun yliopiston oikeuslääketieteen laitokselta ja 2 kontrollihenkilöiden aivoista Kuopion

yliopiston oikeuslääketieteen laitokselta. Aineiston käytön hyväksyi Oulun yliopiston eettinen toimikunta ja terveydenhuollon oikeusturvakeskus. Aivot oli irrotettu, niistä oli poistettu aivokalvojen jäänteet ja ne oli leikattu halki keskisagittaalitasoon suunteisesti. Aivojen vasen hemisfääri oli asetettu lasilevyä vasten ja tämän jälkeen aivot oli pakastettu -75 °C:n lämpötilaan (Tupala 2001).

Kaikki 27 henkilöä joiden aivoja käytettiin tutkimuksessa, olivat eurooppalaista rotua. Henkilöistä 9 luokiteltiin tyyppin 1 alkoholisteihin Cloningerin mukaan, heistä 7 oli miehiä ja 2 naista, keskimääräinen elinikä oli 52,7 vuotta. Mukana oli 8 tyyppin 2 alkoholista, jotka olivat kaikki miehiä keskimääräisen eliniän ollessa 34,6 vuotta. Kontrollihenkilöiden aivoja oli mukana tutkimuksessa 10 kpl, 8 miestä ja 2 naista, heidän keskimääräinen elinikänsä oli 53,5 vuotta. 8:lla 9:stä tyyppin 1 alkoholisteista oli kuollessaan alkoholia veressä, yksi oli ollut raittiina viimeiset 10 tuntia. Tyyppin 2 alkoholisteista 6 oli nauttinut alkoholia ennen kuolemaansa, yksi oli ollut raittiina 5 päivää ja yksi kolmesta seitsemään päivää. Yhdellä kontrollihenkilöistä oli ollut pieni määrä alkoholia veressä kuollessaan.

Kaikki tutkittavista henkilöistä kuolivat äkillisesti. Tyyppin 1 alkoholistien kuolinsyitä olivat keuhkokuume (2 kpl), yliannostus etanolia (2), sydäninfarkti (2), subduraalinen verenpurkauma oikealla puolella (1) sekä itsemurha hirttäytymällä (1). Tyyppin 2 alkoholistien kuolinsyitä olivat itsemurha hirttäytymällä (3), kuolema teräseella tehtyyn haavaan (2), kuolema ampumahaavaan (1), sydänvaurio auto-onnettomuudessa (1) sekä sydänperäinen kuolema (1). 9 kontrollihenkilöä kuolivat sydäninfarktiin ja yksi aortan repeämään.

4.2.2. Reseptoriautoradiografia

Autoradiografialla tarkoitetaan kuvaustapaa, jossa kuvattavaan kohteeseen on lisätty radioaktiivista yhdistettä. Tällöin kohde itse (auto-) säteilyllään (radio-) valottaa kuvausfilmille kuvan. Reseptoriautoradiografiassa radioaktiivinen yhdiste liitetään ligandiin jonka tiedetään sitoutuvan tiettyntyyppisiin reseptoreihin. Näin saadaan määritettyä tietyn reseptorityypin tiheydet kuvattavassa kudoksessa. Reseptoriautoradiografiaa kuvantamismenetelmänä on käytetty jo 1960-luvulta asti, ja yleisesti ottaen radioaktiivisten aineiden liittäminen tunnettuihin ligandeihin ei ole kemiallisesti kovin vaativa prosessi.

Tässä tutkimuksessa käytetyt ligandit olivat tritiumilla leimatut ifenprodili, 3H-CGP-39653 ja 3H-kainaatti. CGP-39653 sitoutuu selektiivisesti NMDA-reseptoreihin erittäin suurella affiniteetilla, jolloin se on hyvä vaihtoehto toimimaan ligandina merkittäessä kudoksen NMDA-reseptorien tiheyttä (Sills ym. 1991). Kainaatti sitoutuu vastaavasti kainaattireseptoreihin.

Autoradiografialeimaukset oli suoritettu noin puoli vuotta ennen kvantitointia ja analysointia. Menetelmä oli lyhyesti kuvattuna seuraavanlainen: Pakastetut aivoviipaleet oli otettu pakkasesta kuvausta varten, annettu sulaa ja aseteltu telineisiin vierekkäin. Tämän jälkeen leikkeet oli esipesty Tris-sitraatti puskuriliuksella 30 min. ajan. Seuraavaksi aivoleikkeet oli käsitelty ligandiliuksella, kainaattireseptoreita tutkittaessa ligandiliuos sisälsi radioaktiiviseksi leimattua [3H]kainaattia, ja vastaavasti tutkittaessa NMDA-reseptoreita ligandiliuos sisälsi radioaktiiviseksi leimattua [3H]CGP39653-ligandia. Tämän jälkeen leikkeet oli pesty uudestaan Tris-sitraatti puskuriliuksella ja kuivattu ilmvirtakuivaimella (Häkkinen 2007).

Ligandien spesifisen sitoutumisen selvittämiseksi jokaisesta aivosta oli otettu yhtä reseptoriautoradiografiatutkimusta varten kaksi leikettä samalta leikkaustasolta. Toinen oli käsitelty edellä kuvatulla menetelmällä ligandiliuksella, ja toinen aivoleike käsitelty saman ligandiliuksen lisäksi varsinaisen ligandin kanssa samoihin reseptoreihin sitoutuvalla kilpailevalla glutamaatilla (Häkkinen 2007).

Radioaktiivisesti leimatut leikkeet oli asetettu tämän jälkeen metallikasettiin kuvausfilmin kanssa. Filmin oli annettu valottua aivoleikkeiden autoradioaktiivisen säteilyn avulla noin kuukauden verran. Tämän jälkeen metallikasetit oli avattu ja filmi otettu käsittelyyn ja skannattu phosphoimager-laitteella.

4.2.3. Autoradiografiakuvien kvantitointi

Autoradiografiakuvat oli siirretty phosphoimager-skannerilla digitaaliseen muotoon ja tallennettu pakkaamattomina TIFF-bittikarttakuvina. Tässä kuvamuodossa ei menetetä informaatiota, kuten pakatussa JPG-formaatissa menetettäisiin. Tästä kohdasta alkoi oma osuuteni autoradiografiakuvien kvantitoinnissa. TIFF-kuvien kvantitointiin valittiin ImageJ-ohjelma (v. 1.37, Rasband WS, 1997-2014), ja kvantitointidatan esikäsittelyyn Excel (Microsoft, 2007). Aluksi kuvatiedosto avattiin ImageJ-ohjelmalla. Kuvatiedostot oli tyypillisesti jaoteltu siten, että yhdellä levyllä oli kuvat neljästä aivosta, vaihtoehtoisesti joko totaalisitoutumiskuvat tai epäspesifisen sitoutumisen kuvat.

Kuvasta etsittiin ohjelmalla kalibrointiliuskat, joiden avulla aivonäytteiden aktiivisuudet saatiin kalibroituja ja tulokset vertailukelpoisiksi muiden kuvien kanssa. Liuskoja oli kahta eri voimakkuusastetta: käytettäväksi valittiin se, jonka tummuusasteet korreloivat paremmin kuvassa olevien aivojen tummuuksien kanssa. Kuvien kalibrointiin käytettiin suurimmaksi osaksi RPA 507-liuskoja, joiden sisältämät asteittaiset aktiivisuuserot mitattiin ”polygon selections” -työkalulla ja saadut keskimääräiset tummuuslukemat kultakin alueelta siirrettiin Exceliin. Samalla työkalulla mitattiin myös standardiliuskoja ympäröivän taustan radioaktiivisuus eli sitä kuvaava tummuusaste. Kun liuskojen tummuusarvoista vähennettiin taustan tummuus, saatiin selville itse liuskojen aiheuttama valottuminen kuvantamislevyillä.

Standardiliuskojen aktiivisuudet oli saatu liuskojen valmistajalta. Liuskojen tummuudet merkittiin kalibrointikuvaajan toiselle akselille ja tummuuksia vastaavat aktiivisuudet toiselle akselille. Saadun pistejoukon kuvaamiseen etsittiin käyrä, joka sovitettiin kulkemaan joukon läpi niin, että sen etäisyys pisteistä olisi mahdollisimman pieni. Tämän jälkeen siirryttiin kvantitoimaan aivoalueita, nucleus accumbensin tasolta leikatuihin leikkeisiin kvantitoituiksi aivoalueiksi valittiin nucleus accumbens, frontaalikorteksi, perigenual cingulate cortex, amygdala, hippocampus ja dentate gyrus. Striatumin tasolta leikatuihin leikkeisiin valittiin kvantitoitavaksi caudatus, putamen, frontaalikorteksi, perigenual cingulate cortex, hippocampus ja dentate gyrus. Nämä aivoalueet rajattiin ImageJ:n ”polygon selections” -työkalulla ja mitatut keskimääräiset tummuudet alueilta siirrettiin Exceliin samalla menetelmällä kuin mitattaessa kalibrointiliuskojen tummuuksia. Tässä vaiheessa tutkimusta kvantitointia suorittanut henkilö pidettiin epätietoisena kunkin aivon menneisyydestä ja siitä, oliko kohde kuulunut mihin alkoholistiryhmään tai verrokkeihin.

Saadut tummuusarvot kultakin alueelta – vähennettynä aivoja ympäröivän alueen tummuusarvoilla - sijoitettiin aiemmin määritettyyn kalibrointiyhtälöön. Tämän jälkeen kunkin aivon epäspesifisen kuvan aivoalueiden tummuudet vähennettiin totaalisitoutumiskuvien aivoalueiden tummuuksista, ja näin saatiin selville spesifinen sitoutuminen. Menettelytapa oli kuitenkin virheellinen, koska piti vähentää pmol/g-arvoja toisistaan. Ensin piti laskea pmol/g-arvot aivoalueille ja taustalle, ja vähentää sitten taustan pmol/g-aivoalueen pmol/g-arvosta. Tämä oli tärkeää, koska vasteet eivät olleet lineaariset, mutta muuntokaava standardin pohjalta otti tämän huomioon ja pmol/g-arvot olivat siten vähennyskelpoiset. Tämä arvo kuvasti siis kulloinkin mielenkiinnon kohteena olevan reseptorin tiheyttä tietyllä aivoalueella.

Osa fosfokuvannuslevyistä oli palanut puhki useiden käyttökertojen jälkeen, joten puolet CGP-39653-ligandia sisältävistä autoradiografiakuvista valotettiin uudestaan. Tällöin havaittiin, että data ei ole samaa suuruusluokkaa entisten kvantitointien kanssa. Muutokset olivat säännöllisiä kaikilla aivoalueilla, ja kuvat olivat optisesti tarkasteltuna hyvälaatuisia. Syynä ilmiöön pääteltiin olevan joko skannerin erilaisten asetusten, taustalta säteilleen erilaisen hajavalon, tai eri vuodelta peräisin olevien standardiliuskojen. Tummuuksien suhde uusien ja vanhojen kuvien välillä oli 20:1. Kvantitoinnissa päädyttiin käyttämään muuntokerrointa, joka saattaisi uudelleen valotetut kuvat vertailukelpoisiksi vanhojen kanssa.

4.2.4. Tilastolliset menetelmät

Tilastolliseen testaukseen käytettiin SPSS-ohjelmaa (versio 14), joka on tilastollisen testauksen perusväline. Sitoutumistiheyksien eroa alkoholistiryhmien ja kontrollien välillä testattiin ANCOVA:lla (analysis of co-variance). Tämä menetelmä on varianssianalyysin johdos. Siinä yksi muuttuja on ko-variantti, jolla tuloksia korjataan. Ikä ei ole ollut näyteryhmissä sama, joten ikä kuolinhetkellä on ko-variantti. Muut käytetyt muuttujat olivat reseptorin tiheys (yhdeällä alueella kerrallaan), sekä näyteryhmä (alkoholisti tai kontrolli). Pienemmät p-arvot kuin 0,05 ovat tässä menetelmässä merkittäviä, tämä raja-arvo on yleisesti käytössä, mutta on täysin sopimuksenvarainen asia. P-arvolla tarkoitetaan tilastollisessa hypoteesin testauksessa sitä todennäköisyyttä, jolla vähintäänkin yhtä merkittävä ero tuloksessa saadaan aikaan käyttämällä nollahypoteesia. Mitä pienempi p-arvo saadaan, sitä varmemmin tulos on luotettava. SPSS-ohjelman Options-kohdasta valittiin lisäksi "descriptives", jolloin analyysituloksissa ilmeni ryhmien keskiarvot ja hajonnat. Saadut tulokset koottiin, ja ne on esitetty seuraavassa luvussa 4.3.

Ryhmien keskiarvojen ja hajontojen erojen suuruutta kuvaa efektikoko. Se mahdollistaa kokeellisten tutkimusasetelmien vertailun. Cohenin efektikoossa muuttujien keskiarvojen erotus suhteutetaan vertailtavien ryhmien keskihajontaan. Alhainen Cohenin d-arvo antaa viitettä siitä, että todennäköisyyden varmistamiseksi tarvittaisiin suurempi näytejoukko, ja korkea d-arvo päinvastoin. Suuret d-arvot ovat noin 0,8 ja sitä suurempia, tämäkin on tosin sopimuksenvarainen asia.

4.3. Tulokset

Osa fosfokuvannuslevyistä, joita käytettiin CGP- ja kainaattiligandien kanssa, oli lukuisien käyttökertojen johdosta liian kuluneita, joten ne jouduttiin valottamaan uudestaan. Silti näiltä fosfokuvannuslevyiltä kvantitoitu data ei ollut käyttökelpoista kohinansa vuoksi. Suoritin tilastollisen analyysin Ifenprodili-sitoutumiskokeen kuvista kvantitoimastani datasta. Ifenprodili-aineistosta sain suhteellisen hyvälaatuista dataa viideltä eri aivoalueelta (taulukko 2).

Taulukko 2. Ifenprodilin sitoutuminen aivoleikkeisiin

Superiorinen frontaalikorteksi	Keskiarvo ja keskihajonta	Cohenin efekतिकoko (d)	F	df	P
Kontrollit (n =10)	245,58±74,56				
Alkoholistit (n =17)	261,89±63,19	0,24	0,891	1, 24	0,355
Kontrollit verrattuna tyyppin 1 ja 2 alkoholisteihin			0,546	2, 23	0,587
Tyyppin 1 alk. (n =9)	265,09±61,39	0,29	0,380	1, 16	0,546
Tyyppin 2 alk. (n=8)	258,29±69,23	0,18	2,330	1, 15	0,148

Pihtipoimu	Keskiarvo ja keskihajonta	Cohenin efekतिकoko (d)	F	df	P
Kontrollit (n =10)	184,47±47,62				
Alkoholistit (n =17)	206,24±48,01	0,46	2,847	1, 24	0,105
Kontrollit verrattuna tyyppin 1 ja 2 alkoholisteihin			1,367	2, 23	0,275
Tyyppin 1 alk. (n =9)	216,83±58,94	0,60	1,897	1, 16	0,187
Tyyppin 2 alk. (n=8)	194,32±31,48	0,24	4,284	1, 15	0,056

Nucleus accumbens	Keskiarvo ja keskihajonta	Cohenin efektikoko (d)	F	df	P
Kontrollit (n =10)	107,65±14,92				
Alkoholistit (n =17)	106,39±36,98	0,04	1,588	1, 22	0,221
Kontrollit verrattuna tyyppin 1 ja 2 alkoholisteihin			4,567	2, 21	0,023
Tyyppin 1 alk. (n =9)	110,89±28,13	0,15	0,067	1, 14	0,799
Tyyppin 2 alk. (n=8)	101,89±45,75	0,17	7,701	1, 14	0,015

Frontaalikorteksi accumbens -tasolta	Keskiarvo ja keskihajonta	Cohenin efektikoko (d)	F	df	P
Kontrollit (n =10)	224,56±48,09				
Alkoholistit (n =17)	280,99±63,44	1,00	3,501	1, 22	0,075
Kontrollit verrattuna tyyppin 1 ja 2 alkoholisteihin			1,735	2, 21	0,201
Tyyppin 1 alk. (n =9)	282,68±75,25	0,92	2,580	1, 14	0,130
Tyyppin 2 alk. (n=8)	279,25±54,35	1,07	2,520	1, 14	0,135

Pihtipoimu accumbens -tasolta	Keskiarvo ja keskihajonta	Cohenin efektikoko (d)	F	df	P
Kontrollit (n =10)	166,48±21,70				
Alkoholistit (n =17)	174,55±50,23	0,21	0,564	1, 22	0,460
Kontrollit verrattuna tyyppin 1 ja 2 alkoholisteihin			0,269	2, 21	0,766

Tyypin 1 alk. (n =9)	161,27±45,06	0,15	0,297	1, 14	0,594
Tyypin 2 alk. (n=8)	187,82±54,53	0,51	0,478	1, 14	0,501

Taulukon 2 tuloksien saanti tapahtui analysoimalla SPSS-ohjelmalla. Tätä taulukkoa tulkitaan siten, että kun ero alkoholistien ja kontrollien välillä frontaalikorteksissa on $p=0,075$, on silloin 7,5 %:n todennäköisyys, että vastaavasti jakautuneista tuloksista tulisi sattumalta merkittävä tulos, eikä se yllä p-arvoon 0,05, jota yleisesti pidetään merkittävyyden rajana. Jotta p-arvon merkitsevyyttä voisi arvioida, ilmoitetaan myös F-arvo, josta p-arvo lasketaan aina tietyn vapausasteen mukaan. Samasta F-arvosta seuraa siis eri p-arvo F-arvotaulukosta katsottuna sen mukaan, mitkä ovat datan vapausasteet. Vapausasteita voitiin pienentää jättämällä analyysistä pois neljä itsemurhan tehnyttä ei-alkoholistia, koska heidän määrä on liian pieni käytettäväksi tilastollisessa vertailussa.

Perusvertailu tutkimuksessa on siis hypoteesin mukaisesti seuraava: onko alkoholistien ja kontrollien välillä tilastollisesti merkittävää eroa ifenprodilin sitoutumisessa eri aivoalueilla. Tilastollinen analyysi varianssi-analyysillä osoitti, että ifenprodilin sitoutumispaikat ovat merkittävästi alentuneet tyypin 2 alkoholisteilla nucleus accumbensin alueella, p-arvo siellä 0,015. Kuitenkin tämän alueen efektikoot kontrollihenkilöihin verrattuna olivat pieniä (0,15 ja 0,17 tyypin 1 ja tyypin 2 alkoholisteilla). Frontaalikorteksilla accumbens-tasolla sen sijaan efektikoot olivat suuria (0,92 ja 1,07 tyypin 1 ja tyypin 2 alkoholisteilla), mutta laskettaessa p-arvoa nämä eivät osoittautuneet tilastollisesti merkitseviksi.

Ikä ei ole ollut näyteryhmissä sama, joten ikä kuolinhetkellä on ko-variantti. ANCOVA-menetelmää käytettäessä tällä ikä-adjustoinnilla on ollut vaikutusta merkitsevän tuloksen syntyyn. Aineiston varsin pieni n-luku myös mahdollistaa sen, että löydetty merkitsevät tulokset olisivat vain artefaktaa.

5. POHDINTA

Jo useiden muidenkin aineistojen perusteella on käynyt selväksi, että alkoholistien luokittelu olisi hyödyllistä, koska tyyppin 1 ja 2 alkoholisteillakin on keskenään eroa välittäjäainejärjestelmien toiminnassa. Diagnostiikkaan tässä suhteessa voisi lisätä panostusta, jotta voitaisiin valita vaikuttavimmat hoidomuodot kullekin potilaalle, koska ryhmien välillä on neurobiologia eroja. Tutkimusta tehdään tietenkin myös muiden välittäjäaineiden kuin glutamaatin saralla, ja glutamaatti on merkittävässä roolissa kaikissa aivojen toiminnoissa.

Tutkielmani kokeellinen osa koki vastoinkäymisiä, koska GCP- ja kainaattiligandien fosfokuvauslevyt olivat vaikeasti luettavia. Ifenprodilin suhteen tulokset ovat rohkaisevia siinä mielessä, että glutamaattijärjestelmää alkoholisteilla pitää tutkia lisää. Tämän tutkielman kokeellisessa osassa saatiin viitteitä siitä, että ifenprodilin sitoutuminen nucleus accumbensin alueella olisi vähäisempää tyyppin 2 alkoholisteilla kuin tyyppin 1 alkoholisteilla ikäkorjatun tilastollisen analyysin perusteella, mutta efektikoot samalla alueella jäivät niin pieneksi, ettei todellisesta biologisesta erosta ryhmien välillä voi ajatella olevan näyttöä. Tämä johtuu suuresta hajonnasta tuloksissa. Iän käyttäminen ko-varianttina sekä aineiston pieni n-luku johtavat siihen, että löydettyt merkitsevät tulokset voivat olla vain artefaktaa. Tulos on kuitenkin looginen ja tukee havaintoja alkoholistien luokittelusta. Nucleus accumbensin aktivoituminen aiheuttaa mielihyvän tuntemuksen syntymistä ja sen yhdistämistä tiettyyn toimeen. Täten on loogista että juuri tyyppin 2 alkoholisteilla on tällä alueella eroavaisuutta.

LÄHTEET

Alho H. Alkoholiriippuvuuden lääkehoito. Kirjassa: Salaspuro M, Kiianmaa K, Seppä K ed. Päihdelääketiede. 2. painos. Helsinki: Duodecim, 2003: 249-256

Alkoholiongelman hoito (online). Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Päihdelääketieteen yhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2011 (viitattu 6.3.2014). Saatavilla Internetissä: www.kaypahoito.fi

Andreasson S, Öjehagen A. Psychosocial treatment of alcohol dependence. Kirjassa: Berglund M, Thelander S, Jonsson E (toim.) Treating alcohol and drug abuse. Wiley VCH, Weinheim 2003; 43-188

Baer JS, Sampson PD, Barr HM, Connor PD, Streissguth AP. A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. Arch Gen Psychiatry 2003; 60:377-85

Bankole A. Johnson, DSc, MD, PhD; Norman Rosenthal, MD; Julie A. Capece, BA. Topiramate for Treating Alcohol Dependence for the Topiramate for Alcoholism Advisory Board and the Topiramate for Alcoholism Study Group JAMA 2007; 298:1641-1651

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Kirjassa Neuroscience: Exploring the Brain, 3. ed. USA, Lippincott, Williams & Wilkins

Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VR, Henley JM. Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function Trends Pharmacol Sci. 1999 20(1):26-35

Cloninger CR, Svrakic DM, Przybeck TR. A psychobiological model of temperament and character. Arch Gen Psychiatry. 1993 50(12):975-90

Freund G Anderson KJ. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. Alcohol Clin Exp Res. 1996 20(7):1165-1172

Hayden BY, Platt ML. Neurons in anterior cingulate cortex multiplex information about reward and action. *Journal of Neuroscience* 2010 30 (9): 3339-3346

Hoffman PL, Tabakoff B. Ethanol, sedative hypnotics and glutamate receptor function in brain and cultured cells. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1993;2:345-51

Häkkinen M 2007 Kainaattireseptorien autoradiografiatutkimuksen työselostus

Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neuroscience* 2002 (5): 1039-1042

Kiianmaa, K. Päihteiden neurobiologia: Alkoholi. Kirjassa: Salaspuro M, Kiianmaa K, Seppä K ed. *Päihdelääketiede*. 2. painos. Helsinki: Duodecim, 2003: 120-131

Kiefer F, Helwig H, Tarnaske T, Otte C, Jahn H, Wiedemann K. Pharmacological relapse prevention of alcoholism: clinical predictors of outcome. *Eur Addict Res.* 2005;11(2):83-91

Kiefer F, Jiménez-Arriero MA, Klein O, Diehl A, Rubio G. Cloninger's typology and treatment outcome in alcohol-dependent subjects during pharmacotherapy with naltrexone. *Addict Biol.* 2007

Koob GF, Le Moal M. Addiction and the Brain Antireward System. *Annual Review of Psychology* 2008 Vol. 59: 29-53

Koulu M, Tuomisto J. *Farmakologia ja Toksigologia*, 6. painos. Kuopio, Kustannusosakeyhtiö Medicina: 2001

Kranzler HR, van Kirk J. Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1335-41

Lerma J. Kainate receptor physiology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006(1):89-97

- Mantere T, Tupala E, Hall H, Särkioja T, Räsänen P, Bergström K, Callaway J, Tiihonen J. Serotonin transporter distribution and density in the cerebral cortex of alcoholic and nonalcoholic comparison subjects: a whole-hemisphere autoradiography study. *Am J Psychiatry*. 2002; 159(4):599-606
- Martinez D, Gil R, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Perez A, Kegeles L, Talbot P, Evans S, Krystal J, Laruelle M, Abi-Dargham A. Alcohol dependence is associated with blunted dopamine transmission in the ventral striatum. *Biol Psychiatry*. 2005;58(10):779-86
- Molander, P, Vuola T. Disulfiraami ja maksahaitat. *Tabu – Lääketietoa lääkelaitokselta* 3/2007, 15. vuosikerta, s.21-22
- Moser EI, Kropff E, Moser M-B. Place Cells, Grid Cells, and the Brain's Spatial Representation System. *Annual Review of Neuroscience* 2008 Vol. 31:69-89
- Naassila M, Hammoumi S, Legrand E, Durbin P, Daoust M. Mechanism of action of acamprosate. Part I. Characterization of spermidine-sensitive acamprosate binding site in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22(4):802-9
- Plested AJR, Mayer ML. Structure and mechanism of kainate receptor modulation by anions. *Neuron*. 2007 (53) 829-841
- Poikolainen K, Leppänen K, Vuori E. Alcohol sales and fatal alcohol poisonings: a time-series analysis. *Addiction* 2002; (97): 1037-1040
- Poikolainen, K. Risk factors for alcohol dependence: A case-control study. *Alcohol and Alcoholism* 2000: 35(2) 190-196
- Poikolainen, K. Päihteet ja kansanterveys. Kirjassa Salaspuro, M & Kiianmaa K & Seppä K: Päihdelääketiede. Helsinki: Duodecim. 2003: 42-46
- Ramirez RL, Varlinskaya EI, Spear LP. Effect of the selective NMDA NR2B antagonist, ifenprodil, on acute tolerance to ethanol-induced motor impairment in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35(6):1149-59

Reynolds IJ, Miller RJ. Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Mol Pharmacol.* 1989; 36(5):758-765

Rasband WS. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2014

Salaspuro, M (2003): Alkoholiriippuvuuden lääkehoito. Kirjassa Salaspuro, M & Kiianmaa K & Seppä K: Päihdelääketiede. Helsinki: Duodecim. 336-345

Seppä, K. Alkoholiongelman varhaistoteaminen. Kirjassa Salaspuro, M & Kiianmaa K & Seppä K: Päihdelääketiede. Helsinki: Duodecim. 57-63

Sills MA, Fagg G, Pozza M, Angst C, Brundish DE, Hurt SD, Wilusz EJ, Williams M. [3H]CGP 39653: a new N-methyl-D-aspartate antagonist radioligand with low nanomolar affinity in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 1991; 192(1):19-24

Spanagel R, Vengeliene V, Jandeleit B, Fischer WN, Grindstaff K, Zhang X, Gallop MA, Krstew EV, Lawrence AJ, Kiefer F. Acamprosate produces its anti-relapse effects via calcium. *Neuropsychopharmacology.* 2014; 39(4):783-91

Stephenson FA. Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 2006 34: 877-81

Storvik M, Tiihonen J, Haukijärvi T, Tupala E. Amygdala serotonin transporters in alcoholics measured by whole hemisphere autoradiography. *Synapse.* 2007 61: 629-36

Storvik M, Tiihonen J, Haukijärvi T, Tupala E. Lower serotonin transporter binding in caudate in alcoholics. *Synapse.* 2006 59: 144-51

Storvik M, Haukijärvi T, Tupala E, Tiihonen J. Correlation between the SERT binding densities in hypothalamus and amygdala in Cloninger type 1 and 2 alcoholics. *Alcohol and Alcoholism.* 2008; 43(1):25-30

Sullivan JT, Sykora K, Schneiderman J, Naranjo CA, Sellers EM. Assessment of alcohol withdrawal: the revised clinical institute withdrawal assessment for alcohol scale (CIWA-Ar). *Br J Addict.* 1989; 84(11):1353-7

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos THL. Päihdetilastollinen vuosikirja 2013. Helsinki: Suomen yliopistopaino Oy, ISBN:978-952-302-013-9

Tupala, E. Dopamine Receptors and transporters in type I and II alcoholism measured with postmortem human whole hemisphere autoradiography. *Kuopio University Publications D. Medical Sciences* 258. 2001. 99 p

Tupala E, Hall H, Särkioja T, Räsänen P, Tiihonen J. Dopamine-transporter density in nucleus accumbens of type-1 alcoholics. *Lancet.* 2000;355(9201):380

Vuori E, Ojanperä I, Nokua J, Ojansivu R-L. Oikeuskemiallisesti todetut myrkytyskuolemat Suomessa vuosina 2002-2004. *Katsausartikkeli Suomen lääkäri-lehdessä* 2006; (21-22);.2339-2344