

OULUN SEUDUN
AMMATTIKORKEAKOULU



Ilpo Rajala, Jouko Roukala & Ida Smith

VAL201-PEPTIDIN VAIKUTUS ETURAUHASSYÖPÄSOLUISSA

VAL201-PEPTIDIN VAIKUTUS ETURAUHASSYÖPÄSOLUISSA

Ilpo Rajala, Jouko Roukala, Ida Smith
Opinnäytetyö
Syksy 2013
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä(t): Ilpo Rajala, Jouko Roukala, Ida Smith

Opinnäytetyön nimi: Val201-peptidin vaikutus eturauhassyöpäsoluissa

Työn ohjaaja(t): Simo Rasi, Paula Reponen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2013

Sivumäärä: 32 + 13 liitesivua

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä ja toiseksi yleisin miesten syöpäkuolemien syy Suomessa. Tutkimukset osoittavat, että osalla eturauhassyövistä kehittyminen ja kasvu ovat riippuvaisia androgeenivälitteisestä säätelystä. Tämä tieto on mahdollistanut uusien lääkkeiden kehittämisen eturauhassyövän hoitoon. Valirx on biolääketieteellinen yhtiö, joka kehittää ja tuottaa teknologiaa sekä tuotteita syövän hoitoon ja diagnostiikkaan.

Opinnäytetyössämme testasimme Valirxille heidän kehittämänsä lääkekomponentin Val201:n vaikutusta eturauhassyöpäsoluihin. Käytössämme olivat eturauhassyöpäsolulinjat PC-3 sekä LNCaP. Testasimme, kuinka Val201 vaikuttaa solujen lisääntymiseen sekä kuinka Val201 vaikuttaa PSA:n erittymiseen soluista. Tavoitteenamme on tuottaa soveltamiskelpoisia tutkimustuloksia, joita Valirx pystyy hyödyntämään lääkekomponentin kehittämisessä.

Käyttämämme menetelmät olivat WST-1 proliferaatio -menetelmä, jota käytimme solujen lisääntymisen tutkimiseen sekä CanAg PSA EIA -menetelmä, jolla mittasimme PSA:n erittymistä mediumiin. Molemmat ovat kaupallisia menetelmiä. Suoritimme testauksen yhteistyössä Valirx:n tytäryhtiön (ValiFinn) kanssa.

Saimme tuotettua merkittäviä tutkimustuloksia Val201:n monipuolisista vaikutuksista syöpäsoluihin. Tulosten avulla voidaan päätellä lääkekomponentin syöpäsoluja vähentävä vaikutus sekä androgeeniriippuvaisen että -riippumattoman eturauhassyövän yhteydessä. Eturauhassyöpädiagnostiikassa käytössä oleva PSA-arvo testissä väheni myös Val201:n vaikutuksesta.

Asiasanat: eturauhassyöpä, soluviljely, proliferaatio, androgeenit, psa

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences

Degree programme in Biomedical Laboratory Science

Author(s): Ilpo Rajala, Jouko Roukala, Ida Smith

Title of thesis: Val201 peptide affect on prostate cancer cells

Supervisor(s): Simo Rasi, Paula Reponen

Term and year when the thesis was submitted: Fall 2013

Number of pages: 32 + 13 appendices

Prostatic cancer is one of the most common cancers among men and the second most common cause of cancer related deaths in Finland. Research shows that in some of the prostatic cancers the development and growth are dependent on androgen mediated regulation. This information has provided the possibility to develop new medication for prostatic cancer treatment. Valirx is a biomedical company that develops technology and products for cancer treatment and diagnostics.

Valirx has produced a test peptide Val201 against prostatic cancer. The objective in this study was to investigate Val201's impact on prostatic cancer cells. We used in our study prostatic cancer cells PC-3 and LNCaP. We investigated the effects of Val201 on cell proliferation with different concentrations and also how Val201 effects the secretion of PSA of the cells. PSA value is used in prostatic cancer diagnostic. Our goal is to produce material that Valirx can utilize in their development of the new drug.

In our cell proliferation study we used a commercial WST-1 proliferation kit, and on PSA secretion study we used a commercial CanAg PSA EIA kit. Our study was conducted in cooperation with ValiFinn. ValiFinn is a subsidiary of Valirx.

We were able to produce research results of the diverse effects of Val201 on prostatic cancer cells. Judging from the results, Val201 has a subtractive effect on both androgen depended and independent prostatic cancer cells. Val201 also reduced the PSA value.

Keywords: prostatic cancer, cell culture, proliferation, androgens, psa

SISÄLLYS

JOHDANTO	5
1 OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELUPROSESSI JA TAVOITTEET	6
1.1 Organisaatio ja aikataulu	6
1.2 Laadunhallinta	7
2 ETURAUHASSYÖPÄ	9
2.1 Eturauhanen	9
2.2 Androgeenit ja niiden merkitys eturauhassyövässä	10
2.3 PC-3 & LNCaP -solulinjat	10
3 APOPTOOSI	13
4 PROJEKTIN TOTEUTUS JA MENETELMÄT	15
4.1 Soluviljely	15
4.2 Proliferaatio	17
4.2.1 WST-1 Proliferaatio	17
4.3 PSA-mittaus	18
4.3.1 CanAg PSA EIA	18
4.3.2 Mittaus spektrofotometrillä	20
5 TULOKSET JA ARVIOINTI	22
5.1 Proliferaatiokoe	22
5.1.1 LNCaP-tulokset	22
5.1.2 PC-3-tulokset	24
5.2 PSA-testi	26
5.2.1 PSA-tulokset	26
6 POHDINTA	28
LÄHTEET	30
LIITTEET	32

JOHDANTO

Työssämme tutkimme lääkekomponentti Val201:n vaikutusta eturauhassyöpäsoluihin. Kasvatimme koettamme varten ensin PC-3 sekä LNCaP eturauhassyöpäsoluja. Kun olimme saaneet tarpeeksi soluja säilöön nestetyypeen, aloimme suorittaa itse koetta. Oletuksena kokeelle oli, että Val201 vaikuttaa tiettyihin kinaaseihin katkaisten signaalin välittymisen solussa.

Yleisesti käytössä olevien eturauhassyöpälääkkeiden toimivuus perustuu androgeenin toiminnan estämiseen. Lääkkeiden vaikutukset voivat kuitenkin johtaa androgeeneistä riippumattomaan eturauhassyöpään, jolle tätä nykyä ei ole tehokasta hoitoa. Val201:n pitäisi pystyä hidastamaan myös tämälääkkeitä syöpämuotoja.

Suoritimme komponentin testauksen yhteistyössä ValiFinn:n kanssa. Valirx on Isobritannialainen biolääketieteellinen julkinen osakeyhtiö. Yhtiö kehittää ja tuottaa teknologiaa sekä tuotteita syövän hoitoon ja diagnostiikkaan (Valirx 2013, hakupäivä 22.2.2013). Valirx:llä on kehitteillä uusi lääke rinta- sekä eturauhassyövän hoitoon. He ovat tilanneet lääkekomponentin testauksen tytäryhtiö ValiFinn:ltä, joka sijaitsee Oulussa.

Tutkimme Val201:n vaikutusta solujen proliferaatioon kaupallisella WST-1 -testillä sekä PSA:n erittymistä soluista kaupallisella CanAg PSA EIA-testillä, joiden avulla selvitimme, mitä vaikutuksia Val201 saa aikaan LNCaP ja PC-3 solulinjoissa synteettisen androgeenin tai testosteronin läsnä ollessa sekä millainen vaikutus lääkekomponentilla on yleisesti eturauhassyöpämarkkerina käytetyn PSA:n arvoihin. Tutkimuksessamme kaikki solut ravintoaineiden loputtua kuolevat, eli ajautuvat apoptoosiin. Todistimme Val201:n ajavan syöpäsoluja normaalia nopeammin apoptoosiin, sillä kaikissa tekemissämme testeissä tuli selvästi esille Val201:n suurimpien pitoisuuksien vähentävä vaikutus elävien syöpäsolujen määrään sekä PSA-arvoon.

1 OPINNÄYTETYÖN SUUNNITTELUPROSESSI JA TAVOITTEET

Opinnäytetyön aiheen saatuaamme perehdyimme aluksi teoriataustaan sekä laadimme projektisuunnitelman. Tavoitteemme oli tuottaa soveltamiskelpoisia tutkimustuloksia, joita Valirx voi hyödyntää lääkkeenkehityksessä. Tutkimustulokset tulevat olemaan hyödyllisiä riippumatta siitä, toimiiko komponentti toivotulla tavalla vai ei. Ominä tavoitteinamme oli oman ammattitaidon kehittäminen ja itsevarmuuden lisääminen molekyylibiologisissa töissä. Projektin jälkeen toivomme, että meillä on parempi taito ja ymmärrys projektin ja tutkimustyön toteuttamisesta.

Tavoitteemme saavuttamiseksi luonnehdimme työllemme listan tehtävistä. Tehtävämme oli selvittää:

- Val201-peptidin vaikutus androgeeniherkkiin LNCaP-soluihin synteettisen androgeenin kanssa
- Val201-peptidin vaikutus androgeeneistä riippumattomiin PC-3-soluihin testosteronin kanssa
- Val201-peptidin vaikutus PSA:n erittymiseen LNCaP-soluista

1.1 Organisaatio ja aikataulu

Projektin suunnittelua ja toteutusta varten on muodostettava projektiorganisaatio, joka jäsentää projektin eri henkilöiden roolia ja vastuualueita. Projektiorganisaatio muodostuu usein kolmesta osasta: projektiryhmästä, ohjausryhmästä ja yhteistyökumppaneista (Silfverberg 2007, 49).

Projektimme asettajana projektiryhmässä toimivat sekä Valirx Plc (työmme tilaaja) että Oulun seudun ammattikorkeakoulu. Ohjausryhmäämme kuuluivat lehtori Paula Reponen ja kliininen kemisti Simo Rasi, jotka ohjasivat työmme sisältöä, hyväksyivät projektisuunnitelmamme ja projektimme väli- sekä lopputuloksen. Metodiohjaajana toimi lehtori Anneli Holmström.

Projektipäällikön tehtäviksi lukeutuvat projektiryhmän johtaminen ja ohjaaminen, projektin toteutumisesta huolehtiminen, sekä kustannusten arviointi ja silmällä pitäminen. Projektipäällikkönä oli Ilpo Rajala. Projektipäällikön avustajana toimivat projektisihteerinä Ida Smith ja projektityöntekijänä Jouko Roukala. Projektissamme päällikön ja sihteerin roolit ovat kuitenkin lähinnä nimellisiä ja kaikki toimivat tasavertaisina kollegoina.

Asiantuntijaryhmä koostui henkilöistä, joiden asiantuntemusta pystyimme käyttämään hyväksi projektin eri vaiheissa. Projektin sisältöasiantuntijoina toimivat lehtori Paula Reponen ja sairaalakemisti Simo Rasi auttoivat meitä projektin sisällöllisessä osuudessa sekä työskentelymenetelmissä ja tulosten tulkinnassa. Äidinkielen tuntiopettaja Marja Kuure toimi kantaa ottavana asiantuntijana projektimme kirjallisen osuuden asioissa, sekä englanninkielenopettaja Marketta Rusanen tarkisti ja kommentoi projektimme loppuraportin englanninkielisen abstract-osion kieliasun.

Tukiryhmäämme kuului joukko muita, projektimme osalta olennaisia henkilöitä, jotka tavalla tai toisella vaikuttivat projektimme etenemiseen ja valmistumiseen. Vertaisarvioijina eli opponoina meillä toimi kolme henkilöä, jotka toteuttavat samaa projektia, mutta eri solulinjoilla. He pystyivät tarvittaessa antamaan meille tukea projektimme eri vaiheissa, sekä pyydettäessä esittämään omia näkökulmiaan projektistamme. Vertaisarviointia ja -tukea saimme myös koko bio0sn -ryhmältä. Tietoteknisten ja tiedonhakuun liittyvien ongelmien ilmettyä koulustamme löytyi myös atk-teknillistä tukea, joiden avulla nämä ongelmat saatiin ratkaistua.

Itse projektin, soluviljelyn sekä Val201-peptidin testauksen, aloitimme keväällä 2013. Kasvatimme soluja noin 2 kuukautta ja tämän jälkeen suoritimme soluproliferaation sekä PSA-mittauksen soluille. Työn saimme valmiiksi toukokuun lopulla. Pysyimme suurilta osin laatimassamme aikataulussa, mutta kesän lähestyessä jouduimme tiivistämään työn viimeisiä vaiheita. Aikataulun tiivistäminen ei kuitenkaan vaikuttanut työn suoritukseen.

1.2 Laadunhallinta

Projektimme vaati toimia, jotta työskentelyn ja tulosten laatu saatiin pidettyä mahdollisimman korkealla. Heti projektityöskentelyn käynnistyttyä aloimme pitää laboratoriopäiväkirjaa, johon kirjasimme päivittäin soluviljelylaboratoriossa tekemämme työskentelyn sisällön. Näin pystyimme tarkistamaan projektin aikana ja sen jälkeenkin eri päivinä tehdyt työvaiheet, jos jotain kysymyksiä tai epäilyjä koskien jotain projektin spesifistä vaihetta ilmenee, tai jos halutaan jäljittää epäiltyä ongelmakohtaa, kuten epäonnistumista työskentelyssä.

Noudatimme työskentelyssä GLP:n (Good Laboratory Practice) mukaisia käytäntöjä. GLP on laatujärjestelmä, joka toimii laadukkaan laboratoriotyöskentelyn ohjenuorana. Tämän

laatujärjestelmän ohjeiden noudattamisen tarkoituksena on taata luotettavia testituloksia. (OECD 1998, hakupäivä 19.9.2013).

Välineistön, reagenssien, mediumien ja muiden tarvikkeiden osalta pidimme tiukan linjan laadunhallinnallisista syistä. Kaikki välineet joita käytimme, olivat luotettavilta valmistajilta peräisin ja steriilejä. Myös mediumit sekä reagenssit hankittiin luotettavilta, kaupallisilta yhtiöiltä, kuten myös solulinjat. Käyttöpäiväyksien tarkistaminen, sekä silmämääräinen ulkoinen arviointi tehtiin jokaiselle välineelle, elatusaineelle ja reagenssille ennen käyttöönottoa.

Työskentelytilat puhdistettiin ennen projektin alkua, sekä projektityöskentelyn aikana suorittamalla tilojen puhdistusta desinfektioaineilla joka kerta työskentelyn yhteydessä. Lisäksi kaikista työskentelystä syntyneistä välineroskista, biojätteistä sekä muista jätteistä hankkiuduttiin välittömästi eroon GLP:n laatujärjestelmän ohjeiden mukaisesti.

Projektissamme käytetyt solulinjat on hankittu eettisten standardien mukaan toimivalta organisaatiolta (ATCC), jolla on 85 vuoden kokemus biologisten materiaalien tarjonnasta tutkimustyöhön (ATCC 2013, hakupäivä 21.2.2013). Oma työskentelymme soluviljelmien parissa tapahtui steriilejä suojaimia, materiaaleja ja välineitä käyttäen, jolloin viljelmien kontaminaatiovaara saatiin mahdollisimman vähäiseksi. Koko viljelylaboratoriotila on puhdistettu perusteellisesti kemiallisilla desinfektioaineilla ja inkubaattorin ilmanvaihdossa käytetään laadukkaita HEPA -suodattimia, joten pinnoilta tai laboratorion ulkopuolelta tulevien haitallisten mikrobien (homeet, pölyt, hiivat) uhka viljeltäville soluille on hyvin minimaalinen.

2 ETURAUHASSYÖPÄ

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä ja toiseksi yleisin miesten syöpäkuolemien syy Suomessa. Uusien tapausten ilmestyminen kasvoi vuoteen 2005 asti voimakkaasti, mutta kasvu on tasaantunut prostataspesifisen antigeenin(PSA) testauksen yleistymisestä johtuen. Vanhenemisella on selvä yhteys syöpäriskin kasvamiseen: yli 40-vuotiailla eturauhassyöpää on löydetty huomattavasti enemmän, kuin nuoremmilla ikäluokilla. (Suomen syöpärekisteri 2012, hakupäivä 21.1.2013.) Iän lisäksi syöpäriskin vaikuttavat perintötekijät, runsas rasvan saanti, lihavuus ja tupakointi. (Duodecim 2012, hakupäivä 21.1.2013).

Eturauhassyöpä on hyvin monimuotoinen tauti. Syöpään johtavien mutaatioiden satunnaisuuden takia jokainen eturauhasen syöpä on yksilöllinen - tästä syystä oireet ja kliiniset toimenpiteet vaihtelevat tapausten kesken (Gelmann 2008.) Oireita voivat olla tiheä virtsaamistarve, virtsasuihkun heikkous, virtsatietulehdus, verivirtsaisuus tai luustokivut kylkiluissa ja selkärangassa. Huomioitavaa on tosin, että virtsaamishäiriöitä aiheuttavat monet muutkin sairaudet, joten pelkkien oireiden perusteella diagnoosia on mahdoton tehdä. (Nurmi, Lukkarinen, Ruutu, Taari & Tamminen 2002, 243.)

2.1 Eturauhanen

Eturauhanen sijaitsee lantionpohjan lihasten päällä, virtsarakon alapuolella ja ympäröi virtsaputken alkuosaa. Eturauhanen jaetaan neljään vyöhykkeeseen. Etuvyöhyke koostuu side- ja lihaskudoksista eikä sisällä rauhaskudosta. Rauhasrakenteet muodostavat keskusvyöhyke ja perifeerinen vyöhyke. Välittömästi virtsaputken ympärillä kurojalihaksen ja keskusvyöhykkeen välissä on välivyöhyke. Valtaosa eturauhassyövistä lähtee liikkeelle perifeerisen vyöhykkeen alueelta. (Nurmi ym. 2002, 37-39.)

Eturauhasen tehtävä on erittää ja varastoida nesteitä, jotka luovat siittiöille sopivan ympäristön. Nesteet ovat osa siemennestettä, jossa ne edesauttavat siittiöiden elinkykyä ja liikkuvuutta. (Nurmi ym. 2002, 36-37.)

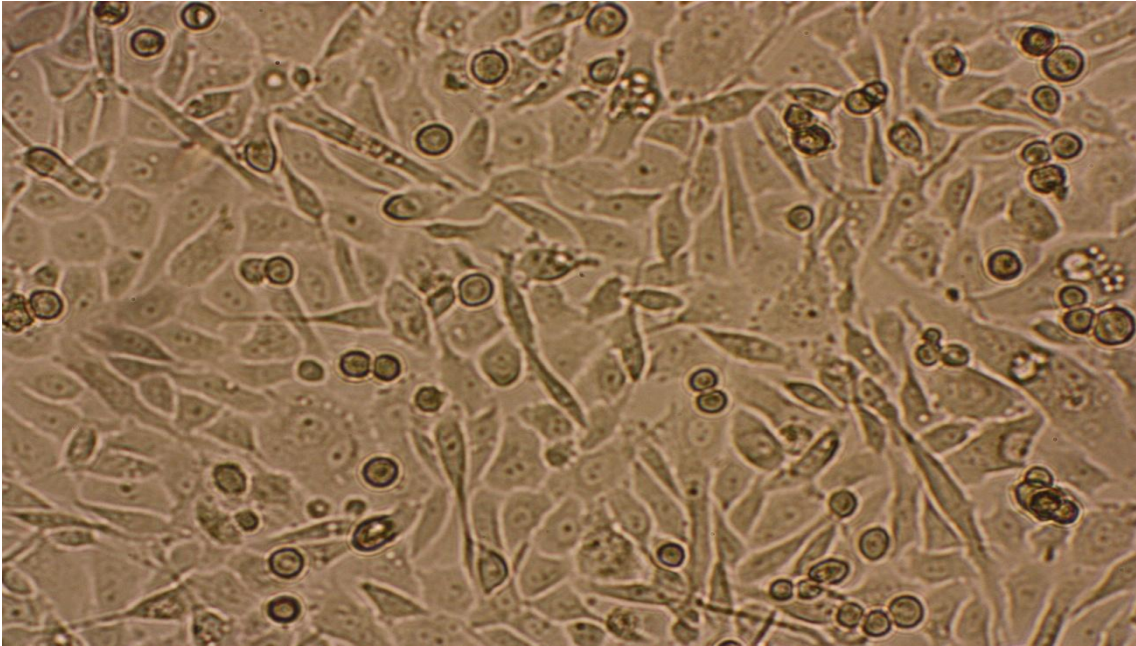
2.2 Androgeenit ja niiden merkitys eturauhassyövässä

Androgeenit eli "mieshormonit" ovat eturauhasen rakenteen kehittymiselle ja toiminnalle välttämätön säätelytekijä. Androgeenien ansiosta eturauhasen kudokset erittävät kasvutekijöitä, jotka toimivat eturauhasen toiminnan ja solujakautumisen säätelijöinä. Samalla tavalla eturauhasen syöpien kehittyminen ja kasvu ovat riippuvaisia androgeenivälitteisestä säätelystä. Se, joka androgeenien vaikutuksia välittää, on androgeenireseptoriproteiini, jota esiintyy kaikissa androgeenivälitteisen säätelyn alaisissa kudoksissa. Myös androgeenireseptorin synteesi on androgeenien säätelemä. (Gelman 2008.)

Edellä mainittua tietoa käytetään hyväksi edenneen eturauhassyövän lääkkeissä ja niiden kehittämisessä. Tyypillisinä esimerkkeinä ovat androgeeninriistohoidot, joissa androgeenien määrää pyritään vähentämään verenkierrossa, sekä androgeenireseptorisalpaajat, jotka estävät androgeenireseptorien aktivoitumista. Ongelmana on, että hoidon seurauksena androgeenivälitteisestä säätelystä vapautuvat syöpäsolut lisääntyvät, mikä aiheuttaa usein androgeeneistä riippumattoman syövän, johon ei tätä nykyä ole parantavaa hoitokeinoa. (Gelman 2008.)

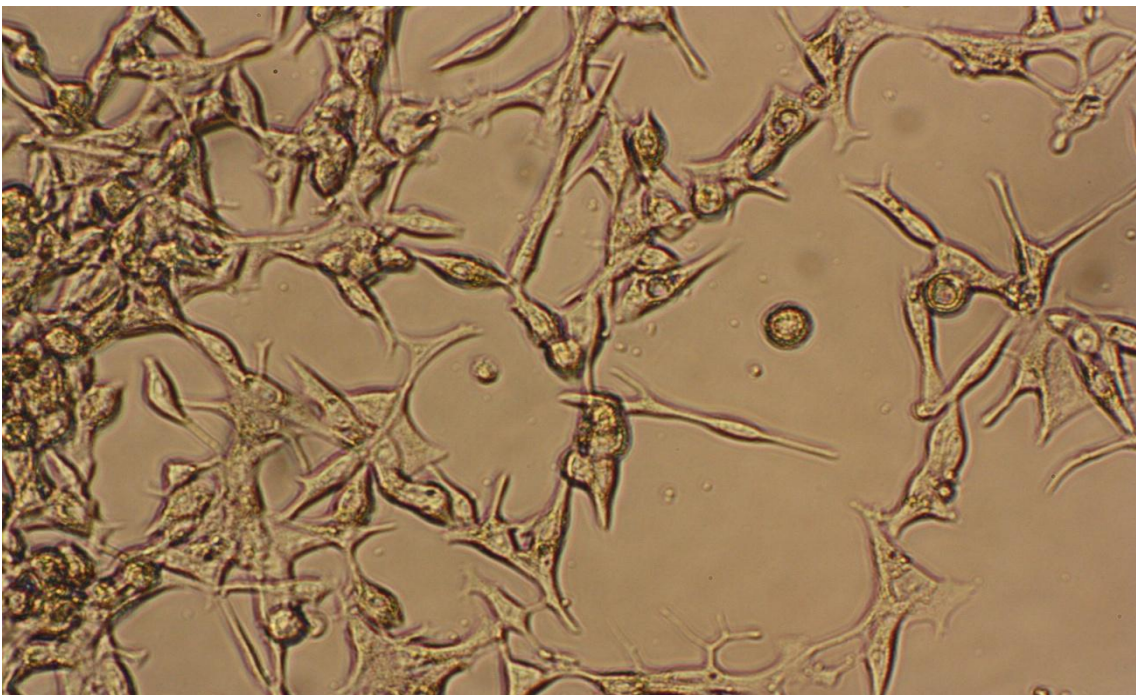
2.3 PC-3 & LNCaP -solulinjat

PC-3-solulinjat ovat peräisin IV -tyypin eturauhassyöpää sairastaneen miehen luumetastaasista ja ne eristettiin ensimmäisen kerran 1979. Niitä käytetään paljon edenneeseen eturauhassyöpään liittyvissä tutkimuksissa, tarkemmin niiden biokemiallisiin ominaisuuksiin liittyen sekä niiden reaktioihin kemoterapiaa kohden. PC-3-solut ovat ominaisuuksiltaan hyvin metastasoivia, joten niiden tutkiminen on tärkeää eturauhassyövän mekanismien ymmärtämiseksi. Ne eivät myöskään reagoi androgeeneihin tai glukokortikoideihin eivätkä tuota prostata-spesifistä antigeenia (PSA). (Pubmed 1979, hakupäivä 4.10.2013.)



KUVIO 1. PC-3-soluja

LNCaP-solut ovat alkujaan ihmisestä eristettyjä androgeeniherkkiä eturauhassyöpäsolujen kloonija. Nämä solut eristettiin vuonna 1977 erään eturauhassyöpää sairastaneen miehen metastaattisesta leesiosta. Kyseisten solujen käyttö on laaja-alaista onkologiassa, sillä ne tuottavat PSA:ta, kasvavat hyvin *in vitro* -olosuhteissa ja jakautuvat nopeasti (jakautumisaika n. 60 tuntia) sekä ovat alttiita androgeenien vaikutukselle. (Pubmed 1983, hakupäivä 5.10.2013.)



KUVIO 2. LNCaP -soluja

PC-3 ja LNCaP -solulinjat ovat siis toiminnaltaan hyvinkin erilaisia. LNCaP-solujen on huomattu fysiologiselta toiminnaltaan olevan lähempänä adenokarsinoomatyypistä (rauhasepiteelistä lähtenyttä) syöpää kuin PC-3-solut *in vitro* -olosuhteissa. (Pubmed 1983, hakupäivä 5.10.2013.)

3 APOPTOOSI

Apoptoosi on ohjelmoitu solukuolema, jossa solut noudattavat valmiina olevaa toimintaohjelmaa. Apoptoosin jälkeen on jäljellä rakkuloita, jotka sisältävät hajonneen solun osia. Solun DNA hajoaa eripituisiksi paloiksi, tuma hajoaa pienemmiksi kappaleiksi ja solun tukiranka hajoaa. Solun solukalvo poimuuntuu ja muodostuu rakkuloita, joiden sisässä on solumateriaalia. Fagosytoivat solut fagosytoivat rakkulat sisäänsä sekä tuhoavat lopullisesti solun makromolekyylit. Apoptoosiohjelma estää solunsisäisten molekyylien joutumisen solukalvon ulkopuolelle. Koska materia pysyy aina solukalvon sisässä, ei synny tulehdusreaktiota. Apoptoosi on hallittu prosessi, haluttu lopputulos. Solu käynnistää apoptoosin esimerkiksi, jos solu käy turhaksi tai haitalliseksi. On tärkeää, että solun elämänsä päättyy apoptoosiin. Apoptoosin toiminnan estymisen on todettu olevan oleellinen osa syövän syntyyn liittyviin solumuutoksiin. (Heino & Vuento 2007, 281-286.)

Solu tietää käynnistää apoptoosin, kun solun pinnalla olevat tietyt reseptorit aktivoituvat tai kun esimerkiksi DNA-vaurio johtaa sisältä käsin ohjelmoituun apoptoosin käynnistykseen. Oli sitten apoptoosin käynnistävä tekijä solun ulkoinen tai sisäinen, on lopputulos aina sama sekä apoptoosi tapahtuu aina samoin mekanismein. (Heino & Vuento 2007, 281-286.)

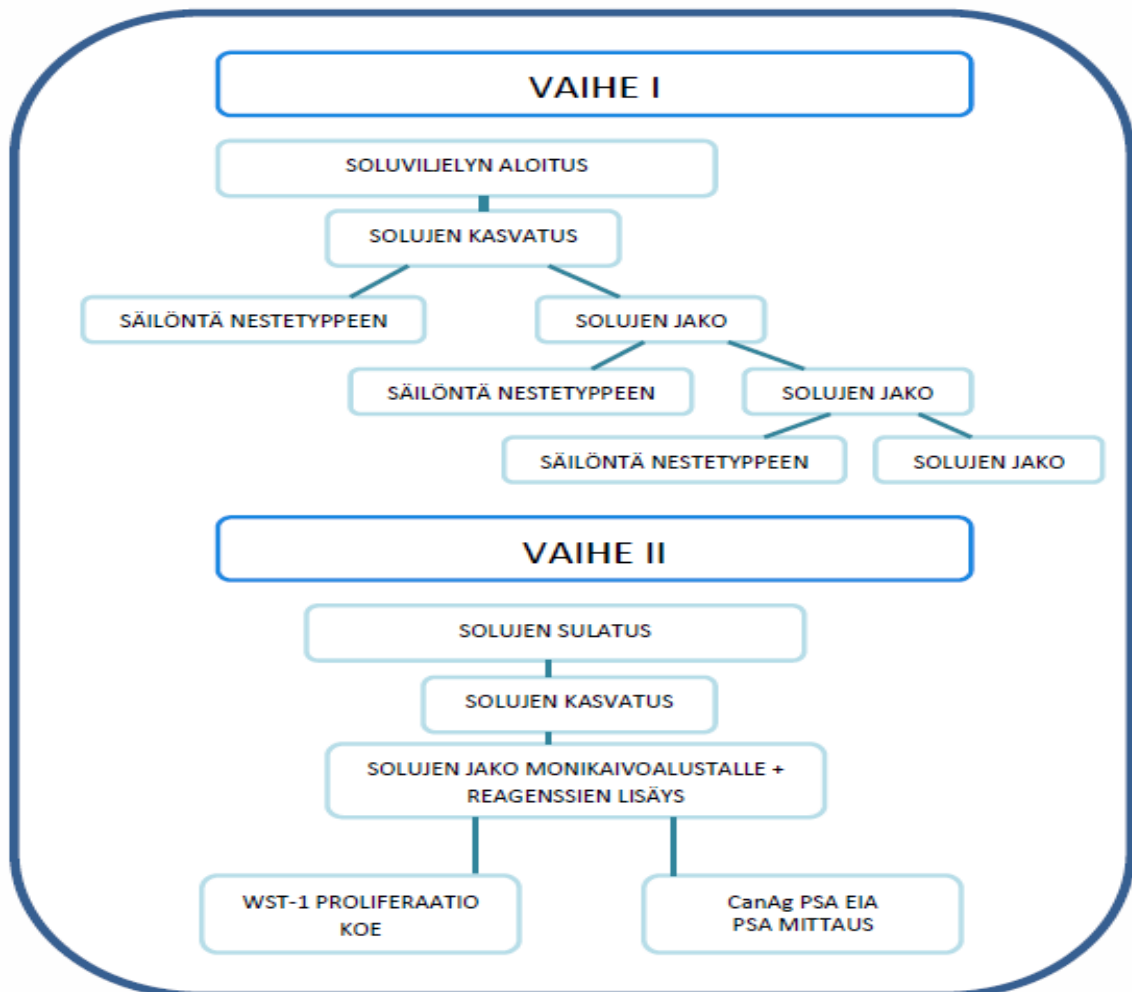
Solun pintareseptorit esimerkiksi CD95 (Fas) sekä tuumorinekroositekijän reseptori 1(TNFR-1), voivat käynnistää apoptoosin. Solun sisällä mitokondrio reagoi solun mahdollisiin stressitekijöihin (mm. myrkylliset lääkeaineet, virukset, säteily) erittämällä sytokromi c:tä. Sekä reseptorin aktivoituminen että sytokromi c:n erittyminen aiheuttavat kaspasien aktivoitumisen. Kaspasit ovat ryhmä solunsisäisiä kysteini-proteaaseja, jotka voidaan jakaa kahteen toiminnalliseen ryhmään. Aloitteentekijäkaspasit laukaisevat suorittajakaspasien aktiivisuuden. Suorittajakaspasit hajottavat useita solun proteiineja. Osa kaspaseista itse hajottavat solun rakennetta, kun taas toiset poistavat inhibiittoreita entsyymeistä mahdollistaen entsyymin toiminnan. Esimerkiksi DNA:n hajoaminen tapahtuu, kun kaspasit poistaa nukleasiin inhibiittorin. Osa kaspaseista taas hajottavat apoptoosin estäjiä. Näiden kolmen toiminnan summana solun sisältö hajoaa ja muodostuu solurakkuloita. Jotta suorittajakaspasit pystyvät toimimaan, on aloitteentekijäkaspasien proteolyttisesti pilkottava siitä pois prodomeerit ja kaspasista muodostuu dimeeri. Dimeeri on yhdiste, joka koostuu kahdesta identtisestä tai samankaltaisesta

molekyylistä. Prodomeni on toiminnallisesti tai rakenteellisesti itsenäinen osa. (Heino & Vuento 2007, 281-286.)

4 PROJEKTIN TOTEUTUS JA MENETELMÄT

Aloitimme projektin solujen kasvatuksella. Kasvatimme sekä keräsimme nestetyypeen säilöön tarvittavan määrän PC-3 sekä LNCaP-eturauhassyöpäsoluja. Näillä soluilla tutkimme solujen proliferaatiota ja sen muutosta Val201:n lisäyksen jälkeen sekä soluviljelmien mediumiin erittyneen PSA:n määrää. Projektimme jakautui siis kahteen erilliseen työvaiheeseen.

TAULUKKO 1. Projektin työvaiheet



4.1 Soluviljely

Soluviljely tarkoittaa tekniikkaa, jonka avulla eukaryoottisoluja voidaan lisätä *in vitro* -oloissa. Soluviljely on siis solujen kasvattamista alustalla elävän organismin tai solun ulkopuolella. Jotta soluviljely onnistuisi, on viljelyolosuhteiden oltava mahdollisimman samankaltaiset, kuin ne

olisivat todellisuudessa *in vivo* -olosuhteissa. Pyritään luomaan samanlainen ympäristö kuten elävän organismin tai solun sisällä. (Turpeenoja 2005, 226,186.)

Päätekijät onnistumisen takaamiseksi ovat ravintoaineet, kasvutekijät, pH sekä lämpötila. Soluviljelyssä käytetään elatusnestettä, joka sisältää solun elämälle välttämättömät orgaaniset ja epäorgaaniset aineet. Näitä aineita ovat mm. aminohapot, glukoosi, vitamiinit, ionit, vesi. Elatusnesteen pH on säädetty puskurien avulla sekä usein sen mukaan, millaista solua kasvatetaan, on elatusaineeseen lisätty myös seerumia, joka sisältää kasvutekijöitä. Kasvatuksen aikana lämpötila, kosteus sekä happi- ja hiilidioksidipitoisuus pidetään vakiona. (Turpeenoja 2005, 186–187.)

Tärkeää on myös työtilojen puhtaus. Soluviljelmät ovat herkkiä kontaminaatioille ja tämän vuoksi vaativat puhtaan ja steriilin työympäristön sekä välineet. Puhtautta ylläpidetään mm. erillisellä soluviljelyhuoneella, jossa viljely suoritetaan laminaarikaapissa. Työntekijät huolehtivat omasta hygieniastaan sekä käyttävät pitkähihaisia työtakkeja. Käytettävät liuokset, välineet sekä kaikki, mikä on kosketuksissa soluviljelmän kanssa, on huolellisesti sterilisoitava. Viljelmän kontaminaation voi aiheuttaa erilaiset mikro-organismit (esim. bakteeri, mykoplasma, hiiva). Kaikki kontaminaation aiheuttajat on otettava huomioon työskentelyssä. Tartunta voi tulla ilmasta, työskentelytasoista, liuoksista ynnä muusta, mikä on kosketuksissa viljelmän kanssa. Työskentelyolot on mahdoton pitää täysin steriileinä, mutta niiden tulee olla puhtaita. (Freshney 2005, 73.)

Kasvatimme soluja noin kaksi kuukautta. Tämän kahden kuukauden aikana säilöimme säännöllisin väliajoin osan soluista nestetyypeen sekä jaoimme solut uudelle kasvualustalle kasvamaan. Solut käyttävät kasvamiensa elatusnesteessä (medium) olevia ravintoaineita. Kun ravintoaineet loppuvat tai solujen kasvuympäristön pinta-ala loppuu, alkavat solut kuolla. (Turpeenoja 2005, 186-187) Tämän vuoksi on solut muutaman päivän jälkeen joko säilöttävä nestetyypeen tai jaettava kasvamaan uudelle kasvualustalle uudessa elatusaineessa. Soluja kasvatimme 37 °C lämpötilassa sekä 5 % hiilidioksidipitoisuudessa. Elatusnesteinä käytimme LNCaP-soluissa DMEM mediumia sekä PC-3 soluissa RPMI mediumia.

Pipetoimme loppuksi solut, Val201 peptidin, R1881, testosteronin sekä kasvumediumin 96-kuoppalevylle. Aluksi solut laskettiin ja jokaiseen kuoppaan lisättiin noin 50 000 solua. R1881 lisättiin LNCaP-soluihin kahtena eri pitoisuutena, 1 nM ja 10nM. R1881 on synteettinen

androgeeni, joka LNCaP-soluissa vahvistaa kasvureaktiota, sillä LNCaP on androgeeniherkkä solulinja. Se laitettiin testiin mukaan "kilpailuttamaan" Val201:sä. LNCaP-solut sekä R1881 luovat eturauhassyöpätyypin koeympäristön, jossa R1881 kiihdyttää solujen jakaantumista, kuten androgeenit normaalisti kehossa eturauhassyövässä. Tavoitteena oli nähdä, kuinka Val201:ssä riittää tehoa hidastamaan tällaista kasvua, ja saada selville, kohdistuuko Val201:n vaikutus hormonaaliseen signaalintireittiin vai johonkin muuhun? Siksi lisäsimme 1nM:n ja 10nM:n pitoisuudet R1881:stä. Testosteronia lisättiin PC-3-soluihin myös kahtena eri pitoisuutena, 1nM ja 10nM. Oletuksena on, että androgeeneistä riippumattomissa PC-3-soluissa pitoisuusero ei pitäisi näkyä. Niiden ei pitäisi vaikuttaa mitenkään PC-3 solukasvua estävästi eikä millään tavalla hidastaa Val201:n tehoa.

Teimme yhteensä 3 sisällöltään identtistä 96-kuoppalevyä. Aina yhdellä mittauskerralla otimme käsittelyyn yhden alustan ja jätimme loput kasvamaan seuraavaan kertaan. Näin seurasimme myös kasvuajan vaikutusta tuloksiin.

4.2 Proliferaatio

Kun solut on saatu soluviljelymenetelmällä soluille ihanteelliseen ympäristöön, alkavat solut kasvaa. Kasvu voi perustua yksittäisten solujen suurenemiseen tai solujen lukumäärän lisääntymiseen. Proliferaatiolla tarkoitetaan solujen lukumäärän lisääntymistä. (Niemi, Virtanen, Vuorio 1994.) Toteutimme solujen proliferaatiotestin käyttäen kaupallista WST-1-proliferaatiomenetelmää. Tulokset saimme mittaamalla soluviljelmien absorbanssin monikaivospektrofotometrillä. Mittaus suoritettiin LNCaP-soluille 24.5.13, 27.5.13 ja 29.5.13. PC-3 soluille mittaukset suoritettiin samoina päivinä sekä myös 30.5.13.

4.2.1 WST-1 Proliferaatio

Metodi perustuu reaktioon, jossa solun entsyymit pilkkovat tetrasolium-suolat värilliseksi formatsaaniksi. Kokeessa lisätään WST-1-reagenssia mittauksen kohteena olevaan soluliukseen, jossa solujen entsyymit pilkkovat WST-1-reagenssin tetrasolium-suolat formatsaaniksi. Soluliuksesta alkaa muodostua formatsaanipohjaista väriä. Kun elävien solujen määrä lisääntyy, kasvaa myös mitokondriaalisten dehydrogenaasien kokonaisaktiivisuus näytteessä. Dehydrogenaasi on entsyymi, joka hapettaa substraatin pelkistysreaktiolla. Tämä entsyymien aktiivisuuden lisääntyminen taas johtaa suurempaan formatsaanivärin määrään, joka taas suoraan korreloi aineenvaihdunnallisesti aktiivisten solujen määrään viljelmässä.

Aineenvaihdunnallisesti aktiivisten solujen (elävien solujen) tuottaman formatsaaniväriin määrä mitataan monikaivospektrofotometrillä. (Roche Applied Sciences. 2011, hakupäivä 16.5.2013.)

Lisäsimme kaivoihin pipetointikaavion(liite 3) mukaisesti solut (PC-3 & LNCaP), Val201:n sekä muut reagenssit. Kun kaikki komponentit oli lisätty, siirrettiin kuoppalevyt lämpökaappiin. Mittasimme absorbanssin levyiltä tietyin väliajoin, näin seurassimme proliferaatiota kasvatuksen aikana sekä arvioimme tulosten perusteella Val201:n vaikutusta solujen lisääntymiseen.

Absorbanssi mitattiin Victor-spektrofotometrillä kahdella eri aallonpituudella, 450 nm ja 650 nm.

4.3 PSA-mittaus

PSA:n, prostataspesifisen antigeenin, on todettu olevan koholla eturauhassyövän yhteydessä. Seerumin PSA määrittelyllä on tärkeä merkitys diagnostiikassa ja syövän levinneisyyden arvioinnissa. Korkeita S-PSA pitoisuuksia on havaittu erityisesti levinneissä prostatasyövissä. (Holmia ym. 2006, 680–618.) Kun syöpä alkaa kehittyä eturauhasessa, prostataspesifistä antigeenia pääsee vereen ja sen taso veressä nousee. (Norlèn ym. 2008, 36).

PSA on eturauhasepiteelin solujen tuottama proteaasi, proteiinia pilkkova entsyymi, jonka tehtävä on säilyttää ejakulaatti nestemäisenä. (Holmia ym. 2006, 680–618.) PSA muuttaa siemennesteen helposti juoksevaksi, jotta siittiöt pääsevät liikkumaan paremmin. (Norlèn ym. 2008. 36). Entsyymiä kutsutaan prostataspesifiseksi koska se on eturauhasepiteelin tuottamaa. (Holmia ym. 2006, 680–618).

PSA mitattiin soluviljelmän mediumista kaupallisella CanAg PSA EIA-menetelmällä. Mediumia kerättiin aina viikon välein kahden viikon ajalta ja pakastettiin näytteen säilymisen vuoksi. PSA:t mitattiin sulaneista näytteistä yhdellä kertaa 29.5.13.

4.3.1 CanAg PSA EIA

CanAg PSA EIA on immunokemiallinen menetelmä. Immunokemiallisessa määrittelyssä mitataan joko yhdisteen antigeenin (Ag) tai vasta-aineen (antibody, Ab) pitoisuutta käyttäen hyväksi antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen ominaisuutta sitoutua toisiinsa. PSA on prostataspesifinen antigeeni. Antigeenilla tarkoitetaan yhdistettä, joka sitoutuu spesifiseen vasta-

aineeseen sekä vasta-aineilla tarkoitetaan immunoglobuliineja, jotka kykenevät sitomaan erilaisia luonnossa olevia tai synteettisiä yhdisteitä. (Halonen 2004, 90.)

Immunokemiallisia määrittämenetelmiä ovat joko kilpaileva tai ei-kilpaileva kaksoisvasta-aineisiin perustuva menetelmä. (Halonen 2004, 90.) CanAg PSA EIA perustuu menetelmään, jossa käytetään kahta vasta-ainetta. (Fujirebio Diagnostics Inc. 2009, hakupäivä 16.5.2013). Kaksoisvasta-ainemenetelmässä toinen vasta-aine on sidottu esim. kuoppalevyn kuopan pintaan kiinni. Näytteen lisäämisen jälkeen mahdollinen antigeeni tarttuu pohjassa kiinni oleviin vasta-aineisiin. Tämän jälkeen ylimääräiset ei-sitoutuneet yhdisteet pestään helposti pois ja lisätään leimattu vasta-aine. Leiman avulla voidaan havainnoida sitoutuneet vasta-aineet. Leimattu vasta-aine sitoutuu myös tutkittavaan antigeeniin. Jälkeen pestään pois ei-sitoutuneet vasta-aineet ja jäljelle jää vain muodostuneet kaksoisvasta-ainekompleksit. Kiteytettynä kaksoisvasta-ainemäärittämissä muodostuu vasta-aine kompleksi ns. sandwich. Lopuksi sitoutunut leimattu vasta-aine määritetään. Leimatun vasta-aineen määrä on suoraan verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. (Halonen 2004, 90-92.)

CanAg PSA EIA menetelmässä käytetään hiirestä eristettyjä biotinyloitua anti-PSA monoklonaalista vasta-ainetta sekä piparjuuriperoksidaasilla (HRP) leimattua anti-PSA monoklonaalista vasta-ainetta. (Fujirebio Diagnostics Inc. 2009, hakupäivä 16.5.2013). Monoklonaalilla vasta-aineella tarkoitetaan yhden antigeenin tietylle epitopille (antigeenin sitoutumiskohta) spesifistä vasta-ainetta. (Solunetti 2006, hakupäivä 3.9.2013). Koska menetelmässä käytetään spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita, voidaan näyte ja leimattu vasta-aine inkuboida samanaikaisesti ensimmäisen vasta-aineen kanssa. (Halonen 2004, 92). Muodostuneet kompleksit sitoutuvat kiinni kaivon pohjaan kiinnitettyyn streptavidiniin. (Fujirebio Diagnostics Inc. 2009, hakupäivä 16.5.2013)

EIA tarkoittaa entsyymi-immunomäärittystä. EIA:ssa leimana käytetään entsyymejä, tässä tapauksessa piparjuuriperoksidaasia. Entsyymileima tarvitsee substraatin, joka aikaansaa havaittavan reaktion. (Halonen 2004, 94). Tämä entsyymireaktio muodostaa värin näytteessä. Käyttämässämme menetelmässä näytteessä oleva PSA-antigeeni värjäytyy siniseksi. Värin voimakkuus on suoraan verrannollinen PSA:n määrään näytteessä. Mitä voimakkaampi väri, sitä enemmän PSA:ta on näytteessä. (Fujirebio Diagnostics Inc. 2009, hakupäivä 16.5.2013.) Kun vasta-aineet sekä antigeeni ovat inkuboituneet kaivoissa tunnin verran, pestään pohjaan sitoutumattomat kompleksit pois. Seuraavaksi lisätään HRP-substraattia värireaktion

aikaansaamiseksi ja sen jälkeen 30 min substraatin lisäyksestä stop-reagenssia, joka estää reaktion etenemisen. Näytteen absorbanssi mitataan stop-reagenssin lisäämisen jälkeen aallonpituudella 405nm. Absorbanssi mitataan 15 min kuluessa. (Fujirebio Diagnostics Inc. 2009, hakupäivä 16.5.2013.) Liitteessä 3 on esitetty tarkempi työohje menetelmälle.

Menetelmä on laimentamatta luotettava PSA:n pitoisuuteen 60 µg/L asti, jolloin sitä suuremmista arvoista ei voi tuottaa laadukkaita tuloksia. Työssämme käyttämät solut erittivät runsaasti enemmän PSA:ta, joten laimensimme näytteet naisseerumilla. Laimennussuhteeksi päätimme valita 1:20, jolloin lopulliset tulokset oli kerrottava vielä 20:llä.

4.3.2 Mittaus spektrofotometrillä

Entsyymien sekä substraatin reaktiossa muodostuneen reaktiotuotteen määrä mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä. Spektrofotometrin toiminta perustuu näytteeseen tulevan ja sen läpi kulkeneen valon intensiteettien suhteen mittaamiseen aallonpituuden funktiona. Mitä enemmän näytteessä on ollut PSA:ta, sitä enemmän on muodostunut väriainetta ja sitä suurempi on näytteen absorbanssi. Mitä tummempi näyte on, sitä vähemmän se päästää valoa lävitseen. (Jaarinen ym. 2005, 55,61.)

CanAg PSA EIA menetelmän mukana tulleiden kalibraatioliuoksilla mitattiin tutkimukselle kalibraatiokäyrä. Kalibroinnissa käytetään vertailumateriaaleja, joissa pitoisuus on tunnettu. Menetelmän kalibraatioliuosten pitoisuudet olivat 0 µg/L, 1 µg/L, 2 µg/L, 10 µg/L, 30 µg/L ja 60 µg/L. Kalibroitiliuokset sisälsivät ihmisen PSA:ta Tris-HCL puskuroidussa suolaliuoksessa, sisältäen myös härän seerumin albumiinin, reagoimattoman keltaisen väriaineen sekä 0,01% metyyli-isotiatsolinonia (MIT). (Fujirebio Diagnostics Inc. 2009, hakupäivä 16.5.2013.) Pitoisuuksien avulla määritetään mittaussignaalin tason ja analyytin pitoisuuden välinen yhteys, eli kalibraatiokäyrä.

Kalibroinnin pysyvyyttä ja tulosten luotettavuutta testataan kontrollinäytteillä. Kontrollinäytteet ovat liuoksia, joiden pitoisuus tunnetaan. (Jaarinen ym. 2005, 18,25.) Testissä käytettiin menetelmän mukana tulleita kontrolleja 1 ja 2 (pitoisuudet 2,8-5,2 µg/L ja 14,4-21,6 µg/L). Kontrollit sisälsivät ihmisen PSA:ta Tris-HCL puskuroidussa suolaliuoksessa, jossa myös härän

seerumin albumiinia sekä säilöntäaineena 0,01% metyyli-isotiatsolinoni (MIT). (Fujirebio Diagnostics Inc. 2009, hakupäivä 16.5.2013.)

5 TULOKSET JA ARVIOINTI

Tulosten analysoinnissa täytyi yrittää nähdä kokonaiskuva yksittäisten tulosten joukosta, sillä saamiemme tuloksia ei voida sanoa täysin tarkoiksi useiden muuttujien takia. Voidaan spekuloida esimerkiksi, ovatko juuri sama määrä soluja mittauskaivoa kohti, kerkeävätkö käyttämämme reagenssit vaikuttaa ensimmäisen päivän mittauksissa vielä ja alkaako 6.-8. päivien kohdalla niiden vaikutus jo lakata kaivoista. Tämän takia otimme muita mittauspäiviä enemmän huomioon neljännen päivän tulokset, jotka mielestämme näyttivätkin laadukkaimmilta. Opinnäytetyön kaikki tulokset löytyvät liitteistä 2-9.

Kaavioissa pitoisuudet on merkitty selkeytyksen vuoksi potenssimuotoihin. Esimerkiksi 1nM pitoisuus on merkitty potenssiksi 10^{-9} ja 10nM potenssiksi 10^{-8} . R1881 synteettinen androgeeni on merkattu isolla kirjaimella R ja testosteroni isolla kirjaimella T.

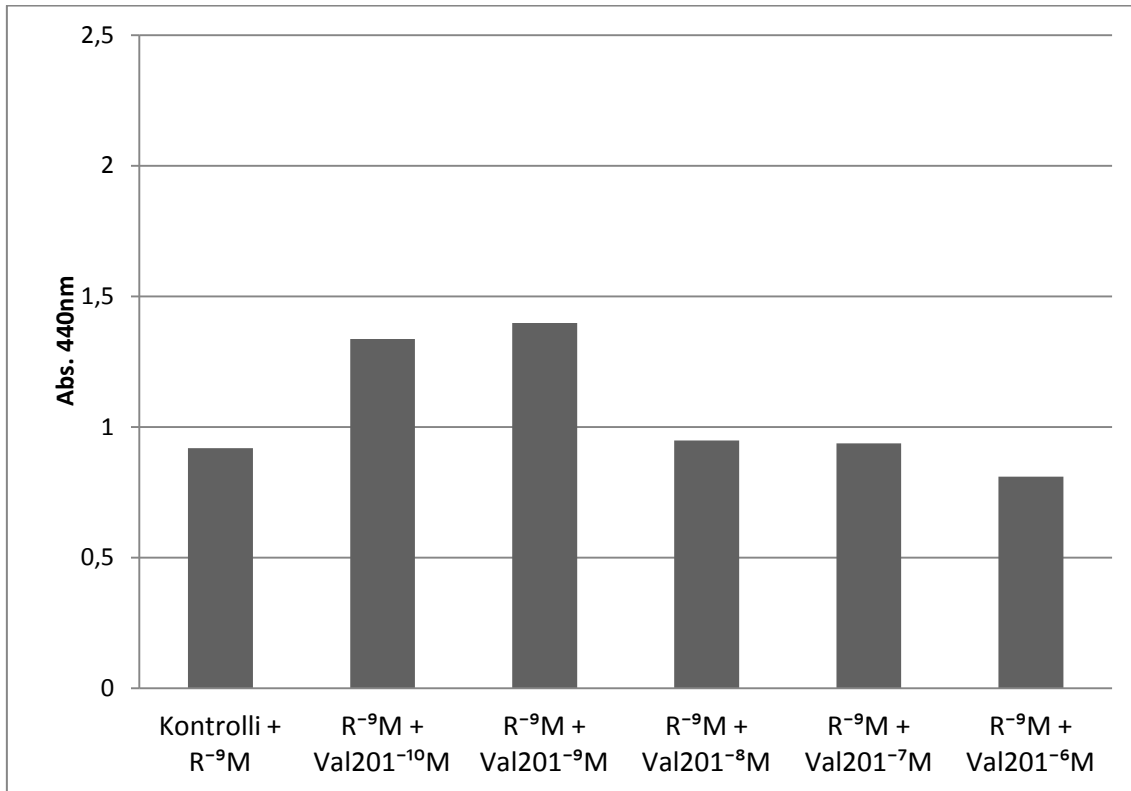
5.1 Proliferaatiokoe

Soluproliferaatiotestin tulosten laskemisen ja arvioinnin avuksi keskiarvoitimme kaikki luotettavat rinnakkaiset absorbanssit ja lisäsimme ne taulukkoon, josta loimme testeille erilliset päivä- sekä pitoisuuskohtaiset kaaviot. LNCaP-solujen proliferaatiotestin tuloksiksi valitsimme yhden tunnin inkubaatioajan jälkeiset absorbanssiarvot ja PC-3 -soluille puolen tunnin inkubaation jälkeiset arvot. Nämä tulokset olivat luotettavimmat ja arviointiin sopivimmat, sillä ne eivät ylittäneet absorbanssiarvoa 3.00, mitkä olisivat olleet liian suuret testin arvioimiseen, kuten pidempien inkubaatioiden arvoille kävi. PC-3 -soluista saimme myös kahdeksannen päivän tulokset 1nM:n testosteronin kanssa, mutta solujen kiihtynyt irtaantuminen kasvualustalta 8. päivänä antoi epäilyksen kasvatusmediumin tehon loppumisesta pitkän kasvatusajan jälkeen ja jätimme tulokset pois arvioinnista.

5.1.1 LNCaP-tulokset

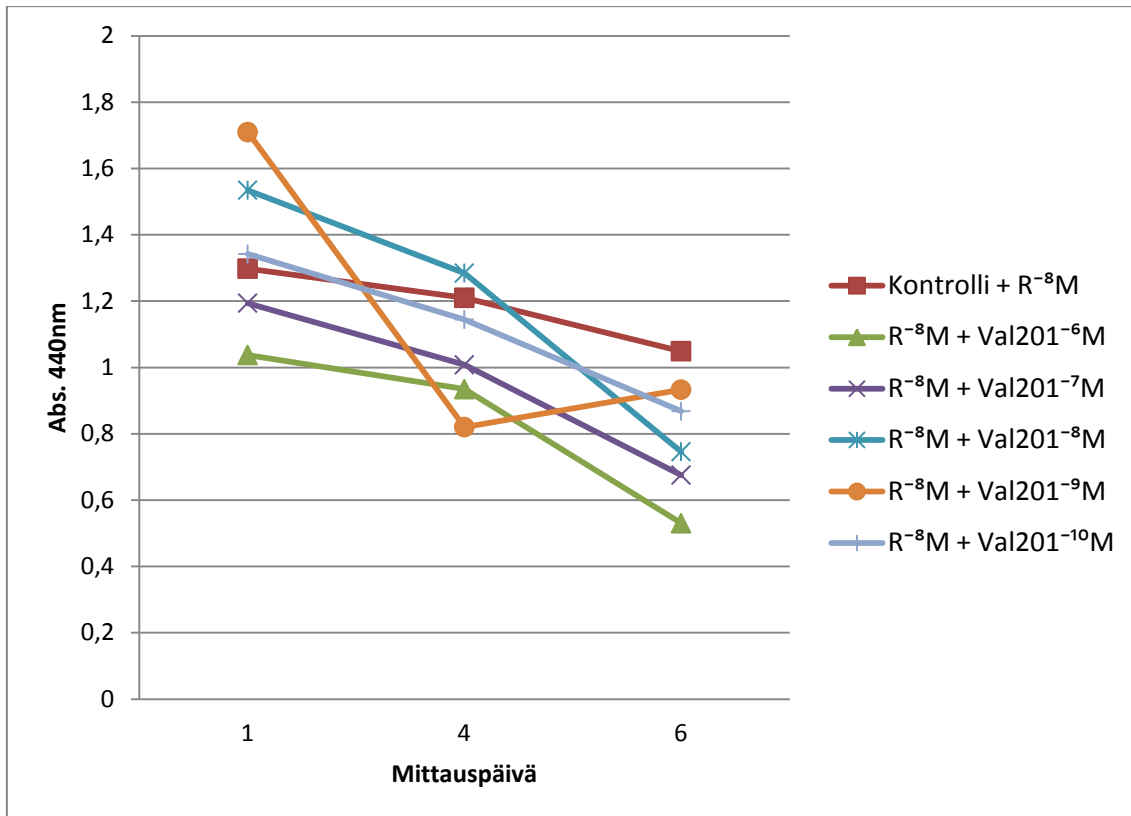
LNCaP-soluissa on nähtävissä huomattavaa solujen vähenemisen määrää molemmissa R1881-pitoisuuksien tuloksissa. Yleisesti ottaen myös suuremmat lääkepitoisuudet näyttävät vähentävän soluja enemmän kuin pienemmät, kuten voidaan olettaakin. Testissä käytetyn synteettisen androgeenin R1881 oletetut ominaisuudet tulevat myös tuloksissa esille. Androgeenin suurempi (10nM) pitoisuus estää voimakkaammin solujen kuolemista kuin pienempi (1nM).

Selvimmät muutokset saimme aikaan 1nM R1881:n ja Val201:n kilpailusta 4. testipäivän kohdalla. Kuvio 4 osoittaa, että suurten ja pienten lääkepitoisuuksien välinen ero on vajaa yksi absorbanssiyksikkö, mikä kertoo jo lääkkeen tehokkaasta vaikutuksesta tässä testissä.



KUVIO 3. LNCaP + 1nM R1881 synteettinen androgeeni, päivä 4.

10nM R1881:n ja Val201:n koe antoi valtavasti tärkeää tutkimustietoa. Ihanteellisia tuloksia saadaan jokaisen testipäivän kuvioista. Kuvioista 5. selviää kuinka androgeeni on pitänyt solumäärän kontrollinäytteissä yhtä korkealla, mutta Val201-käsitellyt näytteet ovat pystyneet ohittamaan androgeenin vaikutusta voimakkaasti laskien elävien solujen määrää testin edetessä. Tulokset osoittavat myös selvästi lääkepitoisuuden määrän vaikuttavan solumäärän vähenemiseen suoraan verrannollisella tavalla.



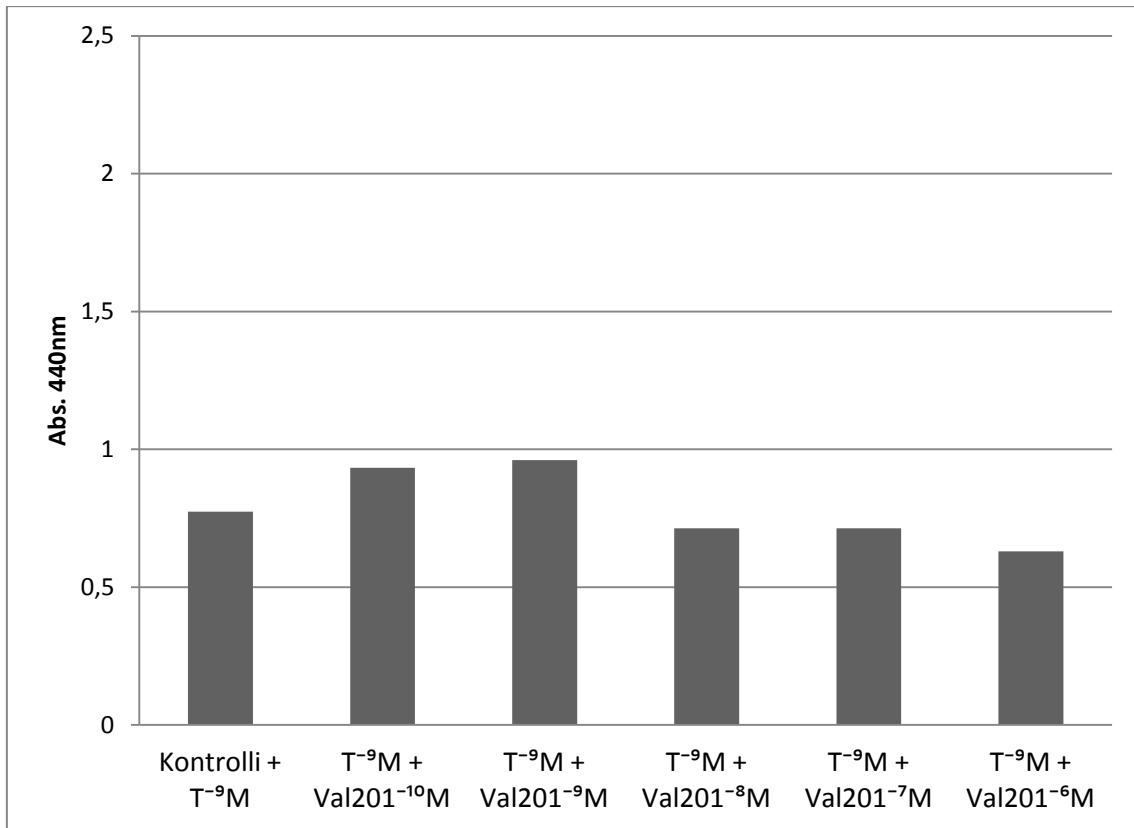
KUVIO 5. LNCaP + 10nM R1881 synteettinen androgeeni, proliferaatiokuvaaja

Tulokset osoittavat Val201:n vähentävän soluproliferaatiota LNCaP -solulinjan syöpäsoluissa ja suurempien pitoisuuden toimivan tehokkaammin proliferaatiota vastaan, kuin pienet. Androgeeni vaikuttaa Val201:stä vastaan ja hidastaa lääkekomponentin tehoa enemmän suurissa androgeenipitoisuuksissa.

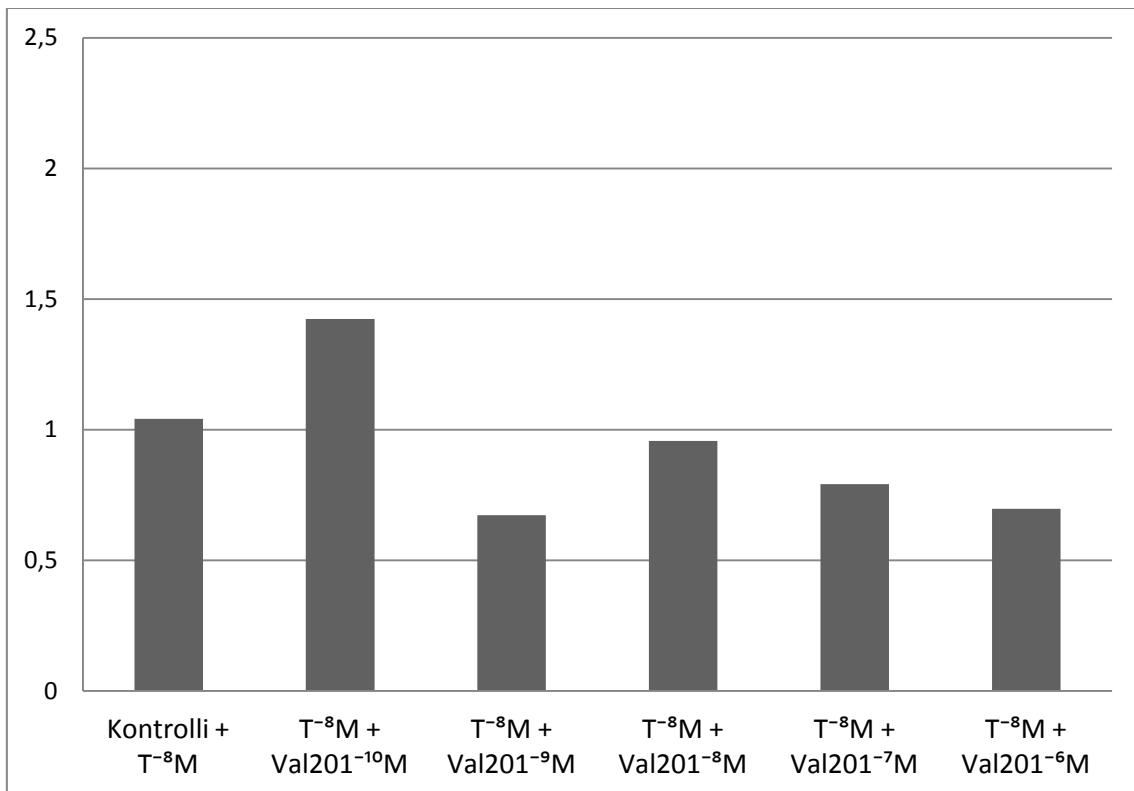
5.1.2 PC-3-tulokset

PC-3 -proliferaatiotestissä käytetyn testosteronin ei oletettu vaikuttavan mitattuihin arvoihin merkittävästi ja molempien testosteronipitoisuuksien samantapainen käyttäytyminen sekä arvoalueet tuloksissa viittaavat näin olevan myös meidän kokeessamme. Kuten LNCaP-testissä, myös PC-3:ssa tärkeä huomio on suurten pitoisuuksien tehokkaampi vaikutus soluihin.

Neljäs testipäivä on ollut merkittävin sekä 1nM että 10nM testosteronin kanssa toteutetuista PC-3 -soluproliferaatiokokeista. Kuvioissa 6 ja 7 on selvästi nähtävissä korkeampien Val201-pitoisuuksien soluja vähentävä vaikutus.



KUVIO 6. PC-3 + 1nM testosteroni, päivä 4



KUVIO 7. PC-3 + 10nM testosteroni, päivä 4

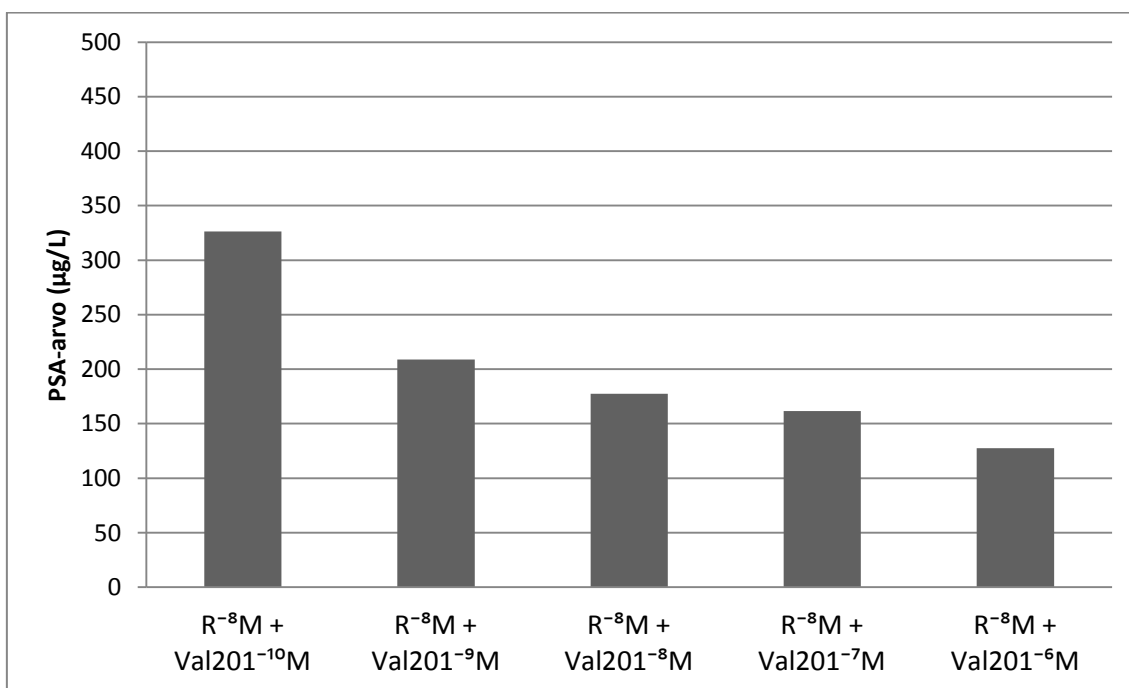
Tuloksista voimme päätellä, että Val201 pystyy tehokkaasti laskemaan myös androgeeniriippumattomien PC-3 syöpäsolujen määrää ja, että suuret pitoisuudet vähentävät proliferaatiota huomattavasti enemmän kuin pienet. Soluihin lisätyllä testosteronilla ei ole merkittävää vaikutusta Val201:stä vastaan.

5.2 PSA-testi

PSA-testin kalibraattorien avulla käyttämämme spektrofotometri loi kuvaajan (liite 9) absoluuttisten arvojen määrittämiseksi absorbanssista mikrogrammoiksi litraa kohti ($\mu\text{g/L}$), joka on Suomessa käytössä oleva yksikkö myös PSA-arvojen diagnostisessa analysoinnissa sekä lääkehoidon tehon arvioinnissa. Kuvaajalta selviää tiettyä absorbanssia vastaava PSA:n absoluuttinen arvo. Lopuksi meidän piti vielä kertoa 1:20 naisseerumilla laimennettujen näytteiden tulokset 20:llä saadaksemme lopulliset vastaukset. Loimme myös PSA:sta vertailutaulukot ja -kaaviot selkeyttääksemme arviointia.

5.2.1 PSA-tulokset

PSA-testissä oleellimmat tulokset tulivat lähes yksinomaan 10nM R1881 synteettisellä androgeenillä käsiteltyjen solujen tuloksista. Kuviossa 8. on esitetty, kuinka solujen määrä laskee suurien lääkepitoisuuksien kanssa enemmän myös PSA-testissä, mikä oli toivottavaakin.



KUVIO 8. PSA-testi + 10nM R1881 synteettinen androgeeni

Näiden tulosten perusteella Val201 -peptidi, solujen vähentymisen myötä, hidastaa myös PSA:n erittymistä syöpäsoluista. Merkillepantavaa tässä on se, että lääkekomponentista tehtyjen lääkevalmisteiden hoitovastetta voitaisiin mahdollisesti seurata nykyaikaisilla eturauhassyövän seurantamenetelmillä.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön suorittaminen oli sekä haasteellista että palkitsevaa. Aihe oli meille erittäin mielenkiintoinen, mikä lisäsi työn suorituksen mielekkyyttä. Koimme itsemme etuoikeutetuiksi, olla edes pienenä osana mukana uuden syöpälääkkeen kehittämisen prosessissa. Haittapuolena aiheeseen liittyen oli työn salaisuus, informaatiota ei ollut paljoa tarjolla. Koska aihe oli myös uusi, teorian löytäminen oli osittain haasteellista. Yhteistyö kemisti Simo Rasin kanssa auttoi tässä asiassa kuitenkin paljon. Ajoittain aikataulussa pysyminen tuotti haastetta, varsinkin kun useamman henkilön aikataulut piti saada sopimaan yhteen. Tutkimustyön suorittaminen vaati paljon joustavuutta sekä etukäteen suunnittelua.

Apuna toimineet ohjaajat selkeyttivät ja avustivat työn tekemisessä erinomaisesti. He esittivät aiheen ja siihen liittyvät työtehtävät tavoilla, mikä sai meidät kiinnostumaan työstä entistä enemmän. He saivat meidät tuntemaan tekevämme jotain todella tärkeää ja arvokasta, jolloin suhtauduimme työhönkin sen vaatimalla arvokkuudella. Ohjaajien tukea oli aina tarjolla sekä itse työn, että opinnäytetyön raportin etenemiselle. Heidän osallisuutensa oli meille korvaamaton apu työstä suoriutumiseen.

Koko opinnäytetyö opetti meille paljon, varsinkin suunnittelun tärkeydestä. Hyvin etukäteen suunniteltu työ vaihe vaiheelta on tärkeää. On hyvä miettiä etukäteen jokainen työvaihe: mitä tullaan tekemään, miten se tullaan tekemään sekä mitä kaikkea tarvitaan sen tekemiseen. On usein vaikea arvioida työn keston pituutta, siksi on osattava toimia yhteistyössä ja joustavasti. Yhteistyö tulee suureen merkitykseen ryhmätyössä. Kaiken organisointia, työnjakoa, kommunikointia ynnä muuta tuli opittua paljon.

Opimme laboratoriotyöskentelystä solulaboratoriossa mitä kaikkea on huomioitava työskenneltäessä solujen kanssa. Omaan työhönsä piti suhtautua kriittisesti. Jos vähääkään epäilee esimerkiksi kontaminaatiota, oli parempi olettaa, että kontaminaatio oli tapahtunut ja aloittaa työvaihe alusta. Työn ansiosta varmuus molekyylibiologisissa, erityistä tarkkuutta vaativissa työsuorituksissa parani huomattavasti.

Pidimme työn aikana laboratoriopäiväkirjaa, johon kirjasimme mitä teimme päivän aikana. Asiat piti opetella kirjaamaan niin, että myös seuraavana päivänä laboratoriossa työskentelevä

ymmärtää tekstistä tarkkaan mitä on tehty. Merkinnät myös mikä soluviljelymalja sisältää mitäkin soluja oli tarkoin merkittävä. Mittauksia suorittaessa pääsimme palauttelemaan mieleen kuinka tuottaa luotettavia tuloksia ja mitä kaikkea on huomioitava, jotta voit luottaa koneen antamaan lukemaan. Suoritimme kalibroitua, kontrollien mittausta, vertailumittauksia ja taustamittauksia varmistaaksemme, että laite toimii halutulla tavalla.

Saimme oleellista tietoa ValiFinn:lle lääkepeptidin toimivuudesta: Val201 hidasti sekä androgeeniriippuvaisten että androgeeniriippumattomien eturauhassyöpäsolulinjojen proliferaatiota ja laskee samalla näytteistä erittyvän PSA:n määrää, mikä antaa lääkepeptidille valoisan tulevaisuudenkuvan. Lääkettä voitaisiin käyttää siis hormonaalisen ja androgeeniestolääkityksistä muodostuneen androgeeniriippumattoman eturauhassyövän hoitoon. Lisäksi hoidon tehokkuutta voitaisiin arvioida jo käytössä olevalla PSA:n mittaussuomenetelmillä.

Koemme saavuttaneemme tavoitteemme sekä löytäneemme vastaukset listaamiimme tehtäviin. Saimme kaikki paljon uutta kokemusta tutkimustyön suorittamisesta sekä kehitimme omaa ammattitaitoaamme molekyylibiologisissa töissä. Ryhmätyöskentelymme toimi hyvin ja saimme jaettua työt niin, että jokainen pääsi osallistumaan kaikkiin työn osiin. Tuloksista saimme vastaukset tehtäviimme sekä tuotettua hyödyllistä informaatiota Valirx:lle. Saamiimme tuloksia arvostettiin myös heidän osaltaan, jolloin tunsimme onnistuneemme tässä tärkeässä tutkimuksessa. Toki komponentti vaatii vielä paljon lisätestauksia ennen kuin sitä voidaan alkaa muodostaa lääkevalmisteksi, mutta näiden tulosten pohjalta heidän on varmasti hyvä jatkaa eteenpäin.

LÄHTEET

ATCC 2013. Ethical Standards for obtaining Human Materials. Hakupäivä 21.2.2013

<http://www.lgcstandards->

[atcc.org/About/About_ATCC/Ethical_Standards_for_Obtaining_Human_Materials.aspx](http://www.lgcstandards-atcc.org/About/About_ATCC/Ethical_Standards_for_Obtaining_Human_Materials.aspx)

Duodecim. 2011. Ajankohtaista lääkärin käsikirjasta: Eturauhassyöpä. Hakupäivä 20.1.2013,

<http://www.terveysportti.fi.ezp.oamk.fi:2048/xmedia/duo/duo10002.pdf>

Freshney, R.I. 2005. Culture of Animal Cells. 5. painos. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Fujirebio Diagnostics Inc. 2009. CanAg PSA EIA. Hakupäivä 16.5.2013.

[http://www.fdi.com/documents/products/inserts/eia/PSA%20340-10%20Eng%202009-](http://www.fdi.com/documents/products/inserts/eia/PSA%20340-10%20Eng%202009-11.%20F5676,%20r5.pdf)

[11.%20F5676,%20r5.pdf](http://www.fdi.com/documents/products/inserts/eia/PSA%20340-10%20Eng%202009-11.%20F5676,%20r5.pdf)

Gelmann, E. 2008. Prostate molecular oncogenesis: Gene deletions and somatic mutations.

Prostate Cancer: Signaling Networks, Genetics, and New Treatment Strategies, 71-97

Halonen, T. 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa I. Penttilä (toim.)

Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.

Heino, J., Vuento, M. 2007. Biokemian ja solubiologian perusteet. 1. painos. Helsinki: WSOY.

Holmia, S., Murtonen, I., Myllymäki & Valtonen, K. 2006. Sisätautien, kirurgisten sairauksien ja syöpätautien hoitotyö. Porvoo: WSOY.

Jaarinen, S. & Niininen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita Publishing Oy.

Niemi, M., Virtanen, I. & Vuorio, E. 1994. Solu- ja molekyylibiologia. Porvoo: WSOY.

Norlén, B.J. & Schenkmanis, U. 2008. Eturauhassyöpä. WSOY.

Nurmi, M., Lukkarinen, O., Ruutu, M., Taari, K. & Tammela, T. 2002. Urologia. 2. uudistettu painos. Jyväskylä: Gummerus.

OECD. 1998. Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Hakupäivä 19.9.2013

[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem\(98\)17&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem(98)17&doclanguage=en)

PubMed. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Hakupäivä 4.10.2013.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?cmd=Retrieve&list_uids=447482&dopt=AbstractPlus

PubMed. 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. Hakupäivä 5.10.2013.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6831420>

Roche Applied Sciences. 2011. Cell Proliferation Reagent WST-1. Hakupäivä 16.5.2013.

https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644807001_en_16.pdf

Silfverberg, P. 2007. Ideasta projektiksi. Projektinvetäjän käsikirja. Hakupäivä 19.2.2013

<http://www.mol.fi/esf/ennakointi/raportit/pvopas.pdf>

Solunetti. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen. Hakupäivä 3.9.2013.

http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/monoklonaalisten_vasta-aineiden_tuottaminen/2/

Suomen Syöpärekisteri (2012) Tilastot. Hakupäivä 20.1.2013

<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/ajantasaiset-perustaulukot/koko-maa/>

Turpeenoja, L. 2005. Biokemiaa. Vantaa: Dark Oy.

Valirx. 2013. Hakupäivä 22.2.2013. www.valirx.com.

Vaihe	Pullo/Levy	Ohje																																													
1. Valmista pesuliuos Valmista vasta-aineliuos	<table border="1"> <tr> <td>WASHBUF</td> <td>25X</td> </tr> <tr> <td>CONJ</td> <td>Anti-PSA</td> </tr> <tr> <td>BIOTIN</td> <td>Anti-PSA</td> </tr> </table>	WASHBUF	25X	CONJ	Anti-PSA	BIOTIN	Anti-PSA	<p>Liuota 50 ml pesukonsentraattia 1200 ml:aan puhdistettua vettä</p> <p>Sekoita 50 ml HRP Anti-PSA:ta ja 1 ml Biotiini Anti-PSA:ta PER STRIP:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>STRIP lkm</th> <th>HRP Anti-PSA (µL)</th> <th>Biotiini Anti-PSA (µL)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr> <tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr> <tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr> <tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr> <tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr> <tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr> <tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr> <tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr> <tr><td>10</td><td>500</td><td>10</td></tr> <tr><td>11</td><td>550</td><td>11</td></tr> <tr><td>12</td><td>600</td><td>12</td></tr> </tbody> </table>	STRIP lkm	HRP Anti-PSA (µL)	Biotiini Anti-PSA (µL)	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5	6	300	6	7	350	7	8	400	8	9	450	9	10	500	10	11	550	11	12	600	12
WASHBUF	25X																																														
CONJ	Anti-PSA																																														
BIOTIN	Anti-PSA																																														
STRIP lkm	HRP Anti-PSA (µL)	Biotiini Anti-PSA (µL)																																													
1	50	1																																													
2	100	2																																													
3	150	3																																													
4	200	4																																													
5	250	5																																													
6	300	6																																													
7	350	7																																													
8	400	8																																													
9	450	9																																													
10	500	10																																													
11	550	11																																													
12	600	12																																													
2. Pesu	MICROPLATE	Pese jokainen kaivo kerran pesuliuksella																																													
3. Lisää kalibraatioliuokset, kontrollit sekä näytteet	<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>PSA</td> </tr> <tr> <td colspan="2">0, 2, 10, 30, 60</td> </tr> <tr> <td>CONTROL</td> <td>PSA</td> </tr> <tr> <td colspan="2">1, 2</td> </tr> </table>	CAL	PSA	0, 2, 10, 30, 60		CONTROL	PSA	1, 2		Lisää 25 µL/kaivo																																					
CAL	PSA																																														
0, 2, 10, 30, 60																																															
CONTROL	PSA																																														
1, 2																																															
4. Lisää vasta-aineliuos	ANTIBODY SOLUTION	Lisää 100 µL jokaiseen kaivoon																																													
5. Inkubointi	MICROPLATE	Laita levy inkuboitumaan sekoittajaan 1h huoneenlämmössä																																													
6. Pesu	MICROPLATE	Pese jokainen kaivo kuusi kertaa pesuliuksella																																													
7. Lisää HRP-substraatti	<table border="1"> <tr> <td>SUBS</td> <td>TMB</td> </tr> </table>	SUBS	TMB	Lisää 100 µL jokaiseen kaivoon																																											
SUBS	TMB																																														
8. Inkubointi	MICROPLATE	Laita levy inkuboitumaan 30 min sekoittajaan huoneenlämpöön																																													
9. Mittaa absorbanssi	MICROPLATE	Mittaa absorbanssi aallonpituudella 650nm																																													
Vaihtoehto 9. Lisää Stopliuos	STOP	Lisää 100 µL jokaiseen kaivoon																																													
Vaihtoehto 10. Inkubointi	MICROPLATE	Laita levy inkuboitumaan 1 min sekoittajaan huoneenlämpöön																																													
Vaihtoehto 11. Mittaa absorbanssi	MICROPLATE	Mittaa absorbanssi aallonpituudella 405nm 15 min kuluessa																																													

