

LAT1-kuljetinproteiinia hyödyntävät aihiolääkkeet - Uusi hoitomuoto rintasyöpään?

Johanna Huttunen

Pro gradu-tutkielma

Biotieteiden
koulutusohjelma

Luonnontieteiden ja
metsätieteiden
tiedekunta

Itä-Suomen
Yliopisto

Joulukuu 2014

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja Metsätieteiden
tiedekunta

Biotieteiden koulutusohjelma

HUTTUNEN JOHANNA: LAT1-kuljetinproteiinia hyödyntävät
aihiolääkkeet – Uusi hoitomuoto rintasyöpään?

Pro Gradu-tutkielma, 71 s.

Ohjaajat: FT Kristiina Huttunen, prov. Jussi Kärkkäinen, FT Sinikka
Parkkinen

Joulukuu 2014

Avainsanat: rintasyöpä, LAT1, aihiolääke

Rintasyöpä on maailmanlaajuisesti naisten yleisin syöpätyyppi. Sen ennuste länsimaissa on varhaisen toteamisen ja tehokkaiden hoitomenetelmien ansiosta kuitenkin yksi kaikkien syöpätyyppien parhaita. Rintasyöpä, kuten muutkin syövät, syntyy DNA:n mutaatioiden seurauksena. Syöpäsoluilla on monia normaalisolukosta poikkeavia ominaisuuksia, joista tärkeimpänä voidaan pitää syöpäsolujen kykyä jakaantua rajattomasti. Rintasyövän synnylle on merkittävää rintarauhaskudoksen muuntuminen läpi eliniän. Tässä prosessissa, sekä syövän kehityksessä mukana on vahvasti naihormoni estrogeeni. Rintarauhaskudoksen erilaistuneiden solujen myötä myös rintasyöpiä on hyvin monen tyyppisiä.

Rintasyövän hoidossa käytetään kirurgisia menetelmiä, sädehoitoa ja lääkehoitoa. Lääkehoito voidaan jakaa solunsalpaajiin, jotka estävät solujen jakautumista, hormonaalisen hoitoon, jolla pyritään laskemaan elimistön estrogeenitasoa, sekä täsmälääkitykseen, jossa lääkeaineen vaikutus perustuu solusignaaloinnin häiritsemiseen ja solun kasvun estämiseen. Hormonaaliset lääkkeet ja täsmälääkkeet sopivat kuitenkin vain tietyn tyyppisten rintasyöpien hoitoon. Kaikki käytetyt lääkkeet vaikuttavat myös normaaliin solukoon ja aiheuttavat lukuisia haittavaikutuksia. Haittavaikutusten minimoimiseksi olisi tärkeää kehittää uusia lääkeaineita joiden vaikutus voitaisiin kohdentaa spesifisesti vain syöpäsoluihin.

Kuljetinproteiinisysteemi L ja sen tärkeimmät alamuodot LAT1 ja LAT2 kuljettavat pääasiassa solujen kasvulle välttämättömiä aminohappoja ja LAT1:n on todettu yli-ilmentyvän etenkin alkuvaiheen kasvainsoluissa. Tässä tutkimuksessa tavoitteena oli selvittää viiden Itä-Suomen yliopistossa kehitetyn aihiolääkkeen sopivuutta ihmisen MCF-7 rintasyöpäsolulinjassa yli-ilmentyvän LAT1-kuljetinproteiinin substraateiksi. Lisäksi työssä tutkittiin tunnetun LAT1-substraatti gabapentiinin soluunkulkeutumista. Lupaavimmat tulokset saatiin rakenteeltaan samankaltaisilla aihiolääkkeillä, jotka molemmat inhiboivat LAT1-substraatti leusiinin soluunottoa merkittävästi. Molempien todettiin myös käyttävän vain LAT1-välitteistä kuljetusta, osoittaen, että näillä aihiolääkkeillä voitaisiin saavuttaa selektiivinen kulkeutuminen syöpäsoluihin.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Science and Forestry
Master of science in Bioscience program
HUTTUNEN JOHANNA: LAT1-Targeted Prodrugs – Novel Treatments
for Breast Cancer?
Master's Thesis, p. 71
Supervisors: PhD Kristiina Huttunen, pharm. Jussi Kärkkäinen, PhD
Sinikka Parkkinen
December 2014

Keywords: breast cancer, LAT1, prodrug

Breast cancer is the most common cancer type worldwide. Due to the early diagnosis and efficient treatment available today, its prognosis though is, however, one of the best of all cancer types in Western countries. Breast cancer, like all cancer types, is caused by DNA mutations. Cancer cells differ from normal cells in many ways. The most significant difference is the ability of cancer cell to be divided unlimitedly. Continuous change of breast tissue throughout its lifetime is remarkable factor in origin of breast cancer. Female hormone estrogen is strongly involved both in this process as well as development of the cancer. Since the breast tissue has many differentiated cell types, there are also various breast cancer types.

Surgical procedures, radiotherapy and pharmacotherapy are all used as treatments of breast cancer. Pharmacotherapy can be classified to cytotoxic chemotherapy, endocrine therapy and targeted agents. Cytotoxic therapy prevents cell division, endocrine therapy reduces estrogen levels and targeted agents distract cell signaling and cell-growth. However, endocrine therapy and targeted agents are suitable only in certain cancer types. Unfortunately, all drugs affect also normal cells and cause many unpleasant adverse effects. To prevent this, development of new targeted drugs is very important.

Amino acid transport system L and its subtypes LAT1 and LAT2 transport large amino acids essential to cell growth. Curiously, LAT1 is found to be overexpressed especially in initial state cancer cells. The aim of this study was to test the suitability of five prodrugs as LAT1-substrates in human MCF-7 breast cancer cell line that overexpresses LAT1-amino acid transporter protein. The prodrugs were developed at the University of Eastern Finland. Gabapentin, a known LAT1-substrate, was also studied as a control compound. The most promising results were obtained by two prodrugs that were similar by their structure. Both of them inhibited significantly the cell uptake of LAT1-substrate leucine. They also used only LAT1-mediated transport which indicates that selective transport to cancer cells could be achieved with these prodrugs.

ESIPUHE

Tämä pro gradu-tutkielma on tehty Itä-Suomen Yliopiston farmaseuttisen kemian laitokselle 2014. Ohjaajina toimivat Kristiina Huttunen ja Jussi Kärkkäinen farmaseuttisen kemian laitokselta. Aivan työn loppuvaiheessa ohjaajaksi nimettiin myös Sinikka Parkkinen Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunnasta.

Tutkielman teko tuntui välillä hieman haasteelliselta, mutta etenkin oman tutkimuksen teko erikoistyövaiheessa oli myös hyvin mielenkiintoista ja opettavaista. Haluankin kiittää ohjaajiani ja laitoksen muuta henkilökuntaa kaikesta avusta ja ideoista työn aikana.

Kuopiossa 26.1.2015

Johanna Huttunen

KÄYTETYT LYHENTEET

ACN	asetonitrili
BCOX1	Rintasyövässä yliekspressoituva geeni (<i>Breast Cancer Overexpressed Gene 1</i>)
BRCA1 ja 2	Rintasyöpägeenit 1 ja 2 (<i>Breast Cancer 1 and 2 gene</i>)
BSA	naudan seerumin albumiini (<i>bovine serum albumin</i>)
CEF	yhdistelmä lääke syklofosfamidi, epirubisiini ja 5-fluorourasiili (<i>Cycklofosfamii, Epirubicin, 5-fluorouracil</i>)
CMF	yhdistelmä lääke syklofosfamidi, metotreksaatti, 5-fluorourasiili (<i>Cycklofosamid, Methotrexate, 5-fluorouracil</i>)
DHFR	dihydrofolaattireduktaasi
DICS	intraduktaalinen karsinooma (<i>Carsinoma Inductale in situ</i>)
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DNA	deoksiribonukleinihappo
EGF	epidermaalinen kasvutekijä (<i>Ephidermal Growth Factor</i>)
ERBB-2	proto-onkogeeni (<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>)
FBS	naudan alkion seerumi (<i>fetal bovine serum</i>)
GPR161	G-proteiinireseptori (<i>G-protein coupled Receptor</i>)
HBSS	Na ⁺ -vapaa suolaliuos

	<i>(Hank's Balance Salt Solution)</i>
HEPES	4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiinietaanisulfonihappo <i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HER-2	epidermaalisen kasvutekijä-reseptoriperheen geeni <i>(Human Epidermal growth factor gene 2)</i>
HOXB9	homeoottinen, syövän angiogeneesiä edistävä geeni <i>(Homeobox 9)</i>
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia <i>(high performance liquid chromatography)</i>
LAT	aminohappojen kuljetusproteiini <i>(L-type Amino Acid Transporter)</i>
LHRH	luteinisoivan hormonin vaputtajahormoni <i>(Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone)</i>
MUC1	musiinia koodaava geeni <i>(Mucin1, Cell surface associated)</i>
M _w	molekyylipaino
P53	kasvurajoitegeeni
PBS	isotoninen fosfaattipuskuriliuos <i>(phosphate buffered saline)</i>
pH	vesiliuoksen happamuutta kuvaava luku
PTEN	tuumorisuppressiogeneeni <i>(Phosphate and Tensin homolog)</i>
TRIS-puskuri	tris(hydroksimetyyli)aminometaani
UICC	(Union for International Cancer Control)
VEGF	verisuonten endoteelin kasvutekijä <i>(Vascular Endothelial Growth Factor)</i>

Sisällysluettelo

I KIRJALLISUUSKATSAUS.....	8
1. JOHDANTO.....	8
2. RINTASYÖPÄ.....	9
2.1. Rintasyövän esiintyvyys	9
2.2. Rintasyövän riskitekijät	10
2.3 Rinnan rakenne ja kehitys.....	11
2.4. Karsinogeneesi	12
2.5. Rintasyövän synty ja eteneminen	14
2.5.1. Rintasyöpään liittyvät geenimuutokset	15
2.6. Rintasyövän toteaminen, luokittelu ja ennusteelliset tekijät	17
2.6.1 Histologinen luokittelu.....	18
2.6.2. Patologinen luokitus.....	19
2.6.3. Genotyyppiin perustuva luokittelu.....	21
3. RINTASYÖVÄN HOITO	22
3.1. Leikkaushoito	22
3.2. Sädehoito	23
3.3. Lääkehoito	24
3.3.1. Solunsalpaajat	24
3.3.2. Hormonaalinen hoito.....	27
3.3.3. Täsmälääkkeet.....	30
3.3.4. Neoadjuvanttihoito	33
3.3.5. Liitännäislääkehoito	33
3.3.6. Lääkehoito erityistapauksissa.....	35

3.4. Lääkehoidon haitat	37
3.4.1. Solunsalpaajien haittavaikutukset	37
3.4.2. Hormonaalisten hoitojen haittavaikutukset.....	38
3.4.3. Täsmälääkkeiden haittavaikutukset	38
3.5. Lääkehoidon tulevaisuus.....	39
II KOKEELLINEN OSA	41
4. TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET.....	41
5. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	42
5.1. Käytetyt reagenssit, liuottimet ja laitteet	42
5.2. Solujen käsittely.....	45
5.3. LAT1-affiniteettikokeet	46
5.3.1. Käytetyt koeliuokset ja niiden valmistus	46
5.3.2. Kokeen suoritus.....	47
5.4. Soluunotto- ja LAT1/LAT2-selektiivisyyskokeet.....	47
5.4.1. Käytetyt koeliuokset ja niiden valmistus	47
5.4.2. Kokeiden suoritus.....	48
5.5. Passiivinen diffuusio	48
5.5.1. Käytetyt koeliuokset ja niiden valmistus	48
5.5.2. Kokeen suoritus.....	49
5.6. Kemiallinen ja entsyymaattinen stabiilisuus	49
5.6.1. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	49
5.6.2. Kemiallinen stabiilisuus	50
5.6.3. Entsyymaattinen stabiilisuus	50
5.7. Proteiinimääritys.....	50
6. TULOKSET JA NIIDEN KÄSITTELY	52
6.1. LAT1-affiniteettikokeet	52
6.2. Soluunottokokeet	54

6.3. Passiivinen diffuusio	55
6.4. LAT1/LAT2-selektiivisyys	56
6.5. Kemiallinen ja entsymaattinen stabiilisuus	58
6.6. Proteiinimääritykset.....	58
7. POHDINTA	59
8. YHTEENVETO	63
9. KIRJALLISUUS	67

I KIRJALLISUUSKATSAUS

1. JOHDANTO

Rintasyöpä on sekä maailmanlaajuisesti, että Suomessa naisten yleisin syöpätyyppi. Riski sairastua rintasyöpään kasvaa iän myötä; alle 30-vuotiailla tauti on hyvin harvinainen ja se todetaankin keskimäärin 60 vuoden iässä (Suomen syöpärekisteri 2014). Etenkin länsimaissa rintasyöpä on lisääntynyt merkittävästi viime vuosikymmenten aikana, mutta myös taudin ennuste on parantunut huomattavasti. Rintasyöpä todetaan nykyään yhä varhaisemmassa vaiheessa ja hoitomenetelmät ovatkin jo hyvin kehittyneitä. Jopa 90 % rintasyöpäpotilaista on nykyään elossa viisi vuotta taudin toteamisen jälkeen (Vehmanen 2012).

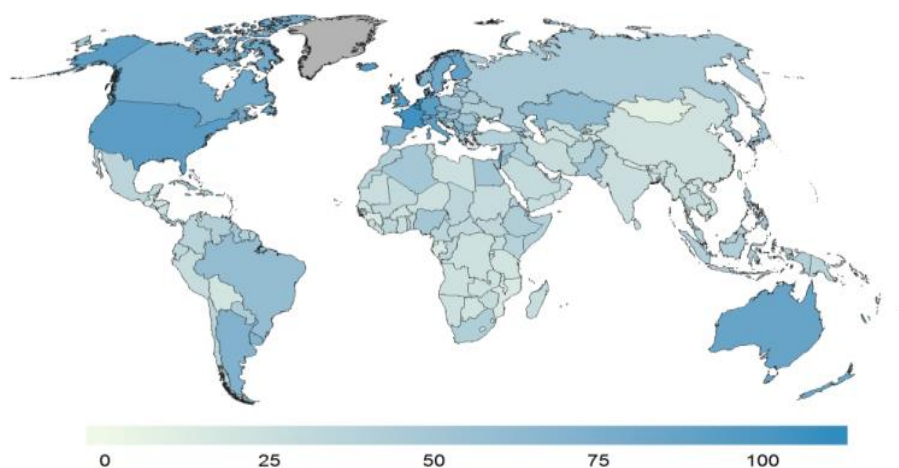
Yleisin ensimmäinen havainto rintasyövästä on naisen itsensä havaitsema kyhmy rinnassa. Kyhmy toteamisen jälkeen rinnat tutkitaan ja potilas ohjataan mammografiaan eli rintojen röntgenkuvaukseen sekä tarvittaessa ultraäänitutkimuksiin (Vehmanen 2012). Kyhmy rinnassa ei aina kuitenkaan tarkoita syöpää, myös hyvänlaatuisia muutoksia löytyy paljon. Mikäli löydökset viittaavat pahanlaatuisuuteen, rinnasta otetaan neulanäyte eli biopsia patologin tutkittavaksi. Suomessa kaikille 50- 69-vuotiaille naisille järjestetään rintasyöpäseulonta kahden vuoden välein (Vehmanen 2012).

Rintasyöpää hoidetaan kirurgisesti, sädehoidolla ja lääkehoidolla. Yleensä käytetään kaikkia kolmea hoitomuotoa. Lääkehoitona käytetään solunsalpaajia, hormonaalisia hoitoja, sekä täsmälääkkeitä. Etenkin solunsalpaajilla on keskeinen asema rintasyövän hoidossa, koska ne yleensä tehoavat kaikkiin kasvaintyyppeihin (Joensuu ja Huovinen 2013). Niiden vaikutus kohdistuu nopeasti jakautuviin soluihin, joita syöpäsolujen lisäksi elimistössä on mm. luuytimessä, iholla, limakalvoilla ja karvatupissa (Johansson 2012). Tämän vuoksi solunsalpaajilla on myös monia vakaviakin haittavaikutuksia, mikä rajoittaa tarpeeksi tehokkaiden annosmäärien käyttöä. Nykyään onkin käytössä myös paremmin juuri syöpäsoluihin vaikuttavia täsmälääkeaineita, mutta tutkimustyö yhä selektiivisempien syöpälääkeaineiden kehittämiseksi on hyvin tärkeää.

2. RINTASYÖPÄ

2.1. Rintasyövän esiintyvyys

Maailmanlaajuisesti rintasyöpä on toiseksi yleisin syöpätyyppi, ja naisilla se on yleisin todettu syöpä (kuva 1). Vuonna 2005 rintasyövän osuus kaikista syöivistä oli 25 %. Rintasyöpää esiintyy eniten Länsi- ja Pohjois-Euroopassa sekä Pohjois-Amerikassa. Vähäisintä esiintyvyyttä on puolestaan Keski- ja Itä-Afrikassa sekä Itä- ja Keski-Aasiassa. Rintasyöpäkuolleisuus on kaikista syöpätyypeistä viidenneksi yleisin ja potilaslukuun suhteutettuna kuolleisuus on korkein Afrikassa ja Aasiassa (WHO 2012).



Kuva 1. Rintasyövän esiintyvyys maailmanlaajuisesti 2012. Ikävakioitu määrä 100 000 henkeä kohti. (WHO: Globocan 2012).

Rintasyöpä on myös Suomessa naisten yleisin syöpätyyppi, 32 % kaikista syöivistä (Joensuu ja Huovinen 2013). Potilaiden keski-ikä on 60 vuotta ja rintasyövän esiintyvyys yleistyy huomattavasti 45. ikävuoden jälkeen.

Rintasyöpä Suomessa on yleistynyt rajusti viime vuosikymmenten aikana; 60-luvulla rintasyöpätapauksia löydettiin vuosittain noin 900, 80-luvulla jo 2000 ja 2010-luvulla noin 5000. Rintasyövän kuolleisuus on kuitenkin pieni. Vuosina 2007- 2009 seurattujen potilaiden elossaoloprosentti oli vuoden kuluttua syövän toteamisesta 97 % ja viiden vuoden kuluttua 89 % (Suomen syöpärekisteri 2014). Suomalaisen naisen riski sairastua rintasyöpään elämänsä aikana on noin 11 % ja riski rintasyöpäkuolemaan noin 2 %. Miesten rintasyöpä on hyvin harvinainen, Suomessa tavataan vain noin 20 tapausta vuosittain (Joensuu 2013).

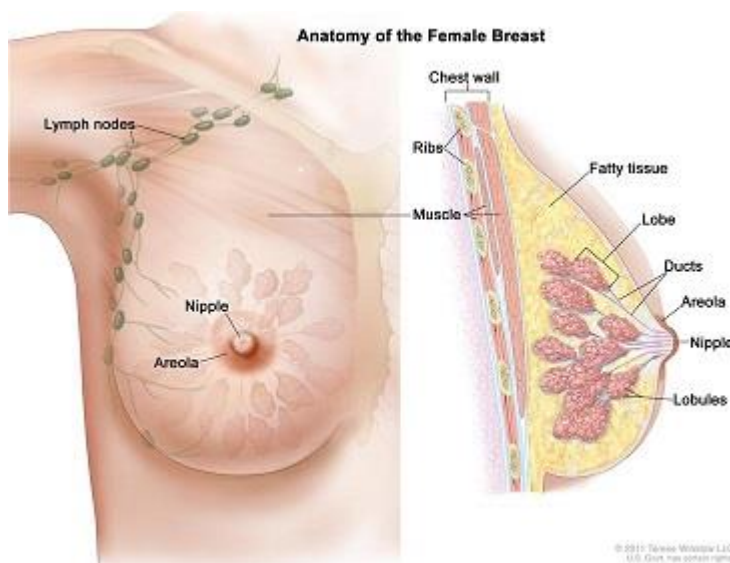
2.2. Rintasyövän riskitekijät

Tärkein rintasyöväälle altistava tekijä on korkea estrogeenipitoisuus. Kuukautiskiertojen runsas määrä nostaa estrogeenipitoisuutta, eli varhainen sukukypsyys ja korkea menopausaalinen ikä lisäävät riskiä sairastua rintasyöpään (Hakulinen 2008). Vaihdevuosisoireiden hoitoon hyvin yleisesti käytetty hormonikorvaushoito nostaa selvästi rintasyöpäriskiä etenkin jos hoidon kesto on yli 5 vuotta. Riski pienenee nopeasti korvaushoidon päättymisen jälkeen. Hormonikorvaushoitona käytetään yleensä yhdistelmävalmisteita, joissa mukana on sekä estrogeeni, että progesteroni. Yksin käytettynä estrogeenin ei ole todettu olevan niin vaarallista rintasyövän kehittymisen kannalta, mutta se voi puolestaan altistaa kohtusyöväälle ilman progesteronin kohtua suojaavaa vaikutusta (Guzik 2008). Näin ollen pelkkä estrogeenihoito sopii ainoastaan potilaille, joiden kohtu on poistettu (Lyytinen 2011).

Muita rintasyövän riskitekijöitä ovat lapsettomuus, korkea ensisynnytysikä, menopaussin jälkeinen ylipaino ja runsas alkoholin käyttö. Osa rintasyövistä on periytyviä ja geneettinen alttius, etenkin geenien BRCA1 ja 2 (Breast Cancer 1 and 2 gene) olemassa olo lisää riskiä sairastua. Rintasyöpäriskiä pienentävät terveellisten elintapojen lisäksi imetys ja liikunta (Joensuu ja Huovinen 2013).

2.3 Rinnan rakenne ja kehitys

Rinnat koostuvat rauhas-, side- ja rasvakudoksesta, jotka sisältävät rintarauhaset ja rintatiehyet (kuva 2). Rinnoissa on noin 20 maitorakkuloita sisältävää maitorauhasta, joita rintatiehyet yhdistävät. Maitorauhasten tehtävänä on tuottaa maito, jonka tiehyet kuljettavat nänneihin. Rasvakudoksen tehtävänä on suojata rintaa. Maitorauhasen tiehytputken pintaa peittävät luminaalisolut ja niiden alla on myoepitaalisolujen muodostama basaalisolukerros (Blanpain 2013).



Kuva 2. Rinnan rakenne © Terese Winslow 2011

Rinnat muuttuvat läpi eliniän. Vastasyntyneellä on täysin kehittyneet nännit ja rintatiehyiden alut. Murrosiässä munasarjojen estrogeenituotanto lisää rasvakudoksen määrää ja myös rintatiehyiden verkosto laajenee. Kuukautisten aikana lisääntynyt estrogeenituotanto stimuloi rintatiehyiden kasvua ja progesteroni kierron loppuvaiheessa puolestaan maitorauhasia. Vaihdevuosien aikana progesteronin, sekä etenkin estrogeenin tuotanto vähenee reilusti. Tämä johtaa rintarauhas kudoksen määrän vähenemiseen ja rintojen sidekudos kuivuu ja menettää elastisuuttaan (Gusterson ym. 2012).

Myös maitorauhasen rakenne muuttuu koko naisen eliniän sikiökaudesta aina vaihdevuosiin saakka. Kuukautiskierron aikana maitorauhasissa tapahtuu toistuvaa kasvua ja palautumista, lopullisen muotonsa

maitorauhanen saa vasta imetyksen aikana. Suurin osa rauhastiehyistä katoaa ja sidekudos muuttuu rasvakudokseksi vaihdevuosien aikana (Härkönen 2008). Nämä jatkuvat muutokset selittyvät todennäköisesti maitorauhasen kantasolujen ylläpitämällä progenitori- eli esiastesoluilla, jotka erilaistuvat ja jakautuvat (Lindeman ym. 2010).

2.4. Karsinogeneesi

Syövällä tarkoitetaan sairautta, jossa esiintyy solukon tai kudoksen epänormaalia kasvua. Karsinogeneesi eli syövän synty on pääosin riippumatonta ulkoisista kasvuärsykkeistä. Syövän synnylle on useita erilaisia teorioita. Kaikille yhteistä on kuitenkin se, että syöpä syntyy vaiheittain useiden eri mekanismien vaikutuksesta. Lähes kaikki syövät saavat alkunsa yhdestä vaurioituneesta solusta, joka alkaa jakautua hallitsemattomasti. Syntyneisiin tytärsoluihin kertyy lisää normaalisolusta poikkeavia muutoksia, kunnes lopulta kyseessä on heterogeenista solukkoa sisältävä kasvain (Isola ja Kallioniemi 2013, Hanahan ja Weinberg 2010).

Syöpä saa alkunsa aina geenien ja DNA:n mutaatioista. Normaalit solut sisältävä proto-onkogeenejä eli esisyöpägeenejä, joiden muuttunut toiminta aiheuttaa syöpää tai lisää syöpäsolukon pahanlaatuisia ominaisuuksia. Lähes kaikkien onkogeenien toiminta liittyy solukasvun säätelyyn. Kasvunrajoitegeenit puolestaan estävät nimensä mukaisesti solujen jakautumista. Jos niiden toiminta estyy, solut voivat jatkaa jakautumista rajattomasti. Syövän kehittyminen vaatii yleensä useita mutaatioita näissä molemmissa geenityypeissä (Isola ja Kallioniemi 2013).

Syövän synty on pitkä prosessi, jossa on useita vaiheita. Ensimmäistä vaihetta kutsutaan initaatioksi, jolloin tapahtuu DNA:n mutaatio. DNA-mutaatioissa yksi DNA:n nukleotidi katoaa tai muuttuu, ja tämä vaikuttaa geenin koodaamaan proteiiniin. Pistemutaatio voi siis muuttaa syntyvän proteiinin toiseksi tai pysäyttää proteiinisynteesin liian aikaisin. Kromosomimutaatioissa puolestaan koko kromosomin rakenne muuttuu. Esimerkiksi translokaatioissa kaksi erilaista kromosomia vaihtavat osia. Tällöin onkogeeni eli syöpägeeni voi siirtyä toisen geenin säätelyalueen yhteyteen, ja johtaa proteiinituotannon moninkertaistumiseen. Geenien

monistuminen taas on DNA-vaurio, joka syntyy DNA:n kahdentumisessa. Se johtaa tytärsoluihin, joissa on normaalia huomattavasti suurempi määrä kopiota onkogeenistä. Initaatiovaiheessa muutoksen kohteena ovat yleensä siis proto-onkogeenit ja kasvunrajoitegeenit (Isola ja Kallioniemi 2013).

Toinen vaihe syövän synnyssä on promotio, jolloin kohdesolukolle tapahtuu syövän synnylle ratkaisevat vauriot. Promotiovaiheeseen liittyy yleensä kohteena olevan solukon suurentunutta solunjakautumisaktiivisuutta. Normaalin solunjakautumisen rajallisuudesta ovat vastuussa kromosomien päissä olevat telomeerit ja DNA-polymeraasi. Telomeerien alueella polymeraasi ei voi kahdentaa DNA:ta täydellisesti, jolloin tytärsoluihin tulee aina entistä hieman lyhyempi telomeeri ja lopulta solunjakautuminen ei enää ole mahdollista ja solu kuolee. Syöpäsoluissa aktivoituu telomeraasientsyymi, joka estää telomeerien lyhentymisen ja näin mahdollistaa loputtoman jakautumisen (Isola ja Kallioniemi ym. 2013).

Promootion jälkeen seuraa progressio, jolloin solukossa tapahtuu lisää muutoksia, jotka lisäävät sen pahanlaatuisuutta. Tällöin solut alkavat täyttää solubiologisesti syövän tunnusmerkit; syöpäsolut pystyvät itse tuottamaan tarvitsemansa kasvusignaalit, solut eivät reagoi ulkoisiin solunjakautumista rajoittaviin signaaleihin ja ne pystyvät välttämään apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman. Syöpäsolut pystyvät myös jakautumaan rajattomasti ja kasvain kykenee muodostamaan oman verisuonituksen (angiogeneesi). Tyypillistä on myös kyky tunkeutua ympäröiviin kudoksiin ja muodostaa etäpesäkkeitä (Hanahan ja Weinberg 2010, Blanpain 2013). Etäpesäkkeitä syntyy jos syöpäsoluja kulkeutuu primäärikasvaimesta imuneste- tai verenkierron mukana muualle elimistöön. Progressio selittää myös sen, miksi aina yhdestä solusta alkunsa saanut syöpäkasvain sisältää lopulta ominaisuuksiltaan hyvin erilaista syöpäsolukkoa. (Isola ja Kallioniemi 2013)

2.5. Rintasyövän synty ja eteneminen

Rintasyövän synnylle on olemassa kaksi teoriaa. Perinteisen evoluutioteorian mukaan syöpä saa alkunsa rintarauhasepiteelin kantasoluista, joihin kasautuu sattumanvaraisia mutaatioita ja nämä mahdollistavat syövän etenemisen. Kasvaimen fenotyyppi on näin ollen mutaatioiden määrittämä. Toisen teorian (kantasoluteoria) mukaan progenitorisolut eli esiastesolut joutuvat mutaation kohteeksi, jolloin syntyneen kasvaimen fenotyyppi on riippuvainen kantasolun erilaistumisasteesta (Olsson 2013). Mutaation kohteena oleva progenitorisolu voi myös säilyttää kantasoluille ominaisen jakautumis- ja erilaistumiskyvyn, jolloin se voi muuttuessaan ylläpitää erilaisten pahanlaatuisten solujen kasvua ja näin edesauttaa heterogeenisen kasvaimen syntyä (Härkönen 2013).

Kaikille rintasyöpätyypeille on yhteistä naishormoni estrogeenin välillinen tai välitön vaikutus. Estrogeeni on välttämätöntä mitorauhasen normaalille kehitykselle ja se on tehokas kasvainpromootori säädellössään eri syistä muuntuneiden solujen kasvua. Rintarauhasen normaalissa epiteelissä estrogeenireseptoreja esiintyy vain osassa luminaalisoluja, myoepiteelisoluissa reseptoria ei ole. Kantasoluteorian mukaan luminaaliset syöpätyypit saavat alkunsa estrogeenireseptoria ilmentävistä progeteronisoluista ja estrogeeni myös stimuloi tällaisten karsinoomien kasvua. Syövän edetessä etenkin ERBB2 (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) eli HER2 (Human Epidermal growth factor gene 2) -onkogeeneittien aktivoituminen voi usein johtaa estrogeenistä riippumattomaan kasvuun ja estrogeenireseptoreiden toiminta voi jopa vaimentua kokonaan. (Härkönen 2008).

Rintasyövän etenemiselle ratkaisevaa on kasvaimen tunkeutuminen tiehyen tyvikalvon läpi. Tämän mahdollistaa myoepiteelisolujen muuntuminen tai katoaminen, jolloin niiden kasvua estävä vaikutus häviää. Kasvainsoluissa on myös mesenkymaalisten eli side- ja tukikuodoksen kantasolujen ominaisuuksia, jolloin ne voivat irrota alustastaan ja kulkeutua muualle elimistöön. Näitä muutoksia indusoivat etenkin tukikudoksen muodostamat kasvutekijät. Estrogeenireseptorien vaimeneminen edesauttaa myös

kasvaimen invaasiota. Vaikka estrogeeni lisääkin estrogeeni-positiivisten solujen kasvua, se myös ylläpitää solujen korkeaa erilaistumisastetta ja näin estää kasvainsolujen tunkeutumista ympäröiviin kudoksiin (Härkönen 2008).

2.5.1. Rintasyöpään liittyvät geenimuutokset

Tutkittaessa perinnöllistä rintasyöpää on löydetty tiettyjä geenejä, joiden mutaatiot altistavat voimakkaasti pahanlaatuisen kasvaimen synnylle. Suvuittain esiintyvät syövät ovat yleensä BRCA1, BRCA2 (Breast Cancer 1 and 2 gene) tai p53 geenien muutosten aiheuttamia (Polyak 2007). Nämä kaikki ovat kasvunrajoitegeenejä ja osallistuvat DNA-vaurioiden korjaamiseen (taulukko 1). EGF (Epidermal Growth Factor)-reseptorigeeniperheeseen kuuluva ERBB2 eli HER2-geeni kykenee muuntamaan maitorauhasen soluja pahanlaatuisiksi ja HER2:n on todettu olevan yliekspressoitunut suuressa osassa rintasyöpiä (taulukko 1) (Härkönen 2008).

Muita rintasyövässä tutkittuja yli-ilmentyviä tai vaimentuneita geenejä ovat esimerkiksi PTEN (Phosphate and Tensin Homolog), BCOX1 (Breast Cancer Overexpressed Gene 1), HOXB9 (Homeobox 9) ja MUC1 (Mucin1, Cell surface associated) (taulukko 1). PTEN on tuumorisuppressorigeeni, joka säätelee solujen kasvuun vaikuttavaa signalointia ja apoptoosia. Häiriöt sen toiminnassa edesauttavat syövän kehitystä (Köninki 2006). BCOX1:n ekspressiota ei havaita normaalissa rintarauhaskudoksessa, joten se on yhteydessä syövän kehitykseen vaikka sen tarkkaa toimintamekanismia ei tunneta (Song ym. 2006). Yksilönkehitystä normaalisti ohjaava homeoottinen HOXB9 edistää syövän kehitykselle tärkeitä angiogeneettisiä tekijöitä (Hayashida ym. 2009). MUC1 koodaa glykoproteiini musiinia ja sitä esiintyy etenkin epiteelisoluissa. MUC1 yli-ilmentyminen stimuloi solujen kasvua ja estää immuunijärjestelmää tuhoamasta syöpäsoluja (Zaretsky ym. 2006).

Taulukko 1. Rintasyöpägeenit

Geeni	Normaali toiminta	Toiminnan muutos syöpäsolussa
BRCA1	kasvurajoitegeeni	vaimeneminen
BRCA2	kasvurajoitegeeni	vaimeneminen
p53	kasvurajoitegeeni	vaimeneminen
HER2	solusignaaloinnin säätely	yliekspressio
PTEN	kasvurajoitegeeni	vaimeneminen
BCOX1	?	yliekspressio
HOXB9	yksilönkehityksen ohjaus	yliekspressio
MUC1	glykoproteiini musiinin tuotanto	yliekspressio

Näiden lisäksi on löydetty monia muitakin onkogenejä ja kasvunrajoitegenejä, jotka pystyvät muuntamaan rauhasepiteeliä ja säätelemään kasvainsolujen toimintaa. Nämä selittävätkin, miksi rintasyövät voivat olla hyvin heterogeenisiä ja niiden fenotyypit hyvin yksilöllisiä (Härkönen 2008).

2.6. Rintasyövän toteaminen, luokittelu ja ennusteelliset tekijät

Rintakudoksen muutosten toteamiseen käytetään kolmoisdiagnostiikka, johon kuuluu rintojen inspektio ja palpaatio käsin, kuvantamistutkimukset, sekä neulanäytteiden histopatologiset tutkimukset (Sudah 2013). Jos yksikään kolmoisdiagnostiikan osista viittaa pahanlaatuisuuteen, muutos poistetaan aina kirurgisesti. Ensisijainen kuvantamismenetelmä on mammografia ja tämän lisäksi tehdään yleensä täydentävä ultraäänitutkimus. Nuorilla (alle 30- v.) naisilla rintakudos on tiiviimpää, jolloin mammografian sensitiivisyys ei välttämättä ole riittävä. Näissä tapauksissa ensisijainen kuvantamismenetelmä on ultraäänitutkimus (Leidenius ja Joensuu 2013). Kaikista epäilyttävistä löydöksistä otetaan paksuneulanäytteet tai vakuumbiopsia ultraäänitutkimuksen yhteydessä. Näytteitä tulee ottaa riittävän monta mahdollisimman luotettavan diagnoosin saamiseksi (Sudah 2013). Koska rintasyövän mahdollisia hoitovaihtoehtoja on nykyään useita, diagnoosien on oltava riittävän yksityiskohtaisia. Tämän takia myös syöpätyypin mahdollisimman tarkka luokittelu auttaa sopivan hoidon valinnassa.

Kainalon imusolmukkeiden testaamisella saadaan tällä hetkellä tärkein tieto rintasyövän ennusteesta (Leidenius 2008). Sairaalla rinnan puoleisen kainalon rasvakudos poistetaan leikkauksen yhteydessä ja siitä tutkitaan metastaattisten imusolmukkeiden määrää. Mitä enemmän niitä on, sitä lyhyempänä voidaan pitää sekä tauditonta aikaa, että kokonaiselinaikaa. Kasvaimen koko määritetään myös aina ja suuren kasvaimen kyseessä ollessa myös kainaloimusolmukemetastaasien riski kasvaa. Kasvaimen erilaistumisaste, solujen jakautumisnopeus ja angiogeneesi kertovat myös ennusteesta. Mitä vähemmän syöpäsolut ovat erilaistuneet, sitä pienempi on metastoitumisriski ja sitä parempi on 5-vuotiselossaoloennuste. Solujen suuri jakautumisnopeus ja verisuoni-invaasio huonontavat ennustetta. Noin 60-80 % kaikista rintasyövästä ilmentää estrogeeni- ja progesteronireseptoreja ja ennuste tämän tyyppisten kasvainten kohdalla on

yleensä parempi kuin reseptorien suhteen negatiivisilla kasvaimilla. Reseptorimäärityksellä on myös merkitystä sopivaa lääkehoitoa valittaessa (Leidenius 2008).

2.6.1 Histologinen luokittelu

Rintasyövän lopullinen histologinen luokitus tehdään aina leikkauksen yhteydessä formaliinilla fiksoidusta parafiinileikkeestä. Rintasyöpä luokitellaan yleensä kasvutapansa perusteella kahteen päätyyppiin. Duktaalinen karsinooma on rintatiehyistä alkanut karsinooma ja lobulaarinen karsinooma puolestaan on rauhasperäinen syöpä. Useita muitakin rintasyöpiä tavataan, mutta ne ovat huomattavasti harvinaisempia kuin edellä mainitut. Lisäksi niiden ennuste on yleensä parempi (Leidenius & Joensuu 2013).

Duktaalinen karsinooma

Duktaalinen karsinooma saa alkunsa rintatiehyiden soluista ja se edustaa noin 70 %:a kaikista rintasyövistä. Invasiivinen duktaalinen karsinooma on sen yleisin muoto, ja sen esiintyvyys on noin 40-70% (Heikkilä 2008). Invasiivisen kasvaimen solut tunkeutuvat rintatiehyen sisältä ympäröivään kudokseen ja kasvain voi näin ollen lähettää etäpesäkkeitä. Intraduktaalinen karsinooma, *carcinoma inductale in situ* (DCIS) ei puolestaan leviä rintatiehyen ulkopuolelle, eikä se siis voi käytännössä metastoitua (Leidenius & Joensuu 2013). Sen vuoksi se onkin luokiteltu rintasyövän esiasteeksi, eikä varsinaiseksi syöväksi. Duktaalisen karsinooman mikroskooppinen kuva on hyvin vaihteleva. Solut voivat kasvaa nauhamaisina tai mattomaisina rakenteina tai solujonoina. Tuman koko voi vaihdella paljon (Heikkilä 2008).

Lobulaarinen karsinooma

Kaikista rintasyövistä noin 10-20% on lobulaarisia karsinoomia (Leidenius & Joensuu 2013, Heikkilä 2008). Kyseessä on rauhasperäinen kasvaintyyppi, joka on viime vuosikymmeninä yleistynyt hormonikorvaushoitojen käytön seurauksena. Lobulaarisella rintasyövällä on duktaalista suurempi todennäköisyys esiintyä molemmissa rinnoissa.

Siitä huolimatta sen ennuste on melko samanlainen kuin duktaalilla karsinoomalla. Invasiivinen muoto lobulaarisesta karsinoomasta voi lähettää etäpesäkkeitä, etenkin vatsaonteloon. Lobulaarisen karsinooman *in situ*-muoto luokitellaan kuitenkin rintasyövän vaaratekijäksi, ei esi-asteeksi. Mikroskooppisesti lobulaariselle karsinoomalle on tyypillistä solujen kasvu jonomaisina rakenteina ja tumat ovat usein pieniä (Heikkilä 2008).

Muut rintasyövät

Tubulaarinen karsinooma on hyvin erilaistunut duktaalinen karsinooma, jossa solut kasvavat nimensä mukaisesti tubulaarisina eli tiehyen kaltaisina rakenteina (Leidenius & Joensuu 2013). Kasvain lähettää harvoin etäpesäkkeitä ja sen ennuste on erinomainen. Kaikista rintasyöivistä noin 2-7 % on tubulaarista karsinoomaa (Heikkilä 2008). Harvinainen (1-2 %) papillaarinen karsinooma esiintyy sekä invasiivisena että *in situ*-muotoisena. Useimmiten se esiintyy osana duktaalista karsinoomaa. Papillaarisen karsinooman ennuste on yleensä hyvä. Kasvaimen solut muodostavat papillaarisia rakenteita tiehyiden sisällä. Medullaarinen karsinooma esiintyy laajoina selkeärajaisina solusaarekkeina ja solut ovat poikkeuksellisen suuria (Leidenius & Joensuu 2013). Myös tämän muodon ennuste on suhteellisen hyvä. Musinoottisen karsinooma on tarkkarajainen, gelatiinimainen kasvain (Heikkilä 2008), jonka solujen ulkopuolella on paljon limaa. Myös tämän muodon ennuste on hyvä (Leidenius & Joensuu 2013).

2.6.2. Patologinen luokitus

Tutkittaessa rintasyövän levinneisyyttä käytetään yleisesti UICC:n (Union for International Cancer Control) patologista TNM- luokitusta (taulukko 2). T-luokalla tarkoitetaan kasvaimen kokoa, N-luokalla alueellisten imusolmukkeiden tilaa ja M-luokalla etäpesäkkeitä. Levinneisyysluokitus tehdään aina, jos potilaalla on etäpesäkkeisiin viittaavia löydöksiä tai oireita, tai jos syöpä on uusiutunut paikallisesti (Joensuu ja Huovinen 2013).

**Taulukko 2. Rintasyövän TNM-luokitus
(Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka-
ja hoitosuositus 2013)**

Primaarikasvain (pT-luokka)

pTX	Primaarikasvainta ei voida määrittää
pT0	Ei viitteitä primaarikasvaimesta
pTis	Karsinooma in situ tai Pagetin tauti, jonka yhteydessä ei ole osoitettavissa kasvainta
pT1	Kasvaimen suurin läpimitta on < 2 cm
pT2	Kasvaimen suurin läpimitta on yli 2, mutta korkeintaan 5 cm
pT3	Kasvaimen suurin läpimitta on yli 5 cm
pT4	Minkä tahansa kokoinen kasvain, joka kasvaa suoraan ihoon tai rintakehän seinämään, johon luetaan kylkiluut, interkostaalilihakset ja serratus anterior-lihas mutta ei pectoralislihasta
pT4a	Kasvain on kiinnittynyt rintakehän seinämään
pT4b	Appelsiini-ihomuutos, haavauma tai saman rinnan alueella olevia satelliittipesäkkeitä
pT4c	Molemmat edellä mainitut (pT4a ja pT4b)
pT4c	Inflammatorinen karsinooma

Alueelliset imusolmukkeet (pN-luokka)

pNX	Alueellisia imusolmukkeita ei voida määrittää
pN0	Ei imusolmuke-etäpesäkkeitä
pN1mi	Mikrometastaasi (kooltaan yli 0,2 mm, mutta korkeintaan 2 mm)
pN1	Metastasointi 1-3 imusolmukkeessa samanpuoleisessa kainalossa ja/tai mikroskooppinen metastointi samanpuolisissa parasternaali-imusolmukkeissa
pN2	Metastasointi 4-9 imusolmukkeessa samanpuolisessa kainalossa tai kliinisesti todettu metastointi samanpuolen parasternaali-imusolmukkeissa muttei molemmissa
pN3	Metastasointi vähintään 10 kainaloimusolmukkeessa tai kainalometastasoinnin kliinisesti todettu metastasointi samanpuolisissa parasternaali-imusolmukkeissa tai metastasointi vähintään 3 kainaloimusolmukkeessa mikroskooppisen parasternaalimetastasoinnin lisäksi tai metastasointi infra- tai supraklavikulari-imusolmukkeissa

Etäpesäkkeet kauempana (M-luokka)

MX	Etäpesäkkeitä ei voida määrittää
M0	Ei etäpesäkkeitä
M1	Etäpesäkkeitä

2.6.3. Genotyyppiin perustuva luokittelu

Viime aikoina rintasyövän luokittelussa on alettu käyttää myös genotyyppiin perustuvaa luokittelua perinteiseen mikroskooppiseen kuvaan perustuvan fenotyypiluokittelun lisäksi. Genotyypiluokittelusta on hyötyä etenkin arvioitaessa syövän ennustetta ja lääkehoitojen vastetta. Rintasyövän genotyypialaryhmät ovat HER2-muoto, luminaalinen A ja B muoto, sekä basaalinen muoto. HER2 eli ERBB2- geeni koodaa solukalvon läpäisevää ja solun kasvua säätelevää solusignaaloinnissa mukana olevaa glykoproteiinia. ERBB2- geenin on todettu olevan monistunut noin 15 %:ssa kaikista rintasyöivistä. HER2- rintasyöpätyyppi ei ilmennä estrogeeni- tai progesteronireseptoreja. Molemmat luminaaliset tyypit ilmentävät puolestaan estrogeeni- ja mahdollisesti progesteronireseptoreja. A-tyyppi on ERBB2:n suhteen positiivinen ja B- muoto negatiivinen. Basaalinen muoto puolestaan on nk. kolmoisnegatiivinen eli on negatiivinen estrogeeni-, progesteroni- ja HER2-reseptorien suhteen (Heikkilä ja Kärjä 2013). Näistä kolmesta basaalisien ryhmän kasvaimilla on huonoin ennuste, kun taas luminaalisella A-muodolla ennuste on paras (Polyak 2007).

3. RINTASYÖVÄN HOITO

Rintasyövän hoito suunnitellaan yksilöllisesti ottaen huomioon kasvaimen ennusteelliset ja levinneisyystekijät, sekä potilaan yleinen terveydentila. Hoitomenetelmät ovat leikkaushoito, sädehoito ja lääkehoito (Leidenius ja Joensuu 2013, Duodecim Käypä hoito-suositus 2007).

3.1. Leikkaushoito

Leikkaushoidon suunnitteluun vaikuttavat kasvaimen laatu ja koko, potilaan ikä, terveydentila ja omat toiveet mahdollisesta rinnan säilyttämisestä (Jahkola ym. 2007). Leikkaushoidon tavoitteena on poistaa kasvain ja kainalon alueen imusolmukkeiden metastaasit. Samalla selviää lopullisesti kasvaimen koko sekä ennusteeseen vaikuttavat tekijät. Rinnan säästävällä leikkauksella poistetaan kasvain ja riittävästi tervettä kudosta sen ympäriltä. Säästävä leikkaus on nykyään yhä yleisempi, mutta sille on myös joitain vasta-aiheita; kasvaimen suuri koko ja huono sijainti sekä pieni rinnan koko ovat usein esteenä säästävälle leikkaukselle. Jos potilas on hyvin nuori, paikallinen uusimisriski on suurempi, joten kokopoisto on suositeltavaa, samoin kuin rintasyöväälle altistavan geenimutaation kantajan kohdalla (Leidenius ja Joensuu 2013). Osapoistoon tulee aina liittää mukaan sädehoito paikallisen uusimisriskin välttämiseksi. Viime aikoina on todettu että säästävällä leikkauksella ja sädehoidolla saadaan usein yhtä hyvät hoitotulokset kuin koko rinnan poistolla (Jahkola ym. 2013)

Masektomiassa eli koko rinnan poistossa pyritään saamaan kaikki rintarauhaskudos pois mahdollisimman tarkkaan. Potilaan toiveesta ja sairauden laadusta riippuen rinnan rekonstruktio voidaan tehdä heti syöpäleikkauksen yhteydessä tai myöhemmin. Nykyisin korjausleikkauksilla saadaan varsin tyydyttäviä tuloksia eivätkä ne rasita potilasta kohtuuttomasti (Jahkola 2007).

Rintasyöpäleikkauksen yhteydessä poistetaan usein kainalorasvan mukana kainalon imusolmukkeet tai osa niistä, koska imusolmukkeiden metastaasit ovat rintasyövän tärkein ennusteellinen tekijä (Leidenius 2013). Imusolmukkeet tutkitaan ennen leikkausta ultraäänellä ja tarvittaessa imusolmukkeista otetaan koepalat. Mikäli koepalossa ei nähdä metastaaseja,

potilaille tehdään yleensä vartijasolmukebiopsia (Vehmanen 2012). Vartijaimusolmukkeilla tarkoitetaan ensimmäisiä imusolmukkeita, joihin imuneste rinnasta kulkeutuu (Mustonen 2001). Näiden imusolmukkeiden tila kuvaa hyvin kaikkien kainalon alueen imusolmukkeiden tilaa. Jos vartijasolmukkeissa ei havaita metastaseja, voidaan kainalotyhjennyksestä luopua, koska se aiheuttaa potilaille usein haittavaikutuksia. Tällaisissa tapauksissa sädehoito ja lääkkeellinen liitännäishoito ovat kuitenkin yleensä välttämättömiä (Vehmanen 2012).

3.2. Sädehoito

Postoperatiivinen sädehoito on ollut keskeisessä asemassa rintasyövän hoidossa jo vuosikymmenien ajan (Schratter-Shen 2012). Sädehoidossa käytetään suurienergistä ionisoivaa säteilyä, joka vaurioittaa DNA:ta ja vaikuttaa näin etenkin jakautumisvaiheessa oleviin soluihin (Kouri ja Sailas 2013). Syöpäsolujen jakautuminen on normaaleja soluja nopeampaa, joten sädehoidolla pyritään kohdistamaan solujen vaurioittaminen vain pahanlaatuisiin soluihin. Sädehoidolla on kuitenkin vaikutuksia myös terveisiin soluihin. Sädehoitoa annetaan potilaille leikkaushoidon jälkeen ja tarkoituksena on tuhota mahdolliset leikkausalueelle tai imusolmukkeisiin jääneet syöpäsolut (Joensuu ja Huovinen 2013). Sädehoito vähentää selvästi paikallista uusiutumisen riskiä. Säästävän leikkauksen jälkeen hoito paikallistetaan jäljelle jääneelle rinnan alueelle ja tarvittaessa kainalon imusolmukkeisiin. Masektomian jälkeen sädehoito on aiheellista vain, jos kasvain on ollut suuri tai imusolmukkeista on löytynyt metastaseja. Tällöin säteilyannos kohdistetaan leikkausonteloon ja imusolmukkeisiin (Vehmanen 2013). Hoitoa annetaan yleensä useita kertoja viikossa 3-5 viikon ajan. Yksi hoitokerta kestää yleensä muutamia minuutteja. Sädehoidon kokonaisannoksen jako pienempiin kerta-annoksiin on todettu olevan yhtä tehokasta kuin suuren kerta-annoksen antaminen. Näin voidaan normaalin kudoksen reaktioita säteilyannokseen vähentää merkittävästi (Kouri ym. 2013).

3.3. Lääkehoito

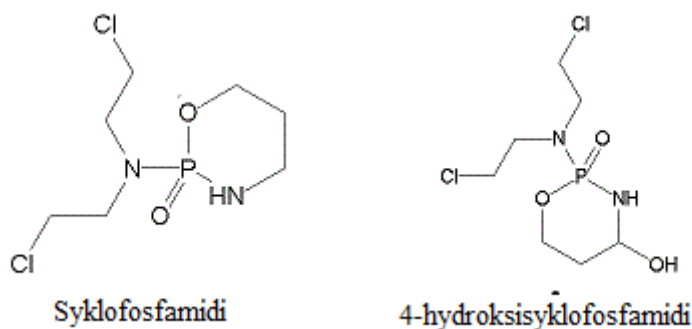
3.3.1. Solunsalpaajat

Sytostaatit eli solunsalpaajat vaikuttavat solujen jakautumista estävästi eikä niillä juurikaan ole tehoa jakautumisen lepovaiheessa oleviin soluihin (Elonen 2001). Sytostaateilla on useita vaikutusmekanismeja kasvainsolujen rakenteisiin ja toimintoihin. Ne voivat esimerkiksi häiritä tai estää DNA:n synteesiä tai muodostaa virheellisiä DNA-sidoksia. Rintasyövän hoidossa käytetään yleensä useamman solunsalpaajan yhdistelmää, jolloin pyritään saavuttamaan eri jakautumisvaiheessa olevat solut. Näin pyritään sekä tehostamaan lääkehoidon vaikutusta, että vähentämään haittavaikutuksia, kun yhtä lääkeainetta käytetään pienempi määrä (Johansson 2012). Lääkehoito toteutetaan yleensä laskimoon annettuna infuusiona ja annostus suhteutetaan potilaan yleistilaan, kokoon ja muihin sairauksiin. Infusioiden annetaan kolmen viikon välein kerta-annoksena, yleensä kuuden viikon ajan. Taulukossa 3 on esitelty yleisimpiä rintasyövän hoidossa käytettyjä solunsalpaajia.

Taulukko 3. Rintasyövän hoidossa yleisimmin käytetyt solunsalpaajat

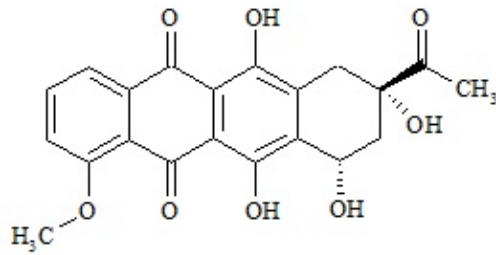
Vaikuttava aine	Vaikutustapa	Antotapa	Annostus	Kauppanimi(ä)
syklofosfamidi	alkyloiva aine, DNA-ketjun katkeaminen, virheelliset sidokset	laskimoinfuusio, oraalinen	laskimoon 600-2400mg/m ² 3-4 vkon välein, oraalinen 50-150mg/vrk	Sendoxan, Endoxan
epirubisiini	topoisomeraasi II-estäjä, DNA-synteesin esto	laskimoinfuusio	60-120mg/m ² 3-4 vko välein	Epirubicin
fluorourasiili	antinetaboliitti, DNA-vauriot ja synteesin esto	laskimoinfuusio	600mg/m ² 3-4 vko välein	Fluorouracil, Flurablastin
metotreksaatti	foolihappoanalogi, DNA-synteesin esto	laskimoinfuusio, oraalinen	laskimoon 10-60mg/m ² , oraali sesti <30mg/m ² maks. 5 pvä ajan+tauko 2 vko	Ebetrex, Methorexat, Metoject, Trexan
doketakseli	mitoosinestäjä	laskimoinfuusio	60-75mg/m ² 3-4 vko välein	Taxotere

Yleisin rintasyövän hoidossa nykyisin käytetty yhdistelmähoito on CEF (Cyclophosphamide, Epirubisiin, 5-fluorouracil) eli syklofosfamidin, epirubisiinin ja fluorourasiilin yhdistelmä. Syklofosfamidi on alkyloiva lääkeaine, joka muodostaa kovalentteja sidoksia DNA-ketjun sisään tai ketjujen välille (Duodecim Lääketietokanta 2014). Sidosten seurauksena DNA-ketju usein katkeaa tai muodostuu uusia virheellisiä sidoksia. Syklofosfamidi on aihiolääke, eli se on inaktiivinen ennen kuin se metaboloituu maksassa aktiiviseen muotoon (Puistola ja Vähäkangas 2014) (kuva 3). Terapeuttisesti tehokkain syklofosfamidin metaboliitti on 4-hydroksisyklofosfamidi (Duodecim lääketietokanta 2014).



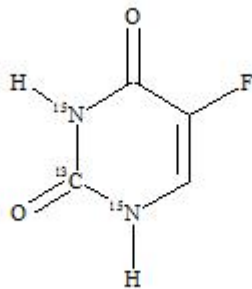
Kuva 3. Syklofosfamidin ja 4-hydroksisyklofosfamidin rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

Epirubisiini (kuva 4) on doksorubisiinin johdannainen, jolla on useita soluun kohdistuvia vaikutuksia (Elonen ja Tolonen 2014). Solunsalpaajavaikutuksen kannalta keskeinen mekanismi kohdistuu topoisomeraasi II- entsyymien toiminnan estoon. Topoisomeraasi II on välttämätön entsyymi DNA:n kopioinnissa. Epirubisiini kiinnittyy DNA:n ja topoisomeraasin väliseen kompleksiin estäen entsyymien toiminnan ja aiheuttaa DNA- ketjun katkeamisen. Näin uuden DNA-ketjun syntetisointi ei ole mahdollista ja kohdesolu tuhoutuu lopulta apoptoottisesti.



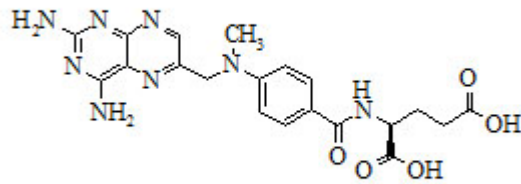
Kuva 4. Epirubisiinin rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

Fluorourasiili (kuva 5) on antimetaboliitti, jonka vaikutus perustuu tymidylaattisynteesin estoon. Tymidylaatti-entsyymin avulla solu syntetisoi DNA:n tymidiini-nukleotideja. Fluorourasiilin aiheuttamat häiriöt entsyymin toiminnassa aiheuttavat DNA:n nukleotideissa epätasapainon, mikä lopulta johtaa vaurioihin DNA:ssa ja sen synteesissä.



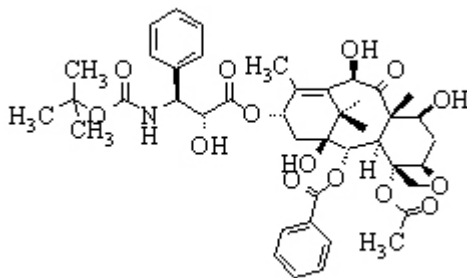
Kuva 5. Fluorourasiilin rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

Jos CEF-yhdistelmähoito ei jostain syystä sovellu potilaalle, toinen käytetty yhdistelmä on CMF (Cyklofosamid, methotrexate, 5-fluorouracil), jossa epirubisiini on korvattu metotreksaatilla (kuva 6). Metotreksaatti on foolihapon analogi, joka soluissa estää dihydrofoolihapporeduktaasin (DHFR) toimintaa (Duodecim lääketietokanta 2014). DHFR:n toiminnan esto johtaa häiriöihin pyrimidiinien ja puriinien synteesissä, ja sitä kautta muutoksiin myös DNA:n synteesissä.



Kuva 6. Metotreksaatin rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

Edellä mainittuihin yhdistelmiin voidaan lisäksi tarvittaessa lisätä taksaanihoito. Taksaaneista yleisimmin käytetään doketakselia (kuva 7). Doketakseli on mitoosin estäjä, joka sitoutuu solujen mikrotubulusten tubuliiniproteiiniin ja stabiloi mikrotubuluksia (Elonen 2001). Näin mikrotubulusten normaali toiminta mitoosin aikana häiriintyy, eivätkä ne voi erottaa vastinkromosomipareja toisistaan.



Kuva 7. Doketakseli rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

3.3.2. Hormonaalinen hoito

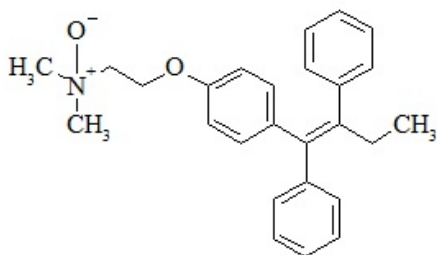
Hormonaalinen lääkehoito tehoaa vain estrogeenireseptoriposiitivisiin syöpätyyppeihin ja sitä voidaan antaa sekä pre- että menopausaalisille potilaille (Joensuu ja Huovinen 2013). Hormonaalisessa hoidossa käytetään tamoksifeenia ja aromataasinestäjiä (Huovinen ja Tanner 2013). Taulukossa

4 on esitelty Suomessa rintasyövän hoidossa käytettävät hormonaaliset lääkkeet.

Taulukko 4. Rintasyövän hoidossa käytetyt hormonaaliset lääkkeet

Vaikuttava aine	Vaikutustapa	Antotapa	Annostus	Kauppanimi(ä)
tamoksifeeni	antiestrogeeni	oraalinen	20mg/vrk 5v. ajan	Tadex, Tamofen
anastrotsoli	aromataasin estäjä	oraalinen	1mg/vrk 5v. ajan	Anastrozol, Anazol, Arimidex
letrotsoli	aromataasin estäjä	oraalinen	2.5mg/vrk 5. ajan	Femar, Letrolan, Letrozol
eksemestaani	aromataasin estäjä	oraalinen	25mg/vrk 5v. ajan	Aromasin, Exemestan, Xemestan

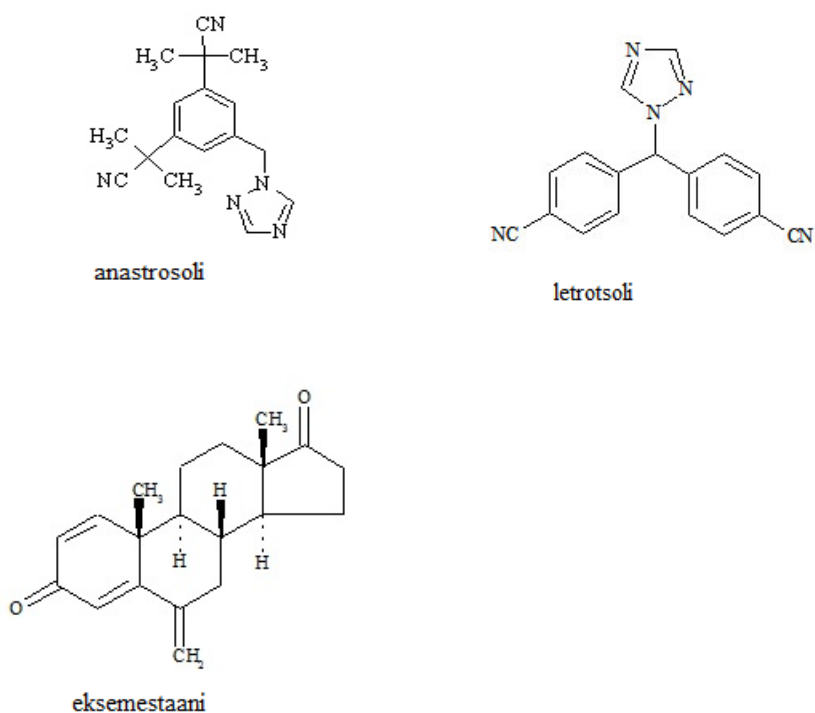
Tamoksifeeni (kuva 8) on antiestrogeeni, joka sitoutuu estrogeenin kanssa samaan solukalvon reseptoriin ja estää näin estrogeenin vaikutuksia solussa (Vähäkangas ja Puistola 2014).



Kuva 8. Tamoksifeenin rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

Aromataasinestäjiä pidetään nykyään tehokkaampana kuin tamoksifeenia (Joensuu ja Huovinen 2013). Rintasyövän hoidossa käytettyjä aromataasin estäjiä ovat anastrotsoli, letrotsoli ja eksemestaani (kuva 9). Niiden vaikutus perustuu estrogeenin synteessin estoon. Aromataasin estäjät soveltuvat vain postmenopausaalisille potilaille, sillä toimivat munasarjat voivat alkaa

kompensoida hormonivajetta ja näin potilaalle voi kehittyä munasarjojen kudoksen liikakasvua (Joensuu ja Huovinen 2013). Postmenopausaalisilla naisilla androgeenejä (androsteenidioni ja testosteroni) muodostuu lähinnä lisämunuaisissa ja aromataasiestymän avulla androsteenidioni muuttuu edelleen estroniksi ja lopulta estradioliksi. Anastrooli, letrotsoli ja eksemestaani sitoutuvat kilpailevasti aromataasiin estäen näin luonnollisten substraattien kiinnittymisen. Aromataasin estäjät inhiboivat siis jo estrogeenin synteesiä kun tamoksifeeni vain estää elimistössä jo olevan estrogeenin vaikutusta (Duodecim lääketietokanta 2014).



Kuva 9. Anastroolin, letrotsolin ja eksemestaanin rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

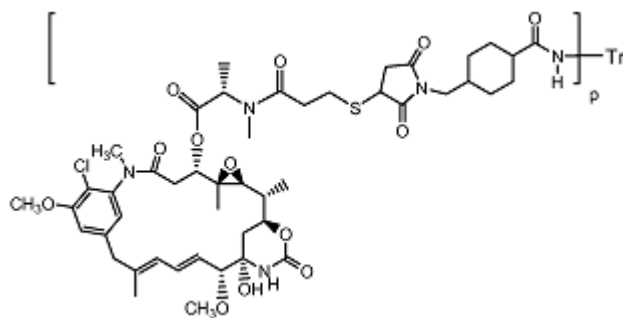
3.3.3. Täsmälääkkeet

Syövän synnystä, kasvusta ja leviämisestä on nykyään paljon tietoa ja tämä on mahdollistanut täsmälääkkeiden kehityksen. Täsmälääkkeellä tarkoitetaan lääkeainetta, joka pystyy häiritsemään nimenomaan syöpäsolun kasvua ja toimintaa vaikuttamatta terveisiin soluihin. Taulukossa 5 on esitelty Suomessa rintasyövän hoidossa käytettyjä täsmälääkkeitä. Tällä hetkellä käytetyin täsmälääke on trastutsumabi.

Taulukko 5. Rintasyövän hoidossa käytettyjä täsmälääkkeitä

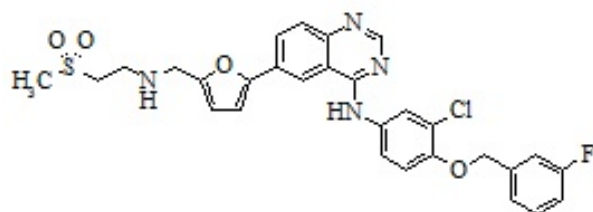
Vaikuttava aine	Vaikutustapa	Antotapa	Annostus	Kauppanimi(ä)
trastutsumabi	HER2-vasta-aine	laskimoinfuusio, injektio ihon alle	6-8mg/kg 3 vko välein tai 4-2mg/kg 1xvko, ihon alle 600mg	Herceptin, Kadcyla
lapatinibi	HER2-vasta-aine	oraalinen	1250-1500mg/vrk	Tyverb
pertutsumabi	HER2-vasta-aine	laskimoinfuusio	aloitus 840mg, jatko 420mg 3vko välein	Perjeta
bevasitsumabi	VEGF-vasta-aine	laskimoinfuusio	5-15mg/kg 3vko välein	Avastin

Täsmälääkitys on käyttökelpoinen kun syövässä havaitaan HER2- geenin monistuma tai syöpä ilmentää HER2- proteiinia (Joensuu ja Huovinen 2013). Trastutsumabi (kuva 10) on monoklonaalinen vasta-aine HER2-reseptorille. Monoklonaalisella vasta-aineella tarkoitetaan yhden antigeenin tietylle epitoopille eli vasta-aineen sitoutumiskohdalle spesifistä vasta-ainetta. Trastutsumabi sitoutuu HER2- reseptorin solunulkoiseen osaan estäen sen aktivoitumista ja viestinvälitystä (Duodecim lääketietokanta 2014). Näin solukasvu hidastuu. Trastutsumabi saa myös aikaan immuunireaktion käynnistymisen luonnollisten tappajasolujen välityksellä (Isola ja Kallioniemi 2013). Trastutsumabin käyttö yhdessä taksaanien kanssa lisää sen tehoa huomattavasti (Bono ja Joensuu 2010).



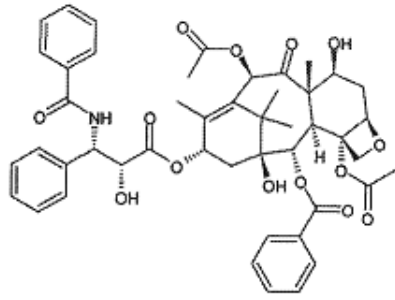
Kuva 10. Trastutsumabin rakenne © Leanne Berry

Syöpäsolun entsyymit voivat saada HER2-reseptorin solunulkoisen osan irtoamaan, mutta solun sisään jää yhä reseptorin solun sisäinen osa p95, joka voi edelleen ylläpitää solun kasvua (Bono ja Joensuu 2010). Lapatinibi (kuva 11) on täsmälääke, joka pääsee tunkeutumaan syöpäsolun sisään, missä se sitoutuu p59-osaan ja estää tätä kautta solun kasvua.



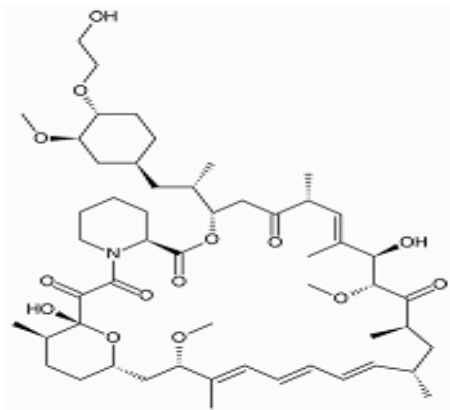
Kuva 11. Lapatinibin rakenne © 2013 TLC PharmaChem Inc.

Pertutsumabi (kuva 12) puolestaan sitoutuu HER2-reseptorin solun ulkoiseen osaan, mutta eri kohtaan kuin trastutsumabi. Lääke estää HER2:n vuorovaikutusta muiden HER-sukuisten reseptorien kanssa (Duodecim lääketietokanta 2014). Kaikkien yllä mainittujen signaalintireittien estyminen johtaa solun kasvun pysähtymiseen ja lopulta apoptoosiin (Duodecim Lääketietokanta 2014).



Kuva 12. Pertutsumabin rakenne © 2011 Genetech Inc.

Neljäs rintasyövän hoidossa käytetty täsmälääke bevasitsumabi (kuva 13) on myös monoklonaalinen vasta-aine ja sen kohteena on verisuonten endoteelin kasvutekijä VEGF (vascular endothelial growth factor) (Bono ja Joensuu 2010). VEGF:n aktiivisuuden estäminen vähentää kasvaimen verisuonitusta ja uusien suonien muodostumista, ja sitä kautta kasvaimen kasvua (Duodecim lääketietokanta 2014). Bevasitsumabia käytetään yleensä yhdistelmähoitona solunsalpaajien kanssa (Bono ja Joensuu 2010).



Kuva 13. Bevasitsumabin rakenne © 2006 Kidney Cancer Institute

3.3.4. Neoadjuvanttihoito

Neoadjuvanttihoitolla tarkoitetaan ennen leikkausta annettavaa lääkehoitoa (Auvinen 2013). Hoidon tarkoituksena on pienentää kasvaimen kokoa, jolloin potilaalle voidaan mahdollisesti tehdä säästävä leikkaus masektomian sijaan (Thompson ja Moulder-Thompson 2012). Neoadjuvanttihoito on suositeltavaa myös niissä tapauksissa, joissa sairaus on edennyt paikallisesti rinnan tai kainalon imusolmukkeiden alueella (Auvinen 2013) tai jos kasvaimen ennuste on huono (Thompson ja Moulder-Thompson 2012). Neoadjuvanttihoito mahdollistaa myös kasvaimen hoitoihin reagoinnin seuraamisen, jolloin tehoamaton hoito huomataan yleensä nopeammin. Syövän hoidossa käytettävillä lääkkeillä on aina haittavaikutuksia, ja näin potilas voi säästyä turhilta hoidoilta (Thompson ja Moulder-Thompson 2012).

Ennen neoadjuvanttihoidon aloittamista selvitetään kasvaimen koko, histologia, erilaistumisaste ja mahdolliset estrogeeni-, progesteroni- ja HER2-reseptoriposiitivisuudet. Myös kainaloimusolmukkeiden tila tutkitaan ennen lääkityksen valintaa ja aloitusta (Auvinen 2013). Hoito aloitetaan yleensä solunsalpaajilla; antrasykliinillä, taksaanilla tai näiden yhdistelmällä. Kuureja pyritään antamaan 6-8 peräkkäistä ennen leikkausta (Thompson ja Moulder-Thompson 2012). HER2- reseptoriposiitivisessa syövässä käytetään ensisijaisesti taksaanin ja trastutsumabin yhdistelmää. Tarvittaessa nämä voidaan yhdistää muihin täsmälääkkeisiin pertutsumabiin tai lapatinibiin. Estrogeeniposiitivista kasvainta hoidettaessa sytostaattilääkityksen sijasta voidaan käyttää aromataasinestäjiä tai antiestrogeenejä. Hoitojen kesto neoadjuvanttihoitossa on sama kuin liitännäislääkehoidossa (kpl 3.3.5.) (Auvinen 2013).

3.3.5. Liitännäislääkehoito

Rintasyöpä on usein levinnyt rinnan ja kainalon alueen imusolmukkeiden ulkopuolelle, vaikka sitä ei aina voidakaan todeta levinneisyystutkimuksissa. Tämä vuoksi lähes kaikille potilaille aloitetaan liitännäislääkehoito mahdollisimman pian leikkauksen jälkeen. Yleensä mittarina käytetään yli 10 % uusiutumiseriskä (Duodecim Käypähoito 1997). Hoidot pyritään aloittamaan 6-8 viikon kuluttua leikkauksesta (Huovinen ja

Tanner 2013). Lääkehoitona käytetään solunsalpaajia eli sytostaatteja, hormonaalisia hoitoja sekä täsmälääkkeitä (Joensuu ja Huovinen 2013). Sopivaa liitännäislääkehoitoa valitessa luokitellaan kasvain hormonireseptorien ja HER2-geeni-ilmentymisen perusteella, sekä arvioidaan uusiutumiseriski. Jos uusiutumiseriski on hyvin pieni ja kasvain estrogeeni-positiivinen, voidaan solunsalpaajahoido jättää pois ja käyttää vain hormonaalista lääkitystä (Käypä hoito 1997). Huomioon on otettava myös potilaan ikä, muut sairaudet ja yleiskunto. Esimerkiksi sytostaatit vähentävät uusiutumiseriskiä kaikissa syöpätyypeissä, mutta lääkityksen haittavaikutukset rajoittavat sen käyttöä (Auvinen 2013). Alle 35-vuotiaille potilaille pyritään aina aloittamaan liitännäislääkehoito, sillä uusiutumiseriski nuorilla potilailla on aina suurempi. Jos potilas saa kaikkia liitännäishoitoja, hoito aloitetaan solunsalpaajilla, jonka jälkeen annetaan sädehoito. Mahdolliset hormonaaliset hoidot ja täsmälääkitys voidaan aloittaa yhtä aikaa sädehoidon kanssa (Käypä hoito 1997).

Solunsalpaajalääkityksessä käytetään CEF- tai CMF-yhdistelmää, jota potilas saa yhteensä 6-8 kerta-annoskuuria kuuria kolmen viikon välein (Huovinen ja Tanner 2013). Hormonaalinen hoito jatkuu huomattavasti pidempään, yleensä noin 5 vuoden ajan. Tamoksifeeni sopii sekä pre- että postmenopausaalisille potilaille. Koska kaikissa estrogeeni-positiivisissa syövässä estrogeeni on tärkein kasvutekijä, premenopausaalisille potilaille yksi vaihtoehto solunsalpaajien lisäksi on munasarjasuppressio eli munasarjojen estrogeenituotannon lopettaminen (Käypä hoito 1997). Suppressioon voidaan käyttää LhRh (luteinizing-hormone-releasing hormone)-analogeja eli luteinisoivan hormonin vapauttajahormonin analogeja. Tällöin aivolisäkkeen luteinisoivan hormonin erityks estyy ja sen vaikutuksesta munasarjojen estrogeenituotanto loppuu (Duodecim lääketietokanta 2014). Vaikutus ei kuitenkaan ole pysyvä. Estrogeenituotanto voidaan myös lopettaa munasarjojen sädehoidolla tai kirurgisella poistolla. Näitä menetelmiä käytetään nykyään kuitenkin hyvin vähän. Postmenopausaalisille potilaille voidaan käyttää tamoksifeenia, letrotsolia tai anastrotsolia viiden vuoden ajan tai vaihtoehtoisesti näistä kahta erilaista kutakin 2-3 vuoden ajan niin että yhteishoitoajaksi tulee viisi

vuotta. Tamoksifeenihoidon jälkeen joissakin tapauksissa voidaan hoitoa jatkaa eksemestaanilla. HER2-positiivisessa syövässä solunsalpaajien jälkeen aloitetaan vuoden ajaksi myös trastutsumabi, jota voidaan käyttää yhtä aikaa sädehoidon ja hormonaalisten hoitojen kanssa (Huovinen ja Tanner 2013)

3.3.6. Lääkehoito erityistapauksissa

Levinneen rintasyövän hoito

Levinnyttä rintasyöpää ei yleensä koskaan voida täysin parantaa. Kaikilla hoitomuodoilla on myös haittavaikutuksia ja hoitojen vaikutus elinajan pidentämiseen on rajallinen. Keskeistä onkin potilaan elämänlaadun parantaminen, joten käytettävistä hoitomuodoista on aina keskusteltava perusteellisesti potilaan kanssa. Hoidon kesto arvioidaan yksilöllisesti, hoitoa on järkevää jatkaa vain niin kauan kuin siitä saatavat hyödyt ovat suurempia kuin haitat (Joensuu ja Huovinen 2013, Kataja 2008).

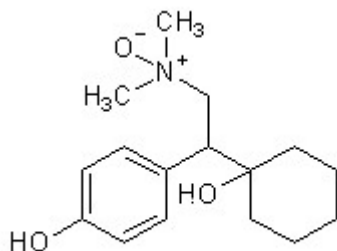
Levinneessä rintasyövässä metastaaseista kannattaa aina tehdä erillinen reseptori- ja HER2-määritys, koska etäpesäkkeiden tyyppi voi erota primäärikasvaimesta (Huovinen 2013). Kun kyseessä on hormoni-reseptoriposiitivinen syöpä, hoito aloitetaan yleensä antiestrogenilla tai aromataasin estäjillä (Joensuu ja Huovinen 2013). Noin 70 % levinneistä rintasyövistä on hormonireseptoriposiitivisia (Saarto 2008). Hormonaalinen hoito on melko hyvin siedettyä ja vaste hoidolle voi kestää jopa vuosia (Joensuu ja Huovinen 2013). Premenopausaalisilla potilailla käytetään tässäkin tapauksessa tamoksifeenia tai munasarjasuppressiota aiheuttavia lääkkeitä, tai molempia yhdessä. Postmenopausaalisilla potilaille paras tulos saadaan yleensä aromataasin estäjillä. Jos käytetyllä lääkkeellä ei saada haluttua vastetta, kokeillaan seuraavana hoitona muita hormonaalisen hoidon vaihtoehtoja. Optimaalista järjestystä hormonaalisille hoidoille ei ole voitu esittää. Jos sairaus etenee hormonaalisesta hoidosta huolimatta, voidaan välillä siirtyä solunsalpaajiin ja palata jälleen hormonaaliseen hoitomuotoon (Huovinen 2013).

Reseptorinegatiivisten syöpien ensisijainen hoitomuoto on solunsalpaajat. Solunsalpaajia käytetään hoitona myös, jos sairaus on hyvin nopeasti

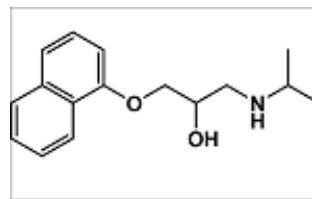
etenevä ja välittömästi potilaan henkeä uhkaava (Joensuu ja Huovinen 2013). Solunsalpaajilla saavutettava hoitovaste on yleensä alle vuoden mittainen ja niitä voidaan käyttää yksittäin tai yhdistelmänä. Yleensä yhdistelmähoidoilla saavutetaan hieman parempi hoitovaste. Mikään yksittäinen solunsalpaaja ei ole levinneen rintasyövän hoidossa osoittautunut selkeästi yliverlaiseksi (Kataja 2008). HER2-positiivisen levinneen syövän hoito aloitetaan solunsalpaajien (yleensä taksaani) ja trastutsumabin yhdistelmällä, jonka on osoitettu lisäävän elinaikaa noin puoli vuotta pelkkään solunsalpaajahoitoon verrattuna (Joensuu ja Huovinen 2013). Kaikkien kolmen reseptorin suhteen negatiivista syöpää hoidetaan vain solunsalpaajilla (Kataja 2008).

Rintasyöpäpotilaan hormonikorvaushoito

Rintasyöpäpotilaat kärsivät vaihdevuosisoireista kuten terveetkin naiset. Suurimpina ongelmina ovat kuumat aallot ja hikoilu. Niiden hoidossa serotoniinin takaisinoton estäjät, lähinnä venlaflaksiini ja beetasalpaajista propranololi ovat osoittautuneet käyttökelpoisiksi (Joensuu ym. 2013).



Venlaflaksiini



Propranololi

Kuva 14. Venlaflaksiinin ja propranololin rakenne © Sinco Pharmachem 2012, Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 2013

Estrogeenia ja progesteronia tai niiden yhdistelmää sisältäviä hormonikorvaushoitoja tulisi rintasyöpäpotilailla käyttää hyvin harkitusti ja lyhytaikaisesti (alle viisi vuotta), sillä ne lisäävät syövän uusiutumiseriskiä. Niiden käytölle ei kuitenkaan ole ehdotonta estettä mikäli potilaan syöpä on

hoidettu ja potilas kärsii vaihdevuosisoireista huomattavasti (Käypä hoito 1997).

3.4. Lääkehoidon haitat

Kaikki rintasyövän hoidossa käytettävät menetelmät aiheuttavat myös haittavaikutuksia. Syöpäsolut ovat lähtöisin elimistön normaalista solukosta, jolloin niiden tuhoaminen on erittäin haastavaa eikä elimistön terveisiin soluihin kohdistuvilta haitoilta voida välttyä. Pitkään käytettyjen syöpälääkkeiden haitat ovat onneksi jo hyvin tunnettuja ja niitä voidaan nykyään hoitaa tai pyrkiä välttämään kokonaan. Rintasyöpäpotilaan hoito on kuitenkin tasapainottelua hoidon hyötyjen ja haittojen välillä ja jokainen potilas reagoi hoitoihin yksilöllisesti (Joensuu ja Huovinen 2013, Käypä hoito 1997, Huovinen 2013).

3.4.1. Solunsalpaajien haittavaikutukset

Solunsalpaajien vaikutus perustuu niiden kykyyn estää syöpäsolujen jakautumista. Tästä johtuen ne vaikuttavat myös elimistön terveisiin nopeasti jakautuviin soluihin. Tällaisia ovat etenkin luuytimen, limakalvojen, ihon ja karvatupen solut. Limakalvot voivat kuivua ja niihin tulla haavaumia, jotka pahimmillaan voivat johtaa antibiooteilla hoidettavaan verenmyrkytykseen. Karvatupen solujen tuhoutuminen aiheuttaa hiusten ja muiden ihokarvojen lähtöä. Vaikutus ei kuitenkaan ole pysyvä vaan karvoitus kasvaa takaisin hoidon loputtua. Luuytimessä muodostuvien verisolujen, etenkin valkosolujen tuotanto laskee. Tämän vuoksi koko immuniteetti heikkenee ja altistaa potilaan monille infektioille. Lähes kaikki solunsalpaajat ovat teratogeenisiä eli sikiövaurioita aiheuttavia. Koska solunsalpaajat ovat tehottomia liian pienillä annoksilla, hoidossa pyritään aina antamaan mahdollisimman suuri annos potilaan elimistön sietokyvyn rajoissa (Johansson 2012, Duodecim lääketietokanta 2014).

Syklofosfamidi aiheuttaa yleisimpien haittavaikutusten lisäksi usein veristä virstatieinfektiota, joka johtuu alkyloituvista metaboliiteista munuaisissa. Hyvin suurilla annoksilla syklofosfamidi voi aiheuttaa rytmihäiriöitä. Epirubisiinin merkittävin kerta-annosta rajoittava haitta on luuydinsuppressio

ja myös epirubisiini voi aiheuttaa rytmihäiriöitä. Epirubisiinin annossa on oltava hyvin huolellinen, suonen ulkopuolelle joutunut lääkeaine aiheuttaa usein hyvin hankalan paikallisen kudosaaurion. Fluorourasiilin suurimmat haitat kohdistuvat koko ruuansulatuskanavan alueelle alkaen suun limakalvovaurioista vatsakipuihin ja veriseen ripuliin. Hiukset voivat lähteä täysin aiheuttaen kaljuuntumisen ja iho-oireet sekä silmätulehdukset ovat hyvin yleisiä. Metotreksaatin yleisimmät haitat ovat hyvin samankaltaisia fluorourasiilin kanssa, joskin luuydinsuppressio on metotreksaattia saavilla potilailla vielä yleisempää. Metotreksaatti aiheuttaa usein keuhkotulehduksen, joka voi helposti sekoittua viruksen aiheuttamaan infektiin. Ainoana hoitona on lääkkeen käytön lopettaminen, tosin annostelua voidaan jatkaa potilaan oireiden parannuttua. Doksetselin ja muiden taksaanien tärkeimmät haitat kohdistuvat luuytimeen, missä etenkin valkosolujen määrä laskee. Haittavaikutuksiin liittyy usein myös kuume. Anemia on myös varsin yleistä taksaaneja saavilla potilailla (Duodecim lääketietokanta).

3.4.2. Hormonaalisten hoitojen haittavaikutukset

Hormonaalisten lääkkeiden haittavaikutukset ovat pääosin elimistön normaaleja reaktioita estrogeenin puutteeseen ja muistuttavatkin vaihdevuosisoireita (Duodecim lääketietokanta 2014). Yleisimpiä ovat hikoilu ja kuumat aallot. Tamoksifeeni voi suurentaa kohtusyövän riskiä sekä aiheuttaa laskimotukoksia (Joensuu ja Huovinen 2013). Aromataasin estäjiä käytettäessä elimistön estrogeenitasot laskevat hyvin pieniksi, jolloin luuntiehyden pienentyminen on hyvin yleinen haittavaikutus. Osteoporoosin mahdollisuutta suurentaa aromataasin estäjien pitkäaikainen käyttö ja postmenopausaalisten potilaiden valmiiksi kohonnut osteoporoosiriski. Muuten kaikki aromataasin estäjät ovat hyvin siedettyjä (Sailas 2008).

3.4.3. Täsmälääkkeiden haittavaikutukset

Rintasyövän täsmälääkkeistä tutkituin on trastutsumabi, joka on yleisesti hyvin siedetty lääkeaine (Joensuu ja Huovinen 2013). Trastutsumabin infuusioon liittyy useilla potilailla viluisuutta ja lämmön nousua, ja sen käyttö pienentää elimistön neutrofiilien määrää ja altistaa näin infektiolle. HER2- reseptorin esto voi johtaa sydämen pumppauskyvyn huononemiseen,

joskin varsinainen kliininen sydämen vajaatoiminta kehittyy hyvin pienelle määrälle potilaita. Pumppauskyvyn muutokset korjautuvat yleensä hoidon päätyttyä (Duodecim lääketietokanta 2014).

Lapatinibin yleisimmät haitat kohdistuvat ruuansulatuskanavaan; potilailla esiintyy usein pahoinvointia ja ripulia. Lääkitys usein myös väsyttää ja voi aiheuttaa ihottumia. Pertutsumabin haittavaikutukset ovat hyvin samanlaisia kuin trastutsumabin, joskin se aiheuttaa usein vielä enemmän ruuansulatuskanavan oireita. Bevastitsumabin haitat liittyvät sen VEGF:n toiminnan estoon. Verenpaine nousee lähes kaikilla potilailla, jolloin laskimoveritulppien riski lisääntyy. Myös haavat paranevat huonosti ja limakalvot vuotavat herkästi verta (Duodecim lääketietokanta 2014).

3.5. Lääkehoidon tulevaisuus

Rintasyövän, kuten monien muidenkin syöpätyyppien pääasiallinen lääkkeellinen hoitomuoto on solunsalpaajat. Solunsalpaajat ovat yleensä hyvin tehokkaita rintasyövän hoidossa, mutta ne aiheuttavat myös runsaasti haittavaikutuksia. Solunsalpaajien vaikutus perustuu niiden kykyyn estää syöpäsolujen kasvua ja jakaantumista. Ne kuitenkin vaikuttavat myös osittain elimistön normaaleihin, terveisiin soluihin ja tämän vuoksi haittavaikutukset ovat merkittäviä (Kervinen ja Gahmberg 2004). Tehotakseen syöpäsoluihin solunsalpaajahoidon annostuksen on oltava riittävän suuri ja haittavaikutukset usein rajoittavat riittävää annostelua. Haittavaikutukset myös kestävät pitkään solunsalpaajahoidon loputtua ja monet potilaat kokevat hoitojen jälkeisen toipumisajan hyvin pitkänä (Sailas ja Leinonen 2012). Nykyään tiedostetaan myös syöpäsolujen mahdollinen resistenssi solunsalpaajille, sekä solunsalpaajien farmakokinetiikan suuri vaihtelu potilaiden välillä (Elonen 2001).

Hormonaalisten hoitojen haluttu vaikutus, eli estrogeenitasojen lasku, aiheuttaa myös paljon epämieluisia haittoja. Solunsalpaajahoidon verrattuna hormonaalisen hoidon haittavaikutukset ovat usein lieviä, mutta hoidon kesto on puolestaan hyvin pitkä, usein vuosia. Tämän vuoksi monet potilaat kokevat myös hormonaalisen hoidon haittavaikutukset hyvin raskaina (Sailas ja Leinonen 2012).

Syöpälääkkeiden kehitys on ollut hyvin laaja-alaista 1900- luvun alusta saakka (Kervinen ja Gahmberg 2004). Tänä aikana ymmärrys syövän kehityksestä, sekä syöpäsoluissa ilmenevistä molekyylibiologisista ominaisuuksista on lisääntynyt huomattavasti. Tämän tiedon myötä lääkkeiden vaikutus pyritään nykyään kohdistamaan vain haluttuihin soluihin tai syövän etenemisen kannalta muuten merkittäviin tekijöihin. Esimerkiksi syöpäsoluissa runsaasti yli-ilmentyvät geenit ja kasvainsolukolle tyypillinen angiogeneesi eli verisuonten uudismuodostus ovat täsmälääkkeiden haluttuja vaikutuskohteita. Rintasyövän hoidossa näitä täsmälääkkeitä on jo käytössä, vaikka ne eivät olekaan mahdollistaneet solunsalpaajahoidosta luopumista (Bono ja Joensuu 2010).

Aihiolääketeknologiaa voidaan hyödyntää myös syöpälääkkeiden kehityksessä. Aihiolääke on inaktiivinen lääkeaineen muoto, josta lääkeaine vapautuu elimistössä tapahtuvan kemiallisen tai entsymaattisen reaktion seurauksena. Halutun vaikutuksen aikaansaamiseksi lääkeaineen on saavutettava vaikutuspaikkansa mahdollisimman tehokkaasti ja aihiolääketeknologialla tämänkaltainen kohdentaminen voidaan saavuttaa esimerkiksi hyödyntämällä syöpäsoluissa yli-ilmentyviä kuljetinproteiineja (Peura ym. 2011). Aihiolääkkeet ja täsmälääkkeet ovat siis hyvin tärkeässä roolissa rintasyövän tulevaisuuden lääkehoidossa.

II KOKEELLINEN OSA

4. TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

Systeemi L on solujen ravinnonsaannin kannalta tärkeä aminohappojen kuljetussysteemi, joka sisältää ainakin neljä kuljetinproteiinia LAT1-4 (L-type Amino Acid Transporter 1-4) (Shennan ja Thomson 2008). Näistä merkittävimpiä ovat alamuodot LAT1 ja LAT2. LAT1 on heterodimeerinen membraaniproteiini, jonka toiminnallinen muoto sisältää glykoproteiini CD98:n ja 4F2hc:n. LAT1 kuljettaa etupäässä haaraketjuisia ja aromaattisia aminohappoja, joilla on tärkeä rooli solujen kasvussa ja metaboliassa (Shennan ja Thomson, 2008). Kuljetinproteiini on Na⁺-riippumaton ja sitä esiintyy melko spesifisesti veri-aivoesteessä, istukassa ja etenkin syöpäsoluissa (Yanagida ym. 2001). LAT2 puolestaan esiintyy huomattavasti runsaammin terveissä soluissa eripuolilla elimistöä ja se kuljettaa useampia, mutta usein pienempiä aminohappoja kuin LAT1 (Uchino ym. 2002, Khunweeraphong 2012). LAT1 on hyvin substraattispesifinen, joten sen kautta kulkevia lääkkeitä on vähän (del Amo ym. 2008).

Tunnettuja lääkkeitä, joiden tiedetään kulkevan LAT1:n kautta ovat mm. gabapentiini, melfalaani ja levodopa (Uchino ym. 2002). Gabapentiinia käytetään epilepsian ja neuropaattisen kivun hoitoon. Gabapentiini läpäisee veri-aivoesteen LAT1-välitteisellä kuljetuksella (Dickens ym. 2013). Melfalaani puolestaan on sytostaatti, joka lamaa luuytimen toimintaa (Kühne ym. 2009). Melfalaani on tehokas lääkeaine syövän hoidossa, mutta sillä on myös monia vakavia haittavaikutuksia LAT1-selektiivisestä syöpäsoluun kulkeutumisesta huolimatta (Lin ym. 2004). Dopamiinin esiaste levodopa on Parkinsonin taudin hoidossa tärkein oraalinen hoitomuoto ja myös levodopa kulkeutuu aivoihin LAT1-välitteisesti (Pekkonen 2008).

Ihmisen rintasyöpäsolulinjassa MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) esiintyy sekä LAT1 että LAT2 kuljetinproteiineja, mutta LAT1:n määrän on osoitettu olevan huomattavasti suurempi (Shennan & Thomson, 2008).

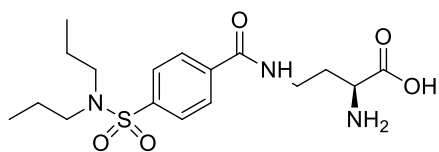
Aihiolääketeknologialla voidaan näin ollen kohdistaa haluttu vaikutus vain syöpäsoluihin LAT1:n kautta. Tämä voisi vähentää haittavaikutuksia terveissä soluissa, jotka ilmentävät pääasiassa vain LAT2-kuljetinproteiinia.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia viiden Itä-Suomen Yliopistossa valmistetun aihiolääkkeen sekä gabapentiinin LAT1-spesifisyyttä. LAT1-affiniteettikokeilla pyrittiin selvittämään, estääkö tutkittava aine tunnetun LAT1-substraatti leusiinin soluunottoa (Matsumoto ym. 2013). Soluunottokokeilla selvitettiin puolestaan kuinka paljon lääkeainetta kulkeutuu solun sisään. Affiniteettikokeissa mitattiin radioaktiivisesti leimatun leusiinin (^{14}C leusiini) antamia tuikkeitä nestetuikelaskurilla ja soluunottokokeissa varsinaisen tutkittavan aineen pitoisuuksia massaspektrometrisesti. Näin ollen soluunottokokeet kertovat todellisesta kuljetuksesta suoraviivaisemmin kuin affiniteettikokeet. Koska aktiiviset kuljetusmekanismit eivät toimi kylmissä olosuhteissa, kylmässä tehdyillä kokeilla pyrittiin selvittämään passiivisen soluunkulkeutumisen määrä kokonaissoluunotosta. LAT1/LAT2-selektiivisyyttä tutkittaessa käytettiin apuna suurina pitoisuuksina alaniinia ja tryptofaania, joista alaniini on LAT2-substraatti ja tryptofaani spesifinen LAT1-substraatti. Koska LAT1-kuljetus ei ole Na^+ -riippuvaista, puskuriliuoksien pH:n säädön avulla (NaOH ja KOH) avulla pyrittiin selvittämään, olisiko kuljetuksessa mukana jokin Na^+ -riippuvainen kuljetusmekanismi.

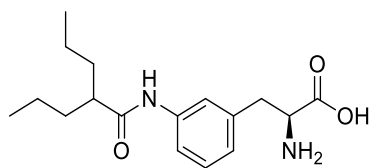
5. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

5.1. Käytetyt reagenssit, liuottimet ja laitteet

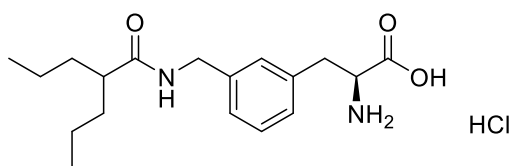
Tutkittavina aineina olivat kaupallinen gabapentiini (M_w 171,24g/mol) sekä Farmaseuttisen kemian laitoksella (Itä-Suomen Yliopisto) valmistetut aihiolääkkeet UEF-PD-1004*0.1 H_2O (M_w 387,29g/mol), UEF-PD-1005 (M_w 437,57g/mol), KAM-031 (M_w 306,41g/mol), KAM-269 (M_w 306,41g/mol) ja KAM-198 (M_w 356,89g/mol) (kuva 15). Kaikki tutkitut aineet sisälsivät aromaattisen ryhmän. Käytetty vesi oli laitoksella puhdistettua Milli-Q-vettä (ks. taulukko 6). Kaikki kokeet suoritettiin kolmella rinnakkaisella näytteellä.



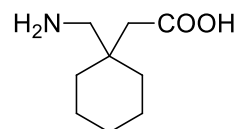
UEF-PD-1004



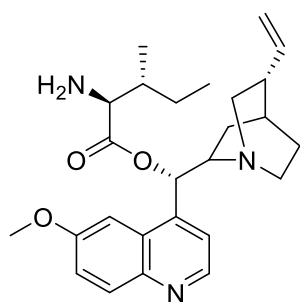
KAM-269



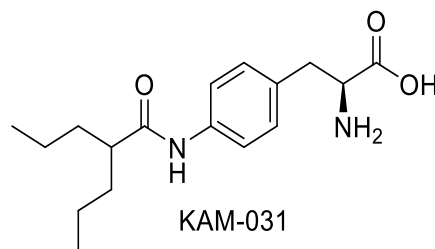
KAM-198



Gabapentin



UEF-PD-1005



KAM-031

Kuva 15. Tutkittavien aineiden rakennekaavat.

Solujen käsittelyssä käytetyt liuokset

medium	DMEM (1x), Gibco Life Technologies, Suomi
l-glutamiini	L-glutamine (100x), EuroClone, Italia
penisilliini	Penicillin+Streptomycin(100x), EuroClone, Italia
streptomysiini	Penicillin+Streptomycin(100x), EuroClone, Italia
FBS	Fetal Bovine Serum, Gibco Life Technologies, Yhdysvallat
PBS	Phosphate buffered Saline, Gibco Life Technologies, Yhdysvallat
trypsiini	Trypsin (10x) Gibco Life Technologies, Yhdysvallat

Solukokeissa käytetyt aineet

HBSS (valmistettu Farmaseuttisen kemian laitoksella 11.4.2014, Itä-Suomen Yliopisto)

dimetyylisulfoksidi (DMSO), Sigma Aldrich, Saksa

natriumhydroksidi (NaOH) (valmistettu Farmaseuttisen kemian laitoksella 14.2.2014, Itä-Suomen Yliopisto)

14C Leusiini (hiili14-radioleimattu leusiini), Perkin Elmer, Yhdysvallat

Alaniini, Sigma Life Service, Yhdysvallat

Tryptofaani, Sigma Aldrich, Japani

nestetuikelius Ultima Gold, Perkin Elmer Inc., Yhdysvallat

Hajoamiskokeissa käytetyt aineet

TRIS-puskuri, pH 7.4 (tris(hydroksimetyyli)aminometaani), (valmistettu Farmaseuttisen kemian laitoksella 12.3.2014, Itä-Suomen Yliopisto)

asetonitriili (ACN), Sigma Aldrich, Saksa

10% perkloorihappo (valmistettu Farmaseuttisen kemian laitoksella, Itä-Suomen Yliopisto)

rotan 20% maksahomogenaatti (valmistettu Farmaseuttisen kemian laitoksella xx, Itä-Suomen Yliopisto)

Proteiinimäärityksissä käytetyt aineet

Bio-Rad 500-0006, Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BioRad, Saksa

BSA (valmistettu Farmaseuttisen kemian laitoksella 24.2.2014, Itä-Suomen Yliopisto)

Puskuriliuksena kaikissa solukokeissa oli Na⁺-vapaa HBSS-liuos (Hank's Balance Salt Solution), joka sisälsi 125 mM klorididia, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glukoosia ja 25 mM HEPES. HBSS-liuoksen pH oli säädetty 7.4:ään natriumhydroksidilla tai kaliumhydroksidilla.

Taulukossa 6 on esitetty kaikki erikoistyössä käytetyt laitteet.

Taulukko 6. Erikoistyössä käytetyt laitteet.

Laite	Merkki ja malli	Valmistaja
Analyysivaaka ₁	Mettler Toledo MT5	Mettler -Toledo GmbH, Sveitsi
Analyysivaaka ₂	Mettler AT261 Delta Range	Mettler -Toledo GmbH, Sveitsi
Fotometri	EnVision 2104 Multilabel Reader	Perkin Elmer Wallac, USA
Inkubaattori	HERA Cell	Kendro, Saksa
Mikroskooppi	Olympus CKX 41	Olympus Optical Co Ltd., Japan
Milli-Q-veden puhdistaja	Milli-Q-Gradient A10	Millipore Corporation, USA
Nestetuikemittari	Trilux MicroBeta 1450	Perkin Elmer Wallac, USA
Sentrifugi ₁	Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf, Saksa
Sentrifugi ₂	Eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf, Saksa
Ravistelija	Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
pH-mittari	Orion 3 Star	Thermo Electro Corporation, USA
Vesihaude	Heto	Prolab Oy, Suomi

5.2. Solujen käsittely

MCF-7 rintasyöpäsolujen kasvualustana käytettiin mediumia, joka sisälsi penisilliiniä, streptomysiiniä, l-glutamiinia ja elatusaine FBS:ää (Fetal Bovine Serum). Soluille vaihdettiin tuore medium 2-3 päivän välein. Jos solumaljat olivat kasvaneet liian täysiksi, solut jaettiin uusille maljoille. Kokeita varten solut pestiin 5 ml:lla PBS:ää (Phosphate Bufferd Saline) ja lisättiin 2 ml trypsiiniä irrottamaan solut maljoilta. Trypsiinin kanssa soluja inkuboitii noin 5 minuuttia +37 °C:ssa ja lisättiin tämän jälkeen 5 ml mediumia. Solususpensio siirrettiin koeputkeen ja sentrifugoitiin 1200 rpm 3 minuuttia. Solujen päältä poistettiin medium ja solusakka suspensoitiin 5 ml:aan mediumia. Tämän jälkeen solususpensiota otettiin 30 µl Bürkerin laskukammioon ja laskettiin solujen määrä/ml. Solujen määrän perusteella otettiin tarvittava määrä solususpensiota ja mediumia, suspensoitiin huolellisesti ja jaettiin solut 24-kuoppalevyille. Kuoppalevyille suspensiota tuli 500 µl/kuoppa ja soluja oli keskimäärin 100 000/kuoppa. Levyä inkuboitii +37 °C:ssa noin vuorokausi ennen kokeen suoritusta.

5.3. LAT1-affiniteettikokeet

5.3.1. Käytetyt koeliuokset ja niiden valmistus

LAT1-affiniteettikokeet tehtiin kaikille kuudelle tutkittavalle aineelle. Kontrolliliuoksena käytettiin HBSS-liuosta johon lisättiin radioleimattua leusiinia 5 µl/10 ml. ¹⁴C leusiinin aktiivisuus oli 0,05 µCi/ml. HBSS:n pH oli säädetty natriumhydroksidilla tai kaliumhydroksidilla ja osassa kokeissa käytettiin molempia puskureita. Natriumin läsnäololla puskuriliuoksessa pyrittiin selvittämään onko kuljetuksessa mahdollisesti mukana jokin Na⁺-riippuvainen kuljetinproteiini, koska LAT1:n toiminta ei ole riippuvaista natriumista. Tutkittavista aineista valmistettiin 40 mM tai 10 mM kantaliuos DMSO:ssa (dimetyylisulfoksidi) josta laimennettiin tutkittavat pitoisuudet HBSS:llä. Koeliuoksissa tutkittavien aineiden pitoisuudet olivat 50 ja 100 µM ja ¹⁴C leusiinin 0,17 µM. Osassa affiniteettikokeita koeliuoksissa oli mukana alaniini pitoisuudella 2 mM (taulukko 7). Alaniini on LAT2-substraatti, joten jos sen läsnäollessa lääkeaineen affiniteetti LAT1:seen on suurempi kuin ilman sitä, voidaan olettaa että lääkeaine käyttää sekä LAT1-että LAT2-kuljetusta.

Taulukko 7. LAT1-affiniteettikokeet ¹⁴C leusiini

Lääkeaine	Tutkitut pitoisuudet	Käytetty puskuri
<u>Gabapentiini</u>	50µM	HBSS Na+
	50µM + 2mM alaniini	HBSS Na+ ja Na-
<u>UEF-PD-1004</u>	50µM	HBSS Na+
	50µM + 2mM alaniini	HBSS Na+ ja Na-
<u>UEF-1005</u>	50µM	HBSS Na-
	100µM	HBSS Na-
<u>KAM-031</u>	50µM	HBSS Na+
	50µM + 2mM alaniini	HBSS Na+ ja Na-
<u>KAM-269</u>	50µM	HBSS Na+ ja Na-
<u>KAM-198</u>	50µM	HBSS Na+
	50µM + 2mM alaniini	HBSS Na+ ja Na-

5.3.2. Kokeen suoritus

MCF-7 rintasyöpäsoluja jaettiin 24-kuoppalevyille 1×10^5 solua/kuoppa. Solut jaettiin kuoppalevyille koetta varten edellisenä päivänä. Kasvatusmediumin poiston jälkeen solut pestiin kaksi kertaa 500 μ l:lla esilämmitetyllä HBSS- puskuriliuoksella. Pesujen jälkeen soluja esinkuboitiin $+37$ °C:ssa 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen HBSS poistettiin ja soluja inkuboitiin 5 min ajan 250 μ l:lla koeliuoksia. Kaikkia koeliuoksia ja kontroleja oli kolme rinnakkaista kuoppaa. Inkuboinnin jälkeen solujen päälle lisättiin 500 μ l jääkylmää HBSS:ä ja kuoppalevy siirrettiin jäähauteeseen. Jäähauteella solut pestiin kaksi kertaa 500 μ l:lla jääkylmää puskuriliuosta. Pesujen jälkeen solut hajotettiin eli lyysattiin 500 μ l:lla 0,1 M natriumhydroksidilla 1 tunnin ajan. Lyysatut solut kerättiin nestetuikепutkiin, joissa oli 3,5 ml nestetuikeluosta ja mitattiin näytteiden ja kontrollien beetasäteily nestetuikemittarilla. Kolme rinnakkaista kuoppaa pakastettiin proteiinimääritystä varten. Proteiinimääritystä varten solut käsiteltiin kuten varsinaiset tutkittavat solut.

5.4. Soluunotto- ja LAT1/LAT2-selektiivisyyskokeet

5.4.1. Käytetyt koeliuokset ja niiden valmistus

Soluunotto- ja LAT1/LAT2-selektiivisyyskokeissa lääkeaineista oli 40 mM kantaliuokset DMSO:ssa. Kantaliuoksista laimennettiin tutkittavat pitoisuudet HBSS:llä joka sisälsi 0.5 % DMSO:ta. Selektiivisyyskokeissa lääkeaineiden lisäksi koeliuoksiin lisättiin 2 mM alaniini tai tryptofaani. Alaniini on LAT2-substraatti ja tryptofaani LAT1-substraatti eli jos lääkeaine käyttää vain LAT1- kuljetusta sen solunsisäisen määrän pitäisi alaniinin kanssa olla samaa luokkaa kuin ilmankin. Tryptofaanin kanssa lääkeaineen määrän tulisi olla hieman pienempi tryptofaanin kilpaillessa samoista reseptoreista.

Soluunotto-kokeet gabapentiinille, UEF-PD-1004:lle ja KAM-269:lle tehtiin pitoisuuksilla 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200 ja 400 μ M. Selektiivisyyskoe gabapentiinille tehtiin samoilla pitoisuuksilla kuin soluunottokoe, mutta koeliuoksessa oli lisänä 2 mM alaniini tai tryptofaani. KAM-269:n

selektiivisyyskokeet tehtiin pitoisuuksilla 50 μM ja 2 mM alaniini tai tryptofaani.

Koeliuokset tehtiin HBSS-puskuriin jossa oli mukana 0.5 % DMSO ja tätä käytettiin myös solujen pesuihin.

5.4.2. Kokeiden suoritus

Kokeita varten MCF-7 rintasyöpäsolut jaettiin edellisenä päivänä 24-kuoppalevyille. Koepäivänä solut pestiin 500 μl :lla HBSS:ä kaksi kertaa ja esi-inkuboitiin $+37\text{ }^\circ\text{C}$:ssa 10 minuuttia. Koeliuoksia lisättiin soluille 250 μl (3 rinnakkaista/pitoisuus) ja inkuboitiin 10 minuuttia. Reaktio pysäytettiin lisäämällä soluille 500 μl :aa jääkylmää HBSS:ä. Solut pestiin jäähauteella 500 μl :lla HBSS:ä kaksi kertaa ja lyysattiin 250 μl :lla 0,1 M NaOH:a 1 tunnin ajan. Lyysauksen jälkeen 200 μl kutakin näytettä kerättiin eppendorputkiin. Putket pakastettiin ja tulokset määritettiin myöhemmin massaspektrometrillä. Jokaiselta levytä pakastettiin 3 kuoppaa proteiinimäärytyksiä varten.

5.5. Passiivinen diffuusio

5.5.1. Käytetyt koeliuokset ja niiden valmistus

Tutkittaessa passiivista diffuusiota lääkaineista oli 40 mM kantaliuokset DMSO:ssa, joista laimennettiin tutkittavat pitoisuudet 0.5 % DMSO HBSS:llä.

Kokeet tehtiin gabapentiinille, KAM-269:lle ja UEF-1004:lle pitoisuuksilla 12.5, 50 ja 100 μM . Koeliuokset tehtiin HBSS-puskuriin jossa oli mukana 0.5 % DMSO ja tätä käytettiin myös solujen pesuihin.

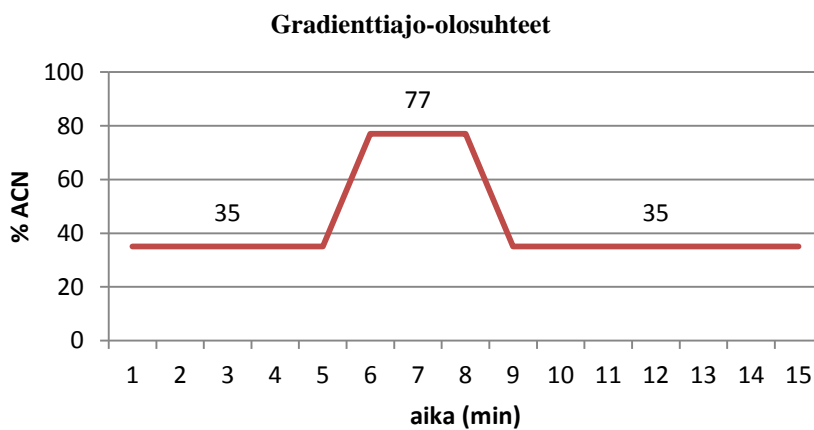
5.5.2. Kokeen suoritus

Kokeet suoritettiin muutoin samalla tavoin kuin soluunotto- ja selektiivisyyskokeet, mutta kaikki solujen pesut ja inkuboinnit tehtiin jäähauteella jääkylmillä pesu- ja koeliuoksilla. Proteiinimäärytyksiä varten pakastettiin 3 rinnakkaista näytettä. Myös passiivisen diffuusiokokeen tulokset määritettiin massaspektrometrisesti.

5.6. Kemiallinen ja entsymaattinen stabiilisuus

5.6.1. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

Näytteet analysoitiin korkean erotuskyvyn nestekromatografisesti (HPLC) kolonnilla (Sigma-Aldrich Supelco HS F5), jonka sisähalkisija oli 2.1mm, pituus 5cm ja partikkelikoko 3µm. Näytteet ajettiin gradienttimenetelmällä (kuva 16). UV-valon aallonpituus oli 254 nm, virtaus 0,3ml/min, lämpötila 30 °C ja injektiomäärä 10 µl.



Kuva 16. HPLC-menetelmän gradienttiajo-olosuhteet.

5.6.2. Kemiallinen stabiilisuus

UEF-1004:lle tehtiin kemiallinen stabiilisuuskoe, jossa sen hajoamista seurattiin kahden viikon ajan 50 μM pH 7,4 TRIS- puskurissa. Puskuria pipetoitiin kolmeen rinnakkaiseen koeputkeen 1920 μl ja esilämmitettiin vesihauteella +37 °C:ssa magneettisekoittajan kanssa. Lääkeainetta pipetoitiin lämmitettyyn puskuriliuokseen 80 μl . Näytteenotossa mahdollinen reaktio pysäytettiin ACN-liuoksella, jota pipetoitiin valmiiksi 950 μl eppendorffputkiin ennen näytteiden ottamista. Näytettä otettiin kerralla 50 μl ja vorteksoinnin jälkeen analysoitiin edellä kuvatulla HPLC-menetelmällä. Näytteet kerättiin aikapisteissä 1 min, 72 min, 3 h, 6 h, 28 h, 48 h, 72 h, 92.5 h, 167.5 h, 239 h ja 336 h.

5.6.3. Entsymaattinen stabiilisuus

Entsymaattista stabiilisuutta tutkittaessa UEF-1004:n hajoamista seurattiin vuorokauden ajan 20 %:ssa rotan maksahomogenaatissa (valmistettu Farmaseuttisen kemian laitoksella, Itä-Suomen Yliopisto). Pakastettu maksahomogenaatti sulatettiin ja kahta rinnakkaista koeputkea esilämmitettiin +37 °C:ssa magneettisekoittajan kanssa. Sulanutta maksahomogenaattia pipetoitiin koeputkiin 750 μl ja lisättiin 750 μl 50 μM UEF-1004:ää. Näytteenottoa varten eppendorffputkiin pipetoitiin valmiiksi 5 μl 10 % perkloorihappoa ja näytettä otettiin kerralla 50 μl . Eppendorffputkia vorteksoitiin 30 sekuntia ja lisättiin näytteeseen 55 μl milliQ-H₂O:ta. Tämän jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 14 000 rpm 5 minuuttia ja supernatantit siirrettiin HPLC-vialleihin. Näytteet kerättiin aikapisteissä 0 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h ja 24 h.

5.7. Proteiinimääritys

Proteiinimääritystä varten valmistettiin standardit 1 mg/ml BSA:sta laimentamalla milli-Q-H₂O:lla. Standardien pitoisuudet olivat 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25 ja 0.35 mg/ml. Jokaista standardipitoisuutta ja näytettä pipetoitiin 96-kuoppalevyille 10 μl 3 rinnakkaista kuoppaa. Tämän jälkeen lisättiin 200 μl Bio-Rad reagenssia, joka oli laimennettu 1:5 milli-Q-H₂O ja suodatettu Whatman 1- suodatinpaperilla folion sisällä pimeässä. Mittaus suoritettiin fotometrillä aallonpituudella 595 nm. Proteiinimäärityksen tuloksia käytettiin soluun kulkeutunutta

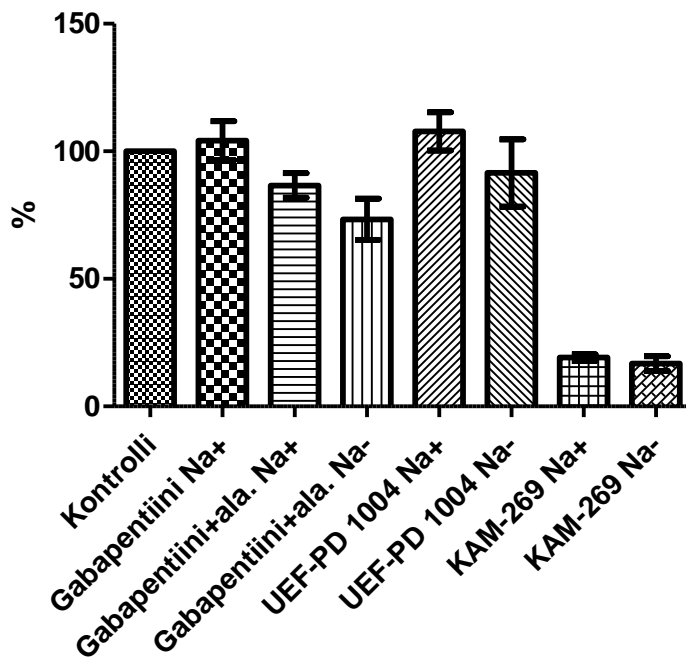
lääkeainemäärää laskettaessa. Lääkeaineen pitoisuus kerrottiin näytteen tilavuudella jolloin saatiin lääkeaineen määrä mooleina. Proteiinimäärä (mg/ml) jaettiin proteiinimääritysnäytteen tilavuudella ja tällä jaettiin lääkeaineen moolimäärä, jolloin saatiin selville lääkeaineen määrä mg/ml. Lääkeaineen määrä jaettiin inkubaatioajalla 10 minuuttia, jolloin saatiin lopulliset tulokset eli solunsisäinen lääkeainemäärä muodossa mol/mg/min. Proteiinimääritykset tehtiin myös kokeille, joissa proteiinimäärää ei käytetty tuloksia tulkittaessa. Näin saatiin selville ovatko kaikkien kokeiden olosuhteet kutakuinkin samanlaisia eli onko soluja keskimäärin yhtä suuri määrä jokaisessa kokeessa.

6. TULOKSET JA NIIDEN KÄSITTELY

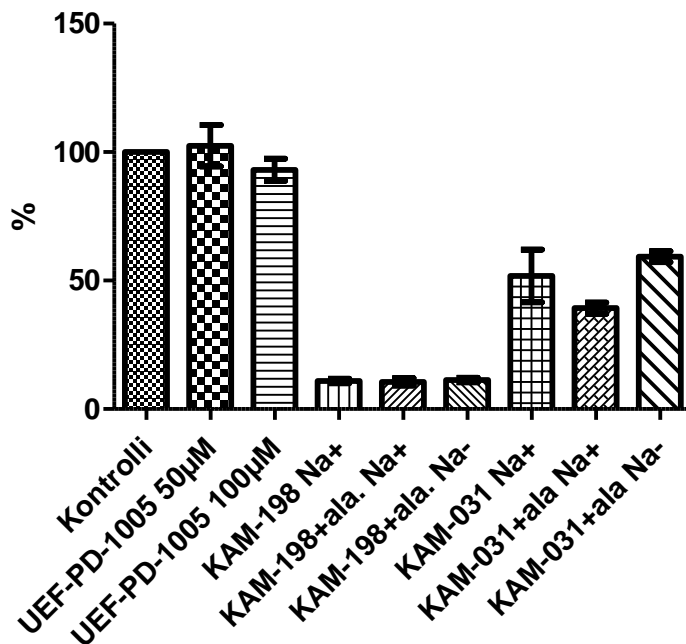
6.1. LAT1-affiniteettikokeet

Affiniteettikokeissa seurattiin estääkö tutkittava lääkeaine LAT1-substraatti ^{14}C leusiinin soluunottoa (kuvat 17 ja 18). Leusiinin soluunkuljetuksessa ovat mukana sekä LAT1- että LAT2- kuljetinproteiinit, mutta LAT1:n osuus on osoitettu olevan merkittävämpi (Matsumoto ym. 2013). Leusiini saattaa käyttää myös jotain kolmatta kuljetusproteiinia. Tämän tiedon avulla affiniteettikokeiden olosuhteita pystyttiin säätämään ja näin saamaan viitteitä siitä, mitä kuljetusmekanismia tutkittava aine käyttää. Osassa kokeita oli mukana spesifinen LAT2-substraatti alaniini. Jos inhibitio oli suurempi alaniinin kanssa, lääkeaineen todettiin käyttävän sekä LAT1-että LAT2-kuljetusta. Puskuriliuoksen natriumlisäyksellä selvitettiin, onko kuljetuksessa mahdollisesti mukana jokin natriumriippuvainen kuljetinproteiini.

Gabapentiini inhiboi ^{14}C leusiinin soluunottoa hyvin vähän (12 %). Alaniinin kanssa natriumvapaassa puskuriliuoksessa inhibitio oli hieman suurempi (26%), samoin alaniinin kanssa natriumia sisältävässä puskuriliuoksessa (24%). Tämän kokeen perusteella gabapentiinin affiniteetti LAT1:seen on melko huono ja gabapentiini näyttäisi käyttävän myös LAT2-kuljetusta. Hajonta tuloksissa on kuitenkin suurta, joten tulosta ei voida pitää kovin luotettavana. UEF-PD-1004 ei inhiboinut ^{14}C leusiinin soluunottoa lainkaan, natriumin kanssa inhibitio oli hieman suurempaa (7 %). Sen kuljetukseen voi siis liittyä jokin natriumriippuvainen kuljetinproteiini. Hajonta näissäkin tuloksissa oli suurta, mutta tuloksista voidaan päätellä että UEF-PD-1004 ei ole hyvä LAT1-substraatti. KAM-269 sen sijaan esti ^{14}C leusiinin soluunottoa natriumista riippumatta molemmissa puskuriliuoksissa hyvin selvästi (81-83 %). Tästä voidaan siis päätellä, että KAM-269 käyttää selkeästi LAT1-kuljetusta, eikä mukana ole muuta kuljetinproteiinia.



Kuva 17. Gabapentiinin, UEF-PD-1004:n ja KAM-269:n LAT1-affiniteetikokeiden tulokset kontrolliin verrattuna. Tutkittavien aineiden pitoisuudet olivat 50 μ M ja alaniinin 2 mM.

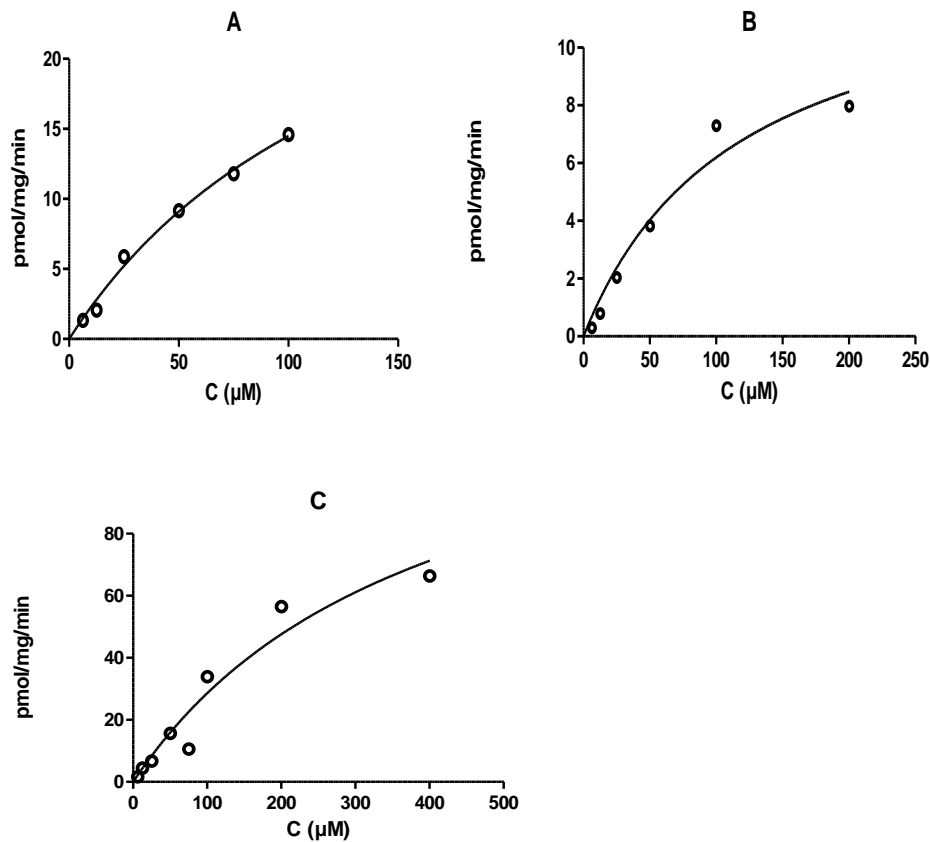


Kuva 18. UEF-PD-1005:n, KAM-198:n ja KAM-031:n LAT1-affiniteetikokeiden tulokset kontrolliin verrattuna. KAM-198:n ja KAM-031:n tutkittavat pitoisuudet olivat 50 μ M ja alaniinin 2 mM.

UEF-PD-1005 ei inhiboinut ^{14}C leusiinin soluunottoa ollenkaan $50\ \mu\text{M}$ pitoisuudella ja $100\ \mu\text{M}$ pitoisuudellakin inhibitio oli vain 7 % eli sen ei todettu käyttävän LAT1-välitteistä kuljetusta. KAM-198:lla oli suurin ^{14}C leusiinin inhibitio, 89-98 %. Puskuriliuoksen natriumsäädöllä tai alaniinin lisäyksellä ei ollut vaikutusta tähän tulokseen. Tämän perusteella KAM-198:n kuljetuksessa ei ole mukana muuta kuljetinproteiinia ja lääkeaine on hyvä LAT1-substraatti. KAM-031 inhiboi ^{14}C leusiinia ilman alaniinia 48 %, alaniinin kanssa ilman puskuriliuoksen natriumia 41% ja alaniinin kanssa natriumin läsnäollessa 61%. Alaniinin kanssa natriumin läsnäollessa ei kuitenkaan tule esille LAT2-kuljetuksen osuutta, joten tämä kokeen osuus luultavasti epäonnistui. Tulosten perusteella lääkeaine käyttäisi siis pääosin LAT1-välitteistä ja hieman LAT2-välitteistä kuljetusta. Natriumriippuvaisen kolmannen kuljetinproteiinin mahdollisesta olemassaolosta ei voida luotettavasti sanoa mitään.

6.2. Soluunottokokeet

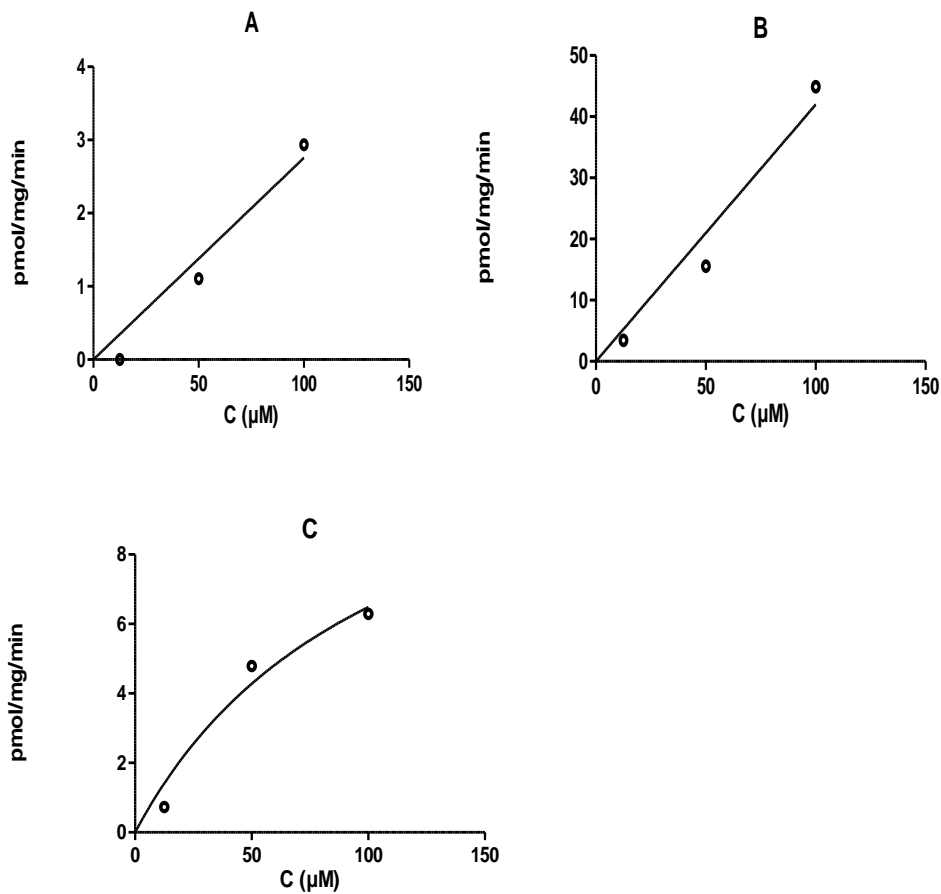
Soluunottokokeissa mitattiin soluun sisään kulkeneen lääkeaineen määrää. Kaikissa tutkittavissa aineissa on havaittavissa LAT1-kuljetuksen saturaatioituminen lääkeaineen pitoisuuden kasvaessa (kuva 19) Gabapentiinin V_{\max} oli $35,54 \pm 6,14\ \text{pmol/mg/min}$ ja K_m $145,5 \pm 37,72\ \mu\text{M}$. Gabapentiinin tuloksia laskettaessa otettiin huomioon vain pitoisuudet $6,25$ - $100\ \mu\text{M}$, sillä pitoisuudet 200 ja $400\ \mu\text{M}$ osoittautuivat soluille liian vahvoiksi. UEF-PD-1004:n V_{\max} oli $13,38 \pm 2,677\ \text{pmol/mg/min}$ ja K_m $115,8 \pm 45,88\ \mu\text{M}$. KAM-269:n V_{\max} saatiin $142 \pm 35,69\ \text{pmol/mg/min}$ ja K_m oli $397,1 \pm 157,4\ \mu\text{M}$. Tutkittavilla pitoisuuksilla näistä aineista solunsisäisen lääkeaineen määrä oli suurin KAM-269:llä ja pienin UEF-PD-1004:llä. Suurin V_{\max} arvo oli KAM-269:llä eli tutkittavista aineista sillä on suurin LAT1-kuljetuskapasiteetti. K_m arvoissa ei ollut kovin suura eroa tutkittavien aineiden välillä, koska hajontaa oli paljon, joten tämän perusteella ei saatu selkeästi esille mikä sitoutuu parhaiten LAT1:seen. KAM-269:n K_m arvo oli muihin tutkimuksen tuloksiin (suuri kuljetuskapasiteetti ja affiniteettikokeen perusteella LAT1-selektivisyys) nähden huomattavan suuri, joten tulosta ei voi pitää täysin luotettavana.



Kuva 19. Soluunottokokeet A) gabapentiini, B) UEF-PD-1004, C) KAM-269

6.3. Passiivinen diffuusio

Kylmässä suoritetuilla soluunottokokeilla tutkittiin, kuinka paljon lääkeainetta kulkeutuu soluun passiivisesti (kuva 20). Gabapentiinin ja KAM-269:n kohdalla nähdään, että lääkeaineen kokonaismäärä solussa aktiivisen transportterin avulla on huomattavasti suurempi passiiviseen soluunottoon verrattuna. UEF-1004 puolestaan näyttäisi menevän soluun enemmän passiivisesti kuin aktiivisella kuljetuksella. Näin ollen UEF-1004:n kohdalla soluunottokokeista saadut V_{max} ja K_m -arvot eivät kerro LAT1-kuljetuksen tilanteesta, vaan mukana on jokin tuntematon kuljetusmekanismi, joka todennäköisesti kuljettaa lääkeainetta ulos solusta.

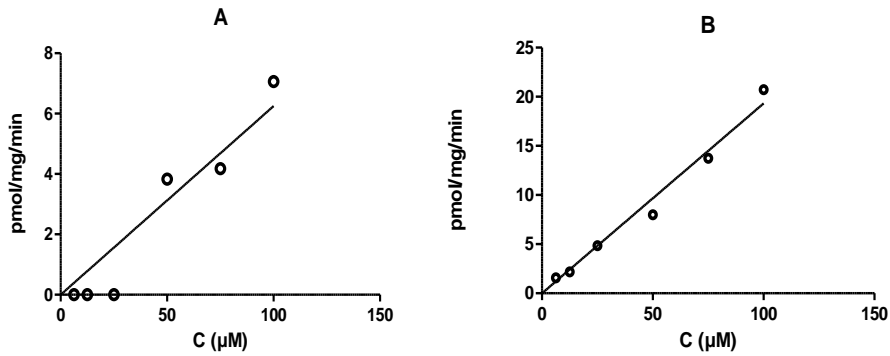


Kuva 20. Passiivinen diffuusio A) gabapentini, B) UEF-PD-1004, C) KAM-269.

6.4. LAT1/LAT2-selektiivisyys

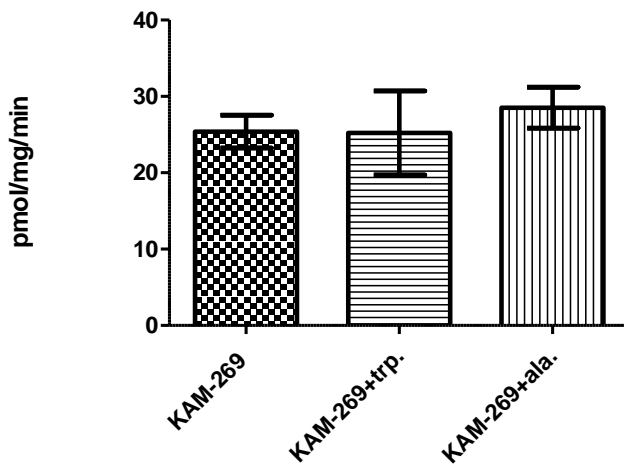
LAT1/LAT2-selektiivisyys-kokeissa tutkittiin lääkeaineen soluunoton mekanismia; käyttääkö lääkeaine LAT1-ja/tai LAT2-kuljetinproteiineja ja missä määrin. Gabapentiniin tuloksissa otettiin huomioon pitoisuudet 6,25-100 μM . Gabapentiniin soluunotto oli tryptofaanin läsnäollessa noin puolet vähemmän kuin alaniinin läsnäollessa (kuva 21). Gabapentiniin voidaan siis sanoa käyttävän pääosin LAT1-välitteistä kuljetusta, koska solunsisäinen lääkeainemäärä oli pienempi kun gabapentini joutui kilpailemaan kuljetinproteiinista tryptofaanin kanssa. Kun mukana oli alaniini, joka käyttää LAT2-kuljetusta, ero soluunottokokeessa soluun päässeeseen gabapentiniin määrään oli huomattavasti pienempi. Näiden

tulosten perusteella gabapentiinin voidaan sanoa käyttävän LAT2-kuljetusta vain hyvin vähän.



Kuva 21. Gabapentiinin LAT1/LAT2-selektiivisyys A) tryptofaani, B) alaniini

KAM-269:lla ei ollut merkittävää eroa soluunotossa tryptofaanin tai alaniinin läsnä ollessa; tryptofaanin kanssa tosin hajontaa oli enemmän (kuva 22). Tämä voisi siis viitata suurempaan kilpailuun tryptofaanin kuin alaniinin kanssa ja näin ollen lääkeaine käyttäisi LAT1-kuljetusta.



Kuva 22. KAM-269:n LAT1/LAT2-selektiivisyys, lääkeaineen pitoisuus 50 μM , tryptofaanin/alaniinin 2 mM.

6.5. Kemiallinen ja entsyymattinen stabiilisuus

UEF-1004:llä ei ollut kemiallista hajoamista 50 mM TRIS-puskurissa kahden viikona aikana eikä entsyymattista hajoamista 20 % rotan maksahomogenaatissa vuorokauden aikana. Aihiolääke ei siis pääse vapautumaan biologisessa kudoksessa tutkittavana aikana.

6.6. Proteiinimääritykset

Proteiinimäärät vaihtelivat eri kokeissa välillä 0,023-0,323 mg/ml eli kokeiden solumäärät ovat vaihdelleet jonkin verran. Osa solumaljoista pääsi tutkimuksen aikana kasvamaan hieman liian täyteen, joten tämä selittää joidenkin kokeiden pienen proteiinimäärän. Jos maljat ovat liian täynnä soluja, solujen normaali toiminta häiriintyy.

7. POHDINTA

LAT1-substraateiksi sopivat suuret aminohapot, joissa on aromaattisen rakenteen lisäksi suuria tai haarautuneita sivuketjuja, sekä vapaa karboksyyli- ja aminoryhmä (Uchino ym. 2002). Yleisimpiä LAT1-substraatteja ovat luonnolliset aminohapot leusiini, isoleusiini, fenyylialaniini ja tryptofaani (Yanagida ym. 2001).

Gabapentiinin on osoitettu läpäisevän veri-aivoesteen LAT1-välitteisellä kuljetuksella. Gabapentiinin plasmapitoisuuksia tutkittaessa on havaittu, että plasmapitoisuudet eivät korreloi täysin annetun annoksen kanssa, vaan gabapentiinin määrä plasmassa saturoituu. Tutkittaessa gabapentiinin soluunottoa LAT1-transfektoidussa HEK-293 solulinjassa (Human embryonic kidney) gabapentiinin V_{\max} arvoksi on saatu noin 5100 pmol/milj.solua/mg ja K_m on ollut noin 220 μM . Korkea V_{\max} arvo antaa viitteitä kuljetinproteiinin suuresta kuljetuskapasiteetista ja pieni K_m arvo puolestaan kertoo substraatin suuresta affiniteetista proteiiniin. Samassa tutkimuksessa on selvästi pystytty osoittamaan että LAT2-välitteisellä kuljetuksella ei ole merkitystä gabapentiinin osalta (Dickens ym. 2013).

LAT1-affiniteettikokeessa gabapentiini esti LAT1- ja LAT2-substraatti leusiinin soluunottoa hyvin vähän. Kun mukana oli alaniini, joka sitoutuu LAT2- kuljetinproteiiniin, ^{14}C leusiinia pääsi soluun sisään hieman vähemmän. Tämän perusteella voidaan siis arvioida että gabapentiini menee soluun sekä LAT1:n että LAT2:n kautta. Soluunottokokeessa jätettiin pois pitoisuudet 200 ja 400 μM , jolloin saatiin selkeästi esille gabapentiinin määrän saturoituminen pitoisuuden kasvaessa. Voi olla, että suuremmat pitoisuudet olivat liian vahvoja tutkimuksessa käytetyille soluille ja tämän takia niiden kanssa lasketut tulokset vääristyivät. Gabapentiinin V_{\max} oli pieni Dickensin tuloksiin verrattuna, joten tämän tutkimuksen perusteella gabapentiinin suhteen kuljetuskapasiteetti on melko huono. K_m arvo puolestaan oli melko lähellä Dickensin saamaa arvoa ja tämä kertoo, että tulokset ovat vertailukelpoisia ja gabapentiinilla on kohtalaista affiniteettia LAT1:een. Dickensin tutkimuksessa käytetyissä transfektoiduissa soluissa on todennäköisesti ollut huomattavasti suurempi LAT1-ilmentyminen kuin tämän tutkimuksen MCF-7 rintasyöpäsoluissa ja tämä selittää

kuljetuskapasiteetissa esiintyvän eron. Kylmässä suoritettussa soluunottokokeessa mitattiin, kuinka paljon lääkettä kulkee soluun passiivisen kuljetuksen avulla. Aktiiviset kuljetusproteiinit eivät enää toimi kylmissä (+4 °C) olosuhteissa. Gabapentiinin kohdalla havaittiin että kylmässä soluun pääse vain noin kymmenesosa aktiiviseen kuljetukseen verrattuna. LAT1/LAT2-selektiivisyyskokeessa tunnetun LAT1-substraatti tryptofaanin kanssa solunsisäinen gabapentiinin määrä oli noin puolet pienempi kuin soluunottokokeessa ilman kilpailevaa substraattia. Myös tässä tutkimuksessa jätettiin suurimmat pitoisuudet 200 ja 400 μM pois tuloksia laskettaessa, sillä reaktio ei näyttänyt enää noudattavan Michaelis-Mentenin kinetiikka kun suuremmat pitoisuudet otettiin muukaan. Tämäkin siis viittaa siihen, että pitoisuus oli liian vahva tutkimuksen soluille. Alaniini on LAT2-substraatti ja jos lääkeaine käyttää LAT1-välitteistä kuljetusta, alaniinin läsnäollessa solunsisäisen lääkeaineen määrän tulisi olla samaa luokkaa kuin ilman alaniinia. Tässä tutkimuksessa alaniinin läsnäollessa ei saatu esille selkeää saturaatiota gabapentiinin pitoisuuden kasvaessa, eikä reaktio noudattanut Michaelis-Mentenin kinetiikka. LAT1/LAT2-selektiivisyyskokeessa voidaan kuitenkin nähdä, että solunsisäisen gabapentiinin määrä alaniinin kanssa oli hieman suurempi kuin soluunottokokeessa ilman alaniinia. Tämä viittaa selektiiviseen LAT1-välitteiseen kuljetukseen affiniteettikokeen tuloksista poiketen. Soluunottokokeissa saadaan selville todellinen solunsisäisen lääkeaineen kokonaismäärä, kun taas affiniteettikoe mittaa vain lääkeaineen kykyä syrjäyttää tunnettu substraatti. Tämän takia affiniteettikoe ei siis suoraan kerro mitä kuljetinproteiinia lääkeaine käyttää, vaan kyseessä on kilpailutilanne tunnetun substraatin kanssa. Tässä kokeessa voidaan siis päätellä, että leusiinilla on parempi affiniteetti LAT1:seen kuin gabapentiinilla ja tämä on vääristänyt affiniteettikokeen tuloksia. Kaikissa gabapentiinin kokeissa solujen proteiinimäärät vaihtelivat hieman ja kaupallisen gabapentiinin liukoisuuden kanssa oli kantaliuosten tekovaiheessa ongelmia. Nämä seikat voivat myös selittää selkeänä LAT1-substraattina pidetyn gabapentiinin tässä tutkimuksessa esiin tulleet hieman poikkeavat tulokset.

UEF-PD-1004 ei näyttänyt olevan LAT1-substraatti. LAT1-affiniteetikokeessa aihiolääke ei estänyt ^{14}C leusiinin soluunottoa juuri ollenkaan ja myös soluunottokokeesta saadut lääkeaineen kokonaismäärät olivat hyvin pieniä muihin tutkittaviin aineisiin verrattuna. Erikoista UEF-PD-1004:n kohdalla oli myös se, että passiivisessa diffuusiassa solunsisäisen lääkeaineen määrä oli lähes kymmenkertainen soluunottokokeeseen verrattuna. UEF-PD-1004 on probenesidi-aihiolääke ja probenesidi on P-glykoproteiinin substraatti. P-gp on puolestaan soluista yleisesti löytyvä effluksiproteiini, joka pumppaa aineita ulos solusta. Effluksiproteiinit eivät myöskään toimi kylmässä, joten passiivisen diffuusion suurempi solunsisäinen lääkeainemäärä selittyy todennäköisesti P-gp:n toiminnalla. Vaikka UEF-PD-1004:n rakenne on erilainen kuin probenesidilla, aihiolääke todennäköisesti on myös P-gp-substraatti. Kemiallista ja entsyymaattista stabiilisuutta tutkittaessa UEF-PD-1004:n ei havaittu vapauttavan aktiivista lääkeainetta eli probenesidiä, mikä kertoo aineen sopimattomuudesta aihiolääkkeeksi.

KAM-269 inhiboi ^{14}C leusiinin soluunottoa hyvin selvästi. Kontrolliin verrattuna aihiolääkkeen läsnäollessa ^{14}C leusiinin määrä oli vain noin 20 %. LAT1-affiniteetikokeessa ei ollut mukana alaniinia, joten sen perusteella ei voida varmasti sanoa käyttääkö lääkeaine mahdollisesti molempia kuljetusproteiineja, sekä LAT1:stä että LAT2:sta. Koska ^{14}C leusiinin inhibitio kuitenkin selvästi oli melko suuri, voidaan olettaa että lääkeaine käyttää suurimmaksi osaksi LAT1-välitteistä kuljetusta. Soluunottokokeessa nähdään että, lääkeaineen määrä satureituu pitoisuuden kasvaessa. KAM-269:n K_m oli suurempi kuin gabapentiinin, samoin V_{max} , joten tästä päätellen KAM-269:n LAT1- kuljetuskapasiteetti on suurempi kuin gabapentiinin, mutta affiniteetti reseptoriin olisi näiden tulosten perusteella huonompi. Soluunottokokeessa nähdään kuitenkin, että KAM-269 menee tutkittavista lääkeaineista tehokkaimmin solun sisään. Se myös inhiboi leusiinin soluunottoa paremmin, joten saatu K_m -arvo ei voi olla todellinen. Soluunottokoe olisi hyvä toistaa useammalla yli 100 μM pitoisuudella, jolloin voitaisiin saada lisää selkeyttä tuloksiin. LAT1/LAT2-selektiivisyyskoe KAM-269:lle tehtiin vain yhdellä pitoisuudella ja

tryptofaanin ja alaniinin läsnäollessa ei saatu esille selkeää eroa soluun päässeeseen lääkeaineen määrässä. Tryptofaanin läsnäollessa hajontaa tuloksissa oli kuitenkin eniten, joten tämän ja affiniteettikokeen perusteella lääkeaine voisi käyttää LAT1-välitteistä kuljetusta. Kylmässä suoritettussa soluunottokokeessa lääkeaineen ei havaittu menevän soluun passiivisesti juuri ollenkaan, joten tämäkin kertoo melko luotettavasti LAT1-välitteisestä kuljetuksesta ja toisaalta vahvistaa soluunottokokeen tulosten mahdollista virheellisyyttä. Lisätutkimukset useammalla tutkittavalla pitoisuudella toisivat varmasti lisää selvyyttä KAM-269:n sopivuudesta LAT1-substraatiksi.

Muille tutkittaville lääkeaineille tehtiin vain LAT1-affiniteettikokeet. UEF-PD-1005:llä ei havaittu inhibitiota juuri ollenkaan ja tämän perusteella se ei ole LAT1-substraatti. KAM-031 inhiboi ^{14}C leusiinia ilman alaniinia ja alaniinin kanssa ilman natriumia lähes yhtä paljon, alaniinin kanssa natriumin läsnäollessa vielä enemmän. Tuloksen perusteella KAM-031 siis käyttäisi pääsääntöisesti LAT1-välitteistä kuljetusta ja mahdollisesti myös LAT2-välitteistä kuljetusta. Natriumriippuvaisen kolmannen kuljetinproteiinin läsnäolosta ei saatu luotettavaa tietoa. Tässä kokeessa proteiinin määrä jäi hyvin pieneksi ja tämä selittää kokeen epäloogisen tuloksen. Affiniteettikokeella ei siis saada tässäkään tapauksessa kovin luotettavaa tulosta, soluunotto- ja selektiivisyyskokeet olisivat varmasti aiheellisia, vaikka ne ovatkin hieman työläämpiä kuin affiniteettikoe.

KAM-198 inhiboi ^{14}C leusiinia kaikista tutkittavista aineista eniten, ^{14}C leusiinin soluun kulkeutunut määrä kontrolliin verrattuna oli vain noin 10 %. Alaniinin tai natriumin lisäyksellä ei ollut vaikutusta tulokseen, joten affiniteettikokeen perusteella lääkeaine käyttäisi vain LAT1-välitteistä kuljetusta.

Tutkittavista aineista rakenteeltaan hyvin samankaltaisia olivat KAM-198 ja KAM-269. Näiden tulokset olivat myös samansuuntaisia eli ne todennäköisesti ovat sopivimpia selektiivisiksi LAT1-substraateiksi ja ne kannattaisi näin ollen valita jatkotutkimuksia varten.

8. YHTEENVETO

Syövällä tarkoitetaan sairautta, jossa solut alkavat kasvaa epänormaalisti ja hallitsemattomasti (Isola ja Kallioniemi 2013). Syöpä syntyy vaihteittain useiden eri mekanismien vaikutuksesta ja se saa harvoin alkunsa pelkästään ulkoisista ärsykkeistä. Syövän synnyn voidaan sanoa johtuvan geeneissä ja DNA:ssa tapahtuvista mutaatioista (Hanahan ja Weinberg 2010).

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpätyyppi ja sitä esiintyy etenkin vaihdevuosi-ikäen ylittäneillä naisilla (WHO 2012). Naisen rinnat kehittyvät syntymästä menopaussiin saakka (Gusterson 2012). Niiden solukko on hyvin muuntautumiskykyistä ja tällä voidaan katsoa olevan yhteys myös syövän syntyyn. Rintasyövän synnystä on olemassa kaksi toisistaan eriävää teoriaa; ensimmäisen teorian mukaan rintasyöpä saa alkunsa rintarauhasepiteelin kantasoluista, joihin kasautuu mutaatioita sattumanvaraisesti, kun taas toisen teorian mukaan rintakudoksen progenitorisolu (esiastesolu) mutatoituu ja syövän kehitys riippuu tämän jälkeen solun jakautumis- ja erilaistumiskyvystä (Olsson 2013 ja Härkönen 2013). Rintarauhasen kehitys vaatii aina naishormoni estrogeenin läsnäolon ja estrogeenin välillinen tai välitön vaikutus onkin yhteistä kaikille rintasyöpätyypeille (Härkönen 2013). Elimistön korkea estrogeenipitoisuus on tärkein rintasyöväälle altistava riskitekijä ja muita ovat mm. pitkäaikainen hormonikorvaushoito menopaussin jälkeen, lapsettomuus ja perinnölliset tekijät sekä elintavat (mm. Guzik 2008, Hakulinen 2008).

Rinnan solujen monimuotoisuudesta johtuen myös syöpätyypit ovat erilaisia. Kasvaimen löytyessä sen luokitus auttaa valitsemaan oikean hoitomuodon. Histologisessa luokituksessa karsinomat erotellaan niiden kasvutavan perusteella. Rintasyövässä yleisimpiä kasvaintyyppisiä ovat duktaalinen karsinooma (noin 70 % kaikista) ja lobulaarinen karsinooma (noin 10-20% kaikista). Duktaalinen karsinooma saa alkunsa rintatiehyistä, kun taas lobulaarinen on puolestaan rauhasperäinen kasvaintyyppi (Leidenius ja Joensuu 2013). Kansainvälinen TNM-luokitus perustuu patologistiin tutkimuksiin, joissa määritetään kasvaimen koko, kainaloimusolmukkeiden tila ja etäpesäkkeiden määrä (Joensuu ja Huovinen 2013). Nykyään määritetään myös kasvaimen genotyyppi. Genotyypillä on

merkitystä etenkin lääkityksen valinnassa ja genotyypijaottelu perustuu kasvaimesta mahdollisesti löytyviin estrogeeni-, progesteroni- ja HER2-reseptoreihin (Heikkilä ja Kärjä 2013).

Rintasyöpää hoidetaan kirurgisesti, sädehoidolla sekä lääkityksellä. Leikkaushoidossa pyritään aina poistamaan koko kasvain mahdollisimman tarkasti. Joissakin tapauksissa haluttuun tulokseen päästään vain itse kasvaimen poistolla, mutta usein joudutaan poistamaan koko rinta (mm. Jahkola ym. 2013, Leidenius ja Joensuu 2013). Sädehoidon tarkoituksena on vaurioittaa syöpäsolun DNA:ta ja näin häiritä jakautumisvaiheessa olevien solujen kasvua. Se pystytään myös kohdistamaan vain kehon sairaalle alueelle (Kouru ja Sailas 2013). Lääkehoidossa käytetään solunsalpaajia, hormonaalisia, sekä täsmälääkkeitä.

Syöpäsoluille on ominaista normaalisoluihin verrattuna huomattavasti nopeampi kasvu- ja jakautumissykli. Solunsalpaajat estävät solujen jakautumista vaikuttamalla eri tavoin DNA:han ja ovat tämän vuoksi tehokkaita syövän hoidossa (Elonen 2001). Rintasyövän hoidossa käytetään lähes aina useamman solunsalpaajan yhdistelmähoitoa, yleisimpänä syklofosfamidin, epirubisiinin ja flurourasiilin yhdistelmää (CEF) tai syklofosfamidin, metotreksaatin ja flurourasiilin yhdistelmää (CMF) (Duodecim Lääketietokanta 2014). Hormonaalista lääkitystä voidaan käyttää, jos syöpä on tyypiltään estrogeenireseptoriposiitivinen (Joensuu ja Huovinen 2013). Antiestrogeeni tamoksifeeniä voidaan käyttää kaikille rintasyöpäpotilaille. Uudemmat ja tehokkaammat aromataasin estäjät soveltuvat vain menopaussin ohittaneille naisille. Jos rintasyöpäsolut ilmentävät HER2-reseptoria, myös uudet täsmälääkkeet ovat hyvä vaihtoehto lääkehoidossa. Käytetyt täsmälääkkeet estävät HER2- reseptorin normaalia toimintaa esimerkiksi estämällä sen aktivoitumista ja solun signalointireittejä. Täsmälääkkeellä voidaan myös estää kasvainsolukolle ominaista verisuonten uudismuodostusta VEGF:n vasta-aineen avulla (Bono ja Joensuu 2010, Duodecim Lääketietokanta 2014). Kaikki rintasyövän hoidossa käytetyt lääkkeet aiheuttavat myös haittavaikutuksia. Etenkin solunsalpaajien solun jakaantumista estävä vaikutus ulottuu syöpäsolujen lisäksi moniin elimistön terveisiin, nopeasti jakautuviin soluihin. (Elonen

2001). Hormonaalisella hoidolla pyritään puolestaan vähentämään elimistön estrogeenipitoisuuksia ja hoito voi kestää useita vuosia. Tämä altistaa potilaat vaihdevuosisoireiden kaltaisille haittavaikutuksille (Duodecim Lääketietokanta 2014). Täsmälääkkeet ovat yleisesti hieman paremmin siedettyjä, joskin täysin ilman haittoja niidenkään käyttäjät eivät selviä. Täsmälääkkeitä voidaan kuitenkin pitää tulevaisuuden lääkkeinä rintasyövänkin hoidossa, sillä niiden avulla lääkeaineen vaikutus saadaan paremmin kohdistettua vain syöpäsoluihin.

Rintasyöpä on aina hyvin yksilöllinen sairaus ja erilaisia kasvaintyyppisiä on paljon. Hoito on suunniteltava jokaisen potilaan kohdalla erikseen kasvaintyyppin ja potilaan iän, menopaussiasteen ja yleiskunnon mukaan. Mitä paremmin rintasyövän solubiologiset ominaisuudet ja syöpäsolujen proteiinien ja geenien toiminta tunnetaan, sitä paremmin on mahdollista kehittää lääkeaineita, joiden vaikutus ei kohdistu elimistön terveisiin soluihin. Näin saadaan vähennettyä haittavaikutuksia ja tehostettua hoitoa. Rintasyöpäsolujen ilmentämiä geenejä ja reseptoreja tunnetaan nykyään jo hyvin paljon. Perinnöllisessä rintasyövässä on löydetty kaksi eri kasvunrajoitegeeniä, BRCA 1 ja BRCA 2, joiden vaimentamisella on selvä yhteys syövän kehitykselle (Polyak 2007). Myös monien muiden vaimentuneiden tai yli-ilmentyvien geenien on todettu olevan merkittävä tekijä rintasyövän synnylle (mm. Song ym. 2006, Zaretsky ym. 2007). Syöpäsolujen pinnalta on myös löydetty normaalisolukossa huomattavasti vähemmän esiintyviä proteiineja ja yksi näistä on aminohappojen kuljetukseen osallistuva LAT1- kuljetinproteiini (Shennan ym. 2004). LAT1:n kuljettamilla aminohapoilla on tärkeä rooli solun kasvussa ja metaboliassa (Shennan ja Thompson 2008). Lisätutkimuksien ja aihiolääketeknologian avulla voisi olla mahdollista kehittää LAT1-spesifinen lääkeaine jonka kohteena olisivat vain syöpäsolut. Näin se voisi olla käyttökelpoinen myös rintasyövän hoitoon.

Tässä tutkimuksessa tuli selvästi esiin LAT1:n substraattispesifinen luonne kuljetinproteiinina, joten sitä käyttävän aihiolääkkeen rakenne on suunniteltava tarkkaan. Tutkimuksen kokeellisessa osassa selvitettiin viiden

aihiolääkkeen mahdollista sopivuutta LAT1-substraateiksi ja näistä kaksi osoittautui jatkotutkimusten arvoisiksi.

9. KIRJALLISUUS

Auvinen P.: Neoadjuvanttihoito. Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Bono P., Joensuu H.: Rintasyövän uudet täsmälääkehoidot. *Duodecim* 126: 1205-1215, 2010

Blanpain C.: Tracing the cellular origin of cancer. *Nature Cell Biology* 15: 126-134, 2013

Cuzik J.: Hormone replacemnt therapy and the risk of breast cancer. *European Journal of Cancer* 44: 2344-2349, 2008

del Amo E., Urtti A., Yliperttula M.: Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15:161-174, 2008

Dickens D., Webb S., Antonyuk S. ym.: Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5). *Biochemical Pharmacology* 85:1672-1683, 2013

Duodecim- lääketietokanta 2014. Haettu Internetistä 26.11.2014. www.terveysportti.fi

Elonen E.: Kasvainten kemoterapia. Kirjassa *Farmakologia ja toksikologia* 6. painos s. 931-959. Toim. Koulu M., Tuomisto J. Gummerus Oy, Jyväskylä 2001

Elonen E., Tolonen H.: Epirubisiini. *Syöpälääkkeet*. *Duodecim lääketietokanta* 2014 sla00027 (024.010). Haettu Internetistä 1.11.2014

Gusterson B., Stein T.: Human breast development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23: 567-573, 2012

Guzik J.: Hormonen replacement therapy and the risk of breast cancer. *European Journal of Breast Cancer* 44: 2344-2349, 2008

Hakulinen T.: Rintasyövän epidemiologia. *Focus Oncologia*, Syöpäsäätiön julkaisusarja n:o 9. Rintasyöpä. Rintasyöpäsäätiön symposiumi XXXV, Syöpäsäätiö, Painotalo Miktor Helsinki 2008

Hanahan D., Weinberg A.: The hallmarks of cancer. *Cell* vol 100: 57-70, 2000

Hayashida T., Takahashi F., Chiba N. ym.: HOXB9, a gene overexpressed in breast cancer, promotes tumorigenicity and lung metastasis. *PNAS* vol 7, n:o 3: 1100-1105, 2009

Heikkilä P.: Rintasyövän luokittelu. *Focus Oncologia*, Syöpäsäätiön julkaisusarja n:o 9. Rintasyöpä. Rintasyöpäsäätiön symposiumi XXXV, Syöpäsäätiö, Painotalo Miktor Helsinki 2008

Heikkilä P., Kärjä V.: Patologian alan tutkimukset. Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Huovinen R.: Levinneen rintasyövän hormonaalinen hoito. . Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Huovinen R., Tanner M.: Rintasyövän liitännäislääkehoito. Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Härkönen P.: Rintasyövän synty ja eteneminen. Focus Oncologia, Syöpäsäätiön julkaisusarja n:o 9. Rintasyöpä. Rintasyöpäsäätiön symposiumi XXXV, Syöpäsäätiö, Painotalo Miktor Helsinki 2008

Isola J., Kallioniemi A: Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Kirjassa: Syöpätaudit. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Jahkola T., Soukainen S., Leidenius M.: Primaari kirurginen hoito. Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Joensuu H., Huovinen R.: Levinneen rintasyövän hoitomenetelmät. Kirjassa: Syöpätaudit. Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Joensuu H., Huovinen R.: Rintasyövän hormonaalinen liitännäishoito. Kirjassa: Syöpätaudit. Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Joensuu H., Huovinen R.: Rintasyövän levinneisyyselvitykset. Kirjassa: Syöpätaudit. Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Joensuu H., Huovinen R.: Rintasyövän liitännäislääkehoito. Kirjassa: Syöpätaudit. Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Joensuu H., Huovinen R.: Rintasyövän yleisyys. Kirjassa: Syöpätaudit. Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Joensuu H., Huovinen R.: Rintasyövän postoperatiivinen sädehoito. Kirjassa: Syöpätaudit. Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Joensuu H., Leidenius M., Huovinen R.: Rintasyöpäpotilaiden raskaus, ehkäisy ja vaihdevuosisoireiden hoito. Kirjassa: Syöpätaudit. Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Johansson R.: Solunsalpaajat eli sytostaatit. Lääkärikirja Duodecim 2012 dlk01077 (028.003). Haettu Internetistä 3.11.2014

Kataja V.: Levinneen rintasyövän solunsalpaajahoido. . Focus Oncologia, Syöpäsäätiön julkaisusarja n:o 9. Rintasyöpä. Rintasyöpäsäätiön symposiumi XXXV, Syöpäsäätiö, Painotalo Miktor Helsinki 2008

Kervinen J., Gahmberg C.: Syövän täsmälääkkeet ja niiden kehitystyö. Duodecim 120: 2323-2330, 2004

Khunweeraphong N., Nagamori S., Wiriyasermkul P. ym.: Establishment of stable cell lines with high expression of heterodimers of human 4F2hc and human amino acid transporter LAT1 and LAT2 and delineation of their differential interaction with α -alkyl moieties. Journal of Pharmacological Sciences 119: 368-380, 2012

Kouri M., Sailas L.: Rintasyövän postoperatiivinen sädehoito. Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Köninki K.: PTEN-ekspressio rintasyövässä. Pro Gradu-tutkielma. Tampereen Yliopisto, Lääketieteellisen teknologian instituutti, 2006

Kühne A., Tzvetkov M., Hagos A., Lage H., Burckhardt G., Brockmöller: Influx and efflux transport as determinants of melphalan cytotoxicity: Resistance to melphalan in MDR1 overexpressing tumor cell lines. Biochemical Pharmacology 78:45-53, 2009

Leidenius M.: Rintasyövän vartijaimusolmukebiopsia. Focus Oncologia, Syöpäsäätiön julkaisusarja n:o 9. Rintasyöpä. Rintasyöpäsäätiön symposiumi XXXV, Syöpäsäätiö, Painotalo Miktor Helsinki 2008

Leidenius M.: Imusolmukelevinneyden selvittäminen ja kainalon imusolmukemetastaasien leikkaushoito. Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Leidenius M., Joensuu H.: Rintasyövän oireet ja löydökset. Kirjassa: Syöpätaudit. . Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Leidenius M., Joensuu H.: Masektomia. Kirjassa: Syöpätaudit. . Osassa: Rintasyöpä. Kustannus oy Duodecim 2013. www.terveysportti.fi

Lindeman G., Visvader J.: Insights into the cell of origin of breast cancer and cancer stem cells. Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology 6: 89-97, 2010

Lin J., Raof D., Thomas D. ym.: L-type amino acid transporter-1 overexpression and melphalan sensitivity in Barrett's Adenocarcinoma. Neoplasia vol.6. 1:74—84, 2004

Lyytinen H., Ylikorkala O.: Vaihdevuosi-ien hormonihoito ja rintasyöpäriski: uutta tietoa Suomesta. Duodecim 127: 235-242, 2011

Matsumoto T., Nakamura E., Nakamura H. ym.: Production of free glutamate in milk requires the leucine transporter LAT1. American Journal of Physiology, Cell Physiology 305: 623-631, 2013

Mustonen P., Vanninen E.: Vartijaimusolmukkeet rintasyövässä. Duodecim 117: 192-199, 2001

Olsson H.: Cell of Origin of Breast Cancer: An updated Hypothesis Merging Epidemiological Data with Molecular Biology. *Carcinogenesis & Mutagenesis* 4: 3-5, 2013

Pekkonen E.: Levodopainfuusio ja apomorfiini Parkinsonin taudin hoidossa. *Duodecim* 124 (4): 402-409, 2008

Peura L., Malmioja K., Rautio J.: Aihiolääketeknologia lääkekehityksessä. *Duodecim* 127: 263-272, 2011

Polyak K.: Breast Cancer origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation* 17: 3155-3163, 2007

Rintasyövän hoito ja seuranta. Käypä hoito- suositus. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecim ja Suomen Rintasyöpä Ry:n asettama työryhmä. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, Helsinki 1997.

Saarto T.: Levinneen rintasyövän hormonaalinen hoito. *Focus Oncologia, Syöpäsäätiön julkaisusarja n:o 9. Rintasyöpä. Rintasyöpäsäätiön symposiumi XXXV, Syöpäsäätiö, Painotalo Miktor Helsinki 2008*

Sailas L.: Rintasyövän hoitojen pitkäaikaisvaikutukset. *Focus Oncologia, Syöpäsäätiön julkaisusarja n:o 9. Rintasyöpä. Rintasyöpäsäätiön symposiumi XXXV, Syöpäsäätiö, Painotalo Miktor Helsinki 2008*

Sailas L., Leinonen P.: Rintasyöpäpotilaan seuranta terveyskeskuksessa. *Suomen Lääkärilehti* 24: 1900-1904, 2012

Shennan D., Thomson J.: Inhibition of system-L (LAT1/CD98hc) reduces the growth of cultured human breast cancer cells. *Oncology Reports* 20:885-889, 2008

Shennan B., Thomson J., Gow I., Travers M., Burber M.: L-leucine transport in human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231): kinetics, regulation by estrogen and molecular identity of the receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1664: 206-216, 2004

Schratter-Sehn A.: Breast Cancer Radiotherapy. *Hamdan Medical Journal* 5: 51-56, 2013

Song Y., Yang W., Shih I., Zhang Z., Bai J.: Identification of BCOX1, a novel gene overexpressed in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760: 62-69, 2006

Sudah M.: Rintasyövän diagnostiikka. Julkaisussa: Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus. Suomen Rintasyöpäryhmä 2013

Suomen Syöpärekisteri 2014. www.syoparekisteri.fi_Haettu Internetistä 6.10.2014

Thompson A., Moulder-Thompson S.: Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Annals of Oncology* 23: 231-23, 2012

Uchino H., Yoshikatsu K., Do Kyung K.y.m.: Transport of Amino Acid-Related Compounds Mediated by L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1): Insights Into the Mechanisms of Substrate Recognition. *Molecular Pharmacology* 61: 729-737, 2002

Vehmanen L.: Paikallisen rintasyövän hoito. Lääkärikirja Duodecim 2008 dlk00468 (016.420). Haettu Internetistä 26.10.2014

Vehmanen L.: Rintasyöpä: toteaminen ja ennuste. Lääkärikirja Duodecim 2012 dlk00618 (016.418). Haettu Internetistä 3.12.2014

Vähäkangas K., Puistola U.: Sinappikaasun johdokset. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Duodecim lääketietokanta 2014 lft00527 (030.022). Haettu Internetistä 15.11.2014

WHO: Globocan 2012: Estimated cancer Incidence, Mortality and Prevelence Worldwide 2012. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa) http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. 25.8.2014

Yanagida O., Kanai Y., Chairoungda A. y.m.: Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochimica et Biophysica Alta* 1514:291-302, 2001

Zaretsky J., Barnea I., Aylon Y., Gorivodsky G., Wreschner D., Keydar I.: MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogenreceptor alpha (ER α) in regulation of the MUC1 gene expression. *Molecular Cancer* 5:57, doi:10.1186/1476-4598-5-57, 2006