

Hypoksisen fenotyypin pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooman sädehoitoresistenssi

Riina Solja

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos
25.06.2014

Linja: genetiikan linja
Erikoistumisala: solu- ja molekyylibiologia

Laajuus: 40 op

Tarkastajat:

1:

2:

Hyväksytty:

Arvolause:

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti
tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä*

TURUN YLIOPISTO
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Biologian laitos

SOLJA, RIINA: Hypoksisen fenotyypin pään ja kaulan alueen
levyepiteelikarsinooman sädehoitoresistenssi

Pro gradu -tutkielma, 75 s, 5 liitettä
Genetiikka
Kesäkuu 2014

Pään ja kaulan alueen levyepiteelin syöpiä kutsutaan karsinoomiksi. Kasvaimet luokitellaan vaikeahoitoisiksi ja niihin liittyy korkea potilaskuolleisuus. Yleisimmät pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooman hoitomenetelmät ovat säde- ja leikkaushoito, joihin liitetään yhdistelmänä kemoterapiaa.

Kasvaimen morfologia, sen puutteellinen tai rakenteellisesti poikkeava verisuonitus voi aiheuttaa syöpäkudoksessa hapenpuutteesta kärsiviä hypoksisia alueita. Erityisesti syövässä hapenpuute toimii syöpäsolupopulaatiossa valintatekijänä. Muuttuneet olosuhteet suosivat solupopulaatioita, jotka pystyvät sopeuttamaan genotyyppinsä mukauttamana fenotyyppinsä vähähappiseen ympäristöön. Tämän katsotaan olevan potilaan hoitoennusteen kannalta huono prognostinen merkki.

Hapenpuute indusoi soluissa voimakkaan HIF-1- eli hypoksian indusoiman transkriptiofaktori-1 stabilisaation ja ekspression kasvun. Proteiinin on havaittu oleva eräs merkittävin solun sisäisten vasteiden säätelijä hypoksiassa. HIF-1 koostuu kahdesta alayksiköstä, jonka α -alayksikön stabiliteetti on hapen osapaineen säätelemä. Mikäli happea on riittävä pitoisuus soluissa, HIF-1 α hajoaa soluissa. Hypoksiassa α -domeeni sitoutuu β -alayksikköön muodostaen stabiilin toiminnallisen geenien ilmentymiseen vaikuttavan transkriptiofaktoriin.

Pro gradu- tutkielmassa tarkasteltiin aluksi neljän pään ja kaulan alueen syöpäpotilaiden kasvaimista eristettyjen UT-SCC-solulinjojen (UT-SCC-8, -25, -34 ja -74A) morfologiaa ja kasvua. Solujen jakautumisnopeutta uudella alustalla tutkittiin PE(%)- eli plating efficiency-menetelmällä. Soluja siirrostettiin uudelle kasvualustalle, josta niiden määrä laskettiin vuorokauden kuluttua. UT-SCC-74A-linja sietä parhaiten uuden kasvuympäristön asettaman rasitteen. Sädeherkkyys määritettiin tutkimalla UT-SCC-74A-linjan solujen asteittaista vastetta erisuuruisiin sädeannoksiin (Gy). Tulosten perusteella laskettiin linjan sisäistä sädeherkkyyttä kuvaava AUC-arvo. Työn toisessa osassa tarkasteltiin HIF-1 α :n ekspression riippuvuutta hapen läsnäolosta soluissa molekyylibiologisilla menetelmillä.

UT-SCC-74A-solulinja osoittautui sädeherkkyysmäärityksessä AUC-arvonsa perusteella suhteellisen säderesistentiksi. Lisäksi kyseisen linjan soluista vaimennettiin HIF-1 α -geeni, jonka ekspression häviäminen todennettiin hypoksia-altistuskokeiden jälkeen. Proteiinin puuttuminen vähähappisista olosuhteista huolimatta osoitti geenihiljennyksen onnistuneen koejärjestelyissä.

AVAINSANAT: pään ja kaulan alueen syöpä, UT-SCC-solut, hypoksia, geeniekspressio, HIF-1 α , säderesistenssi.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
1.1	Pään ja kaulan alueen syöpä.....	1
1.1.1	Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma.....	2
1.1.2	Kasvaimen diagnosointi ja luokittelu.....	7
1.1.3	Hoitomenetelmät.....	11
1.2	Kasvaimen mikroympäristö	14
1.2.1	Angiogeneesi eli verisuonten uudismuodostuminen.....	14
1.2.2	Kasvainhypoksia.....	16
1.2.3	Hypoksiaan liittyvä geeniekspressio.....	21
1.2.4	Hypoksia ja sädehoito pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomassa.....	25
1.3	Työn tarkoitus	27
2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	29
2.1	Solulinjat.....	29
2.1.1	Solujen ylläpito	30
2.2	Klonaalisten solujen suhteellisen jakautumiskyvyn määrittäminen.....	31
2.2.1	Koejärjestelyt	31
2.3	SF-tekijä ja eloonjäämistä kuvaavat käyrät.....	33
2.3.1	Koejärjestelyt	36
2.4	Toiminnallisten geenien vaimentaminen in vitro.....	38
2.4.1	Transfektio	40
2.4.2	Hypoksianäytteiden valmistus	42
2.5	Western blot-analyysi	43
2.5.1	Western blot -näytteiden valmistaminen.....	45
2.5.2	Geielektroforeesi ja vasta-aineleimaus.....	46
2.5.3	Tehostettu kemiluminesenssi – ECL.....	47
2.5.4	β -aktiinimääritys	48
3	TULOKSET	49
3.1	Solulinjat.....	49
3.2	PE(%)-käyrät.....	51
3.3	SF-tekijät ja AUC-arvo	53
3.4	Transfektio	55
3.5	Western blot–analyysi ja ECL	56
3.6	β -aktiinimääritys	57

4	TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA	59
4.1	Solulinjat ja ekspressioprofiilit	59
4.2	Säderesistenssin tutkimus syöpäsoluilla	63
4.3	siRNA-tutkimus HIF-1 α :lla	66
4.4	Tulevaisuuden näkymät	67

1 JOHDANTO

1.1 Pään ja kaulan alueen syöpä

Pään ja kaulan alueen syövät ovat maailman kuudenneksi yleisin syöpämuoto. Euroopassa tämä sairaus todetaan vuosittain yli 100 000 ihmisellä ja siihen menehtyy yli 60 000 eurooppalaista (Vermorken & Specenier 2010). Tauti on haastava tunnistaa ja usein sen esiasteet jäävät huomaamatta, mikä vastaavasti huonontaa potilaan tilaa ja hankaloittaa sairauden hoitoa sen myöhemmässä vaiheessa. Suomen Syöpäjärjestön ylläpitämä rekisteri kirjaa vuosittain maassamme ilmenevät uudet tautitapaukset kaikista eri syöpätyypeistä sukupuolten välisinä tilastoina. Viimeisimmät pään ja kaulan alueen syöpien yhteenvetotilastot on listattu taulukkoon 1a ja b.

Taulukko 1. Pään ja kaulan alueen eri syöpätyyppien esiintyminen Suomessa naisväestössä (a) ja miesväestössä (b). Taulukkoon on koottu seuraavat tiedot: taudin suhteellinen osuus kaikista syöpätapauksista, taudin ilmenemisen muutos viimeisen kymmenen vuoden aikana, tautiin kuolleiden määrät, tautikuolemien osuus kaikista syöpätapauksista sekä tautikuolleisuuden muutos viimeisen kymmenen vuoden aikana (<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/>).

(a)

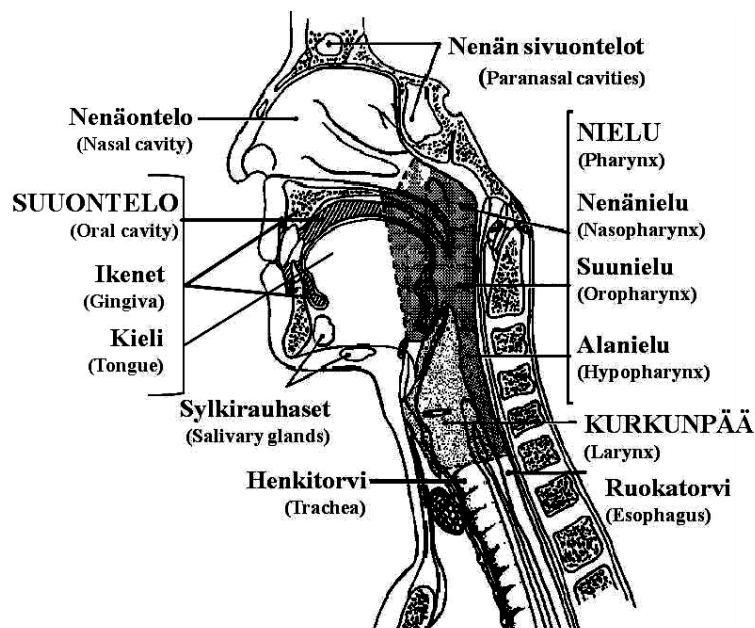
Naiset	Uusien syöpien määrä vuodessa (2007-2011)	Osuus kaikista syövistä (%)	Vuotuinen keskimääräinen ilmaantuvuuden muutos viimeisen 10 vuoden aikana (%)	Syöpäkuolemien määrä vuodessa (2007-2011)	Osuus kaikista syöpäkuolemista (%)	Vuotuinen keskimääräinen kuolleisuuden muutos viimeisen 10 vuoden aikana (%)
Kieli	64	0,5	2,2	19	0,4	5,1
Kurkunpää	14	0,1	0,3	5	0,1	2,4
Nielu	30	0,2	5,8	13	0,2	3,3
Suu ja nielu	206	1,6	1,2	66	1,2	1,8
Suuontelo	59	0,4	0,0	23	0,4	2,5

(b)

Miehet	Uusien syöpien määrä vuodessa (2007-2011)	Osuus kaikista syövistä (%)	Vuotuinen keskimääräinen ilmaantuvuuden muutos viimeisen 10 vuoden aikana (%)	Syöpäkuolemien määrä vuodessa (2007-2011)	Osuus kaikista syöpäkuolemista (%)	Vuotuinen keskimääräinen kuolleisuuden muutos viimeisen 10 vuoden aikana (%)
Kieli	74	0,5	3,5	27	0,5	1,3
Kurkunpää	105	0,7	-1,5	36	0,6	-1,4
Nielu	99	0,7	5,0	46	0,8	3,8
Suu ja nielu	331	2,3	1,1	111	1,9	1,5
Suuontelo	74	0,5	3,0	24	0,4	-0,3

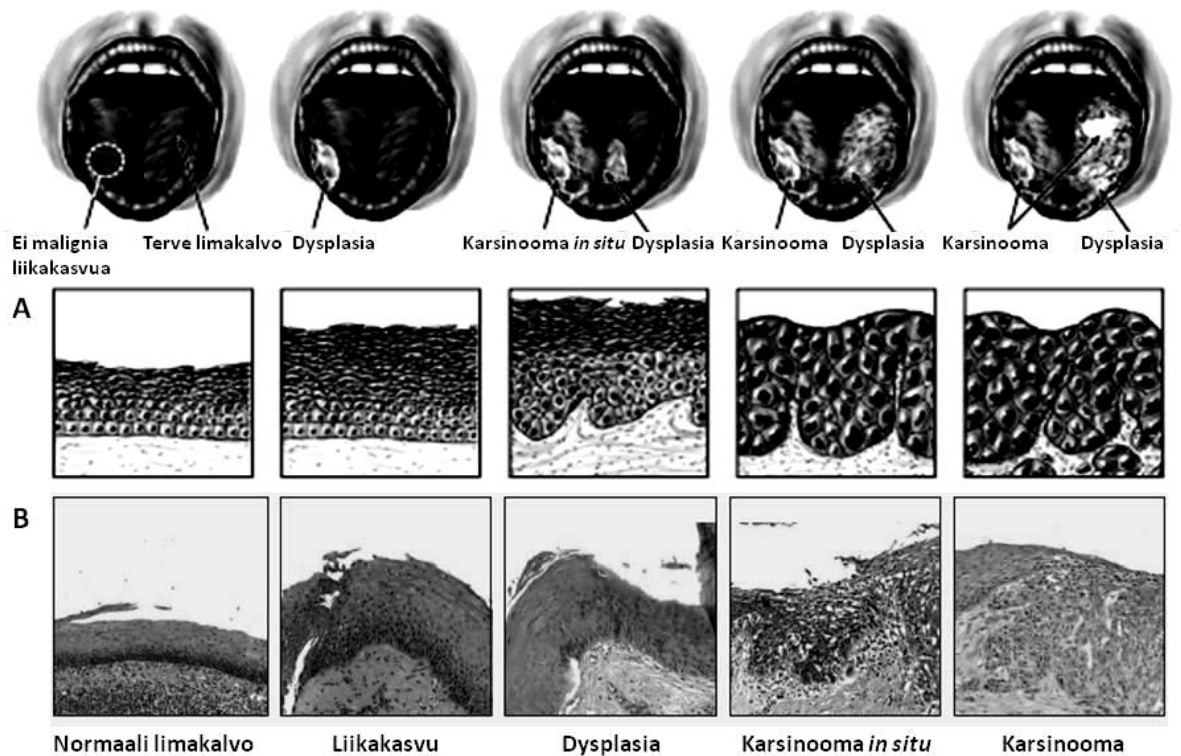
1.1.1 Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma

Pään ja kaulan alueen syöviksi luokitellaan kasvaimet, jotka sijaitsevat suun, nielun, nenän tai kurkun alueella. Tarkemmin määriteltynä suun syöviksi lukeutuvat huulten, ikenien, huulten ja poskien välialueen, kielen ja sitä ympäröivän kudoksen sekä suuonteloa ympäröivien luurakenteiden syövät. Nielu (pharynx) jaetaan anatomisesti kolmeen osaan: nenänieluun (nasopharynx), suunieluun (oropharynx) sekä alanieluun (laryngopharynx) (kuva 1), joista kaikki muut osat nenänielua lukuun ottamatta koostuvat levyepiteelistä ja näissä kaikissa rakenteissa voi esiintyä syöväksi diagnosoitavia solumuutoksia. Kurkunpään (larynx) alueella syöpää esiintyy äänihuulissa sekä kurkunkannenrustosta ja sitä peittävästä limakalvosta muodostuvassa kurkunkannessa (epiglottis). Lisäksi suun alueen sylkirauhasissa esiintyvät syövät lukeutuvat pään ja kaulan alueen syöpäkasvaimiksi. Luokittelusta jätetään ulkopuolelle ihon, aivojen, silmän ja kilpirauhasen kasvaimet sekä histopatologisesti eroavat syöpätyypit, kuten sarkoomat ja lymfoomat. Nämä syöpätyypit käsitellään omina tapauksinaan, sillä näiden solubiologisten ominaisuudet poikkeavat yleisesti verrattuna edellä mainittuihin pään ja kaulan alueen syöpätapauksiin (Vokes ym. 1993, Forastiere ym. 2001, Hunter ym. 2005). Kuvassa 1 on läpileikkaus pään ja kaulan anatomisesta rakenteesta, jossa osoitetaan ne kohdat, joissa pään ja kaulan alueen syöpiä esiintyy.



Kuva 1. Pään ja kaulan alueen anatomiset rakenteet. Levyepiteelisyöpää esiintyy suuontelossa, nielussa ja kurkunpäässä. (mukailten Vokes 1993)

Pään ja kaulan alueen anatomisia rakenteita verhoavat levyepiteelisolut. Solut ovat lieriömäisiä ja ne kiinnittyvät tiiviiden liitosten avulla tyvikalvoon, josta ne kasvavat kuutiomaisen-lieriömäisenä, pintaa kohden ohenevana monisoluisena kerroksena (kuva 2). Pinnan kudoksen solujen rinnakkainen asettuminen, kerrostuminen sekä kiinnittyminen tyvikalvoon takaa sen, että ne ovat tiiviissä yhteydessä toisiinsa ja samalla alttiina naapurisolujen ulkopuolelle välittyvälle signaaloinnille. Yksittäisen solun toiminnan häiriintyminen joko ulkoisten tai sisäisten tekijöiden takia voi aiheuttaa muutoksia solussa ilmentyvien proteiinien pitoisuuksissa. Vähäiset poikkeamat eivät välttämättä häiritse solun normaalia toimintaa mikäli vaurioita korjaavat mekanismit ovat kunnossa (esim. solusyklin kulkua ohjaavat geenit ovat toimintakykyisiä ilman mutaatioita) ja että olosuhteet solun elinympäristössä mahdollistavat näiden mekanismien aktivoitumisen. Varsinaiseksi levyepiteelikarsinoomaksi eli pahanlaatuiseksi syöväksi muuttuminen edellyttää soluissa useiden eri vaurioiden yhteisvaikutusta. Tällöin levyepiteelin solujen tumiin kertyy useita geenimutaatioita, joiden vaikutukset välittyvät naapurisoluihin. Sen myötä solujen normaali jakautuminen riistyy hallitsemattomaksi. Geneettinen valintaetu suosii tässä tilanteessa niitä solupopulaatioita, joilla on perimässään mutaatiot, jotka auttavat soluja selviämään kasvaimen muuttuvassa ympäristössä sekä irtautumaan alkuperäisestä sijainnistaan, tunkeutumaan tyvikalvon lävitse sekä välttämään apoptoosin (Weinberg & Hanahan 2000). Kuvassa 2. on esitetty vaiheittain, kuinka levyepiteelisolujen normaalikasvu muuttuu pahanlaatuiseksi ja miten se voidaan havaita sekä silmämääräisestä että solutasolla.



Kuva 2. Epiteelin muutos syövän kehityksessä. Solujen muutos erilaistuneista, hyvänlaatuisiksi kasvaimiksi (dysplasia ja Karsinoma *in situ*), erilaistumattomiksi soluiksi ja lopulta pahanlaatuisiksi kasvaimiksi (karsinoma) pään ja kaulan alueen limakalvolla (mukaiillen Pai & Westra 2009).

Molekyylibiologisten tutkimusmenetelmien kehityksen myötä syöpätautien kartoitus on lisääntynyt sekä tarkentunut. Ensimmäiset kattavimmat tutkimukset pään ja kaulan alueen syöpien syntymekanismeista ja taudin etenemistä on julkaistu 1980-luvulla. Kiinnostuksen kohteena ovat olleet taudin solubiologinen tausta, kehityskaari hyvänlaatuisesta kasvainvaiheesta itse syöväksi sekä eri hoitomuotojen soveltaminen tautiin ja potilaiden selviämiseen syövästä. Huomiota ja huolta on herättänyt se, että suurin osa pään ja kaulan alueen syöpää sairastavista menehtyy tautiin (Patel SH & Shah JP 2005, Vatanasapt ym. 1995). Suuren kuolleisuuden vuoksi maailman terveydenhuollon viranomaiset toteuttivat Thaimaassa vuosina 1988–1992 kattavan aluekohtaisen selvityksen eri pään ja kaulan alueen syöpätyypeistä (Vatanasapt ym. 1995). Kyseinen tutkimus oli alansa pioneeri ja se tarjosi runsaasti pohjatietoa pään ja kaulan alueen syöpien muodostumiseen johtavista riskitekijöistä. Nykyään on kiinnitetty entistä enemmän huomiota eri syöpäkasvainten monipuolisiin geneettisiin ekspressiokuvioihin, joista voi tulevaisuudessa olla apua oikeantyyppisten hoitomuotojen määrittämisessä syöpää sairastaville potilaille (Chung ym. 2004).

Pään ja kaulan alueen syöville altistaviksi tekijöiksi on listattu lukuisia elintapoihin ja -tasoon liittyviä seikkoja. Eri maanosien väestössä näissä esiintyy poikkeamia johtuen maiden välisistä varallisuus-, kulttuuri-, ilmastollisista sekä ympäristöllisistä eroavaisuuksista. Ravinnon on osoitettu olevan selvästi eräs syövän syntyyn vaikuttava tekijä. Esimerkiksi kasvien ja hedelmien sisältämien antioksidanttien syöpää ennaltaehkäisevästä vaikutuksesta on näyttöä useissa vuosikymmenten takaisissa tutkimuksissa aina tähän päivään saakka. Silti suurin elintason ja kulttuuriin rinnastettava riskitekijä pään ja kaulan alueen syövissä on tupakointi ja sen yhteisvaikutus liiallisen alkoholin kulutuksen kanssa. Tupakka sisältää runsaasti karsinogeneiksi lukeutuvia aineita, kuten erilaisia bentseenijohdannaisia ja nitrosoamiineja. Näiden on osoitettu aiheuttavan vaurioita solun perimäaineeseen, mikä pahimmassa tapauksessa voi johtaa syöpään (Hunter ym. 2005, Leemans ym. 2011, Brennan 1995). Edellä mainituista riskitekijöistä oman osa-alueensa muodostavat virusperäiset geenimutaatiot. Tautiseulonnoissa on havaittu, että esimerkiksi yli 50 % suunielussa, nielurisoissa sekä kielen alaosassa diagnosoiduissa kasvaimissa ilmenee onkogeenisistä DNA:ta, joka on peräisin ihmisen papilloomaviruksesta (HPV). Toinen soluja infektoiva ja pään ja kaulan alueen syöpiin liitetty virus on Epstein-Barr virus (EBV), joka on yleisempi Pohjois-Afrikassa ja Aasiassa esiintyvissä tautimuodoissa. HPV-positiivisessa syövässä solut ilmentävät virusperäisiä onkoproteiineja eli syöpää, sen etenemistä ja leviämistä edistäviä proteiineja ja eroavat näin HPV-negatiivisista tapauksista. Lisäksi on havaittu, että yleisimmät kromosomipoikkeamat, jotka liitetään syövän muodostumiseen, puuttuvat virusperäisistä pään ja kaulan alueen kasvaimista. Tällä on merkitystä yksilön syöpähoitoja suunniteltaessa, sillä HPV-positiivisilla potilailla hoitovaste on parempi kuin HPV-negatiivisilla potilailla (Forastiere ym. 2001, Vokes ym. 1993).

Pään ja kaulan alueen syövän muodostuminen edellyttää lukuisten eri geenimutaatioiden kertymistä soluihin. Mutaatiot takaavat solujen kuolemattomuuden, rajattoman ja hallitsemattoman kasvun, tunkeutumisen tyvikalvon läpi ympäröiviin kudoksiin sekä leviämisen muualle kehoon verenkierron ja lymfaattisen järjestelmän välityksellä. Karsinogeeniset tekijät, säteily, vapaat radikaalit sekä häiriöt solun sisäisessä säätelyjärjestelmässä voivat vaikuttaa tuman kromosomeihin poistamalla niistä tiettyjä alueita, vaihtamalla joidenkin osien paikkaa kromosomissa tai sitten monistamalla niissä joitain tiettyjä kohtia. Erityisen haitallisia ovat ne mutaatiot, jotka vaikuttavat solusyklin kulkuun etenkin sellaisessa poikkeustapauksessa, joka vaatisi

solunsisäisten mekanismien puuttumista prosessiin sitä korjaavalla tavalla. Suurimmat syöpään liitettävät mutaatiot ovat pään ja kaulan alueen syövissä tuumorin kasvua heikentävien eli supressorigeenien vauriot. Solusykliissä siirtymää vaiheesta G₁ vaiheeseen S ohjaa muun muassa CDKN2A- ja Rb-geenituotteet. Näiden geenien molemmissa alleeleissa ilmenevät mutaatiot aiheuttavat joko kyseisten geenien kokonaisvaltaisen vaimenemisen tai sitten heikentyneesti toiminnallisen proteiinin muodostumisen solussa. Esimerkiksi p16^{INK4A} on eräs CDKN2A-geenin transkription tuote, jonka tehtävä solussa on rajoittaa sykliiniriippuvaisen kinaasin (CDK) toimintaa. Pään ja kaulan alueen syöpäkasvaimista otetuissa histopatologisissa näytteissä on havaittu tämän proteiinin toiminnallisesti heikentyntä muotoa. Onkogeeniksi lukeutuvan P53-geenin mutaatio aiheuttaa geenin ilmentämään proteiinia, jonka normaali toimintakyky eli solusyklin pysäyttäminen tai solun ohjaaminen apoptoosiin on kadonnut. Tämän seurauksena solut välttävät solukuoleman ja jatkavat jakautumista ilman sisäisen säätelyjärjestelmän puuttumista prosessiin (Forastiere ym. 2001, Vokes ym. 1993). Kasvutekijöiden reseptoreissa (EGFR ja TGFβ) ja niiden signalointireiteissä on havaittu myös muutoksia, joiden osan on todettu liittyvän syövän etenemiseen. Epidermaalisen kasvutekijän reseptori-geenissä (EGFR) voi esimerkiksi ilmetä joko toimimattomuuteen tai yliaktiivisuuteen johtavia geenimutaatioita (esimerkiksi monistumia) Jälkimmäisen seurauksena solussa muodostuu joko eri ligandeille yliherkkiä reseptoreita tai sitten itse näiden yksiköiden tuotanto solussa lisääntyy. Reseptorien välityksellä solu saa ympäristöstään viestejä kasvaa ja jakautua nopeammin, jonka on todettu olevan eräs syövälle tyypillinen piirre. Muut mutaatiot, joiden on havaittu edistävän pahanlaatuisten solujen lisääntymistä, edistävät solujen sisäisten signalointireittien jatkuvaa toimivuutta. Tämä vastaavasti edesauttaa niitä välttämään ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin, irtautumaan muiden solujen vaikutuspiiristä, tunkeutumaan uusiin kudoksiin sekä selviytymään mahdollisista muuttuvista olosuhteista kudoksissa (Leemans ym. 2003). Muuttuvat biologis-kemialliset olosuhteet luovat soluille uudenlaisen valintapaineen, mikä vuorostaan aiheuttaa niissä sellaisten geenien päällekytkeytymisen, joka muodostaa kullekin kasvaimelle tyypillisen ekspressioilmiasun. Tämän perusteella voidaan analysoida tarkemmin kasvaimen tyyppiä ja arvioida sille parhaita hoitomuotoa.

1.1.2 Kasvaimen diagnosointi ja luokittelu

Pään ja kaulan alueen syövät muodostavat heterogeenisen kasvainpopulaation, mikä johtuu tämän anatomisen alueen erilaisista kudoksista ja solutyypeistä. Levyepiteeli, joka verhoaa pään ja kaulan alueen sisäonteloiden pintoja, muodostaa yhden diagnostisen syöpätyypin (levyepiteelikarsinoma), mutta syöpää voi esiintyä myös sylkirauhasten alueella (rauhasstyypin syöpä), ruston ja kallon luiden alueella (sarkooma), imukudosjärjestelmissä (lymfooma) sekä hermokudoksessa (kuva 1). Eri kudosten muodostama rakenteellinen kokonaisuus aiheuttaa kasvainten havainnoinnissa sekä diagnostiikassa omat haasteensa. Syöpään liittyvät oheisoireet ovat lisäksi melko arkisia vaivoja, joiden perusteella moni sairastunut ei edes osaa epäillä karsinoman mahdollisuutta. Potilaiden on kerrottu hakeutuneen hoitoon joko hammas- tai sitten yleislääkärin vastaanotolle suussa, kielessä, ikenissä tai kitalaessa esiintyneiden kipeiden haavaumien vuoksi, jotka eivät parane itsestään. Kipua on esiintynyt myös nenän sivuonteloissa, kurkussa nielemisen yhteydessä sekä poskien alueella. Syöpään liittyy myös nielemis- ja puhevaikeudet sekä krooniset tulehdukset. Haavaumat sekä silmämääräisesti näkyvät solumuutokset, kuten leukoplakiat ja haavaumat, ovat selviä viitteitä mahdollisesta kasvaimesta (Vokes ym. 1993).

Diagnoosin ensimmäisessä vaiheessa on ehdottoman tärkeää suorittaa kokonaisvaltainen tutkimus potilaalla pään ja kaulan alueen rakenteissa. Hoitohenkilökunta arvioi sekä silmämääräisesti että käsin tutkien ja tunnustellen mahdollisia syövän riskialueita. Kurkun ja kaulan alueella sekä nenäonteloissa tarkastelu tehdään tähystyksellä. Kudoksista otetaan neulalla pienet näytteet (biopsiat), joista analysoidaan solujen erilaistumisaste. Tämän perusteella voidaan jo sanoa epäilläkö syöpää vai ei. Karsinoman muodostuessa levyepiteelin solut menettävät vähitellen niille tyypilliset piirteensä, joka on seurausta niiden sisäisessä geenien ilmenemisjärjestelmässä. Jos havaitaan, että solut ovat muuttuneet erilaistuneista pahanlaatuisiksi eli omaksuneet kudosten läpi tunkeutuvan ja erilaistumattoman ilmiäsun, joilla on muusta kudoksesta poikkeava sisäinen solusignointi ja proteiinien ekspressiokuvio, kasvaimen soluista on mahdollista määrittää nykyisten solu- ja molekyylibiologisten tutkimusmenetelmien perusteella tarkemmin, millaisesta kasvaintyyppistä on kysymys. Levyepiteelikarsinoman geeniekspressiota on tutkittu ja tämän perusteella kasvaimia on yritetty ryhmitellä erilaisten ekspressioilmiasujensa perusteella. Menettelystä ennustetaan mahdollista keinoa määrittellä entistä

tehokkaampia ja yksilöllisempiä hoitoja syöpäpotilaille. Perinteisesti biopsioista on määritetty P53-, EGFR- sekä muita proto-onkogeeneja, onkogeeneja ja tuumorin supressiogeneenimutaatioita, mutta varsinaisessa ryhmittelyssä päähuomio on yhtenäisemmässä geenien ilmentymislinjauksessa (Pai & Westra 2009). Eräs jaottelu sisältää neljä erilaista kasvaimia yhdistävää piirrettä, joita useat solubiologian tutkimusryhmät ovat viime aikoina tarkastelleet ja todenneet näiden paikkaansa pitävyyden pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövissä. I-kategorian levyepiteelikarsinomat ilmentävät runsaasti epiteelin kasvutekijäreseptoria (EGFR), minkä vuoksi tämän kasvaintyyppin potilailla on tutkimusten mukaan huonoin mahdollisuus selvitä taudista. II-kategorian solut ovat menettäneet miltei kokonaan erilaistuneet piirteensä ja muuttuneet mesenkymaalisten solujen kaltaisiksi. III-kategorian potilaiden solut ilmentävät solun sisäisten keratiinien mutaatioita. Tutkimusten mukaan sellaisilla potilailla, joilla on III-kategoriaan lukeutuvia kasvainsoluja, on paras selviämismahdollisuus syövästä. V-kategorian soluilla ei ole todettu yhtenäistä ja selväperäistä ekspressiokuviota, mutta yhdistävänä tekijänä mainittakoon, että kyseisen kategorian potilaat olivat kaikki tupakoitsijoita. Geneettisen ilmiöselvityksen lisäksi kasvaimen histopatologiasta on syytä varmistaa, onko tauti mahdollisesti lähtöisin virusinfektiosta. On osoitettu, että yleisesti HPV-positiivisilla kasvaimilla on paremmat hoidon tulokset verrattaessa näitä HPV-negatiivisiin syöpätapauksiin (Chung ym. 2004, Hunter ym. 2005).

Kasvaimen fyysisen koon sekä levittäytymisasteen tutkiminen on syövän diagnostiikassa sekä hoitojen suunnitteluvaiheessa tärkeää tehdä huolellisesti. Kasvaimen lähi-imusolmukkeet tutkitaan ottamalla niistä biopsiat sekä lymfanäytteet. Magneettikuvausta (MRI) sekä tietokonetomografian (CT) avulla voidaan tutkia kasvainten kokoa sekä sen levinneisyyttä lähikudoksiin. Kuvantamismenetelmien diagnostisuutta on paranneltu viime vuosikymmenten aikana ja nykyisin ne tarjoavat tietoa jopa syövän fysiologisesta tilasta ja parhaimmillaan voivat antaa viitteitä sen solujen ekspressioprofiilista. Eräs tutkituimmista kuvantamis- ja analyysimenetelmistä on ollut positroniemissiotomografia (PET-kuvantaminen), jossa hyödynnetään radioaktiivisesti leimattuja merkkiaineita. Potilaaseen annosteltuna nämä merkkiaineet hakeutuvat erityisominaisuuksiensa vuoksi kasvainsoluihin tai niiden lähiympäristöön. Esimerkiksi kasvainten aineenvaihdunnallista aktiivisuutta määritetään [¹⁸F]FDG (2-deoksi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glukoosi, fluori-18-isotooppileima)-PET:n avulla. Eräs PET:in sovellustarkoitus on pään ja kaulan alueen syövän hoidossa ja sen suunnittelussa

kasvaimen happipitoisuuden tutkiminen. Erityisesti kasvaimessa esiintyvien hapen puutteesta kärsivien alueiden kartoitusta varten on kehitetty lukuisia radioaktiivisesti leimattuja merkkiainemolekyylejä. Eräs tällainen yhdiste on [¹⁸F]FMISO ([¹⁸F]fluoromisonidatsoli, fluori-18-isotooppileima), jonka on osoitettu hakeutuvan potilaassa kasvaimen hypoksisiin eli hapen puutteesta kärsiville alueille (Minn ym. 2008, Sun ym. 2011).

Syövän diagnosoinnissa ja hoitoa suunniteltaessa määritellään sen histologinen leviäminen eli missä levyepiteelin osassa pahanlaatuiset solumuutokset havaitaan, kuinka laajalle alueelle ne ovat jo levittäytyneet ja onko niissä havaittavissa enää alkuperäiselle kudokselle tyypillisiä piirteitä. Kasvaimen solujen erilaistumistilan arvioinnin pisteytyksessä käytetään gradus-asteikkoa: G1-G4. G1:n solutyyppi on vielä erilaistunut ja kasvain muistuttaa toiminnallisesti vielä normaalia kudosta. G2 – luokan solut ovat jo menettäneet osan erilaistuneille soluille tyypillisistä ominaisuuksistaan liittyen niiden proteiinien ilmentymistasoon, mutta ulkonäöllisesti näistä muodostuva tuumori muistuttaa vielä normaalikudosta. G3 – luokan kasvainsolut täyttävät jo selvästi ulkoiselta ilmiasultaan erilaistumattoman kudoksen kriteerit. G4 – luokan tuumorisolut eivät muistuta enää lainkaan erilaistunutta kudosta. Yleisesti voidaan todeta, että pienempi G:n arvo on potilaan hoitoennusteen kannalta aina parempi uutinen.

Yleisin anatominen syövän pisteytysmenetelmä eli TNM-pisteytys, on ollut käytössä jo yli viisikymmentä vuotta syövän hoidossa. Kansainvälinen syöpäyhdistys (IUCC) lanseerasi tämän Pierre Denoix'n alkuperäisestä ideasta lähtöisin olevan syövän leviämistä ja rakenteellisuutta kuvaavan systemaattisen järjestelmän käyttöön vuonna 1968 ja sitä on kehitetty ja päivitetty ajan tasalle uuden tutkimustiedon ja hoitomenetelmien kehittymisen myötä. Koska luokittelu on käytössä maailmanlaajuisesti, sen etu on siinä, että kunkin lääkärin diagnoosi potilaan tilasta on vertailukelpoinen keskenään ja jokaiselle 23 syöpätyypille on julkaistu oma TNM-taulukko. Pään ja kaulan alueen syöpien TNM-pisteytys on listattu taulukossa 2.

TNM-luokituksessa ensimmäinen kirjain T viittaa primäärituumorin kokoon tai yleisesti sen havaittavuuteen kehossa ja se arvioidaan numeerisesti asteikolla 1-4. Asteikolla 1 primäärituumorin koko on alle 2 cm, kun taas asteikolla 2 se sijoittuu välille 2-4 cm. Asteikolla 4 tuumorin kokoluokka on jo yli 4 cm:ä. Näiden numeroiden lisäksi T-luokituksessa käytetään myös 0-asteikkoa, mikä kuvaa sitä, ettei varsinaista primäärituumoria ole havaittu potilaassa. Jos taas syövän on havaittu rajoittuneen

epiteelissä tai rauhaskudoksessa tyvikalvon yläpuolelle, T-luokituksessa tämä merkitään kirjainyhdistelmällä Tis, mikä on suora viittaus tarkoittaen karsinoma *in situ*:a. Toisaalta on myös mahdollista, ettei varsinaista primäärituumoria voida luokitella lainkaan, jolloin T-luokituksella tämä ilmaistaan kirjaimin TX. Kattegoria T4 on jaettu vielä alaluokkiin ”a” ja ”b”, joista ”a” viittaa siihen, että potilaan kasvain voidaan hoitaa leikkaamalla, kun taas vastaavasti ”b”-luokan tapauksissa tämä ei ole enää mahdollista.

Syövän levittäytymistäipumusta läheisiin imusolmukkeisiin kuvaa TNM-luokituksessa kirjain N ja tämä voidaan jaotella aggressiivisuutensa perusteella pään ja kaulan alueen syövässä vielä tyyppeihin 0-3. Niissä tapauksissa, joissa levinneisyyttä ei voida määrittää, merkitään systeemissä kirjaimin NX. N0-arvio ilmaisee, että tuumori ei ole siirtynyt vielä potilaan imusolmukkeisiin, kun taas N1-luokassa esiintyy jo havaintoja pienistä yksittäisistä pesäkkeistä tuumoria lähinnä olevasta imusolmukkeesta (koko <3 cm). Luokituksen siirtyessä N2- (koko >3 cm, mutta <6 cm) ja N3-tapauksiin (koko >6cm), imusolmukkeissa olevien pesäkkeiden halkaisija suurenee samalla kun, niiden lukumäärä lisääntyy. Myös N-luokituksessa on käytössä vielä numeroiden lisäksi pienemmät kirjaimet ”a”, ”b” ja ”c” jotka havainnollistavat pesäkkeiden lukumäärää imusolmuketta kohden sekä levittäytymistä; ”a” tarkoittaa, että kyseessä on vielä yksittäiset pesäkkeet, kun taas ”b” kohdalla puhutaan jo lukuisista tapauksista. ”c”-ryhmän imusolmukepesäkkeet ovat vastaavasti suurikokoisia, niitä on runsaasti ja että ne ovat levittäytyneet myös muihinkin lähellä oleviin imujärjestelmän tiehyisiin.

Viimeinen kirjain M luokitteluasteikon yhdistelmässä symboloi kasvaimen metastaasien lukumäärää. Tämä vastaavasti jaotellaan yhtäläillä numeerisesti, mutta jako on huomattavasti karkeampi verrattuna edellä esitettyihin järjestelmän kategorioihin. Jos kasvaimen etäpesäkkeitä ei voida määrittää, niin tätä merkitään kirjainyhdistelmällä MX. M0 ilmaisee, ettei potilaalla ole etäpesäkkeitä, kun taas M1 vastaa positiivista implikaatiota näiden havainnoista. M1-diagnoosi on potilaan hoitoennusteen kannalta huono uutinen, sillä etäpesäkkeiden lukumäärän on todettu korreloivan käänteisesti hoidon onnistumisen suhteen (Patel & Shah 2005).

Taulukko 2. Eräs pään ja kaulan alueen syöpien TNM-luokitteluasteikko (suusyövän mukainen luokittelu), sillä jokaiselle pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomalle on määritelty erikseen oma TNM-luokittelusysteemi (Patel & Shah 2005 mukaan).

SYMBOLI	TULKINTA
TX	Primäärituumoria ei voida määrittää
T0	Primäärituumoria ei havaita
Tis	Karsinooma <i>in situ</i>
T1	Primäärituumorin koko ≤ 2 cm
T2	Primäärituumorin koko välillä 2 cm – 4 cm
T3	Primäärituumorin koko ≥ 4 cm
T4	Tuumorisolut tunkeutuneet läheisiin kudoksiin (luu-, hermo-, imu- ja rauhaskudos)
a	Tuumori hoidettavissa kirurgisesti
b	Tuumoria ei voida hoitaa kirurgisesti
NX	Lokaaleja imusolmukkeita ei voida määrittää
N0	Ei etäpesäkkeitä primäärituumorin läheisessä imusolmukkeessa
N1	Yksittäinen etäpesäke saman puoleisessa imusolmukkeessa, joka ≤ 3 cm
N2	
a	Yksittäinen etäpesäke saman puoleisessa imusolmukkeessa, koko välillä 3 cm – 6 cm
b	Useita etäpesäkkeitä saman puoleisessa imusolmukkeessa, koko ≤ 6 cm
c	Useita etäpesäkkeitä molemmin puolissa tai vastakkaisissa imusolmukkeissa, koko ≤ 6 cm
N3	Etäpesäke imusolmukkeessa, joka ≥ 6 cm
MX	Etäpesäkkeitä ei voida määrittää
M0	Etäpesäkkeitä ei havaita
M1	Etäpesäkkeitä

1.1.3 Hoitomenetelmät

Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomien hoidon suunnittelu ja toteutus vaatii lääketieteenhenkilökunnan moniammatillista osaamista. Hoitoon osallistuu yleensä pään ja kaulan alueelle erikoistuneita kirurgeja, onkologian eli syöpälääketieteen lääkäreitä, radiologeja eli lääketieteen ammattilaisia, jotka tutkivat ja soveltavat säteilyä sairauksien todentamisessa sekä mahdollisissa hoitotoimenpiteissä. Lisäksi usein tarvitaan yhteistyötä plastiikkakirurgien sekä hammaslääkäreiden kanssa.

Pään ja kaulan alueen syöpäkasvaimien hoitoon sovelletaan kolmea menetelmää riippuen taudin levinneisyydestä ja erilaistumisasteesta: leikkaus- ja sädehoitoa sekä kemoterapiaa. TNM-luokittelua pidetään edelleen tärkeimpänä kriteerinä, joka määrittää, mitä hoitokäytäntöä sovelletaan kuhunkin potilaaseen. Käytäntö, tutkimukset ja tilastot ovat osoittaneet, että pään ja kaulan alueen syövässä tietyille kasvaintyypeille on olemassa hoitosuositukset. Tästä huolimatta jokaiselle potilaalle on laadittava yksilöllinen hoitosuunnitelma, jossa huomioidaan kasvaimen ja taudin monimuotoisuus ihmisessä (Argiris ym. 2008).

Leikkaus- tai sädehoito ovat yleisimmät hoitomenetelmät kasvaimilla, jotka ovat levinneet vain vähäisessä määrin ympäröiviin kudoksiin tai tunkeutuneet tyvikalvoon. Tällaiset syövätkä luokitellaan yleensä kuuluvan joko luokkaan G1 tai G2, ja ne määritellään paikallisesti levinneiksi. Syöpäkasvaimien leikkaus vaatii kirurgeilta runsaasti erikoisosaamista, sillä pään ja kaulan alueen elinten toiminnallinen säilyminen on potilaan elinkyvyn sekä elämänlaadun kannalta ehdottoman tärkeää. Leikkaukset vaativat yleensä tiettyjen rakenteiden, kuten sylkirauhasten tai kasvainta lähellä olevien imusolmukkeiden poistamista. Kaikki syövän hoidossa käytettävät kirurgiset toimenpiteet eivät sisällä tai vaadi enää kokonaisvaltaista kaulan tai leuan alueen avaamista. Mikro- eli hienokirurgia on nykyisin yleistyvässä määrin käytössä oleva menetelmä, jossa leikkaus tehdään erityisinstrumentteja käyttäen (endoskooppinen laser ja robotiikka, erityisen tarkat optiset tähystyskamerat). Menetelmän avulla esimerkiksi varhaisen vaiheen kurkunpään syöpien hoidossa potilaiden toipuminen leikkaushoidosta on parantunut. Lisäksi näiden äänen tuottaminen on säilynyt miltei täysin ennallaan, mikä ennen ei ollut täysin varmaa kirurgisten hoitojen jälkeen. Sädehoitoa käytetään joko ensisijaisena tai sitten liitännäisenä hoitomuotona pään ja kaulan alueen hoidossa. Jokaiselle potilaalle suunnitellaan onkologiaan ja radiologiaan erikoistuneen henkilökunnan kanssa yksilöllinen hoitomalli riippuen syövän laajuudesta ja siitä, missä elimessä tai rakenteessa se esiintyy. Sädehoitoa annetaan potilaalle tietyn suuruisina annoksina eli fraktioina tietyn ajanjakson verran, esimerkiksi 2,0 Gy:n viiden päivän viikkoannoksesta 70 Gy:n seitsemän viikon kokonaisannokseen. Fraktioidusta sädehoidosta käytetään tyypillisesti kahta päähoitolinjaa: hyperfraktiointia ja kiihdytettyä fraktiointia. Hyperfraktioinnissa potilaalle annetaan kahdesta kolmeen fraktiota päivässä, jonka tarkoitus on lisätä säteilyn soluja tappavaa vaikutusta kasvaimessa. Kiihdytetyssä fraktioinnissa vastaavasti kasvaimen säteilyannoksen kokonaismäärää lisätään kasvattamalla säteilyn kokonaisintensiteettiä 1,6 – 1,8 Gy:llä

huomioiden kuitenkin potilaalle alun perin suunnitellun hoidon kokonaissäteilymäärän. Verrattuna hyperfraktiointiin, kiihdytetyn fraktioinnin sädehoidot kestävät lyhyemmän ajanjakson ja niiden kokonaissäteilymäärä on pienempi.

Syöpien, jotka ovat levittäytyneet jo laajemmalle alueella tai että kasvainten sisältämät solumuutokset ovat sen verran erilaistumattomia (syöpäluokitus: G3-G4), hoidossa voidaan käyttää yhdistelmähoitoina kirurgiaa, kemoterapiaa sekä sädehoitoa. Yleisesti kasvaimesta riippuen yhdistelmät ovat joko leikkaus ja sädehoito tai sädehoito yhdistettynä kemoterapiaan. Kemoterapiassa potilaille annetaan sytostaatteja eli solunsalpaajalääkkeitä, kuten cis- tai karboplatinaa tai fluorourasiilia. Nämä yhdisteet sitoutuvat DNA:han aiheuttaen siinä säteilylle herkistäviä ominaisuuksia, jonka ansiosta sädehoitojen tehokkuutta voidaan kasvattaa syöpäsolujen tuhoamisessa. Kaksoiskierrerakenteeseen sitoutunut kemoterapeuttinen yhdiste ja siihen kohdistettava ionisoiva säteily aikaan saa atomeissa elektronien viritystiloja, joiden muutokset muodostavat DNA:han aukkoja. Vahingot ovat yleensä niin suuria molekulaarisessa mittakaavassa, että solun sisäiset mekanismit eivät pysty korjaamaan niitä, mistä johtuen solut kuolevat. Paikallisesti pitkälle edenneiden syöpien hoidossa kemoterapeuttisten lääkkeiden käyttö on vakiintunut liitännäishoitona muiden menetelmien kanssa, mutta yksistään niiden tehon ei ole osoitettu olevan riittävä syövän hoidossa (Argiris ym. 2008).

Nykyisin käytössä on myös muihinkin syövän molekyylibiologisiin ominaisuuksiin pohjautuvia kemoterapeuttisia lääkevaihtoehtoja, jotka puuttuvat enemmän syöpäsolujen signaalintijärjestelmään. Cetuximab (tai vastaavasti Merckin valmistama Erbituxi[®]) on ensimmäisiä syövän hoidossa täsmälääkkeenä tunnustettu yhdiste. Cetuximab on IgG1-luokan monoklonaalinen vasta-aine, jonka teho perustuu siihen, että se vaimentaa syöpäsolujen EGF-reseptoreiden signaalintiherkkyyttä. Lääkemolekyylit sitoutuu kasvutekijämolekyyleille spesifisiin kohtiin syöpäsolun solukalvolla, estäen näin kasvusignaalin kulkeutumisen solun sisään aina tumaan saakka. Cetuximabia voidaan antaa yhdistelmänä myös muiden kemoterapeuttisten yhdisteiden, kuten platinapohjaisten lääkkeiden (cis-platina, karboplatina) tai 5-fluorourasiilin kanssa, joiden on osoitettu muodostavan tehokkaan kokonaisuuden syöpäkasvainten hoidossa (Vermorcken ym. 2008, Pai & Westra 2009). Muitakin solujen sisäiseen signaalintijärjestelmään vaikuttavia lääkeaineita kehitellään ja tutkitaan jatkuvasti.

Uusia hoitomenetelmiä kehitellään jatkuvasti pään ja kaulan alueen syöpiin ja kiinnostuksen kohteena on muun muassa kehitteillä ollut HPV-rokote, jonka tarkoitus on ollut vähentää riskiä sairastua kohdunkaulansyöpään. Osa pään ja kaulan alueen syöpäkasvaimista on havaittu olevan HPV-positiivisia ja tästä johtuen rokotteen soveltamista myös levyepiteelikarsinoomiin on ehdotettu (Pai & Westra 2009).

Syövän hoidot ovat potilaille raskaita toimenpiteitä sekä fysiologisesti että myös henkisesti. Toipuminen vie aikaa useita vuosia ja vaatii sopeutumista muuttuneisiin elintoimintoihin, mikäli kyseessä on ollut esimerkiksi vaativa kirurginen toimenpide (elimen tai kudosten poisto). Kemoterapiasta ja sädehoidosta aiheutuvat sivuvaikutukset, kuten ihottumat, limakalvojen kuivumiset, nielemisvaikeudet, pahoinvointi, hiustenlähtö, tulehdukset sekä muut oheisoireet muodostavat lisähaasteensa toipumiselle. Lisäksi syövän uusiutumisriski on potentiaalinen riski jokaisella potilaalla. Tämän vuoksi hoidon läpikäyneitä seurataan riittävällä, tietyin aikavälein toteutettavilla lääkärin kontrollikäynneillä.

1.2 Kasvaimen mikroympäristö

1.2.1 Angiogeneesi eli verisuonten uudismuodostuminen

Nisäkässolut tarvitsevat happea ja ravinteita pysyäkseen elossa kudospäristössä. Varmistaakseen riittävän hapensaannin sekä kaasujenvaihdon toiminnallisuuden, solujen on sijaittava verisuonten välittömässä läheisyydessä. Hapen diffuusiomatka, eli kaasumaisen aineen kulkeutuminen korkeammasta osapaineesta matalampaan osapaineeseen, on 100–200 µm. Tämä vähimmäisetäisyys määrittää fysiologisen raja-arvon hapenpuutostilan muodostumiselle soluissa. Mikäli hapen- ja ravintoaineiden kuljetusmatkat kasvavat liian suuriksi, elimistössä muodostuu uusia verta kuljettavia väyliä joko vaskulo- tai angiogeneesin kautta. Angiogeneesissä uusia verisuonia syntyy jo olemassa olevista suonista esimerkiksi vanhan emosuonen seinämästä kuroutumalla. Angiogeneesiä tapahtuu esimerkiksi kudosten paranemisessa ja kasvainmuodostuksessa. Vaskulogeneesissä uusia verisuonia muodostuu esimerkiksi irtonaisista endoteelisoluista kasvutekijöiden ohjaamana. Kyseinen ilmiö on enempi oleellinen yksilönkehityksen kuin syövän muodostumisen kannalta, jossa säätelevänä tekijänä on verisuonitusta muodostavien sekä estävien eli pro- ja anti-angiogeneettisten tekijöiden

välinen tasapainotila sekä solujen sieto- ja vastaanottokyky näille molekyyille. Häiriöt verisuonten uudismuodostuksessa erilaisten mutaatioiden (onko- ja proto-onkogeenit) tai fysiologisten tilojen vaihteluiden seurauksena (hapen puutos, kiihtynyt aineenvaihdunta, reaktio tulehdusvasteeseen ym.) aikaansaavat verisuoniverkoston kehittymisen kasvaimen ympärille. Lisäksi tämä piirre edesauttaa syövän levittäytymistä muualle kehoon (Carmeliet & Jain 2000, Vaupel 2004).

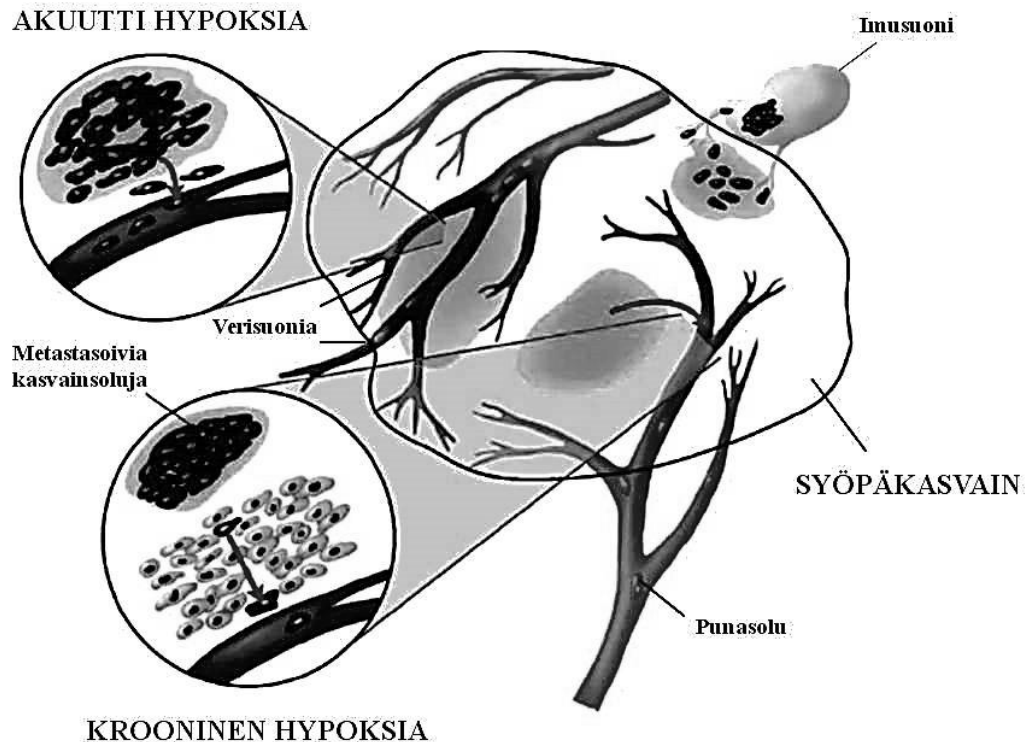
Verisuonten uudismuodostumista ja erityisesti siihen vaikuttavia tekijöitä on tutkittu vuosikymmenten ajan. Ensimmäiset angiogeneesiin vaikuttavat proteiinit eristettiin ja karakterisoitiin jo 1970-luvulla, mutta varsinainen läpimurto tapahtui 1990-luvun alussa proteomiikan ja sen sovellutusten kehittyessä (Ferrara 2002). Merkittävimpiä verisuonten muodostumisessa vaikuttavia kasvutekijöitä ovat VEGF (verisuonen endoteelin kasvutekijä; engl. vascular endothelial growth factor) sekä Ang1 (angiopoietiini 1; engl. angiopoietin 1). Näiden proteiinien sitoutuminen spesifeihin reseptoreihin aikaansaa endoteelisolujen irtoamisen, vanhojen suonten solujen välisten liitosten purkautumisen ja uusien suonien muodostumisen. VEGF-geenistä voi muodostua transkription yhteydessä vaihtoehdoisessa silmukoinnissa useita eri VEGF-variantteja. Verisuonituksen muodostumisen kannalta olennaisimmat ovat VEGF-A (varsinainen VEGF-molekyyli) ja VEGF-B. Nämä sitoutuvat solukalvon pinnalla oleviin tyrosiinikinaasireseptoreihin (VEGFR), joiden dimerisaatio eli pariutuminen aiheuttaa solunsisäisen fosforylaatioreaktion. Tämä aktivoi solunsisäisen signaaloinnin erilaisten toisiolähettien välityksellä. Loppujen lopuksi prosessi johtaa spesifisten geenien ilmentymiseen. Ang1 ja VEGF ohella myös muut tekijät säätelevät uusien verisuonten muotoutumista. Esimerkiksi TGF α (transformoiva kasvutekijä alfa; engl. transforming growth factor alpha) edesauttaa endoteelisolujen erilaistumisessa varsinaisiksi kapillaareiksi. Lisäksi uusien suonten kiinnittymiseen sekä näiden kasvusuunnan määrittämiseen vaikuttaa olennaisesti erilaiset integriinit ($\alpha_v\beta_3$, α_v), VE-kadheriinit ja verihiutaleen kaltaiset endoteelisolujen soluliitosmolekyylit; engl. platellet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) (Carmeliet & Jain 2000).

Normaalit laskimot ja valtimot poikkeavat sekä rakenteensa että veren virtaamisominaisuuksiensa puolesta syöpäkasvaimen verisuonituksesta. Kasvaimen kapillaarit ovat muodostuneet joko haaroittumalla emovaltimosta tai irrallisesta endoteelisolusta, joka kasvutekijöiden ohjaamana jakautuu ja erilaistuu putkimaiseksi rakenteeksi, johon kasvaimen verivirta ohjautuu. Syöpäkasvaimen verisuonia voi myös syntyä kasvaimen sisälle solujen välitiloihin (valesuonet). Suonten välinen

haaroittuminen ja epäjärjestelmällisyys, seinämien löyhä rakenne ja solujen väliset heikot liitokset lisäävät kasvaimen verisuonten vuotavuutta. Tämä aiheuttaa kasvaimen sisäisessä nestevirtauksessa suuria painenvaihteluja. Lisäksi suonista puristuu hydrostaattisen paineen vuoksi jatkuvasti kudostenestettä, minkä seurauksena kudostenesteen määrää lisääntyy syöpäsolujen välisessä tilassa. Suodattunut neste puristaa valtimoita kasaan vaikeuttaen veren virtausta näissä poikkeavissa kapillaareissa entisestään. Tällöin osa suonista voi altistua hetkittäisille tukoksille, mistä johtuen kasvaimen verisuonet eivät kykene ravitsemaan ja hapettamaan ympäröiviä syöpäkudoksia riittävän tehokkaasti (Vaupel 2004).

1.2.2 Kasvainhypoksia

Syöpäkasvaimissa esiintyy hapenpuutetta eli hypoksiaa, jos tuumorin solujen hapen saanti rajoittuu joko väliaikaisesti tai kokonaan. Tavallisesti kudosten hapen osapainearvo (pO_2) ylittää 20 mmHg:n. Alhaisempia osapainelukemia pidetään hypoksiseen tilaan viittavana tekijänä (Dewhirst ym. 2008). Koska kasvainsolujen aineenvaihdunta on normaaliin kudokseen nähden kiihtynyt, kasvainsolut vaativat tehostettua ravinnon- että hapen kuljetusta. Kasvainsolut erittävätkin erilaisia verisuonien uudismuodostusta indusoivia kasvutekijöitä saadakseen lisääntynyt hapentarve tyydytettyä. Muodostuneen uudissuonituksen tehtävä on taata kasvavalle syöpäsolupopulaatiolle riittävät energian sekä kaasujen vaihdon mahdollisuudet, jotta tuumori selviäisi elinkykyisenä yksikkönä. Syntyvän perusteella kasvaimien hypoksiatyypit jaetaan joko akuuttiin tai krooniseen hypoksiaan (kuva 3).



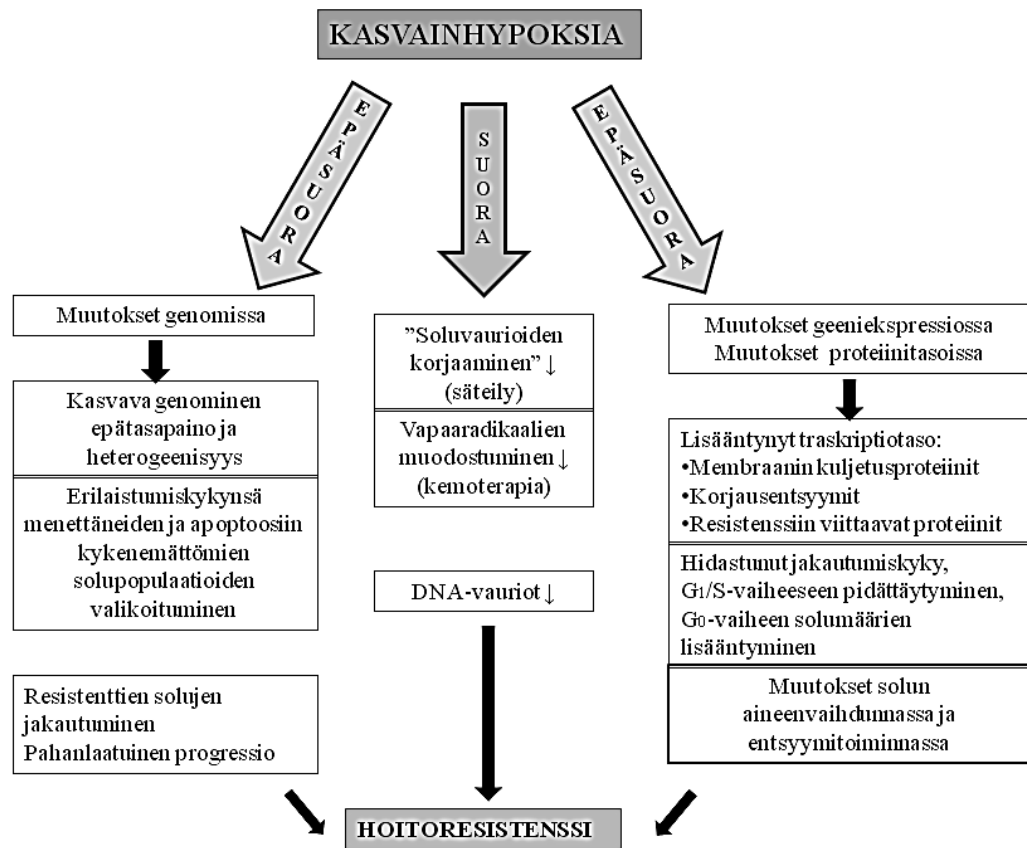
Kuva 3. Kasvainhypoksian alalajit. Akuutti hypoksia ja krooninen hypoksia sekä niiden syntyyn vaikuttavat tekijät. Rajoittuneen hapen saanti on esitetty kuvan verisuonissa voimakkaan tummina alueina ja kasvaimen hypoksiset alueet harmaina alueina (mukaiillen Chaudary & Hill 2007).

Kasvaimen verisuoniston akuutti eli hetkittäinen hypoksia johtuu poikkeavasta sekä ajoittain katkonaisesta veren virtauksesta. Tämän seurauksena hapen kulku ympäröiviin kudusrakenteisiin heikkenee ja saa aikaan soluissa hapenpuutostilan (Isa ym. 2006, Dewhirst ym. 2008). Krooninen eli jatkuva hypoksia vuorostaan aiheutuu solujen ja happea kuljettavan verisuonen liian pitkästä välimatkasta (Chaudary & Hill 2007).

Hypoksian on todettu olevan syöpäpotilaan hoitoennusteen kannalta huono merkki. Hapenpuutos voi luoda kasvainympäristössä valintapaineen, mikä ohjaa sellaisten solupopulaatioiden selviytymistä, jotka kykenevät sopeutumaan vähähappisiin oloihin. Näille soluille on tyypillistä se, että ne välttävät apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman, kykenevät anaerobiseen eli hapesta riippumattomaan energian muodostamiseen (Warburgin efekti) ja pystyvät lisäksi säätelemään solun sisäistä vetyionikonsentraatiotaan happamoituvassa kudospäristössä. Hypoksian on osoitettu lisäävän myös sellaisten kasvaintyyppien elinkykyä, jotka muodostavat tehokkaammin ympärilleen uusia verisuonia ja metastasoituvat herkemmin. Lisäksi näiden soluissa

esiintyy epiteeli-mesenkymaalista solumuuntautumista (Isa ym. 2006, Wilson & Hay 2011). Hypoksiassa solusykli hidastuu tai jopa pysähtyy, minkä seurauksena valinta suosii niitä soluja, jotka kykenevät jakautumaan hapenpuutteesta huolimatta. Tästä johtuen valinta suosii erityisesti pahanlaatuisiksi luokiteltuja soluja, joihin tyypillisesti on kasaantunut monia syövän etenemistä edistäviä ominaisuuksia.

Kasvutekijöiden sekä metastasointiin liittyvien proteiinien ja näiden reseptoreiden määrällisessä ilmentymisessä hypoksisissa syöpäsoluissa on todettu olevan myös merkittävää kasvua verrattaessa normaaleihin kudoksiin (Harris 2002). Kuvassa 4 on osoitettu kaaviona hypoksian suorat ja epäsuorat vaikutukset kasvainsolujen toimintaan.

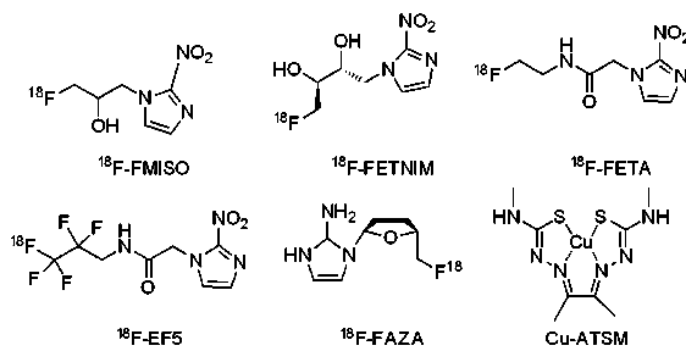


Kuva 4. Kasvainhypoksian aiheuttamat suorat ja epäsuorat vaikutukset. Kaavakuva kasvainhypoksian mahdollisista vaikutuksista syöpäsoluihin. Suora vaikutus voi heikentää sädehoidon ja tiettyjen kemoterapeuttisten lääkeaineiden tehoa kasvainsoluissa. Epäsuorissa vaikutuksissa vuorostaan genomissa ja geeniekspressiotasoissa tapahtuvat muutokset voivat ohjata kasvaimessa hypoksiaa parhaiten sietävien solupopulaatioiden valikoitumista. Näiden kolmen tekijän oletetaan johtavan hoitoresistentin kasvaimen muodostumiseen hypoksisissa kudospäristössä (mukaillen Harrison & Blackwell 2004).

Kasvainten hapetustasoa tutkitaan jo syöpähoitojen suunnitteluvaiheessa, sillä tämä määrittää käytettävät hoitomenetelmät sekä prognoosin. Hapetusastetta voidaan tutkia joko invasiivisin tai non-invasiivisin menetelmin. Näiden perinteisten tutkimusmenetelmien lisäksi kasvaimen hypoksiaan liittyvästä proteiinitasojen muutosten tarkastelusta eli endogeenisten markkeerien määrittämisestä voisi tulevaisuudessa olla hyötyä kasvaimen hoitotoimenpiteiden suunnittelussa. On havaittu, että hapenpuute aiheuttaa solun geeniekspressiossa muutoksia, jolloin muun muassa HIF-1 (hypoksian indusoima transkriptiofaktori-1; engl. hypoxia inducible factor-1), Glut-1 (glukoosinkuljettaja 1; engl. glucose transporter 1) ja CA IX-proteiinien (hiilihappoanhydraasi 9; engl. carbonic anhydrase 9) tasot kohosivat. Näiden proteiinien pitoisuuksien mittaamista ei kuitenkaan vielä sovelleta diagnostiikassa tai hoidon suunnittelussa. On syytä muistaa, että proteiinien ekspressiotasoihin vaikuttavat monet eri tekijät, mikä hankaloittaa tulosten tulkintaa ja liittämistä itse hypoksiseen fenotyyppiin (Isa ym. 2006, Sun ym. 2011).

Invasiivisessa hypoksian tutkimisessa on ollut käytössä jo vuosia polarografiset happielektrodit. Tässä menetelmässä syöpäkudokseen pistetään ohut neula, jonka kärjen ilmasin mittaa kudoksen happiosapaineissa tapahtuneet muutokset. Vaikkakin menetelmä on mittaussominaisuuksiensa perusteella tarkka, sen avulla ei saada kokonaiskuvaa kasvaimen hapetustilasta. Tulosten luotettavuus johtuen mittaajan tarkkuudesta ei välttämättä takaa luotettavaa tietoa kudoksen kokonaihappipitoisuudesta. Lisäksi happielektrodien avulla ei voida määrittää elinkykyisten ja nekroottisten eli kuolleiden kudosten välistä suhdetta. Toinen invasiivinen menetelmä perustuu ns. molekulaarisiin koettimiin. Ne kertyvät kemiallisten ominaisuuksiensa johdosta kohdekudokseen, mistä ne havainnoidaan histologisilla menetelmillä. Hypoksian havainnointi perustuu yleensä molekyylikoettimien indusoimisiin pelkistymisreaktioihin. Kasvaimen hapetusasteen määrittämisessä käytetään esimerkiksi 2-nitroimidatsoli-johdannaisia, kuten misonidatsoli [1-(α -metoksimetyylietanoli)-2-nitroimidatsoli] ja EF5 [2-(2-nitro-1*H*-imidatsoli-1-yyli)-N-(2,2,3,3,3,-pentafluoropropyli)-asetamidi] (kuva 5.). Immunohistokemialliset määrittäyksetkään eivät kuitenkaan anna todellista kokonaiskuvaa kasvaimen hypoksian tasosta. Tämä rajoittaa molekyylikoettimien perusteella saadun tiedon soveltamista kasvaimen hoidon suunnittelussa (Isa ym. 2006).

Non-invasiivisessa hypoksian määrittämisessä voidaan käyttää edellä kuvattuja molekyylikoettimia. Merkittävä ero invasiiviseen menetelmään on se, ettei potilaasta tarvitse ottaa kudospäätteitä, sillä koettiin on liitetty radioaktiivinen isotooppileima, joka voidaan kuvantaa suoraan erikoiskameroiden avulla. Suurin etu non-invasiivisessa menettelyssä on, että sen avulla saadaan suhteellisen kokonaisvaltainen ja informatiivinen kuvaus potilaan syöpäkasvaimen hapetustilasta. Ongelmana on merkkiaineiden ohjaaminen kohdekudokseen spesifillä tarkkuudella. Näiden kertyminen muualle kuin kohdekudokseen heikentää todellisesta kasvainhypoksiasta peräisin olevaa signaalia. Toistaiseksi yleisin käytössä oleva non-invasiivinen hypoksian kuvantamismenetelmä on positroniemissiotomografia eli PET-kuvantaminen. PET:issä potilaaseen injisoidaan pieni pitoisuus radioleimattua merkkiainetta ja leiman kertyminen kohdekudokseen määritetään PET-kameran avulla. Radioaktiivinen leima lähettää β^+ -hajoamiseen perustuen positronin, joka annihiloituu eli pariutuu kohdekudoksessa elektronin kanssa muodostaen kaksi vastakkaisessa kulmassa toisistaan siroavaa γ -sädettä. Kummankin säteen indusoima energia on 511 keV, jonka ajallinen osuma tallennetaan PET-laitteiston vastakkain oleviin detektoreihin ajan ja paikan funktiona. Kerätty data voidaan laitteen tietokoneen avulla laskea matemaattisesti ja täten mallintaa kolmiulotteisena kuvana. PET-laitteistoon on yleensä liitetty tietokonetomografialaitteisto eli CT, jolloin kuvattavasta kohteesta voidaan muodostaa anatominen kokonaisuus. CT kuvaa kudosten tiheyseroja, johon perustuen voidaan mallintaa potilaan kasvaimen ympäristöstä kolmiulotteinen kehokuvaus. Tähän ympäristöön integroidaan merkkiainekertymädata PET-kuvantamisesta, josta vastaavasti on hyötyä hoitohenkilökunnalle diagnostisessa mielessä.



Kuva 5. Eräitä kasvaimen hypoksiatason PET-kuvantamisessa käytettäviä merkkiaineita (Sun ym. 2011).

Yleisimmät radionuklidit, joita sovelletaan PET-kuvantamisissa, ovat fluorin (^{18}F), hiilen (^{11}C), typen (^{13}N), hapen (^{15}O) ja jopa kuparin (^{64}Cu) isotooppeja, joiden puoliintumisajat on listattu taulukossa 3.

Taulukko 3. Yleisimmät PET-kuvantamisessa käytetyt radionuklidit ja niiden puoliintumisajat (http://www.taulukot.com/index.php?search_id=isotooppeja&lng=fi)

RADIONUKLIDI	PUOLIINTUMISAIKA ($t_{1/2}$)
^{11}C	20,38 min
^{13}N	9,96 min
^{15}O	2,03 min
^{18}F	1,83h
^{64}Cu	12,70 h

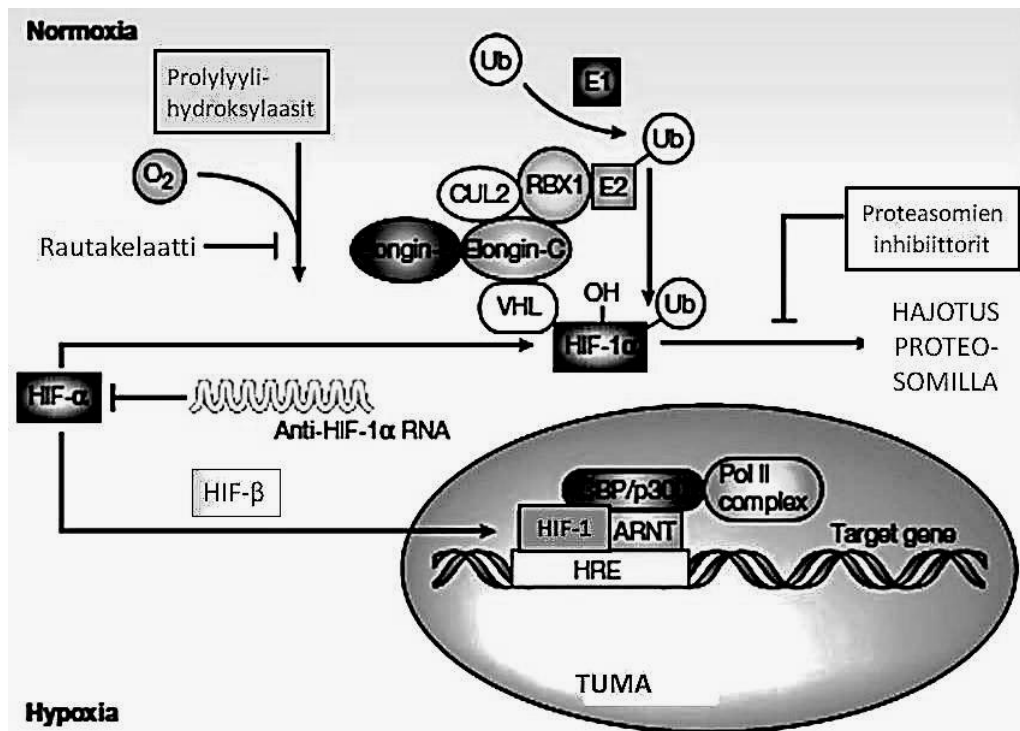
PET-kuvantamisen pioneerimolekyylinä pidetään [^{18}F]FDG eli [^{18}F]fluorodeoksiglukoosia, jonka käyttö perustuukasvaimen kiihtyneeseen aineenvaihduntaan ja tehostuneeseen glukoosin sisäänottoon soluun. Täten fluorileimattua glukoosia kertyy erityisen runsaasti kasvaimiin, josta se on kuvannettavissa PET-kameralla. Hypoksian kuvantamisessa varsinainen läpimurto tapahtui, kun keksittiin biopelkistyvät typen rengasmaiset yhdisteet, kuten nitroimidatsolit ja näitä ryhdyttiin leimaamaan radioaktiivisilla fluorin 18-isotoopeilla. Tehokkaampien ja valikoivasti hypoksisiin kudoksiin kertyvien molekyylikoettimien suunnittelu ja valmistaminen vaatii monitieteellistä osaamista. Uusia yhdisteitä kehitetään jatkuvasti samalla kun jo olemassa olevien molekyylikoettimien ominaisuuksia muokataan paremmiksi. Alan tutkimustulokset vaikuttavat lupaavilta.

1.2.3 Hypoksiaan liittyvä geeniekspressio

Solut pyrkivät vähähappisessa ympäristössä muuttamaan geenien ilmentymistä ja siten sopeutumaan hypoksisiin olosuhteisiin. Solun geenien luentaa eli transkriptiota sekä tulkintaa eli translaatiota säätelevät erityiset proteiinit, transkriptiofaktorit. Hapenpuutteen on osoitettu kasvattavan tiettyjen transkriptiofaktoreiden pitoisuuksia soluissa. Nämä tekijät vastaavasti säätelevät niiden geenien luentaa tumassa, joiden on osoitettu edesauttavan soluja sopeutumaan kudoksen vähähappisiin olosuhteisiin. Samojen geenien ilmeneminen liitetään myös metastasoivaan solufenotyypiin

pahanlaatuisissa syövässä. 1990-luvun alussa tunnistettiin eräs kaikkiin näihin syövän pahanlaatuisiin ominaisuuksiin ja niiden toiminnallisuuden säätelyyn osallistuva proteiini: HIF-1. HIF-1 on dimeerinen proteiini eli se koostuu kahdesta eri alayksiköstä eli domeenista (HIF-1 α ja HIF-1 β). HIF-1 β :n muodostuminen soluissa on konstitutiivista eli jatkuvaa. α -alayksikköä syntyy soluissa MAPK (engl. mitogen activated protein kinase pathway) sekä PI3K (engl. phosphoinositide 3-kinase) aktivoituessa kasvutekijän sitoutuessa solukalvon tyrosiinikinaasireseptoriin. Domeenin hajotus on riippuvainen hapesta, joka on sen solun sisäisen määrän tärkein säätelvä tekijä (Semenza 2003).

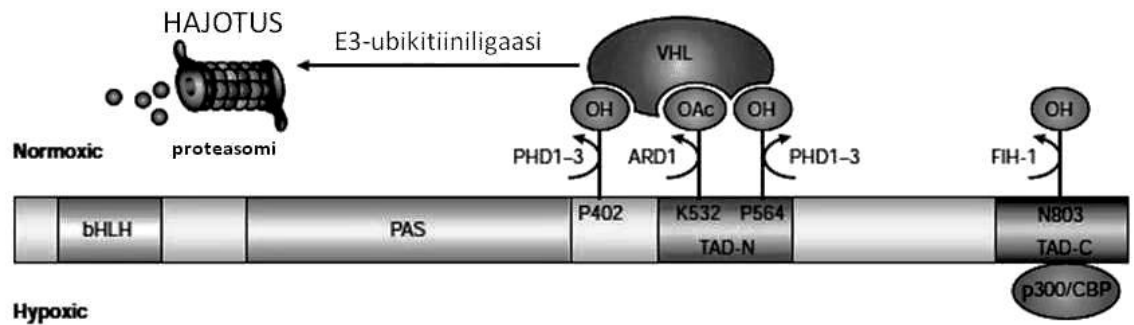
HIF-1 muodostaa stabiilin eli pysyvän, toiminnallisen kokonaisuuden ainoastaan dimerisoituneena. Tällöin se kykenee sitoutumaan tumassa DNA-emästen HRE-alueeseen (engl. hypoxia responsible element) ja aloittamaan kohdegeenien transkription. HIF-1:n sekä muiden transkriptiofaktoreiden sitoutuminen DNA:han ja translaation aloituskompleksin muodostuminen saa aikaan RNA-polymeraasin aktivoitumisen ja geenien luennan aktivaation (kuva 6). HIF-1:n aktivoimat spesifiset geenit, edesauttavat solua sopeutumaan olosuhteisiin, joissa hapen saanti on rajoittunut. HIF-1 säätelee muun muassa solun aineenvaihdunnallisiin toimintoihin liittyvien geenien ilmentymistä. Hapenpuutteen indusoima solun glykolyttinen aineenvaihdutareitti happamoittaa solun ulkoista tilaa, jossa HIF-1 on osallisena aktivoimassa näihin olosuhteisiin mukauttavien geenien aktivoitumista. Tähän aktivaatio-aktivaatio-ketjuun liitetään myös solujen herkistymiseen kasvusignaaleihin ja niiden irtautuminen herkemmin varsinaisesta kasvualustastaan (metastasoituminen) (Harris 2002).



Kuva 6. Transkriptiofaktori HIF-1:n toiminta solun normoksisissa ja hypoksisissa olosuhteissa. Toiminnallinen HIF-1-proteiini muodostuu jatkuvasti stabiilina pysyvän HIF-1 β :n ja O₂:n säätelemän HIF-1 α :n dimerisoituessa. Mikäli solussa on riittävästi happea läsnä, aktiivista HIF-1-proteiinia ei muodostu, sillä α -domeeni hajoitetaan entsyymallisesti. Hypoksiassa HIF-1 α on stabiili ja se sitoutuu β -alalyksikön kanssa muodostaen HIF-1-transkriptiofaktorin. Tämä sitoutuu tumassa spesifisten emästen muodostamaan HRE-kohtioon ja aktivoi täten niiden transkriptiota proteiineiksi (mukaillen Harris 2002).

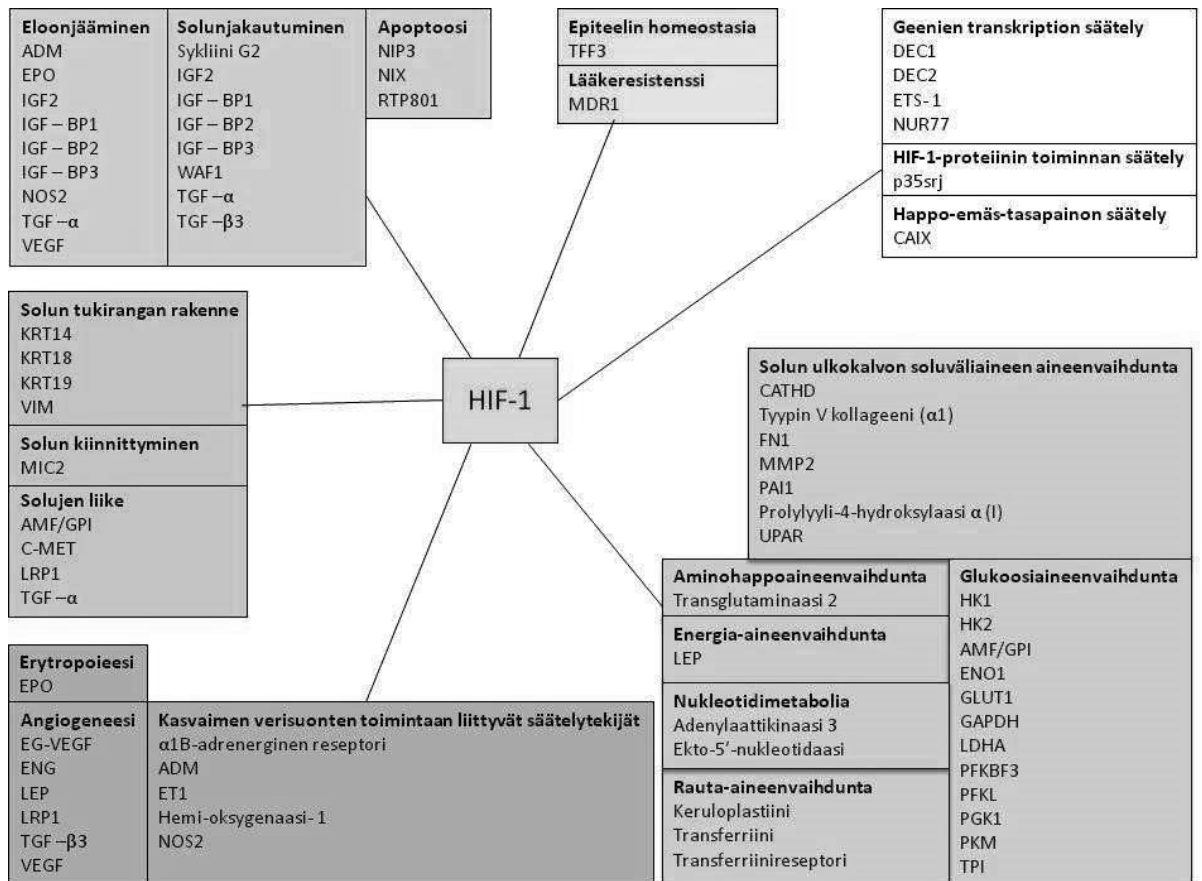
HIF-1 α :n hajotus on riippuvainen solun ja kudosten sisäisestä O₂-pitoisuudesta (kuva 7). Normoksiassa eli normaalissa happiosapaineessa (yli 20 mmHg) kolme prolylylihydroksylaasi entsyymiä (PHD 1-3), jotka käyttävät happimolekyyliä kofaktoreinaan, katalysoivat HIF-1 α :n proliini-aminohappojen 402:n sekä 564:n hydroksylaatioreaktiota. Lisäksi asetyylitransferaasi ARD1 osallistuu domeenin valmisteluun proteiinivälitteistä hajotusta varten asetyloimalla sen lysiini-aminohappo 532:n. Hydroksylaatioiden sekä asetyloinnin ansiosta syövän kasvua estävä eli tumoria suppressoiva proteiini VHL (engl. von Hippel-Lindau tumour-suppressor protein) tunnistaa HIF-1 α -proteiinin ja kiinnittyy siihen. Tämän johdosta E3-ubikitiiniligaasi voi merkitä kompleksin, jolloin se viedään hajotettavaksi proteasomiin. Toinen hapesta riippuvainen säätelymekanismi alalyksikön hajotukselle on FIH-1 -välitteinen reitti (engl. factor inhibiting HIF-1). FIH-1 katalysoi asparagiini-aminohappo 803:n hydroksylointia, mikä vastaavasti estää p300- ja CBP-proteiinien kiinnittymisen HIF-1 α :n karboksiterminaaliseen transaktivaatiodomeeniin. Sitoutumisellaan nämä kaksi

tekijää mahdollistaisivat α -alaysikön stabiliteetin ja täten geenien transkription (Semenza 2003).



Kuva 7. Kaavakuva HIF-1 α :n hajoituksesta normoksiassa. Jos kudoksessa on riittävästi happea (normoksia), tällöin HIF-1 α -domeenin hajoitus voi tapahtua joko PHD 1-3 tai sitten vaihtoehtoisesti FIH-1:n välitteisesti (mukaihen Semenza 2003).

Hypoksian vuoksi soluissa havaitaan kohonneita HIF-1-tasvoja, jotka vastaavasti aiheuttavat muutoksia solun sisäisessä geeniekspressiossa (Semenza 2003). Monet geenit ovat solun toiminnassa välttämättömiä ja niiden ilmentyminen on tavallisesti tarkoin kulutuksen ja hajotuksen tasapainon säätelämään. Näiden lisäksi esiintyy myös sellaisten geenien aktivoitumista, joita ei normoksiassa erityisemmin esiinny. Geenit, joiden aktivoitumista HIF-1 edistää on listattu kuvassa 8.



Kuva 8. Geenit, joiden aktivoitumista HIF-1 edistää. (mukaiillen Semenza 2003)

1.2.4 Hypoksia ja sädehoito pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomassa

Radiologian varsinaisena isänä pidetään saksalaista Conrad Wilhelm Röntgeniä (1895), jonka mukaan röntgen-säteet (engl. x-rays) nimettiin. Henry Becquerel havainnoi luonnossa esiintyvää radioaktiivisuutta ja hän oli ensimmäinen, joka esitti γ -säteiden olemassa olon 1896. Marie ja Pierre Curie löysivät radiumin ja ehdottivat ensimmäisinä tätä syövän hoidossa käytettäväksi γ -säteiden lähteeksi. Alkukantaisimmat sädehoidot ja radiologia perustui havaintoihin, joissa potilaiden kasvainten läheisyyteen tai sitten varsinaisesti iholle asetettiin kiinteitä radioaktiivisiksi aineiksi lukeutuvia metalleja tai niiden suoloja. Syöpäkudosalueissa, jotka oli altistettu säteilylle, havaittiin kudolvaurioita sekä kasvainten todettiin silmämääräisesti pienentyneen. Myöhemmin ydinfysiikan tietämyksen lisääntyessä säteilyn käyttöä sekä varsinaisen säteilylähteen hallintaa opittiin kohdistamaan potilaisiin entistä paremmin ja hoitojen tehokkuus kasvoikin merkittävästi. Laiteteknologian kehittyminen on mahdollistanut sen, että sädehoidossa kasvaimen suunnattavan sädeannoksen määrää säädellään ja annostellaan hallitusti. Sairaaloiden syöpähoitojen γ -säteet tuotetaan nykyisin lineaarikiihdyttimissä,

joiden ensimmäiset versiot saapuivat hoitolaitoksiimme toisen maailman sodan aikoihin. Uusimmat sädehoidon tekniikat suuntautuvat ulkoisen säteilylähteen sijaan sisäisen tavan menettelyyn, jossa varsinainen säteilylähde viedään itse syöpäkasvaimen sisälle. Tämä tarkoittaa sitä, että syöpäkasvaimeen annostellaan isotooppia, esimerkiksi jyvän muotoisia metallikimpaleita, joka aikaan saa sen sisällä säteilyn vaikutuksesta hoidollisen vaikutuksen. Tällöin puhutaan brakyterapiasta, jonka etu ulkoiseen sädehoitoon verrattuna on sen nopeus ja suurempi kerralla annettava sädeannoskoko. Radiologiaan liitetty solubiologinen ja fysiologinen tutkimus on perusta modernille sädehoidolle. Ymmärrys siitä, että kasvaintyyppien välinen erilaisuus aiheuttaa sen, että sädehoito ei välttämättä sovi kaikille hoitomuodoksi, säästää vaivaa ja potilaita virheellisiltä hoitoarvioilta. Lisäksi solujen reagointi sädehoitoon ei ole aina samankaltaista ja solukuolemaan johtavaa (Bernier ym. 2004).

Ionisoivan säteily aiheuttaa solujen perimässä DNA-vaurioita, joista erityisen tuhoisia ovat DNA:n kaksoiskiarteeseen muodostuvat katkokset. Säteily reagoi solun sisäisten vesimolekyylien (H_2O) kanssa ja hapen (O_2) läsnä ollessa muodostuu hydroksyyliiradikaaleja ($HO\cdot$). Radikaalit ovat molekyylejä tai atomeja, joilla esiintyy uloimmalla elektronikuorella parittomia, löyhästi kiinnittyneitä elektroneja. Tämä tekee niistä kemiallisesti hyvin reaktiivisia yhdisteitä ja ne voivat toimia voimakkaina hapettimina aiheuttaen vaurioita DNA:n kaksoiskiarteessä. Lisäksi hapen on todettu vakauttavan eli stabiloivan hydroksyyliiradikaaleja soluissa, jolloin niiden DNA-vaurioita aiheuttava vaikutus tehostuu (Harrison & Blackwell 2004).

Sädehoidon tehokkuuden kannalta syöpäkudosten happipitoisuudella on tärkeä merkitys. Ionisoiva säteily on haitallista terveille kudoksille ja se lukeutuu karsinogeeneihin. Terveisiin kudoksiin kohdistuvat vauriot on pidettävä mahdollisimman pieninä, vaikka solut kykenevätkin itsestään korjaamaan vähäiset säteilyn aiheuttamat vauriot. Tästä johtuen sädehoitosuunnitelma laaditaan tarkkaan ja säteilytettävän alueen pinta-ala pyritään mallintamaan mahdollisimman huolella. Kasvainhypoksian on osoitettu aiheuttavan tilan, jossa syöpäkudokseen on kohdistettava vähintään kolminkertainen sädeannos, jotta saadaan sama hoitovaste kuin normoksiassa. Lisäksi hypoksia aiheuttaa solun proteiiniekspressiotasoissa ja genomissa muutoksia, jolla vastaavasti voi olla mahdollisia vaikutuksia myöhemmin kehittyvään solujen sädehoitojen vastustuskykyyn eli resistenttiyteen (Höckel & Vaupel 2001).

Sädehoitokertojen välillä kasvaimessa esiintyy solukuolemaa ja uudelleen hapettumista eli re-oksygenaatiota. Tämän johdosta osa hypoksisista syöpäsoluista voi hapettua uudelleen tai osittain, minkä vastaavasti on esitetty johtavan syöpää edistävien genomisten muutosten kertymiseen soluihin ja siten pahanlaatuiseen, metastasoivaan fenotyyppiin (Harrison & Blackwell 2004). Näistä kahdesta edellä mainitusta teoreemasta on haettu viimeaikoina selitystä siihen, miksi pään ja kaulan alueen hypoksisien levyepiteelikarsinomatapausten hoidossa esiintyy sädehoitoresistenssiä. Selitykset tarjoavat lisäksi lähtökohdan sille, miten erilaisia hoitomuotoja kyseisen syöpätyypin parantamiseksi tai sitten potilaan kivunlievitystä varten pitäisi kehittää.

1.3 Työn tarkoitus

Tutkielman tavoitteet voidaan jakaa kahteen osaan. Ensinnäkin mielenkiinnon kohteena oli tarkastella syöpäsolujen jakautumista, kehitystä sekä niiden ilmiä *in vitro*-olosuhteissa. Toiseksi tavoitteena oli suunnitella ja toteuttaa käytännössä erilaisia kokeita, jotka osoittaisivat proteiiniteknologisten menetelmien soveltuvuuden havainnoimaan syöpäsoluista hypoksia. Tähän osioon liittyi perusteellinen perehtyminen jo olemassa olevaan tutkimustietoon.

Tutkimus tehtiin Valtakunnallisen PET-keskuksen prekliinisissä laboratorioissa Medicity PET:ssä dosentti Tove Grönroosin tutkimusryhmässä. Ryhmän tutkimustavoitteena on selvittää eri radioleimattujen merkkiaineiden ominaisuuksia ja merkkiaineiden soveltuvuutta pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomakasvainten PET-kuvantamisessa. Tutkimus keskittyy ¹⁸F-isotooppileimattuihin molekyyliin, jotka on kehitetty ominaisuuksiltaan sellaisiksi, että ne kertyvät hypoksiin syöpäkudoksiin.

Työn tavoitteet olivat:

- 1) Tutkielman ensimmäisessä vaiheessa perehdyttiin soluviljelyyn. Jakson tavoitteena oli määrittää optimaaliset kasvuolosuhteet neljälle eri solulinjalle.
- 2) Selvittää solulinjojen herkkyyttä uusiin kasvuolosuhteisiin, mikä perustui niiden jakautumisnopeuteen uudella kasvualustallaan. Jakautumisnopeutta mallinnettiin matemaattisesti laskemalla kullekin koe-erälle oma prosentuaalinen jakautumiskykyä kuvaava PE(%)-tekijä (engl. plating efficiency).
- 3) Tutkia normoksiassa kasvaneiden syöpäsolujen reaktiota intensiteetiltään voimistuviin sädeannoksiin. Tavoitteena oli määrittää tulosten perusteella solujen herkkyyttä tietylle sädeannokselle kuvaava SF-tekijä (engl. survival factor), jonka avulla mallinnettiin kullekin solulinjalle niiden kokonaissädetyssietokykyä kuvaava AUC-arvo (engl. area under curve). Tämä osuus tehtiin yhteistyössä TYKS:n onkologian osaston henkilökunnan kanssa.
- 4) Selvittää miten hypoksia vaikuttaa solujen geeniekspressioon. Tavoitteena oli vaimentaa hypoksian stabiloima HIF-1 α -geeni, altistaa solut vähähappisille olosuhteille ja analysoida solutason muutokset tiettyjen proteiinien ilmentymisessä.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Solulinjat

Pro gradu -tutkielmassa koemateriaalina olivat UT-SCC-solulinjat, joiden alkuperä oli pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomapotilaiden kasvaimista eristetyistä syöpäsoluista (Erjala 2006). Luvan solulinjojen perustamiseen oli myöntänyt Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin eettinen toimikunta ja soluja hallinnoi Reidar Grénman (Korva-, kurkku- ja nenätautien klinikka, TYKS). Solulinjojen tunnuksessa kirjainyhdistelmät UT viittaavat Turun yliopistoon ja SCC levyepiteelikarsinomaan (engl. squamous-cell carcinoma). Pro gradu -tutkielmassa käytettyjen solulinjojen potilasluovuttajajaksilöt olivat käyneet PET-keskuksessa [¹⁸F]FDG-kuvauksissa osana hoitosuunnitelman toimenpiteitä.

UT-SCC-solulinjojen perustaminen kirjallisuuslähteiden mukaan eteni siten, että leikkauksen jälkeen potilaiden syöpäkudoksen elinkykyisimmistä osista viipaloitiin steriileissä olosuhteissa 1 mm³:n suuruiset palat. Nämä siirrostettiin soluviljelyalustoille, joissa oli lisänä kasvatusmediumia. Solujen annettiin kiinnittyä säädellyissä olosuhteissa (+37 °C, 5 % CO₂-pitoisuus). Kiinnittymisen jälkeen kudost materiaalin fibroblastit poistettiin entsyymaattisella käsittelyllä (Erjala 2006).

Syöpäkudokset, joista solulinjat ovat perustettu, ovat peräisin yli 30-vuotiailta miespotilailta, joilla oli diagnosoitu pään ja kaulanalueen levyepiteelikarsinoma. Kasvaimet sijaitsivat joko suuontelossa tai kurkunpäässä. Lukuun ottamatta UT-SCC-25-solulinjan potilasta muiden kasvaimet olivat primäärejä ja gradus-asteikolla niiden morfologia sekä toiminnallisuus olivat suurimmalla osalla G1:sen luokkaa. Ainoastaan UT-SCC-74A-linjan potilaan kasvaimen solujen katsottiin menettäneen jo osittain kyseiselle kudokselle tyypillisiä ominaisuuksia. Tuumorien koko vaihteli T2:sta T4:seen ja vain UT-SCC-74A:n muodosti etäpesäkkeitä läheisiin imusolmukkeisiin, mutta muutoin metastaaseja ei havaittu. Taulukoon 4. on listattu pro gradu-tutkielman kokeellisissa osuuksissa käytettyjen UT-SCC-solulinjojen tarkemmat tiedot.

Taulukko 4. Tutkielmassa käytetyt UT-SCC-solulinjat, kasvaimen alkuperä sekä kasvainten TNM-luokittelu (katso taulukko 2).

SOLULINJAN NIMI	SUKUPUOLI	POTILAAN IKÄ	PRIMÄÄRI TUUMORI	TNM-LUOKITUS	KASVAIN-LUOKKA	ALARYHMÄ	NÄYTEPAIKKA	LEESIO
UT-SCC-8	Mies	42	Ääniraon yläpuolinen kurkunpää	T2N0M0	G1	Kurkunpää	Kurkunpää	Primääri
UT-SCC-25	Mies	50	Kieli	T2N0M0	G1	Suuontelo	Kieli	Uusiutunut
UT-SCC-34	Mies	63	Ääniraon yläpuolinen kurkunpää	T4N0M0	G1	Kurkunpää	Kurkunpää	Primääri
UT-SCC-74A	Mies	31	Kieli	T3N1M0	G1-G2	Suuontelo	Kieli	Primääri

2.1.1 Solujen ylläpito

Tarkemmat soluviljelyssä käytettyjen liuoksien ja kemikaalien tiedot sekä työskentelyprotokollat on kuvattu liitteissä 1 ja 2.

Solujen sulatus

Soluja sisältävää kryoampullia sulatettiin käsissä pitelemällä niin kauan, että sen sisältö muuttui hileiseksi. Osittain sula solumassa kaadettiin falcon-putkeen, johon oli pipetoitu valmiiksi kasvatusmediumia (DMEM, 10 % FBS, L-glutamiini, penisiliini ja streptomysiini, sekä soluille olennaisia aminohappoja). Solut pelletoitettiin sentrifugoimalla (5 min/1400rpm), minkä jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja pelletti resuspensoitiin kasvatusmediumiin. Yhden ampullin sisältämä solususpensio jaettiin kahteen T25-kasvatuspulloon, joka siirrettiin soluviljelytilan lämpökaappiin (+37 °C, 5 % CO₂-pitoisuus). Solujen kasvatusmedium vaihdettiin uuteen heti seuraavana päivänä, jonka jälkeen mediuminvaihdot suoritettiin kaksi kertaa viikossa. Soluviljelmien kuntoa havainnointiin mikroskoopilla.

Solujen kasvatus kokeita varten

Kun kasvatuspullon pohjalla solujen peittoaste oli 60 - 80 %, muodostuneita kasvustoja harvennettiin kontakti-inhibition välttämiseksi. Liian tiheäksi muodostuvalla solukasvulla olisi voinut olla vaikutusta niiden väliseen geenien ilmentymiseen, joka

taas vuorostaan olisi voinut vaikuttaa tutkimuksen tuloksiin. Solut irrotettiin alustaltaan käsittelemällä niitä trypsiinientsyymiä sisältävällä irrotusliuoksella 6 - 8 minuuttia. Entsyymien toiminta pysäytettiin lisäämällä pulloon kasvatusmediumia. Solut kerättiin falcon-putkeen, pelletoitettiin sentrifugoimalla ja solupelletti resuspensoitiin kasvatusmediumiin. Solut siirrostettiin uusiin kasvatuspulloihin niin, että alkuperäinen solutiheys harveni yleensä 1:3. Solut kasvatettiin soluviljelytilan lämpökaapissa (+37 °C, 5 % CO₂-pitoisuus).

Solujen pakastus

Solut irrotettiin kasvatusalustaltaan entsyymikäsitteilyn avulla. Solut kerättiin falcon-putteeseen ja sentrifugoitiin. Solupelletti resuspensoitiin kasvatusmediumiin siten että solutiheys oli 1×10^6 solua/ml. Solususpensiosta pipetoitiin pakastusampulliin 500 µl:aa sekä 500 µl kylmää pakastusliuosta (kasvatusmedium + 10 % DMSO). Putket siirrettiin pipetoinnin jälkeen ensin jälle. Tämän jälkeen ampullit siirrettiin vähintään vuorokaudeksi pakastimeen (-70 °C). Ampullit siirrettiin lopulta syväjäähäpakastimeen (-135 – -150 °C).

2.2 Klonaalisten solujen suhteellisen jakautumiskyvyn määrittäminen

Ennen säderesistenssin määrittämissä aloittamista selvitettiin eri solulinjojen kasvutehokkuus uudelle alustalle siirrostettaessa. Tämä tehtiin ns. PE(%)-menetelmän avulla. Tarkoituksena oli saada solulinjakohtaista tietoa UT-SCC-solujen kiinnitymisnopeudesta uudelle kasvualustalle sekä määrittää näiden jakaantumispotentiaali. Saatujen kasvunopeustietojen avulla valittiin seuraaviin koejärjestelyihin parhaiten soveltuva solulinja.

2.2.1 Koejärjestelyt

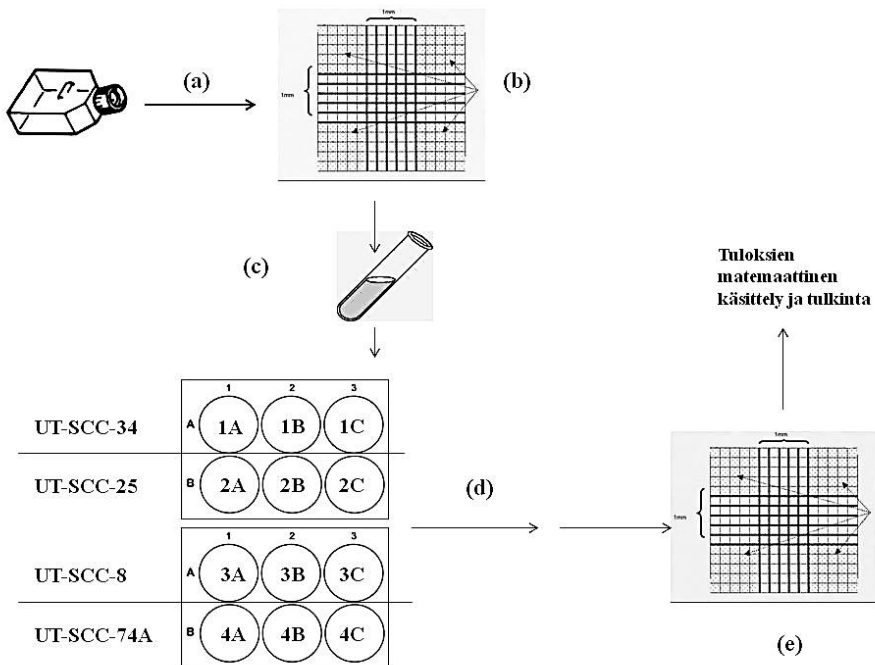
PE(%)-määrittämisessä siirrostettiin aina yhdelle 6-kuoppalevyn kaivolle kasvuun 195 000 solua. Ennen 6-kuoppalevylle siirrostamista solut irrotettiin entsyymikäsitteilyllä ja solutiheys määritettiin Bürker-laskukammioilla kaavan 1. mukaisesti (kuva 9, kohta a ja b). Vuorokauden kuluttua kunkin kaivon sisältämät solumäärät laskettiin ja tietojen perusteella määritettiin prosentuaalinen lukuarvo, joka kuvaa solujen suhteellista jakautumiskykyä siirrostuksen jälkeen kaavan 2. mukaisesti.

$$n(\text{solut}) \times 10^4 = n(\text{solut})_{\text{tot.}}/\text{ml} \quad (1)$$

$$\text{PE (\%)} = \frac{n(\text{solut } 24\text{h})}{n(\text{solut } 0\text{h})} \times 100\% \quad (2)$$

PE % -määritys tehtiin UT-SCC-8, UT-SCC-25, UT-SCC-34 ja UT-SCC-74A solulinjoille ja määritys toistettiin jokaisella kolme kertaa. Tuloksista saatujen keskiarvojen perusteella jokaiselle solulinjalle laskettiin suhdeluku, joka ilmaisi solujen kykyä kiinnittyä uuteen kasvatusalustaansa. Kuvassa 9. on esitetty PE(%) -määrityksen toteutusmenettely yksinkertaisena kaaviona.

Alkuperäisten soluviljelmien kokonaissolumäärästä laskettiin pipetoitavaksi tilavuus, josta valmistettiin stokkiliuos (kuva 9, kohta c). Stokkiliuoksesta vastaavasti pipetoitiin 195 000-solun sisälmä tilavuus 6-kuoppalevyille. Nämä siirrettiin soluviljelytilan lämpökaappiin (+37 °C, 5 % CO₂), jossa niiden annettiin olla tarkalleen vuorokausi (24h) (kuva 9, kohta d). Inkubaatioajan jälkeen jokaisen 6-kuoppalevyn kaivon sisältämä solumäärä laskettiin ja tuloksista määritettiin kullekin solulinjalle PE % -tekijä (kuva 9, kohta e).



Kuva 9 (PE %)-määrityksen protokollakaavio. Neljästä eri solulinjasta pipetoitiin 6-kuoppalevyn kaivon 195 000 solua sisältävä tilavuus stokkiliuosta. Jokaisesta solulinjasta tehtiin kolme otosta ja nämä triplikaatit on esitetty kuvassa kirjainnumeryhdistelminä UT-SCC-34: 1A-1C, UT-SCC-25: 2A-2C, UT-SCC-8: 3A-3C ja UT-SCC-74A: 4A-4C.

2.3 SF-tekijä ja eloonjäämistä kuvaavat käyrät

Eri syöpätyyppien vasteita käytössä oleviin hoitomenetelmiin on vaikeaa päätellä johdonmukaisesti. Solujen reagointi eri hoitomuotoihin (lääke- ja sädetyshoidot) voi poiketa toisistaan, vaikka ne olisivatkin peräisin samaan kategoriaan lukeutuvasta syöpätyypistä. Tästä johtuen on kehitetty useita tutkimusmenetelmiä, joiden perusteella on mahdollista tarkastella syöpäsolutyypin vastetta *in vitro* erilaisiin hoitokeinoihin. Tulosten pohjalta arvioidaan siten hoitomenetelmien tehokkuutta ja soveltamista *in vivo*-potilastyössä.

Sädehoidon tavoitteena on tuottaa riittävän tehokas sädeannos kasvaimen, jotta saavutetaan riittävän suuri solukuolemien määrä syöpäkudoksessa. Hoidon suunnittelu edellyttää laajaa fysiikan tuntemusta, jonka perustana ovat teoreettisesti lasketut matemaattiset mallit. Näiden laatiminen vuorostaan vaatii tuekseen biologian solutason tutkimusta ja tietämystä. Solubiologinen tarkastelu huomioi sädehoidon jälkeiset muutokset sekä itse kohde että sitä ympäröivässä terveessä kudoksessa. Kasvainta ympäröivä terve kudokse reagoi kohdekudoksen tavoin hoitoihin ja on tärkeää, että sädehoidosta johtuvat mahdolliset sivuvaikutukset ja vauriot näissä ympäröivissä soluissa jäisivät vähäisiksi. Biologisten testausmenetelmien avulla voidaan optimoida kullekin potilaalle soveliaain kokonaissädetysannos, fraktiointi, hoidon toistojen lukumäärä ja kontrolliaikataulu.

Matemaattisesti johdettujen säteilybiologiset mallit perustuvat pääosin soluviljelykokeista saatuihin tuloksiin. Laboratoriossa soluviljelmien kasvuolosuhteen voidaan säädellä tutkimuksen mielenkiinnonkohteen mukaisesti. Täten saadaan arvokasta tietoa siitä, miten solut käyttäytyvät koeoloissa muuttamalla vain tutkittavaa säteily- tai lääkemäärää pitäen samalla muut olosuhteet vakiona. Varsinaiset kudostason reaktiot jäävät kuitenkin vain solutasonkokeista peräisin olevien arviointien varaan, sillä nämä ovat kokonaisuudessaan mahdottomia mallintaa monimutkaisuutensa vuoksi. Matemaattisissa annos-vaste-tutkimuksissa tehdään monesti yksinkertaisia oletuksia, koska muutoin esitysten laatiminen olisi mahdotonta. Tällaisia ovat muun muassa mallin lineaarisuus, stationaarisuus ja toisinaan osa tunnetuistakin tekijöistä joudutaan jättämään pois laskuista. Matemaattiset mallien avulla voidaan määrittää tuloksena keskiarvoja tai todennäköisyyksiä hoidon onnistumistehosta suuressa potilasjoukossa. Mitään absoluuttisia totuuksia ne eivät siis tarjoa. Kliiniset lopputulokset eli hoidon vaikutus ilmenee vasta myöhemmässä vaiheessa potilaan seuranta-ajanjaksolla.

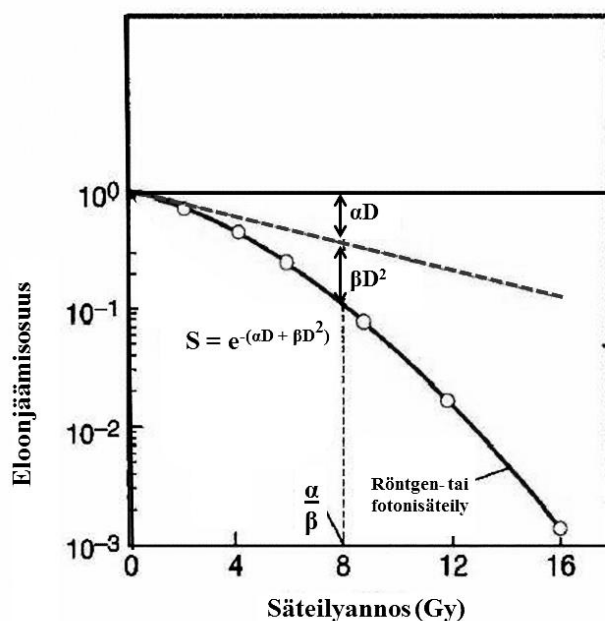
Eräs tarkoitukseen soveltuva solubiologinen tutkimusmenetelmä, jolla voidaan tarkastella solujen vastetta ulkoisiin rasitteisiin, on 96-kuoppalevyllä toteutettava klonogeeninen määrittäminen (engl. The 96-well plate clonogenic assay). Se perustuu solujen loputtomaan kykyyn jakautua ja muodostaa uusia yhdyskuntia niiden lisääntymisen pysäyttävistä tai tuhoon johtavista pakotteista huolimatta. Tällaisia soluja kutsutaan klonogeenisiksi ja muun muassa syöpäsolut lukeutuvat tähän kategoriaan. Syitä tähän on käsitelty luvussa 1., mutta voidaan todeta yleisesti, että klonogeenisten solujen geneettisessä säätelykoneistossa esiintyy loputtomaan jakautumiseen indusoivia säätelymekanismeja.

96-kuoppalevyn klonogeenisen määrittäksen perusteella solubiologisista ilmiöistä voidaan laskea numeerisia arvoja. Näiden perusteella vuorostaan on mahdollista johtaa matemaattisia malleja, joilla ennustaa hoitojen vastetta. SF-tekijä (engl. survival factor) kuvaa numeerisesti solujen sietokykyä ja vastetta ympäristön rasitteisiin, kuten sädehoidosta aiheutuviin solu- ja DNA-vaurioihin. Pro gradu-tutkielman SF-tekijä laskettiin kaavan 3. mukaisesti.

$$SF = \frac{\left(\frac{\text{positiivisten kaivojen lkm}}{\text{kaivoon siirrostettujen solujen lkm}} \right) \times \text{kontrollikaivoon siirrostettujen solujen lkm}}{\text{positiivisten kontrollikaivojen lkm}} \quad (3)$$

Mitä suurempi lasketun SF-tekijän arvo on (tekijä saa kaikki arvonsa suljetulla välillä [0:1]), sitä paremmin solut selviävät elinkykyisinä niihin kohdistetuista rasitteista. Tulosten laskemisessa ja käsittelyssä käytettiin lähdeaineistona apuna Pekkola-Heinon väitöskirjaa (Pekkola-Heino 1992).

Soluviljelykokeissa aiotumallisten solujen eloonjäämiskäyrä eli elossa olevien solujen osuus annoksen funktiona noudattaa kaavaa $S = S(D)$, jossa D kuvaa sädeannoksen suuruutta ftoni- ja elektronisäteilyllä. Tästä voidaan mallintaa matemaattisesti erilaisia solujen sädeherkkyyttä kuvaavia matemaattisia sovituksia, joiden pohjalta sädehoitojen suunnittelu toteutetaan. Yksinkertaisin malli on lineaarinen, mutta nykyisin yleisimmin käytössä oleva sovitus on lineaari-neliöllinen malli eli LQ-malli (engl. Linear quadratic model), joka on muokattavissa selkeämmin tulkittavaksi logaritmiasteikolla. Kuvassa 10 on tästä esitetty eräs sovitus.



Kuva 10. Esimerkki LQ-mallin matemaattisesta sovituksesta ja siinä esiintyvien parametrien α ja β esiintymisestä suhteessa havaintopisteistä muodostettuun suoraan

Siinä kuvataan esimerkkinä solujen elossäilymistä, josta hahmotellaan käyrä määritettyjen SF-tekijän arvoihin perustuen (arvot y-akselille). Säteilyannokset vastaavasti ovat sovituksen muuttuja-arvona (arvot x-akselille). Lineaari-neliöllistä sovitusta laskettaessa on tunnettava syöpäsolutyyppin lisäksi säteilyfraktioiden annosteluprotokollat. Kuvaaja hahmotellaan kaavan 4. mukaan.

$$S(D) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (4)$$

Parametri α kuvaa eloonjäämiskäyrän lineaarista alkuosaa eli se liittyy soluvaurioihin, jotka lisääntyvät lineaarisesti säteilyannoksen D funktiona. α on riippumaton eri tapahtumien keskinäisestä vuorovaikutuksista ja edustaa siis suoria soluvauriotapahtumia, joihin fraktiointi ja annosnopeus eivät vaikuta. Parametri β kuvaa eloonjäämiskäyrän laskunopeutta suurilla annoksilla ja siten kyseisillä annoksilla muodostuvaa sekä ajallisesti että paikallisesti läheisten soluvaurioiden kasautumista ja niiden letaalia yhteisvaikutusta syöpäkudoksessa. Tällöin siis raskaammilla hiukkasilla kuvaajassa esiintyvää olkapäätä ei havaita, vaan tällöin sovitus olisi lineaarinen. LQ-mallin parametreja α ja β tai näiden välistä suhdetta (α/β) (kuva 10.) on määritetty hyvin monille syöpäsolutyypeille ja kudoksetyypille (taulukko 5). Mallia voidaan johtaa ja soveltaa siten, että parametrien ja niiden välisen suhteen perusteella on mahdollista

määrittää sädehoidossa yksilöllinen hoitosuunnitelma, jonka odotettavat tulokset olisivat potilaan toipumisen kannalta parhaimmat.

Taulukko 5. Eloonjäämiskäyrien parametrien tyypillisiä arvoja eräille ihmisen syöpäsoluille (mukaillen Malaise ym. 1986)

SYÖPÄMUOTO	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	n	D ₀ (Gy)
Glioblastooma	0,24	0,03	12	1,4
Melanooma	0,26	0,05	73	1,0
Levyepiteeli-karsinooma	0,27	0,05	5	1,3
Adenokarsinooma	0,31	0,06	37	1,0
Lymfooma	0,45	0,05	2	1,5
Pienisolusyöpä	0,65	0,08	2	1,5

LQ-mallin matemaattisen sovituksen mukaan voidaan lisäksi arvioida solujen sädeherkkyyttä laskemalla käyrän yhtälöstä osittaisintegroinnilla tietyillä sädeannoksilla aiheutuva käyrän alle jäävän pinta-alan suuruus. Tämä AUC-arvo (engl. Area under curve) saa säderesistenteillä soluilla yleensä arvoja, jotka ovat suurempia kuin 2, kun taas sädeherkillä solulinjoilla käyrän alle jäävät alat ovat arvoiltaan pienempiä kuin 2 (Pekkola-Heino 1992).

Pro gradu-tutkielmassa 96-kuoppalevyn klonogeenisessä määrittämisessä tarkasteltiin pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomasolulinja UT-SCC-74A:n solujen vastetta sädehoitoon eri solumäärillä suhteutettuna eri vahvuisiin sädeannoksiin. Sädetyksestä elossa selvinneiden solujen lukumäärää verrattiin niiden alkuperäiseen määrään ennen kokeiden toteuttamista. Saaduista tuloksista laskettiin suhdelukuna eloonjäämistekijä eli SF-tekijä edellä esitetyn kaavan 3. mukaisesti.

SF-arvot taulukoitiin ja niiden perusteella määritettiin solulinjan sädeherkkyyttä kuvaava LQ-sovitus kaavan 4. mukaisesti yhteistyössä TYKS:n onkologian osaston yliindfyysikko Jarmo Kulmalan sekä sairaalafyysikko Sami Suilamon avustuksella. Mallista laskettiin vielä solulinjakohtainen AUC-arvo, kun annosten suuruudet saivat arvot 0 – 7,5 Gy.

2.3.1 Koejärjestelyt

Kaksi UT-SCC-74A-linjan soluviljelmää perustettiin T70-kasvatuspulloihin, joita ylläpidettiin säädelyssä olosuhteissa (+37 °C, 5 % CO₂-pitoisuus).

Harvestointivaiheessa pullon pohjan peittoaste oli noin 40 – 60 %. Solut kerättiin kasvatuspulloista solut irroittamalla ne entsyymaattisella käsittelyllä ja solutiheys määritettiin Bürker-laskukammiolla kaavan 1. mukaisesti

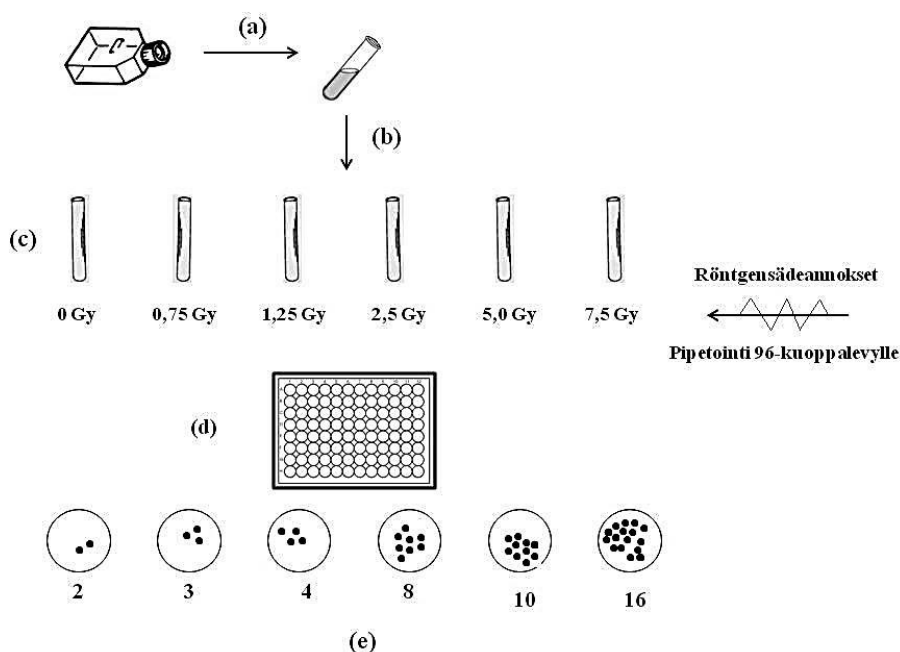
Tulosten perusteella valmistettiin primäärinen solukantaliuos (solumäärä optimoitiin 4167 solua/ml) Ham's F12-mediumiin (lisänä 15 % FBS). Varsinainen koesarja valmistettiin pipetoimalla primäärisestä solukantaliuoksesta taulukon 6. tilavuudet (laskut liite-osiossa) numeroituihin falcon-putkiin, joihin oli jo valmiiksi mitattu 50 ml Ham's F12-mediumia (lisänä 15 % FBS). Solu- ja säteilymäärät määräytyivät koejärjestelyissä siten, että suurempaa yksittäistä solujoukkoa kohtaan suunnattu sädeannos olisi intensiteetiltään voimakkaampi. Koesarjan solu- ja säteilymäärän optimoinnissa käytettiin apuna Erjalan väitöskirjaa (Erjala 2006).

Taulukko 6. UT-SCC-74A:n säderasituskojärjestelyn solumäärät, sädeannokset sekä solukantaliuoksesta pipetoitava tilavuus riittävän solutiheyden saamiseksi. Säteilyn yksikkönä on Gray (Gy), mikä ilmaisee säteilyfysiikassa absorboituneen annoksen yksikköä. SI-järjestelmän yksiköiden mukaan se voidaan määrittää myös yhden joulen kohdistaman energian suuruutta yhtä kilogramman massa-yksikköä kohden.

KOEPUTKEN NUMERO	<i>n</i>(solumäärä)_{96-kuoppal.}	SÄDEANNOS/Gy	<i>V</i>_{kantaliuos/μl}
1	2	0	120
2	3	0,75	180
3	4	1,25	240
4	8	2,5	480
5	10	5	600
6	16	7,5	960

Falcon-putket suljettiin tiiviisti ja ne kuljetettiin säteilyaltistusta varten TYKS:n onkologian osastolle jatkuvassa ravistelussa. Säteilystä käytettiin lineaarikiikahdytintä (Varian Clinac 2100C/D, Varian Medical Systems, Palo Alto, USA). Laitteen toimintaperiaate on luoda sähkökenttä, jossa elektroneja kiihdytetään tiettyyn energiavoimakkuuteen (6 MV). Nämä törmäytetään kohtioon (kohtio = solujen etäisyyssäteilylähteestä, 100 cm), jolloin muodostuu jarrutussäteilyä. Tätä jarrutussäteilyä eli fotonisäteilyä käytetään sädetykseen (säteilykentän koko 100 cm:n etäisyydellä säteilylähteestä: 20 cm x 40 cm, annosnopeus kohteessa: 5 Gy/min).

Säteilyaltistuksen jälkeen solut kuljetettiin jatkuvassa ravistelussa soluviljelytiloihin, jossa ne siirrostettiin 96-kuoppalevyille. Yhtä sädetettyä falcon-putkea varten oli varattu kaksi 96-kuoppalevyä ja jokaiseen kaivoon pipetoitiin 200 µl:n tilavuus näytettä. 96-kuoppalevyjen suojakanteen kirjattiin solulinja tietoineen, koeputken numero, sädeannos sekä eksperimentin toteutuspäivämäärä. Kuoppalevyt suljettiin tiiviisti ja niiden annettiin olla soluviljelytilojen lämpökaapissa kolme viikkoa (+37 °C, 5 % CO₂).



Kuva 11. SF-tekijän koejärjestelyt. Soluviljelmästä pipetoidaan riittävä tilavuus solukantaliuokseen, josta vastaavasti pipetoidaan tarkkaan lasketut tilavuudet koejärjestelyn falcon-putkiin. Sädeytyksen jälkeen putkista pipetoidaan 96-kuoppalevyn kuhunkin kaivoon 200 µl.

Määräajan kuluttua 96-kuoppalevyt avattiin ja tarkastelun niiden sisältämät positiiviset kaivot laskettiin. Positiivisuuden ehtona oli, että kaivo sisälsi vähintään 32 solun kasvuston. Jokainen tuplakoesarjan levy laskettiin ja tulokset kirjattiin ylös. Näiden perustella laskettiin solujen eloonjäämisosuus eli SF-tekijä sekä arvioitiin solujen sietokykyä sädehoitoon.

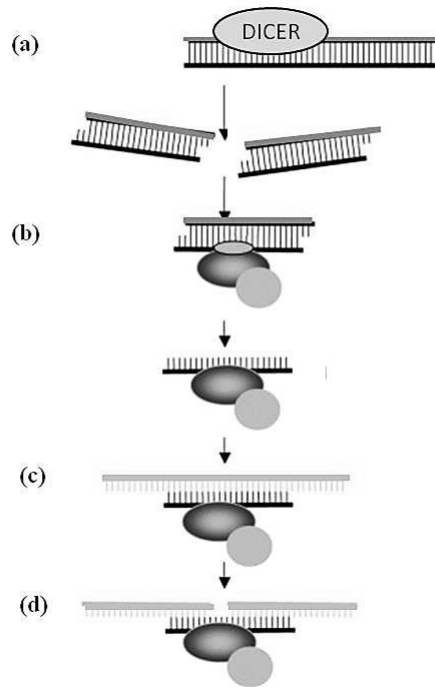
2.4 Toiminnallisten geenien vaimentaminen *in vitro*

RNA-interferenssi, lyhyemmin RNAi – on ilmiö, joka havaittiin alun perin kasveilla. Ensimmäinen eläinkunnan organismi, johon RNA-interferenssiä sovellettiin, oli sukkulamato (*C.Elegans*) ja tämän jälkeen kokeiluja laajennettiin myös selkäjänteisiin ja

näiden soluihin. RNAi:n avulla voidaan hiljentää jokin tietty solussa aktiivisesti toiminnallinen geeni joko kokonaan toimimattomaksi tai siten, että sen toiminta palautuu vähitellen takaisin vaimentamisen jälkeen (Fire ym. 1998, Voorhoeve & Agami 2003).

Eliöillä RNA-interferenssi on luonnollinen mekanismi varmistaa geenien ilmenemisen tasapaino solutasolla. Tumassa valmistetut lähetti-RNA:t (messenger eli mRNA) kuljetetaan sytoplasmaan, niiden sisältämä koodi puretaan ribosomien avulla ja valmistetaan peptidiketjuja translaatioissa. Myöhempien muokkausten seurauksena näistä voidaan muokata muun muassa toiminnallisia proteiineja. Liian korkea mRNA-taso solun sisällä aktivoi RNAi-mekanismi, joka voi vaikuttaa edellä mainittuun proteiinien muodostumiseen. Ilmiötä hyödynnetään solubiologisissa tutkimuksissa *in vitro*, esimerkiksi geenin vaimentamisessa. RNA-interferenssin avulla voidaan näin esimerkiksi tarkastella geenin aiheuttaman vasteen poiskytkennän vaikutusta erilaisiin ulkoisiin pakotteisiin tai ympäristötekijöihin. Näitä voivat olla muun muassa erilaiset lääkkeet, säteilytys, kemikaalit tai vaikka muutokset solujen ympäristön happipitoisuudessa (Mocelin S & Provenzano M, 2004).

RNA-interferenssin käynnistyminen etenee solussa vaiheittain ja se on esitetty kuvassa 12. Solun omia kaksisäikeisiä RNA-ketjuja (dsRNA) tai vaihtoehtoisesti soluun siirrettyjä keinotekoisia siRNA-komplekseja muokkaavat solun omat entsyymit. Dicer-entsyymi, joka lukeutuu ribonukleaaseihin, pilkkoo dsRNA:n 20–25 emäsparin pituisiksi paloiksi (kuva 12, a-kohta). Muodostuneet RNA-oligonukleotidinauhat sitoutuvat usean proteiinin muodostamaan yhdistelmään eli kompleksiin, jota kutsutaan RISC-kompleksiksi (RISC – *RNA-induced silencing complex* eli RNA:n indusoima vaimentamiskompleksi). RISC-kompleksin jokaisella proteiinilla on kohde-mRNA:han sitoutumista edistäviä- sekä sen hajoitukseen erikoistuneita ominaisuuksia. Kompleksin muodostumisessa toinen dsRNA:n nukleiinihappoketjunauha eli ”sense”-nauha hajoaa, jolloin jäljelle jää tällöin vain ”anti-sense”-nauha (kuva 12. b-kohta). Tämä ”anti-sense”-ketju tunnistaa emäsjärjestyksen perusteella kohde-mRNA:n, joka johtaa sen hajoitukseen (kuva 12, kohdat c ja d). Emäsjärjestys on jokaisella vaimennettavalla geenillä spesifinen ja juuri tähän ominaisuuteen perustuen menetelmällä voidaan tutkia yksittäisten geenien vaimentamista soluissa.



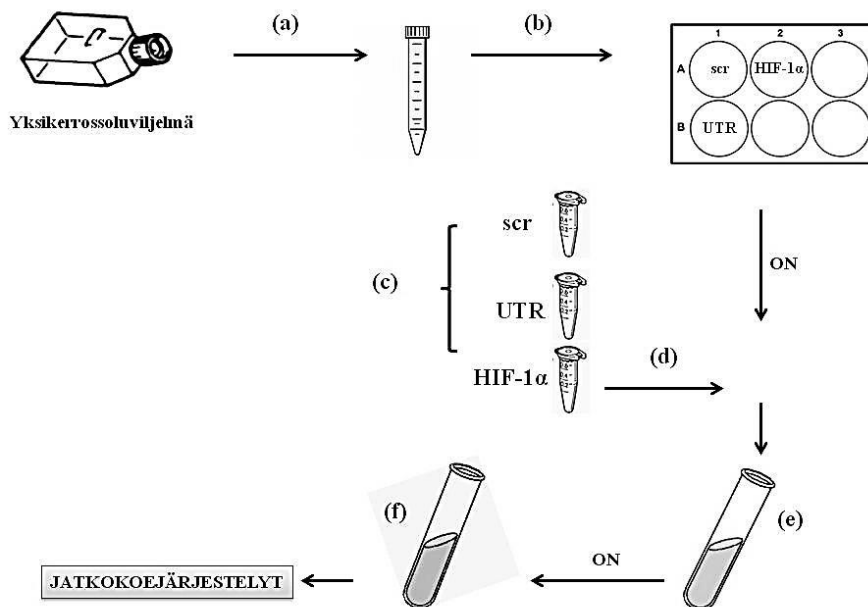
Kuva 12. RNA-interferenssin muodostumis- ja toimintamekanismi solussa. Kaksisäikeisen RNA:n entsymaattinen aktivoiminen seurauksena, kohde-mRNA:han sitoutuminen indusoi tämän hajotuksen ja translaation vaimentaminen (mukailen Karpala AJ ym. 2005).

2.4.1 Transfektio

Pro gradu -tutkielmassa RNAi:llä vaimennettiin UT-SCC-solulinjassa hypoksian indusoima HIF-1 α -geeni. Hiljennyskompleksin muodostamista varten käytettiin Oligofectamine™ - reagenssia (Invitrogen™, Life Technologies Corporation). Reagenssi muodostaa spontaanisti oligonukleotidien kanssa transfektoivia oligonukleotidikomplekseja, joiden emäsjärjestysspesifiteettiin perustuen voidaan vaimentaa soluissa jokin tietty geeni. Menetelmä vaatii optimointia, koska reagenssi ei välttämättä sovellu kaikille eukaryoottisolutyypeille. UT-SCC- solulinjalla menetelmä toimii, sillä muutama tutkimusryhmä on jo aiemmin testannut sitä kyseisillä soluilla ja todennut sen sopivan RNAi-työskentelyyn (Marxsen J ym. 2004).

Kuvassa 13 on esitetty transfektio protokolla kaaviona. Transfektioita varten soluja viljeltiin kasvatuspulloissa, kunnes saavutettiin konfluentti kasvusto. Solut kerättiin ja laskettiin. Solususpensiosta valmistettiin kantaliuos (kuva 13, kohta a). Transfektioita varten siirrostettiin kolmelle 6-kuoppalevyn kaivolle 30 000 solua. 6-kuoppalevyn kanteen merkittiin solulinjan tunnus, päivämäärä, siirrostajan puumerkki ja merkittiin kunkin kaivon kohdalle lisättävien oligonukleotidien tiedot (kuva 13, kohta b).

Oligonukleotidit olivat HIF-1 α kohdegeenille spesifiset siRNA:t sekä epäspesifistä siRNA-sekvenssiä sisältävät oligonukleotidit eli ns. Scramble-oligonukleotidit. Scramble- ja HIF-1 α :n siRNA-sekvenssit on lueteltu liite-osiossa. Koejärjestelyssä oli myös mukana näyte (UTR, engl. untreated), johon ei transfektoitu lainkaan oligonukleotidiä. Tämä näyte toimi siis tutkimuksen kontrollinäytteenä, johon lisättiin ainoastaan Oligofectamine™ - reagenssia. Kuoppalevy siirrettiin lämpökaappiin (+37 °C, 5 % CO₂ – pitoisuus), jossa sen annettiin olla yön yli.



Kuva 13. Transfektion toteutuskaavio

Transfektioon tarvittavat liokset valmistettiin Oligofectamine™ -reagenssikitin ohjeiden mukaan (kuva 13 c-kohta). Kitin A-liuos sisälsi transfektoivia komplekseja muodostavan reagenssin eli Oligofectamine™:n, kun taas B-liuosten sisältö riippui koejärjestelyn 6-kuoppalevyn kaivoihin pipetoitavista oligonukleotidien sekvensseistä. Koejärjestelyissä tarvittavat liuosmäärät on listattu taulukkoon 6. UT-SCC-74A-solulinjalle optimaalinen oligo-pitoisuus oli ohjesuosituksen mukaan 20 μ M.

Taulukko 6. Eksperimentin Oligofectamine™ -transfektiokitin A- ja B-liuoksen reagenssimäärien pipetointitaulukko.

A-liuos		B-liuos		
DMEM	Oligofectamine™	DMEM	OLIGO	A-liuos
37,8 µl	6,3 µl	UTR	200 µl	-
		scr	175 µl	12,5 µl
		siHIF-1α	175 µl	12,5 µl
				18,5 µl

B-liuosta sisältävään eppendorf-putkeen lisättiin 18,5 µl A-liuosta ja näiden annettiin reagoida huoneenlämmössä 15-20 minuuttia (taulukko 6). Ennen transfektiota 6-kuoppalevyn soluja sisältävät kaivot huuhdeltiin PBS:llä, minkä jälkeen kaivoihin pipetoitiin D-MEM:iä 800 µl. Tämän jälkeen kaivoihin pipetoitiin 200 µl A/B-liuosta (UTR, scr tai siHIF-1α). Transfektio-reagenssin annettiin interaktoida solujen kanssa neljä tuntia lämpökaapissa (+37 °C, 5 % CO₂ – pitoisuus) (kuva 13, kohdat c ja d). Solujen vitaalitoimintojen aktivoimiseksi kuoppalevyjen kaivoihin lisättiin tämän jälkeen 1 ml D-MEM-kasvatusliuosta, jonka seerumipitoisuus oli 20 % (kuva 13, kohta e). Seuraavana päivänä solujen kasvatusmedium vaihdettiin D-MEM + 10 % FBS liuokseen (kuva 13, kohta f).

2.4.2 Hypoksianäytteiden valmistus

Transfektoidut solunäytteet siirrettiin hypoksiakaappiin 6 tunniksi (Invivo2, Ruskinn Technology Ltd., UK), jotta hapen suhteellisen osapaineen vähentyminen aktivoisi solujen HIF-1α:n ekspression (1% O₂-pitoisuus, huoneenlämpötila). Hypoksiakaappiin siirrettiin transfektioitujen solunäytteiden lisäksi Western blot-näytteiden valmistusta varten tarvittavat soluviljelyvälineet sekä reagenssit tasapainottamaan kuudeksi tunniksi. Solujen irrotusta sekä niiden rakenteiden hajottamista varten tarvittavan lyysis-puskurin valmistus ja säilytys on kuvattu tutkielman lopun liitteessä. Lyysis-puskuriin lisättiin solujen proteiinien molekulaarisia rakenteita kelatoivia yhdisteitä, jotka kuitenkin takasivat sen, että analysoitavat proteiinit säilyvät näytteissä ehjinä.

Soluviljelmistä imettiin kasvatusmedium pois ja solut pestiin PBS-liuoksella. Kuhunkin kaivoon lisättiin lyysis-puskuria 1 ml ja tämän annettiin inkuboitua hetken. Solut raaputettiin kaivojen pohjalta irti ja solulysaatti pipetoitiin eppendorf-putkiin. Näytteet siirrettiin välittömästi jäälle. Näytteiden lopullinen säilytys tapahtui -70 °C:ssa.

2.5 Western blot-analyysi

Western blot-analyysi on biotekninen menetelmä, jonka avulla voidaan erotella solu- tai kudoslüsaattinäytteistä proteiineja. Menetelmä perustuu polypeptidiketjujen sähkökemiallisiin ominaisuuksiin, kolmiulotteisiin rakenteisiin, aminohappoketjujen suhteellisiin pituuksiin tai näiden yhdistelmiin, joiden avulla proteiinit on mahdollista erotella toisistaan sähkövirran ohjaamana geelielektroforeesilla.

Pro gradussa proteiinien erottelussa käytettiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE, Laemmli 1970), jossa erottelu perustui erillisten polypeptidiketjujen kokoon. SDS-PAGE:ssa proteiinien kolmiulotteinen rakenne hajotetaan ennen geeliajtoa ja lisäksi mahdolliset proteiinien alayksiköt irrotetaan toistensa vaikutuspiiristä. Polypeptidiketjujen väliset rikkisillat pelkistetään kuumentamalla näytteitä näytepuskurissa β -merkaptotanolin tai DTT:n (Ditiotreitoli) kanssa. Proteiinin sisältämien aminohappojen varuserot muokataan negatiiviseksi näytepuskurin anionisen SDS-lisän (natriumdodekyylisulfidi) myötä, joka peittää molekyyliketjun. Näin niiden rakenne pysyy yksinkertaisena ja stabiilina ketjuna, joka mahdollistaa proteiinien kokoon ja varaukseen perustuvan erottelun geelillä.

SDS-PAGE:n geeli koostuu polyakryyliamidin ja bis-akryyliamidin seoksesta, joiden polymerisaatio muodostaa tiheän molekulaarisen verkoston. Geelille johdetaan sähkövirtaa, jonka seurauksena proteiinit ajautuvat negatiivisen varauksensa johdosta katodilta anodille (negatiiviselta kohtioltta positiiviselle). Suuremmat proteiinit jäävät näin ollen jo heti geelillä sen alaosaan, kun taas pienemmät yksiköt ajautuvat nopeammin huokosverkoston läpi geelin yläosaan. Voidaankin sanoa, että SDS-PAGE:ssa proteiinien nopeus ja ajautuminen geelillä on kääntäen verrannollinen niiden kokoon nähden. Akryyliamidipitoisuutta muuttamalla verkoston tiheyttä on mahdollista muokata tutkittavan proteiinin molekyylipainolle sopivaksi. Jotta proteiinit kulkeutuisivat tasaisesti sähkövirran ohjaamana, käytetään epäjatkuvaa SDS-PAGE:a, jossa erottelugeeleinä ovat sekä ylä- että ala-geeli. Ylägeeli (kokoojageeli) varmistaa tällöin proteiinien tasaisen kulkeutumisen alageelillä (erotusgeelissä), mikä perustuu sen suurempiin huokoskokoihin. Gealien eri tiheydet aiheuttavat sen, että polypeptidiketjut tiivistyvät näiden rajalle ohuiksi juoviksi.

Proteiinien erottaminen ja niiden tunnistaminen tapahtuu erilaisten vasta-aineleimaus- ja värjäysmenetelmien avulla, joista jälkimmäistä ei voida suoraan soveltaa käytännössä itse geelille. Tästä syystä elektroforeesilla erotellut proteiinit on ensin siirrettävä materiaalille, kuten nitroselluloosamembraanille tai PVDF-kalvolle, jotka sitovat edellä mainittuja tunnistamisreagensseja. Proteiinien siirrossa eli ”blottauksessa” negatiivisesti varatut polypeptidiketjut kulkeutuvat sähkövirran avulla anodin suunnassa olevalle materiaalille.

Vasta-aineleimauksessa käytetään yleensä kaksivaiheista leimaamismenetelmää. Kalvolla olevat proteiinit käsitellään ensiövasta-aineella, jonka tarkoitus on toimia ankkurina toisiovasta-aineelle. Tämä vuorostaan sisältää yleensä reporterin (tai leiman), joka aktivoituessaan (ei-fluoresoiva, fluoresoiva tai radioaktiivinen leima) välittää leimatusta proteiininäytteestä signaalin, joka vuorostaan voidaan havaita muun muassa erilaisilla kuvantamismenetelmillä. Signaali muodostuu käsiteltäessä vasta-ainetyypistä riippuen leimattua materiaalia joko substraattiliuoksella, eri aallonpituutta sisältävällä valolla tai mahdollisesti säteilyllä. Ennen varsinaista leimaamista kalvo, jolle näytteestä erotetut proteiinit on siirretty, käsitellään siten, että vasta-ainemolekyylit sitoutuvat vain kohdeproteiineihin. Yleinen menetelmä tähän on huuhdella membraania maitojauheesta ja PBS:stä valmistetussa liuoksessa, jossa maidon proteiinit sitoutuvat tyhjiin kohtiin parantaen näin lisättävän vasta-aineen sitoutumista kohdeproteiineihin.

Pro gradu-tutkielmassa proteiinien havainnoimiseksi käytettiin vasta-aineena piparjuuriperoksidaasi-konjugoituja leimoja (HRP, Horseradishperoxidase), joissa proteiinien paikallistaminen kalvolla sekä niiden tunnistus perustui tehostettuun kemiluminesenssiin (ECL, Enhanced chemiluminescence). ECL muodostuu reaktiosarjan seurauksena, jossa HRP:n hapettuu, kun vasta-aineleimattua membraania käsitellään vetyperoksidia sisältävällä substraattiliuoksella. HRP:n reaktio vuorostaan katalysoi edelleen luminolin hapettumisen 3-APA:ksi ja samalla molekyyleissä esiintynyt viritystila purkautuu vapauttaen valoa. Säteily tallennetaan röntgenfilmille, josta proteiinit voidaan havainnoida ja tunnistaa sekä niiden määrää arvioida esiintyvien intensiteettierojen perusteella. Hapetusreaktiossa vapautuvan valon voimakkuutta voidaan kasvattaa lisäämällä reaktioon erilaisia kemikaaleja (tehostaja eng. enhancer), kuten esimerkiksi jodofenolia. Maksimaalinen intensiteetti saavutetaan valottamalla membraania kaksi tuntia reaktion alusta. Western blot-analyysissä käytettyjen liuosten ja kemikaalien tiedot, sekä menetelmäohjeet laitetietoineen on esitetty liiteosiossa.

2.5.1 Western blot -näytteiden valmistaminen

SDS-PAGE-ajoa varten jokaisesta hypoksianäytteestä määritettiin kokonaisproteiinipitoisuus, jotta erotusgeelin kaivoihin ladattaisiin samassa määräsuhteessa proteiineja. Koska solut oli hajoitettu SDS:ää sisältävällä lyyisipuskurilla, kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin BCA-menetelmällä (Smith assay, Smith 1985).

BCA-menetelmä perustuu kupari-ionin hapetus-pelkistysreaktioon voimakkaasti emäksisissä olosuhteissa ja on lämpötilasta riippuvainen. Proteiininäytteiden sisältämien aminohappojen (kysteini tai sen hapettunut muoto kystiini, tyrosiini ja tryptofaani) pelkistävät BCA-liuoksen sisältämät Cu^{2+} -ionit Cu^+ -ioneiksi. Muodostuneet yhden arvoiset kupari-ionit kelatoituvat bikinkoniinihappomolekyylien kanssa, joka havaitaan liuoksen värinmuutoksena. Muodostuneen värin intensiteetti mitataan spektrofotometrillä (750 nm:n aallonpituusabsorptio). Intensiteetti on suoraan verrannollinen reaktioon osallistuvien peptidisidosten määrän kanssa. Tunnetuissa olosuhteissa absorbanssilukema a vastaa mitatun näytteen kokonaisproteiinipitoisuutta c . Geelille pipetoitavan näytteen kokonaistilavuus V voidaan siten laskea kaavan 5. mukaisesti, jossa n kuvaa proteiinien määrää näytteessä.

$$\begin{aligned} n_1 &= n_2 \\ c_1 V_1 &= c_2 V_2 \quad | \quad c = a \\ a_1 V_1 &= a_2 V_2 \quad \Leftrightarrow \quad \frac{(a_1 \times V_1)}{a_2} = V_2 \quad (5) \end{aligned}$$

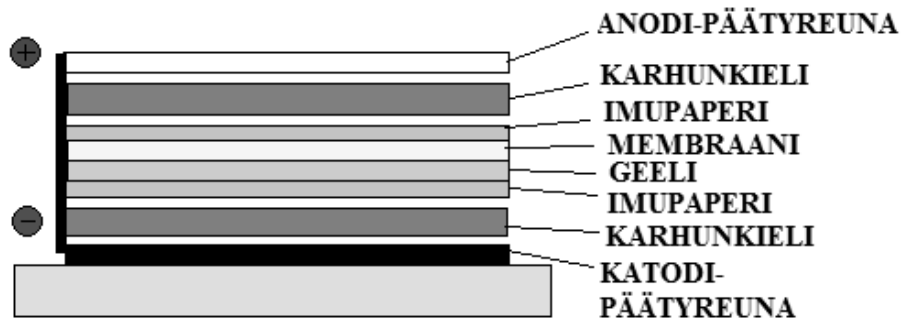
Kokonaisproteiinipitoisuuden määrittämisessä käytettiin DC Protein Assay -tuotetta (Bio-Rad Laboratories). Jokaisesta näytteestä otettiin kaksi rinnakkaisotosta. Määrittäminen tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan. Kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin spektrofotometrillä (Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader, Thermo Fischer Scientific Oy, Finland) 750 nm:n filterillä. SDS-PAGE:n geelin kaivoihin pipetoitiin näytteitä siten, että mitatuista absorbanssilukemista keskiarvoista pienimmän luvun saaneesta koeasetelmasta pipetoitiin 50 μl :n tilavuus. Muiden näytteiden määrä laskettiin kaavan 5. mukaan. Näytteiden lisäksi geelille pipetoitiin myös 10 μl NEBTM:n Prestained

Protein Marker (Broad Range: 7-175 kDa) (NEB, USA) proteiinien tunnistamista varten.

2.5.2 Geelielektroforeesi ja vasta-aineleimaus

Pro gradu-tutkielman geelielektroforeesi tehtiin BioRad:n MiniProt 3[®] -laitteistolla (Bio-Rad, USA), johon valettiin epäjatkuvaan SDS-PAGE -menettelyä varten 10 % -erotusgeeli (alageeli) sekä 4 % -kokoajageeliä (ylägeeli). Gealien paksuus oli 1 mm ja kaivojen lukumäärä yhdeksän. Laitteisto koottiin valmistajan ohjeiden mukaisesti siten, että molemmat geelit valettiin ja ajettiin samaan aikaan. Erotusgeeli valmistettiin ensin ja valmis geelimassa pipetoitiin välittömästi ajolaitteiston lasien väliin varovasti ilmakuplien välttämiseksi. Geeli tasattiin lisäämällä lasien reunustoja pitkin automaattipipetillä MQ-H₂O:ta ja jotta ilman happi ei estäisi geelin bis-akryyliamidin ja polyakryyliamidin välistä polymerisaatioreaktiota. Geeli polymersoiti (vähintään 30 min, RT), jonka jälkeen tasausvesi poistettiin varovasti imupaperilla. Kokoajageeli valettiin valmistetun erotusgeelin päälle vastaavalla tavalla. Kaivot muotoiltiin asettamalla ddH₂O:ssa kastellut geelikammat varovasti kokoajageelin ja erotusgeelin väliin, jonka jälkeen ylägeelin annettiin polymerisoitua (vähintään 45 min, RT).

Koottiin ajolaitteisto valmistajan ohjeiden mukaisesti ja valmisteltiin näytteet elektroforeesiin ennen niiden pipetoimista geelin kaivoille. -70 °C:ssa säilötyt näytteet sekä 6 × latausliuos (10 % SDS) siirrettiin jälle. Jokaiseen näytteeseen pipetoitiin 30 µl 6 × latausliuosta, minkä jälkeen näytteet kuumennettiin 100 C:ssa 5 minuuttia ja sentrifugoitiin nopeasti. Näytteet pipetoitiin geeliin ja eroteltiin kokoluokkiin 90 V:n jännitteellä (90 min). Proteiininäyterintamaa seurattiin ajon aikana, jottei se ylittäisi geelin alarajaa. Ajon jälkeen laite pysäytettiin ja geeli irrotettiin laseista varovasti. Kokoluokkiin erotellut proteiinit siirrettiin nitroselluloosamembraanille (Millipore, Merck) Western blot-proteiinien siirtolaitteistossa (350 mA/60 min) (BioRad Mini Trans Blot[®], Bio-Rad). Siirtolaitteisto koottiin valmistajan ohjeiden mukaisesti (Kuva 14.) Ajon jälkeen laite purettiin ja membraanit huuhdeltiin MQ-H₂O:ssa kevyessä ravistelussa (15 – 20min.).



Kuva 14. Western blot-siirtolaitteiston kokoamisjärjestys.

Yleinen käytäntö siirron jälkeen on, että membraani käsitellään blokkauks-
liuoksella (1 % maitojauhe ja $1 \times$ PBS), jotta vasta-aineleimauksen vasta-ainemolekyylit tarttuisivat kohdeproteiineihin tarkasti eivätkä membraanin muiden mahdollisten proteiinien epitooppeihin. Pro gradu-tutkielman ensiövasta-aine oli kuitenkin riittävän tehokas kohdentuessaan tutkittaviin proteiineihin, joten tämä vaihe voitiin sivuuttaa ensiöleimauksessa.

Anti-HIF1 α -ensiövasta-aineesta (BD Biosciences) valmistettiin 1:3000-laimennos 5 ml PBST:hen. Membraani siirrettiin pinsetillä steriiliin 50 ml:n falcon-putkeen, johon pipetoitiin vasta-aineliuos ja annettiin inkuboitua yön yli viileässä (+4 °C) jatkuvassa pyörimisliikkeessä. Toisiovasta-aineesta (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP-vasta-aine, DakoCytomation) valmistettiin 1:5000-laimennos 5 ml:aan PBST-5 % maitojauheliuos. Ensiö-vasta-aineleimattu membraani pestiin kaksi kertaa PBST-liuoksella, jonka jälkeen se siirrettiin pinsetillä uuteen steriiliin 50 ml:n falcon-putkeen, johon pipetoitiin toisiovasta-aineliuos. Toisiovasta-ainetta inkuboitin membraanin kanssa yli yön (+4 °C) jatkuvassa pyörimisliikkeessä.

2.5.3 Tehostettu kemiluminesenssi eli ECL

Toisiovasta-aineleimauksen jälkeen membraanit pestiin kaksi kertaa 10 ml PBST-liuoksella ja kaksi kertaa 10 ml MQ-H₂O:ssa kevyessä ravistelussa (10 min.). Kemiluminesenssireagenssi (ECL-liuos) valmistettiin Pierce[®]ECL Western Blotting Substrate-materiaalipakkauksen (Thermo Fisher Scientific Inc.) ohjeiden mukaisesti yhdistämällä 600 μ l 1-substraatti- ja 2-substraattiliuosta. ECL-liuos pipetoitiin

membraanin päälle ja paineltiin kevyesti kalvot kiinni toisiinsa siten, että ilmakuplat ja ylimääräiset nesteet poistuivat. Membraani asetettiin valotuskasettiin (Amersham) ja membraanin päälle asetettiin pimiössä röntgenfilmi (Medical X-Ray Film 100NF, Fuji) Valotusajat vaihtelivat 3-10 minuuttia. Valotusaika riippui tutkittavasta proteiinista. Filmit kehitettiin kehityskoneessa (Curix-60, Afga).

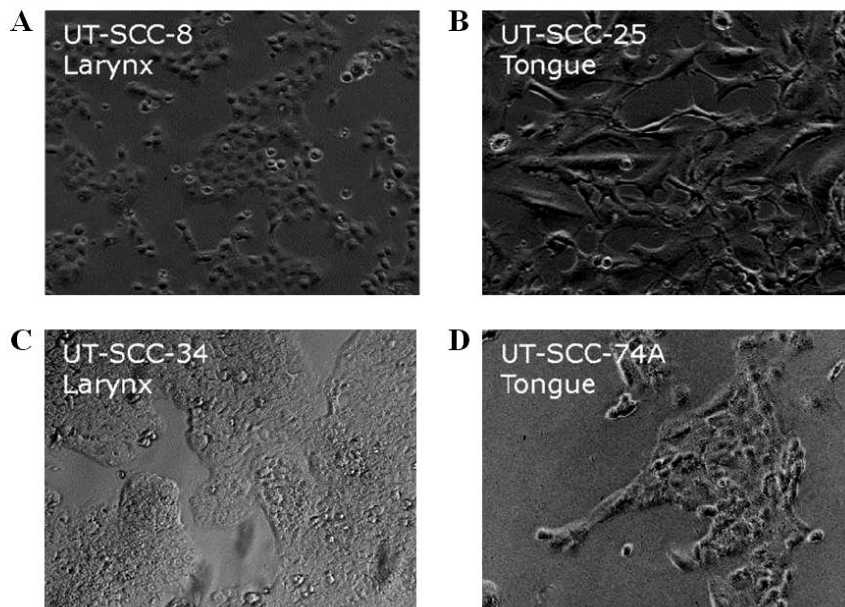
2.5.4 β -aktiinimääritys

Membraneilta havainnoitiin myös β -aktiini-proteiini sille spesifisellä vasta-aineella. Vasta-aineesta (Ac-74 -vasta-aine, Sigma-Aldrich) tehtiin 1:3000-laimennos 5 ml PBST:hen. Tämän jälkeen tehtiin toisiovasta-aineleimaus (1,5–2 tuntia pyöryksessä huoneenlämmössä). Signaali havainnoitiin samalla protokollalla, kuten luvussa 2.5.3 (valotusaika 30 sekuntia).

3 TULOKSET

3.1 Solulinjat

Ennen varsinaisia säteilyherkkyyskokeita perhdyttiin soluviljelyn perusteisiin sekä solulinjojen käyttäytymiseen niiden aktiivisen kasvun aikana. Tiedot solujen alkuperäisestä sijainnista sekä kasvaintyyppistä, joista linjat oli perustettu, on selostettu luvussa 2.1 taulukossa 4. Tutkimuksiin pyrittiin valitsemaan solubarastosta linjoja, joiden passage- eli jakamiskertaluvut olivat mahdollisimman alhaisia. Tämä johtui siitä, että tällöin soluilla olisi säilynyt edes hieman kyseisen kasvainkudoksen syöpäsoluille tyypillisiä piirteitä. Mitä useammin soluja jaetaan kasvatusalustoilla, sitä enemmän ne menettävät erikoistumispiirteitään, joka vastaavasti vaikuttaa eri eksperimenttien tulosten luotettavuuteen heikentävästi. Soluja oli kuitenkin jaettava, sillä muutoin liian tiiviissä kasvustossa olisi ilmentynyt solujen välistä kontakti-inhibitiota, mikä vuorostaan olisi voinut vaikuttaa niiden geeniekspressiotasoihin ja siten myöhempien solukokeiden tuloksiin. Kuvassa 15. on esitetty kasvussa olleet solulinjat. Jotta linjakohtaiset tulokset olisivat toistensa suhteen vertailukelpoisia, solulinjoja kasvatettiin samanlaisissa olosuhteissa ja niiden käsittely ei poikennut toisistaan (luku 2.1 ja liite-osio).



Kuva 15. Pro gradu-tutkielman solulinjat: A) UT-SCC-8, B) UT-SCC-25, C) UT-SCC-34 ja D) UT-SCC-74A.

Havaittiin, että alhaisilla passage-luvuilla (passage-luku < 10) solujen kiinnittymiskyky uudelle kasvualustalle heikkeni ja ne olivat erityisen herkkiä kaikille viljelyoloissa tapahtuneille muutoksille (trypsiinikäsittely ja kasvatusliuoksen vaihdot) verrattaessa soluihin, joiden passage-luku oli suurempi (passage-luku > 10). Myös linjakohtaisia eroja havaittiin. Esimerkiksi UT-SCC-8-linja oli erityisen vaativa ja näiden solupopulaatioiden kanssa oli työskenneltävä erityisen varovaisesti. Solujen kiinnittyminen alustalle vaati useamman päivän ja lisäksi linjan trypsiininsietokyky oli erittäin herkkä: vain 2 min. Toista ääripäätä vuorostaan edusti UT-SCC-74A-linja, joka vuorostaan muodosti uusia solukasvustoja jo reilun vuorokauden päästä siirrostamisesta. Näiden solujen trypsiiniresistenssi oli korkea: solut irtosivat alustalta yli 6 minuutin inkubaation jälkeen. Solujen morfologia erosi toisistaan huomattavasti, vaikka esimerkiksi UT-SCC-25 ja UT-SCC-74A sekä UT-SCC-34 ja UT-SCC-8 olivat peräisin samasta anatomisesta rakenteesta (kieli ja kurkunpää). Tähän vaikuttaa luultavimmin kasvaimen erilaistumisaste (gradus-asteikko) sekä tietysti solulinjojen harvestointi uusille alustoille. Solujen metabolian indusoiman aktiivisuuden seurauksena solujen ulkopuolella havaittiin mikroskoopilla erikokoisia eritysrakkuloita joko runsaasti tai ei ollenkaan. Esimerkiksi UT-SCC-25-solulinjan soluilla näitä rakkuloita oli paljon, kun taas vastaavasti UT-SCC-8-linjan soluilla näitä ei havaittu. Taulukossa 7. on listattu tarkemmat tiedot solulinjoista.

Taulukko 7. Pro gradu – tutkielman solulinjat ja niiden erityispiirteet

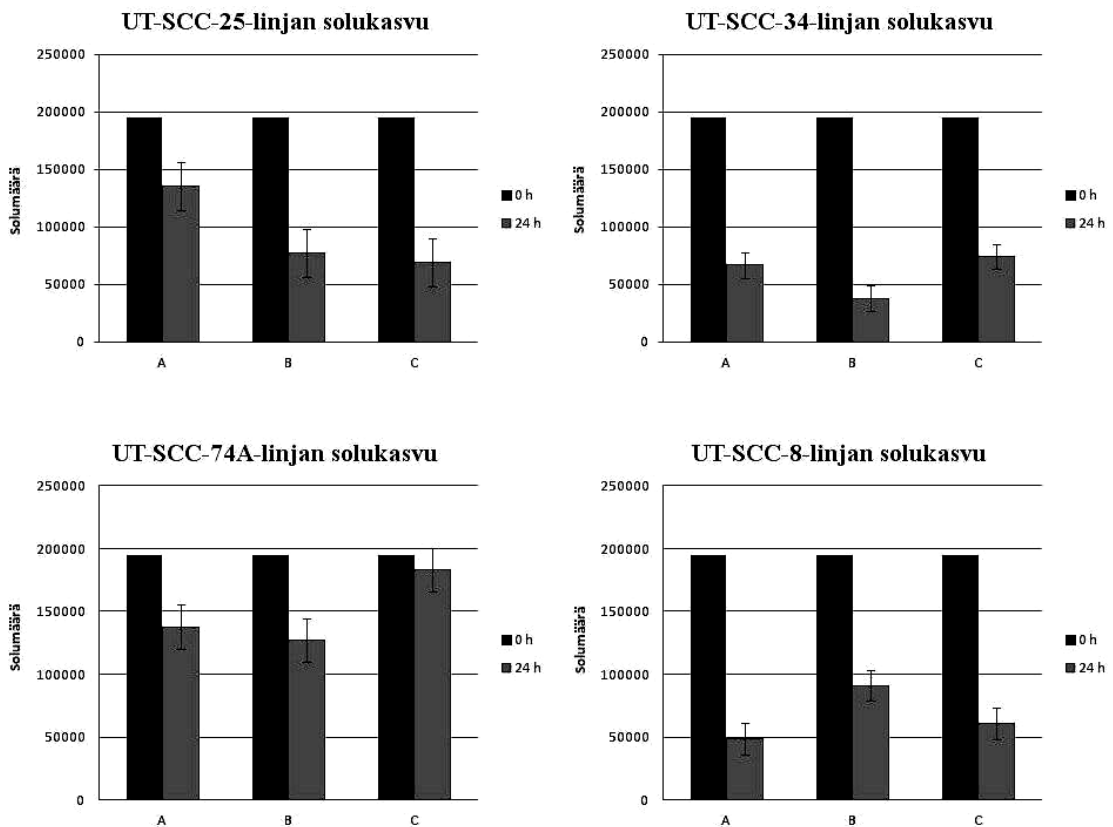
SOLULINJA	KASVUTAPA	KOKO	MUOTO	KASVUNOPEUS	KIINNITTYMINEN ALUSTALLE	TRYPsiININ SIETO
UT-SCC-8	yksisolukerros	+	pyöreä	+	+	+
UT-SCC-25	päällekkäinen verkostomainen rakenne	+++	monihaarainen, "okainen"	++	++	+
UT-SCC-34	monisolukerros	+	pyöreä	+	++	+
UT-SCC-74A	monisolukerros, levymäisiä rakenteita	++	pyöreä, levymäinen	+++	+++	++

3.2 PE(%)-käyrät

Pro gradu – tutkielman kokeita varten tarvittiin tietty lukumäärä soluja, joten linjakohtaisesti tarkasteltiin jokaisen luvussa 3.1 mainitun solulinjan kasvunopeutta ajan funktiona. Solujen kiinnittymispotentiaali määritettiin istuttamalla kolmeen 6-kuoppalevyn kaivoon sama määrä jokaisesta solulinjasta soluja (195 000 solua). Alkuperäisistä viljelmistä sopivien solulaimennosliuosten valmistamiseen liittyvät laskuesimerkit on kuvattu liite-osiossa. 24 tunnin jälkeen jokaisen kaivon sisältämä elossa olevien solujen lukumäärä laskettiin. Tästä vuorostaan määritettiin luvussa 2.3 olleen kaavan 2. mukaisesti linjakohtainen prosentuaalinen elossaolo-osuus, joka perustui solujen kykyyn kiinnittyä uudelle kasvualustalleen. Tulokset soluviljelystä ja laskuista on listattu taulukossa 8. Soluviljelyn tulokset on esitetty vielä pylväsdiagrammina linjakohtaisesti kuvassa 16., jossa näkyy selvästi UT-SCC-linjojen väliset erot kiinnittätymispotentiaalın suhteen.

Taulukko 8. PE(%)-määrityksen soluviljelykokeiden tulokset. Solujen lukumäärät laskettiin 24 tunnin jälkeen siirrostuksesta ja tästä määritettiin solujen kiinnittätymispotentiaali prosentuaalisesti. Jokaisesta linjasta tehtiin kolme määrittystä ja näiden kiinnittätymispotentiaalista määritettiin kullekin solulinjalle keskiarvo ja tästä laskettiin vielä keskihajonta.

SOLULINJA		SOLUMÄÄRÄ/KAIVO	PE(%)	Keskiarvo(PE(%))	Keskihajonta(PE(%))
UT-SCC-25	A	135600	69,53	48,25	18,56
	B	77800	39,89		
	C	68900	35,33		
UT-SCC-34	A	66700	34,2	30,57	9,89
	B	37800	19,38		
	C	74400	38,15		
UT-SCC-74	A	137800	70,66	76,54	15,38
	B	126700	64,97		
	C	183300	94		
UT-SCC-8	A	48900	25,07	34,37	11,13
	B	91100	46,71		
	C	61100	31,33		



Kuva 16. PE(%) -määritys UT-SCC-linjan soluilla. Musta palkki kuvaa solumäärää siirrostuksen alussa (0h, 195 000 solua jokaisessa kaivossa) ja harmaa palkki kuvaa solumäärää 24 tuntia siirrostuksen jälkeen. 24 tunnin pylväsiin on liitetty myös laskennallinen keskivirhe.

Solujen kiinnittymispotentiaali vaihteli runsaasti linjakohtaisesti. Esimerkiksi suurin osa UT-SCC-8- sekä -34-linjan soluista menehtyi siirrostuksen yhteydessä. Tämä havaittiin välittömästi seuraavana päivänä tulosten tarkastelun yhteydessä sekä silmämääräisesti että laskennallisesti. UT-SCC-74A kiinnittyi uudella alustalleen ylivoimaisesti tehokkaimmin, joten se valittiin tästä syystä jatkokokeisiin. Verrattaessa esimerkiksi muihin solulinjoihin se kiinnittyi uudelle alustalleen jopa 30 prosenttiyksikköä paremmin kuin muiden UT-SCC-linjojen solut. Tuloksia kirjattaessa ja PE(%) -tekijöitä laskettaessa linjan UT-SCC-25 kohdalla harkittiin ensimmäisen arvon hylkäämistä, sillä se poikkesi muista arvoista huomattavasti. Tämä johtui luultavimmin pipetointivirheestä alkujärjestelyiden yhteydessä. Solususpensiota valmistettaessa on syytä sekoittaa pipetillä solut tasaisesti pipetoimalla liuosta edestakaisin koeputkessa siten, että solut ovat tasaisesti sekoittuneena suspensioon. Näin vältetään suurempien solukasaumien muodostumista uudelle kasvualustalle pipetoinnin yhteydessä. PE(%) -määritys tarjosi riittävän arviointipohjan sille, miten nopeasti solut kiinnittyvät uudelle alustalleen. Tähän perustuen arvioitiin, että UT-SCC-74A-linjalla, joka valittiin jatkokokeisiin,

kuluisi noin 2-3 päivää konfluentin kasvuston muodostamiseen. Tämä oli edellytys säderesistenssimäärittämissä kokeilla.

3.3 SF-tekijät ja AUC-arvo

Luvun 3.2 tulosten perusteella määritettiin UT-SCC-74A-linjalle suhteelliset eloonjäämisosuudet ja säderesistenttiyttä kuvaava AUC-arvo luvun 2.3 koejärjestelyiden mukaisesti. Jokainen 96-kuoppalevyn kaivo, joka sisälsi vähintään 32 solun kasvuston, huomioitiin laskuissa (positiiviset kaivot) ja SF-tekijä (eli suhteellinen eloonjäämisosuus) määritettiin kaavan 3. mukaisesti. Taulukkoon 9. on listattu positiivisten kaivojen lukumäärät vuosilta 2011 ja 2012, jolloin 96-kuoppalevymääritykset UT-SCC-74A:lle tehtiin. Taulukkoon 10. on listattu SF-tekijät, jotka saatiin taulukon 9. arvojen mukaan laskettua kaavan 3. mukaan. Laskuesimerkki löytyy liiteosiosta

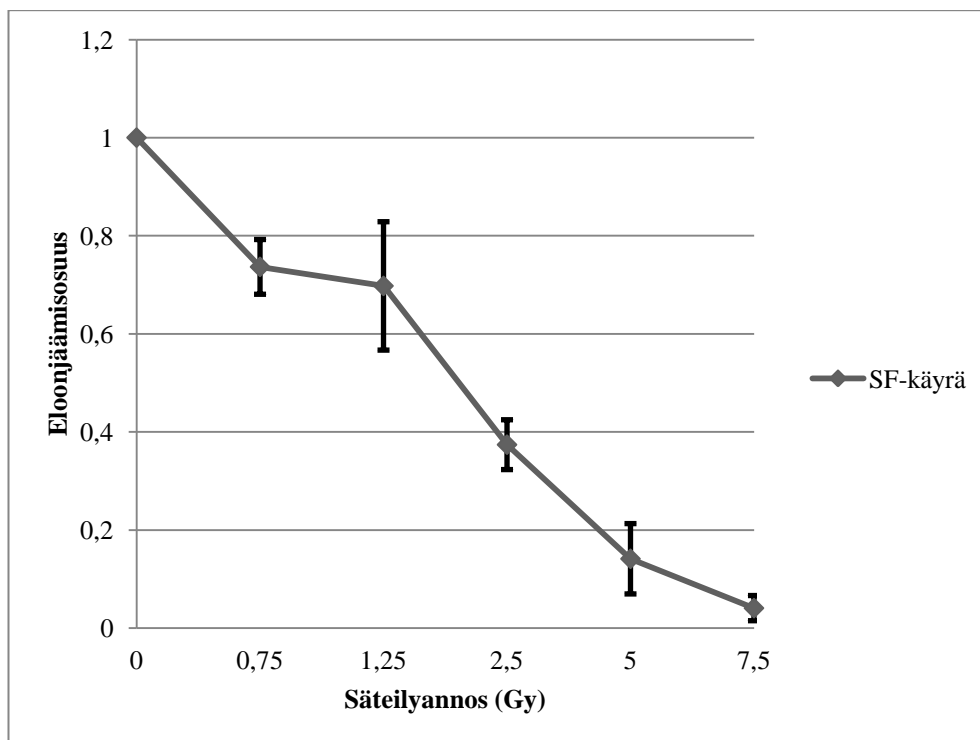
Taulukko 9. UT-SCC-74A-linjan 96-kuoppalevymäärityksen positiivisten kaivojen lukumäärät. Mittauksia tehtiin jokaiselle sädeannokselle kaksi kappaletta: 2011/1. ja 2011/2. sekä 2012/1. ja 2012/2.

Säteilyannos	2011/1.	2011/2.	2012/1.	2012/2.
0	53	44	26	26
0,75	57	54	27	28
1,25	58	62	35	45
2,5	75	79	37	35
5	46	47	6	17
7,5	20	25	7	2

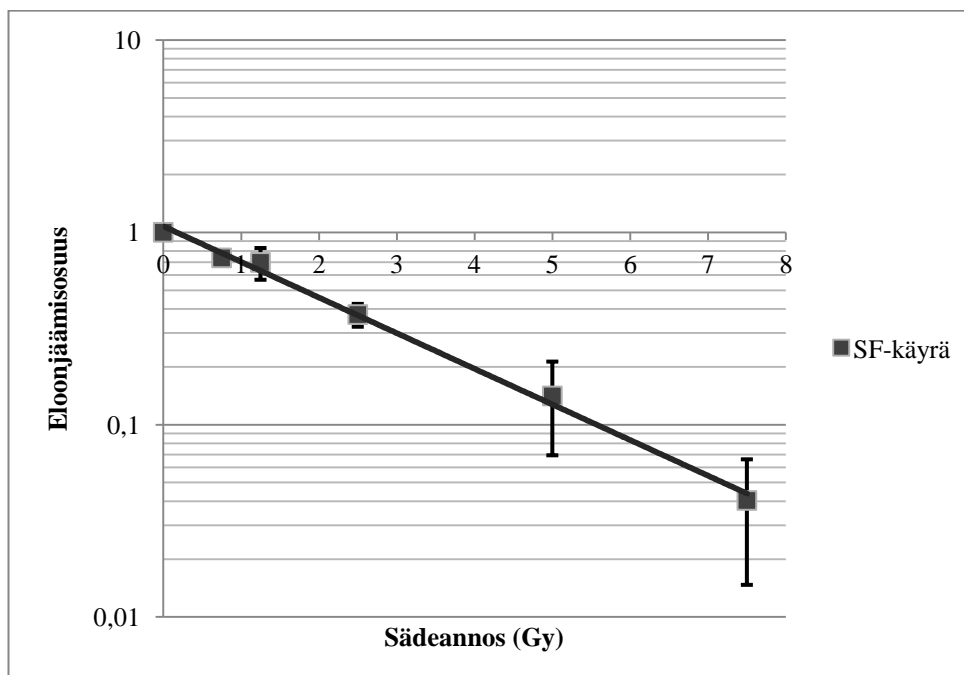
Taulukko 10. UT-SCC-74A- linjan SF-tekijät sekä näiden keskiarvot ja keskihajonnat taulukon 9. arvojen mukaisesti laskettuna.

Säteilyannos	2011/1.	2011/2.	2012/1.	2012/2.	keskiarvo	keskihajonta
0	1	1	1	1	1	1
0,75	0,717	0,819	0,693	0,718	0,737	0,056
1,25	0,548	0,705	0,674	0,866	0,698	0,131
2,5	0,354	0,449	0,356	0,337	0,374	0,051
5	0,174	0,214	0,047	0,131	0,142	0,072
7,5	0,048	0,072	0,034	0,01	0,041	0,026

Näiden SF-tekijöiden keskiarvojen mukaan hahmoteltiin solujen eloonjäämistä kuvaava käyrä sädeannoksen funktiona. Tästä laadittiin sekä lineaarinen että logritminen sovitus, jotka on esitetty kuvissa 17. ja 18.



Kuva 16. Eloojäämiskäyrä säteilyannoksen (Gy) funktiona: lineaarinen sovitus UT-SCC-74A-linjalle. Sovitukseen on liitetty taulukon 10. keskihajonnat.



Kuva 17. Eloojäämiskäyrä säteilyannoksen (Gy) funktiona: logaritminen sovitus UT-SCC-74A-linjalle. Sovitukseen on liitetty taulukon 10. keskihajonnat.

Taulukossa 10. esitetyt arvot sovitettiin LQ-malliin, joka on nykyisin yleisin syöpäsolujen säderesistenttisuuden määrittämiseksi käytettävä malli. Solulinjan α -parametriksi määritettiin keskiarvona mittaustuloksista 0,345 ja β -parametrin keskiarvona saatiin 0,015. Näiden perusteella voitiin määrittää koejärjestelylle kaavan 4. mukaan seuraava solulinjan sädeherkkyyttä kuvaava yhtälö: $S(\text{UT-SCC-74A}) = e^{-(\alpha 0,345D + 0,15D^2)}$. AUC-arvot laskettiin kyseisestä kaavasta, joiden yhteinen keskiarvo kuvasi linjan sädeherkkyyttä. UT-SCC-74A-linjan AUC-arvoksi saatiin 2,4 (keskihajonnalla $\pm 0,4$). Luvussa 2.3 todettiin säderesistenttien linjojen saavan AUC-arvoja, jotka ovat suurempia kuin 2. Tällöin saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että integroitaessa kuvissa esitettyjen käyrien pinta-ala välillä 0 – 7,5 Gy saadaan keskiarvoina tulos, joka kuvaa kyseisen solulinjan olevan suhteellisen säderesistenttiä.

3.4 Transfektio

Pro gradu – tutkielman geenihiljennyksen lopputuloksia voitiin tarkastella Western blot-analyysimenetelmällä. Ennen analyysiä valmistettiin UT-SCC-74A-linjan soluista kolme näytettä, jotka käsiteltiin seuraavasti: UTR-käsittely, scramble-lisäys ja anti-HIF-1 α . UTR (engl. untreated) tarkoittaa näytettä, jota ei soluja transfektoitaessa käsitelty oligonukleotidilisäyksellä lainkaan. Tämä kohtio toimi tutkimuksen kontrollinäytteenä, johon lisättiin ainoastaan OligofectamineTM-reagenssia. Lähtöhypoteesina oli, että myöhemmin tarkasteltaessa solujen geenien ilmentymistasoja HIF-1 α :n suhteen, kyseisen geenin pitäisi näkyä toiminnallisena näissä soluissa hypoksia-altistuksen jälkeen. Luvun 2.4.1 kuvan 13. 6-kuoppalevyn oikeassa yläkulmassa kirjainyhdistelmä scr (engl. scramble) viittasi näytteeseen, jossa OligofectamineTM-reagenssin lisäksi oli pipetoituna kohdegeenille epäspesifiä siRNA-sekvenssiä sisältäviä oligonukleotideja. Komponentit muodostivat yhdessä transfektoivia komplekseja, joiden toiminta kuitenkin ei kohdistunut kohdegeenin vaimentamiseen. Scr-kaivon solut toimivat koeasetelman toisena kontrollinäytteenä. Kohdegeenin vaimentumista ei tämän kaivon soluissa olisi tällöin oletettavasti pitänyt havaita. Kuvan 13. 6-kuoppalevyn HIF-1 α -kaivon vastaavasti pipetoitiin sekä kohdegeenille spesifi siRNA sekä OligofectamineTM - reagenssia. Oletuksen mukaan spesifinen HIF-1 α -vaimeneminen tapahtui tässä kohtiossa. Transfektion jälkeen solujen kunto varmistettiin mikroskooppitarkastelulla. Koska solut voivat näennäisesti hyvin ja vaikuttivat

elinkykyisiltä, ne altistettiin hypoksialle ja pakastettiin myöhempää Western blot-analyysiä varten.

3.5 Western blot-analyysi ja ECL

Ennen Western blot-analyysin SDS-PAGE-ajoa määritettiin kokonaisproteiinipitoisuus jokaisesta hypoksianäytteestä, jotta erotusgeelin kaivoihin ladattaisiin samassa määräsuhteessa proteiineja. Tällä tavoin varmistettiin näytteiden vertailukelpoisuus toisiinsa. Valmistettiin kaksi rinnakkaisotosta jokaisesta transfektoidusta näytteestä ja mitattiin niistä luvussa 2.5.1 viitatulla menetelmällä muodostuneita väri-intesiteettieroja spektrofotometrillä (750 nm:n aallonpituusabsorptio). Mittauksista saatiin seuraavat absorptiolukemat, jotka on listattu taulukossa 11.

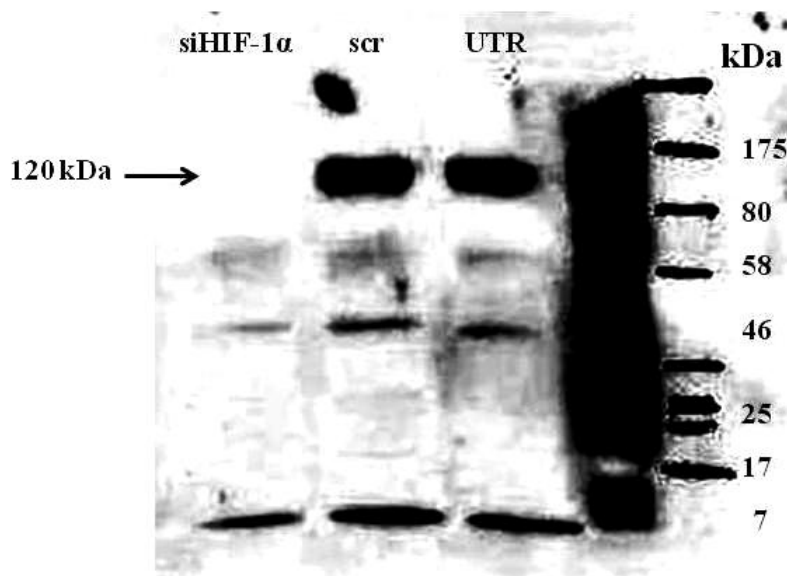
Taulukko 11. Mitatut absorbanssilukemat rinnakkaisnäytteille.

	UTR	scr	siHIF-1 α
näyte 1	0,125*	0,138	0,152
näyte 2	0,161	0,149	0,144
ka.	0,161	0,1435	0,148

Tuloksista valittiin keskiarvo, joka oli mitattujen näytteiden absorbansseista laskennallisesti pienin. On syytä huomata taulukosta 11, että UTR:n 1 näyte (merkitty taulukossa 11. *) hylättiin pipetointivirheen vuoksi laskuista. Koska scr-näytteen keskiarvo oli pienin ($a = 0,1435$), niin tätä näytettä pipetoitiin Western blot-geelin kaivoon 50 μ l ja muiden näytteiden pipetoitava tilavuus laskettiin kaavan 5. mukaisesti. Laskuissa oletushan oli, että absorbanssilukema a tunnetuissa vakio-olosuhteissa (21 % O₂-pitoisuus, huoneenlämpötila) vastasi näytteen kokonaisproteiinipitoisuutta c . Tällöin Western blot-geelin kaivoon pipetoitiin 44,6 μ l UTR-näytettä ja 48,5 μ l HIF-1 α -näytettä. Näytteet ja molekyylipainomarkkeeri pipetoitiin geelille kuvan 18. osoittamassa järjestyksessä, jossa ensimmäinen kaivo jätettiin tyhjäksi. Kuvassa 19. on esitetty western blot-analyysin SDS-PAGE:n ajon tulokset.

①	②	③	④	⑤
HIF-1 α	scr	UTR	molekyyliipm.	tyhjä

Kuva 18. Pro gradu – tutkielman western blot-ajon pipetointikartta

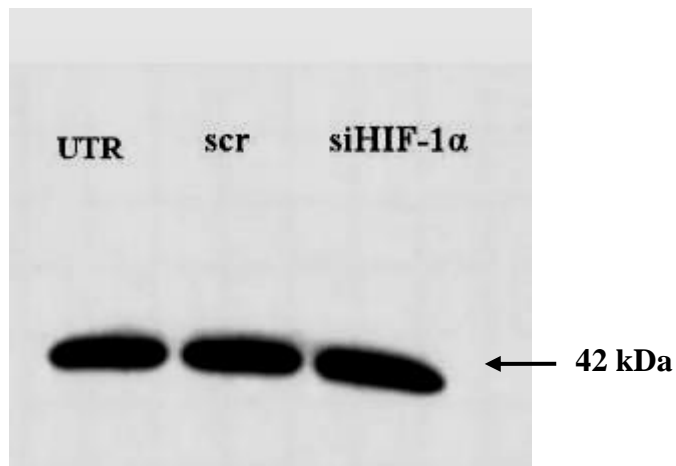


Kuva 19. Western blot – ajon tulokset. Kuvassa havaitaan selvästi oikean puolen molekyylipainomarkeeriin verrattaessa, että noin 120 kDa:n kohdalla kontrolleissa HIF-1 α :n ala-yksikkö ekspressoituu normaalisti, kun taas siHIF-1 α :lla transfektoidussa näytteessä ekspressiota ei havaita.

OMIM-tietokannan mukaan (engl. Online Mendelian Inheritance in Man) HIF-1 α -alayksikön koko on 120 kDa (<http://www.omim.org/entry/603348>) (kuvassa 19. osoitettu nuolella). Kuvassa nähdään voimakas HIF-1 α -ekspressio molemmissa kontrollinäytteissä, kun taas siHIF-1 α :lla käsitellyssä näytteessä hypoksia ei indusoi geenin ilmentymistä, jolloin HIF-1 α proteiinia ei muodostu. Vasta-aine ei tällöin tartu membraaniin, mikä osoittaa, että siRNA:n indusoima anti-HIF-1 α inhibitio toteutuu. ECL-reaktiolla signaalia on voimistettu, mutta tällöinkään ei havaita HIF-1 α -proteiinin ekspressiota HIF-1 α -siRNA-käsitellyssä näytteessä. Muissa näytteissä, joissa transfektio oli epäspesifi, vasta-aine sitoutuu hypoksian indusoiman HIF-1 α -geeniekspression proteiinien epitooppeihin ja saa ne näkymään filmillä positiivisena tuloksena. Muut membraanin signaalit, jotka havaitaan ECL-reaktion kuvauksen jälkeen filmiltä, ovat luultavasti hajonneita proteiinituotteita tai sitten mahdollista taustaa.

3.6 β -aktiinimääritys

Membraanille tehtiin vielä β -aktiinimääritys, jotta varmistuttaisiin siitä, että geelille oli pipetoitu sama suhde proteiininäytteitä ja että geeliltä membraanille siirron aikana siirtyivät proteiinit. Vasta-aineiden aviditeetti oli hyvä, joten vierasproteiinien blokkausta ei tarvinnut suorittaa leimauksen yhteydessä.



Kuva 20. β -aktiinimäärityksen lopputulokset.

Kuten kuvasta 20. voidaan havaita, niin vasta-aineen sitoutuminen β -aktiiniproteiineihin oli havaittavissa ECL-reaktiolla 30 sekunnin valotuksen jälkeen selvästi. β -aktiinin molekyylipaino oli vasta-ainevalmistajan ohjeen mukaan 42 kDa (kuvassa osoitettu nuolella). Jokaisessa näytteessä ilmeistyi membraanille näkyvä signaali samaan kohtaan ja samansuuruisella intensiteetillä. Tämä oli osoitus siitä, että proteiineja oli ladattu juuri oikeassa suhteessa SDS-PAGE:n kaivoihin ja että tällöin ne ovat vertailukelpoisia keskenään.

4 TULOSEN TARKASTELU JA POHDINTA

4.1 Solulinjat ja ekspressioprofiilit

Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomien kasvaimista eristetyistä soluista on perustettu omat SCC-solulinjat tutkimuskäyttöä varten. Näiden avulla voidaan muun muassa selvittää eri hoitomenetelmien vaikutusta kasvainsoluihin ja sen myötä kasvaimen hoitoon. Syöpä on sairautena erittäin monimuotoinen sekä alati muuttuva, mikä vaikeuttaa yleisten linjausten muodostamista sekä diagnosoinnin että hoidon suhteen. Joitain yhteneväisyyksiä on havaittu, ja näihin pohjautuu toistaiseksi nykyinen perustutkimuksemme sekä pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooman että myös muidenkin syöpäsairauksien suhteen.

Kokeellisten syöpäsolulinjojen ja syöpätutkimuksen pioneereina voidaan pitää HeLa-solulinjan soluja, joita edelleenkin käytetään lääketieteellisessä tutkimuksessa. Tämä kuolelattomaksi kutsuttu solulinja on nimetty yhdysvaltalaisen Henrietta Lacksin mukaan. Solut on eristetty kohdunkaulan syövästä rouva Lacksin kuoltua 31-vuotiaana 1951 (Boerner 2010). HeLa-solut tarjosivat lähtömateriaalin tutkimukselle ja niiden kasvua sekä elinkykyä erilaisissa olosuhteissa on raportoitu monien vuosien ajan aina tähän päivään asti. Tutkimustyön edistämiseksi tarve kasvainspesifimpien, stabiilien syöpäsolulinjojen suhteen kasvoi. Ensimmäiset pysyvät pään ja kaulan alueen syöpäsolulinjat ovat peräsin 1950-luvulta. Tuolloin Moore tutkimusryhmineen raportoi neljästä eri pään ja kaulan alueen kasvaimesta eristettyjen syöpäsolujen jakautumisominaisuuksista vaihtelevissa kasvatusolosuhteissa. Ryhmän tavoitteena oli luoda pysyviä solulinjoja, joita voisi toistuvasti käyttää tutkimustyössä (Moore ym. 1955). Soluviljelytekniikoiden katsotaan kehittyneen 50-luvulla todella nopeasti. Tuolloin tutkimustiedon ja solubiologiaan liittyvän tiedon määrä lisääntyi tekniikan ja erilaisten soluviljelymenetelmien kehityksen myötä.

Olemassa olevia HNSCC-solulinjoja on rekisteröity suhteellisesti enemmän, kuin vastaavasti niitä syöpätyyppejä, joiden esiintyvyys väestön keskuudessa on runsaampaa (rintasyöpä, eturauhassyöpä, paksusuolen syöpä). Solulinjoista on mahdollista valikoida kuhunkin diagnostiseen tutkimukseen sopivin solulinja. Koska solulinjoista ei ole vielä yhtenäistä tietokantaa, on tiedonhaku edelleen melko hidasta ja työlästä.

Solulinjoja voidaan luokitella muun muassa sen perusteella, mistä elimestä kasvainsolut ovat peräisin, sisältävätkö solut joitain syövässä yleisinä esiintyviä geenimutaatioita

(esimerkiksi TP53-geeni), soluviljelmän hallinnoimispaikan perusteella (esimerkiksi Turun yliopisto: UT, Michiganin yliopisto: UM jne.), solulinjojen viljelmän perustamisen kahdentumisajan sekä ksenokraftikokeiden (eli kokeiden, jossa kasvainsoluja siirrostetaan esimerkiksi hiireen tavoitteena muodostaa koe-eläimeen keinotekoinen kasvain) ja niiden toiminnallisuuden osoittamisensa perusteella. Lin tutkimusryhmineen julkaisi 2007 kirjallisuuteen pohjautuvan katsauksen rekisteröityjen stabiilien HNSCC-solulinjojen lukumääristä sekä lajitteluperusteista. Solulinjojen muodostaminen on nykyään suhteellisen yksinkertaista johtuen soluviljelytekniikoiden monipuolistumisesta sekä soluviljelytilojen että – materiaalien kehityksestä. Ryhmä painottikin artikkelissa, että alati lisääntyvän tiedon määrä olisi hyvä koota yhtenäiseksi solutietokirjastoiksi. Tällöin säästyisi aikaa sekä vaivaa haettaessa sopivaa koesoluyksikköä syöpätutkimukseen (Lin ym 2007).

Pro gradu-tutkielman UT-SCC-solulinjoilla on tehty pitkälti säderesistenssiin sekä syövän kemoterapiaan liittyvää tutkimusta Turun yliopistossa ja myös muissa onkologiaan erikoistuneissa yksiköissä maailmanlaajuisena yhteistyönä. Kiinnostuksen kohteena on ollut muun muassa se, miten kasvutekijäreseptori EGFR:n yliexpressoituminen vaikuttaa UT-SCC-26-solulinjoissa solujen cisplatinaherkkyteen, jota käytetään kemoterapeuttisena hoitomenetelmänä syövässä yleisesti (Mandic ym. 2009). Turun yliopistossa eräs tutkimuksen aihe on ollut jo pidempään ne mekanismit, joiden oletetaan aiheuttavan eroja UT-SCC-solulinjan sekä yleisestikin pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomasolujen sädehoitoresistenssin muotoutumisessa (Pekkola-Heino ym. 1992, Pekkola-Heino ym. 1995).

Syöpäsolujen eräs ominaisuus on niiden vähittäinen kudosis- tai solutason erilaistumispiirteiden katoaminen (Hanahan & Weinberg 2000). Tämä voidaan todentaa soluista tai kudosisbiopsioista silmämääräisesti valomikroskoopilla. Konkreettisimmin syöpä havaitaan selvästi erottuvana, epäsäännöllisenä solumuodostelmana eli kasvaimena, jossa solujen välinen työnjako on täysin epäjärjestyntynyt. Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooman solut ovat peräisin anatomisesti monimuotoisista rakenteista, jotka koostuvat useista erilaisten solujen jakaumasta (rauhas-, valekerros-, yms. epiteelit). Tästä huolimatta ne voidaan selvästi erottaa morfologisen poikkeavuutensa tai sitten perusteellisemmän molekulaarisen profiilianalyysin kautta joko terveestä kudoksesta. Pro gradu-tutkielmassa havaittiinkin syöpäsolujen fenotyypin poikkeavan toisistaan, vaikka ne olivat peräisin samasta elimestä. Tämän saman havainnon ovat tehneet myös muut pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomaa

tutkineet ryhmät. Solujen muotoon vaikuttavia tekijöitä on tarkasteltu muun muassa analysoimalla esimerkiksi niiden pintaproteiinien (CD44) ja EGFR-ekspression välisiä suhteita. La Fleur ryhmineen havaitsi tutkimuksissaan 2012, että tällaiset pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooman solupopulaatioissa havaittiin korrelaatiot eriasteisten CD44- ja EGFR-ekspressiotasojen välillä. He havaitsivat, että jos solun pinnalla ilmeni runsaasti CD44-proteiineja samalla kun solun EGFR-ekspressiotasot pysyivät matalina, solujen fenotyyppi muuntui mesenkymaaliseen suuntaan. Tämä solujen muuntuminen epiteelimäisestä fenotyypistä mesenkymaaliseksi (eli EM-transitio, engl.lyh. EMT) on eräs syövän pahanlaatuisuutta kuvaava tekijä. Samaan ekspressioprofiiliin liittyvä toinen havainto koski solulinjojen säderesistenssi. Ryhmä totesi julkaisussa, että voimakkaasti CD44-ekspressoivat, mutta vain heikosti EGFR-ekspressoivat solut olivat resistenttejä sekä kemoterapeuttisten lääkeaineiden vaikutuksille että sädehoidolle. Tällaisen pintaproteiinikokonaisuuden katsottiin heikentävän syöpähoitojen tehoa potilaassa. Ryhmä havaitsi eri pään ja kaulan alueen syöpäkasvaimista eristettyjen solujen fenotyypeissä sekä proteiinikokonaisuuksissa eroavaisuuksia. Ryhmä havaitsi myös sen, että peräti samasta elimestä eristetyillä soluilla oli omanlaisensa proteiinien ilmentymiskokonaisuus sekä fenotyyppi (La Fleur ym. 2012). Myös Nguyen ryhmineen 2013 havaitsi eriäviä fenotyyppejä syöpäsolulinjoissa, jotka kuitenkin olivat alun perin eristetty ja perustettu saman anatomisen rakenteen syöpäkasvaimen soluista. Heidänkin tutkimuksensa painottui EM-transition ilmenemiseen HNSCC:ssä sekä tähän mahdollisesti FGFR1:n (fibroblastien kasvutekijäreseptori-1, engl. fibroblastic growth factor reseptori 1) myötävaikutukseen. Ryhmä totesi julkaisunsa alussa, että on osoitettu, että yli puolessa HNSCC-tapauksissa FGF-proteiinia yliekspressoituu. Lisäksi tämän todettiin vaikuttavan syöpäsolujen fenotyypin muotoutumiseen epiteeli-mesenkymaalisen transition kautta, mikä vastaavasti ilmeni tarkasteltaessa solujen morfologiaa. Artikkelin tutkimuksessa todettiin, että inhiboimalla FGF-proteiinin sitoutuminen FGFR1:een, EMT-prosessin oli todettu hidastuvan tutkimuksen HNSCC-solulinjoissa (Nguyen ym. 2013)

Yhtenäisen ekspressioprofiilin tarkka määrittäminen eri syövässä on haasteellista. Samoja mutaatiota ilmenee tietyissä kromosomikohdissa, onkogeneissa tai proto-onkogeneissa miltei kaikissa syövässä. Nämä poikkeamat genomissa vaikuttavat muun muassa kasvaimen metastasointiin, aineenvaihduntaan, apoptoosin välttämiseen ja solusyklin etenemiseen. Syöpätyyppispesifeinä proteiinimarkkereina eli taudin tilan analysoinnissa ja hoidon suunnittelussa nämä eivät kuitenkaan tarjoa mitään tarkkaa

tietoa kasvaimesta sillä tasolla, jota taudin diagnoosin ja prognoosin laadinta edellyttäisi. Eri syöpätyyppien välillä on kuitenkin havaittu syöpäkohtaisia yhteneviä geeniekspressioeroja. Näiden selvityksessä sovelletaan nykyisin muun muassa kaksostutkimuksia, sukututkimusten tarjoamaa tietoa, ympäristötekijöiden riskiarviointeja ja molekyylibiologisista menetelmistä erityisesti DNA-sirutekniikkaa. DNA-sirutekniikka perustuu komplementaarisen eli lähetti-RNA:sta syntetisoidun yksiketjuisen DNA-ketjun, josta on poistettu intronit ja syöpäsolunäytteistä eritettyjen mRNA-molekyylien väliseen hybridisaatioreaktioon. Eri leimausmenettelyillä voidaan näin määrittää kussakin syövässä eri intensiteetillä ilmentyvät proteiinit, joiden ekspressiotasoissa on havaittu syöpäkohtaisia eroja. Verrattaessa eri syöpätyyppejä esimerkiksi pään ja kaulan alueen syöpäkasvaimien cDNA-analyseissa on havaittu aivan omanlainen ekspressioprofiili verrattuna muihin syöpätyyppeihin. Sotiriou ryhmineen julkaisi 2004 artikkelin, jossa tarkasteltiin sen hetkistä tilannetta pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomien proteiinimarkkeeritutkimuksista ja tuloksista. He totesivat, että yleisten onkogeneimutaatioiden (p53, EGFR ja VEGF) lisäksi HNSCC:ssä havaittiin syövän invasiivisuuteen liittyviä mutaatioita muun muassa matriksin eri metalloproteinaaseissa MMP-7, MMP-10 ja MMP-14:sta sekä solusyklin etenemiseen vaikuttavaan proteiiniin sykliini D1:ssä (Sotirou ym 2004). Syöpien merkkigeenien kirjastojen tietomäärät ovat kasvaneet nopeasti vuodesta 2008 lähtien, jolloin kansainvälinen syöpägeenikonsortio ICGC (engl. the International Cancer Genome Consortium) perustettiin. Tämän yhteistyön tavoite on sekvensoida 25 000 syövän genotyyppiä 50 eri kasvaintyyppistä tutkimuskäyttöön maailmanlaajuisesti. Tutkimuksessa on muun muassa analysoitu yleisimpien hyvinvointivaltioiden syöpien, kuten paksusuolensyövän, rintasyövän sekä eturauhassyövän merkkiaineiksi kutsutut geenimutaatiot sekä listattu myös näiden potilastyössä esiintyvät yleisimmät virhearvioinnit (esimerkiksi paksusuolensyövässä ja rintasyövässä tiettyjen geenitestien tulosten ylianalysointi). Paksusuolensyövässä esiintyy sekä perinnöllistä että harvinaisempaa muotoa, joissa molemmilla on omanlaisensa ekspressioprofiili. Perinnöllisen paksusuolen syövän eli familiarisen adenomatootti polypoosin muodostumisessa on olennaista tunnistaa potilaan merkkiainenäytteistä APC-tuumorisupressorigeenin sekä DNA:n replikaation korjausgeenien (MLH1, MSH2 ja MSH6) mutaatiot. Näiden lisäksi tutkitaan myös potilaan suvussa kyseisen syövän esiintyvyyttä, joka lukeutuu perinnöllisen paksusuolensyövän suureksi riskitekijäksi. Rintasyöpäriskiä kartoitetaan merkkiainetesteillä, joiden tarkkuus paranee johtuen aktiivisesta tutkimustyöstä. Rintasyöville on määritetty viisi erilaista molekulaarista

profiilia, joiden tunnistaminen potilaskohtaisesti, toimii nykyisin hoidon suunnittelun perustana. Nämä viisi erilaista genotyyppiä antavat ennusteen kasvaimen vasteesta hoitoon ja arvion uusiutumiseriskistä (Hudson 2013).

Yhteenvedon voidaan todeta, että syöpä itsessään on hyvin haastava ja monipuolinen sairaus. Samasta elimestä eristetty biopsia eri potilailla voi ilmentää täysin toisistaan poikkeavaa geneettistä proteiiniekspressiota ja fenotyyppiä, vaikka kyseessä olisi täysin sama syöpätyyppi.

4.2 Säderesistenssin tutkimus syöpäsoluilla

Pro gradu-tutkielmassa tarkasteltiin solujen jakautumiskykyä uudella kasvualustalla, jotta voitiin optimoida solujen lukumäärä suotuisaksi säderesistenssikokeita varten. Toistaiseksi syöpäsolujen herkkyyttä eri hoitomenetelmille, kuten säteilylle tai kemoterapeuttisille reagensseille tutkitaan joko klonogeenisin tai sitten non-klonogeenisin menetelmin. Non-klonogeenisistä menetelmistä mainittakoon esimerkkinä solujen värjäys kristallivioletillä ja eloonjääneiden kolonnioiden todentaminen kuvantamalla, joka perustuu väripigmentin intensiteettieroihin. Menetelmä on suosittu, mutta se ei sovellu täysin solulinjoille, jotka on vastikään perustettu (eli alhaisten passage-arvojen linjoille) johtuen solujen heikosta kasvupotentiaalista. Menetelmän toinen ongelma on sen tulosten yliarviointiriski, jolloin solujen resistenssiarvot voivat olla todenmukaisia korkeampia. Tästä huolimatta non-klonogeenista määrittystä suositellaan solulinjoilla resistenssimäärittäyksissä, jossa näkyvien solukolonnioiden muodostuminen on joko epätodennäköistä tai silmämääräisesti vaikeasti havaittavaa (Vandersickel ym. 2011).

Klonogeenisiä menetelmiä voidaan soveltaa kaikille olemassa oleville solulinjoille (syöpäsolut, terveestä kudoksesta eristetyt solut). Mielenkiinnon kohteena on määrittää sen populaation suhteellinen koko, joka selviää parhaiten poikkeuksellisissa kasvatusolosuhteissa hengissä. Tällaisen solupopulaation havaitseminen koeolosuhteissa on potilaan hoitoennusteen kannalta huonoin mahdollinen merkki. Resistenteissa kolonioissa solujen perimään on mitä todennäköisimmin kasaantunut perimään ominaisuuksia, jolloin soluihin kohdistetut hoitosovellukset eivät jatkossa tehoa halutulla tavalla. Terveiden solujen reagointi ulkoisiin pakotteisiin noudattaa luonnon lainalaisuuksia, mutta syöpäsolujen kohdalla on aina suoritettava linjakohtainen tarkastelu hyvinkin perusteellisesti. Näin minimoidaan virheiden

todennäköisyys ja saavutetaan mahdollisimman todenmukaiset tulosarvioinnit. Pro gradu-tutkielmassa määritettiin neljälle eri UT-SCC-solulinjan soluille klonogeenisellä PE(%)-määrittelyllä ensin solujen jakautumispotentiaalit uudella alustalla, jonka jälkeen niistä valikoitiin suurimman PE(%)-keskiarvon saanut linja UT-SCC-74A. Tälle tehtiin jatkokokeena säderesistenssimäärittely laskemalla koeprotokollan jälkeen eloonjääneiden solujen osuuden perusteella linjalle SF-arvot ja AUC-arvo. Vastaavia määrittelyksiä on tehty myös muille olemassa oleville pään ja kaulan alueen UT-SCC-solulinjan soluille aiemmin. Pekkola-Heino ryhmineen suoritti kattavan sädeherkkyysmäärittelyksen vuonna 1995 Michiganin yliopiston pään ja kaulan alueen UM-SCC- sekä Turun yliopiston vastaavilla UT-SCC-soluilla. Määrittely toteutettiin samalla protokollalla, jota sovellettiin tämän tutkielman kokeellisessa osuudessa. Tutkimuksessa keskityttiin vertailemaan eri anatomisista rakenteista muodostettujen solulinjojen säderesistenttiyttä laskemalla niiden AUC-arvot klonogeenisten määrittelysten avulla. Menetelmässä ainoa poikkeus gradun kokeisiin verrattuna oli se, että solujen annettiin kasvaa viljelmissä keski-log-faasiin (eli 40–60%:een tiheyteen viljelyalasta), jonka jälkeen niistä valmistettava primäärinen kantaliuos ja siitä tehtävät laimennokset altistettiin astetta voimakkaammille sädeannoksille. Tutkimuksessa todettiin, että ääniraon yläpuolisen alueen levyepiteelikarsinoomat olivat resistentimpiä säteilylle kuin ne kasvaimet, jotka sijaitsivat liki äänihuulia. Muutoin ryhmän saamat tulokset eri elimistä eristettyjen solulinjojen suhteen vaihtelivat joko resistentin tai sädeherkän välillä riippumatta oliko kyseinen solulinja lähtöisin samasta saatikka eri anatomisesta rakenteesta (Pekkola-Heino ym. 1995).

Säderesistenssimäärittelysten lisäksi näillä soluilla on kokeiltu samaa tekniikkaa soveltaen syövän hoidossa käytettävän paklitakseli-kemoterapeutin vaikutusta solujen eloonjäämiseen. Raitanen ryhmineen tutki kuuden eri UT-SCC-linjan solujen reagointia paklitakseliin sekä kahteen sen johdannaisyhdisteeseen BMS-184476 ja BMS-188797. Tutkimuksissa määritettiin solujen elossa selviämistä laskemalla solukolonnioiden määrät 96-kuoppalevyiltä lääkealtistuksen jälkeen. Tutkimuksissa selvisi, että kaikki kokeiden solut olivat herkkiä paklitakselille, mutta analogien tehokkuus oli huomattavasti parempi verrattuna alkuperäiseen luonnolliseen yhdisteeseen (Raitanen ym. 2004).

Menetelmää on kehitetty jo 1950-luvulta lähtien ja sen tehokkuutta on optimoitu tutkimustyön ohella. Jokaista solutyyppeä ja -linjaa on tarkasteltava omana yksilönään, ja jokaiselle on räätälöitävä kullekin koejärjestelyn populaatiolle sopivimmat olosuhteet.

Protokollissa on eroja alkaen käytettävistä liuoksista inkubaatioaikoihin ja säteilyfraktioiden määriin sekä intensiteetteihin. Solujen siirrostamistiheys ja niiden väliset vuorovaikutukset sekä niiden perimiin jo kumuloituneet muutokset syövässä muodostavat omat haasteensa, mikä vastaavasti vaikuttaa tutkimuksen lopputuloksiin. Esimerkiksi Pomp ryhmineen osoitti 1995, että siirrostettaessa suurempia solumääriä uudelle kasvualustalle ei välttämättä saada muodostumaan suurempia solukolonioita toisin kuin alun perin oletettiin. Ryhmä teki PE(%)-määritykset sekä melanoomasyöpäsolulinjan soluilla sekä terveen kudoksen fibroblastisoluilla. Melanoomasolulinjan soluista eli IGR39D:stä osa transfektoitiin c-myc-onkogeenillä (IGRmyc) ja osalla indusoitiin N-ras-mutaatio (IGRras). Solulinjalle, joka transfektoitiin noemysiinifosfotransferaasiresistenssigeenillä (resistenssi G418-proteiiniin), toimi kontrollina (IGRneo). Fibroblastisolut olivat vuorostaan peräisin potilailta, jotka olivat parhaillaan sädeherkistystutkimuksissa liittyen rintasyövän hoitoon ja sen jälkivaikutuksiin. Näistä eroteltiin vielä kaksi sädeherkkää solulinjaa (eri SF-tekijän arvot) BAR1 ja S33, joita tarkasteltiin koloniamuodostustutkimuksissa verrokkina syöpäsolunäytteelle. Tutkimuksessa havaittiin, että syöpäsolujen PE(%):t vaihtelivat 20–50 %:n välillä ja fibroblastien 6-50 %. Transfektoituneiden melanoomasolujen annettiin kasvaa joko eksponentiaalisesti tai konfluenteiksi kasvustoiksi, jonka jälkeen ne siirrostettiin kasvamaan 60 mm:n petrialjoille. Jokaisesta yksiköstä tehtiin kolme eri solutilavuuden siirrostusta omille maljoilleen, joissa solujen annettiin kiinnittyä uudelle alustalleen 4 h. Tämän jälkeen solut säteilytettiin (0 – 4,0 Gy) ja niiden annettiin muodostaa kolonioita lämpökappissa. Fibroblasteilla koeprotokolla poikkesi melanoomasolujen suhteen siten, että niillä säteilyvoimakkuuden vaihteluväli oli 0-3,0 Gy. Säteilyttämisen jälkeen ne siirrostettiin 100 ml:n petrialjoille 3-5 eri solutiheyksillä, joista jokaisesta tehtiin kaksi otosta. 2-3 viikon inkubaation jälkeen petrialjoille muodostuneet koloniat laskettiin. Tässä koejärjestelyssä solukolonian kooksi määriteltiin 50 solun rykelmä. Fibroblastikokeiden johtopäätöksenä ryhmä totesi, että solujen kolonian muodostuminen noudatti lineaarista suhdetta 100 ml:n alustalla 70 yksikköön saakka, jonka jälkeen määrä romahti riippumatta alustalle siirrostettujen solujen määrästä. Sama havainto tehtiin myös melanoomasoluilla, mutta alhaisemmilla kolonialuvuilla. Siirrostuspinta-alan kasvatus lisäsi kolonioiden määrää, josta ryhmä päätteli solujen välisten interaktioiden vaikuttavan solupopulaatiorykelmien muotoutumiseen. Säteilyttämiskokeiden tuloksista vastaavasti kävi ilmi, että kolonian muodostaminen suhteessa säteilyannoksen voimakkuuteen ja siirrostettujen solujen määrään vaihteli. Tästä ryhmä laski kolmella

eri tavalla saamiensa tulosten arvot, joiden pohjalta he saivat muodostettua lineaarisen regression annos-vastesuhteelle. Tutkimusryhmä painottikin erityisesti artikkelin lopussa samaa havaintoa, joka pro gradu-tutkielman yhteydessä havaittiin: jokainen solulinja on omanlaisensa yksikkö, jolle on syytä tehdä perusteellinen kokeellinen ominaisuustarkastelu ennen varsinaisten tutkimusten aloittamista (Pomp ym. 1996).

4.3 siRNA-tutkimus HIF-1 α :lla

Geenien toiminnallisuuden tutkimuksessa eräs käyttökelpoinen menetelmä on soveltaa siRNA:ta, kuten tutkielman luvuissa 1. ja 2. todettiin. Sen avulla voidaan tarkastella, kuinka esimerkiksi päältä pois kytketty geeni vaikuttaa solun kokonaistoimintaan altistettaessa sitä esimerkiksi jollekin ulkoiselle pakotteelle (sädehoito tai lääkitys) tai tarkemmassa mittakaavassa, kuinka sen proteiiniekspressiotasot mahdollisesti muuttuvat.

Pään ja kaulan alueen syöpien yhdistelmähoidoissa, joissa tärkein terapeutinen pääkomponentti on sädehoito, käytetään kemoterapeuttisia lääkkeitä. Näiden tehtävä on kasvattaa syöpäsolujen sädeherkkyttä sekä indusoida näissä solupopulaatioissa suurempaa solukuolleisuutta. Hypoksiaan liittyvä HIF-1 α -domeenin stabiliteetti, mikä vastaavasti viittaa geenin toiminnalliseen aktiivisuuteen, on tiedostettu syövän molekyylibiologiatutkijoiden keskuudessa jo pitkään. Nykyisinkin tarkastelun kohteena on muun muassa se, kuinka esimerkiksi jo käytössä olevien syöpälääkkeiden teho muuttuu, jos siRNA:n avulla voidaan ”sammuttaa” toiminnallinen HIF-1 α -geeni ja tämän jälkeen altistaa soluja eri lääkepitoisuuksille kombinoituna hypoksiaan ja säteilyttämiseen. Solujen eloonjääminen sekä ekspressoituvat HIF-1 α -proteiinit viittaavat *in vitro*-kokeissa antavat viitekehykset syöpähoitojen kehitykselle ja perustutkimusta tällä saralla tehdään ahkerasti.

Syöpäsolujen ekspressioprofiilit vaikuttavat siihen, mitä täsmälääkitystä voidaan potilaalle antaa. Syövät, joissa ilmenee EGFR-yliekspressiota, ovat melko resistenttejä sädehoidolle. Tästä syystä näille potilaille suositellaan Cetuximab-lääkitystä. Cetuximab sitoutuu EGFR:ään pysäyttäen tällöin solun sisäisen signalointiketjun, joka indusoisi syövän etenemistä mahdollisesti edistävän geeniekspression aktivoitumista. Olennaisinta hoidon onnistumisen kannalta on hapen läsnäolo kasvainympäristössä, joten hapettomissa kasvaimissa Cetuximab-lääkityksen vaikutus jäänee vähäiseksi. Lu ryhmineen julkaisi tutkimuksen 2012, jossa tarkasteltiin HIF-1 α -geenin vaimentamisen

sekä Cetuximab-yhdistelmähoidon vaikutusta solujen sädehoitoherkkyyteen. Tutkimuksessa todettiin, että syöpäsolujen sädeherkkyys kasvoi Cetuximab-lisäyksen yhteydessä ja herkkyys lisääntyi, mikäli HIF-1 α -geeni hiljennettiin siRNA-välitteisesti (Lu ym. 2012).

Perustutkimusta HIF-1 α -vaimennoksista siRNA:n avulla on tehty myös muissakin syöpätapauksissa. Esimerkiksi Huang ryhmineen julkaisi 2012 tutkimuksen eturauhassyövästä, jossa he hiljensivät HIF-1 α -geenin siRNA-välitteisesti ja tarkastelivat, kuinka pitkään vaimennos pysyi stabiilina. Ryhmä havaitsi, että geenin vaimennustila oli proteiiniekspressiotasolla voimakkaimmillaan heidän PC3-solulinjallaan 48–72 tuntia transfektiosta. Geenin vaimennus purkaantui vähitellen ja proteiiniekspressiotila palautui normaalitasolle viikon sisässä (Huang ym. 2012).

4.4 Tulevaisuuden näkymät

Monipuolinen ja kattava tutkimus pään ja kaulan alueen syövästä tarjoaa runsaasti pohjatietoa, josta nykytutkimus ja -tietämys lisääntyvät. Eri yliopistot ja niihin liittyvät keskussairaalat tarjoavat ihanteellisen ympäristön kerätä potilasmateriaalia. Ne takaavat tämän lisäksi osaavaa ammattihenkilöstöä ja laitteiston, joilla moniammatillinen yhteisö voi tuottaa sekä tieteelle elintärkeää perustutkimusta että taata uutta hoidollista näkökulmaa syövän voittamiseksi.

Pro gradu – tutkielmassa tarkasteltiin neljää pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomakasvaimista perustettua solulinjaa (UT-SCC-8, -25, -34 ja -74A) havainnoimalla niiden kasvua sekä vastetta sädehoitoon. Lisäksi tarkastelun kohteena oli soluissa ilmentyvä transkriptionfaktori HIF-1-proteiinin α -domeeni hypoksiassa proteomisin menetelmin. Tarkastelu kohdistettiin perustutkimukseen ajankäytöllisistä syistä ja koejärjestelyt rajattiin lopulta koskemaan vain transkriptiofaktori HIF-1 α :a.

Eksperimenttien vähäisyydestä huolimatta minulle tarjoutui hieno mahdollisuus päästä henkilökohtaisesti tekemään syöpätutkimukseen liittyvää tutkimusta ja perehtyä sen haasteisiin. Yllättävintä ja innostavinta oli havaita syövän monimuotoisuus ja – ennalta arvaamattomuus suhteutettuna kokeiden lopputulosten arviointiin sekä solujen ulkonäköön ja käytökseen: UT-SCC-8 ja UT-SCC-34 sekä UT-SCC-25 ja UT-SCC-74A, jotka olivat eristetty samoista anatomisista rakenteista (kurkunpää ja kieli),

näyttivät kukin omanlaisiltaan tyypeiltä, ja niiden yhdistäminen samaan elimeen oli mahdotonta. Kasvua, resistenssiä trypsiinille, eri olosuhteiden sietokykyä ja muita ominaisuuksia oli myös hyvin vaikeaa arvioida. Tästä syystä jokaista käyttöön otettua solulinjaa oli tarkasteltava erikseen, jotta kokeiden toteuttaminen olisi ollut mahdollista ja virheen todennäköisyys olisi minimoitu. Syöpä oli aiheuttanut jo mitä ilmeisimmin solujen geneettisessä säätelykoneistossa riittävästi solujen fenotyyppiin ja aineenvaihduntaan vaikuttavia mutaatioita. Näiden seurauksena solut poikkesivat toisistaan ulkonäöllisesti sekä toiminnallisesti täysin eikä niissä ollut enää jäljellä kyseiselle kudokselle tyypillisten solujen piirteitä, joista ne olisi voinut identifioida levyepiteelin soluiksi.

Tutkielman teon yhteydessä olisi ollut mielenkiintoista tutkia linjakohtaisesti solujen kasvua pidempikestoisella PE(%)-määrityksellä: olisin halunnut tarkastella, miten pidempi kiinnittymisaika olisi vaikuttanut PE(%)-lukemaan solulinjakohtaisesti. Tämä erityisesti siitä syystä, että joistain solulinjoista saadut PE(%)-tulokset olivat suhteellisen heikkoja (UT-SCC-8) verrattuna taas toiseen äärilaitaan (UT-SCC-74A). Avoimeksi kysymykseksi jääkin, olisiko näissä lukemissa tapahtunut vaihtelua – erojen kaventumista tai kenties mahdollisen kontakti-inhibition vaikutusten sisällyttämistä ja sen ilmentymistä tuloksissa. Olisi ollut myös mielenkiintoista havainnoida solujen PE(%)-tehokkuutta erisuuruilla solumäärillä linjakohtaisesti esimerkiksi siirrostamalla samasta solulinjasta aina erisuuruinen solupopulaatio otos 6-kuoppalevyn kaivolle ja havainnoida näiden kasvua ajan funktiona. Näin olisi voinut tarkastella solumäärän vaikutusta suhteessa PE(%)-lukemaan soluilla. Tällä kertaa havainnot ja PE(%)-määrityksen arvot jäivät siis informatiivisesti melko suppeiksi, jonka vuoksi laajalaisempi tarkastelu olisi ollut hyvä toteuttaa kyseisillä solulinjoilla.

Lisäksi olisi ollut mielenkiintoista tehdä vastaavanlaiset sädeherkkyysmääritykset myös tutkielman muille solulinjoille samoilla sädeannoksilla ja vertailla eri linjojen herkkyyttä keskenään. Tämä olisi tuonut hyvää materiaalia vertailuun mahdollisista linjakohtaisista eroista säteilylle ja vahvistanut kirjallisuuslähteiden tarjoamaa tietoa. Olisi ollut myös hyvä tutkia myös vertailun vuoksi solujen suhtautumista erilaisiin sädeannostelutekniikoihin ja – annossuuruuksiin: olisivatko SF-arvot muuttuneet eli olisiko eloonjäämisessä tapahtunut muutoksia? Tästä olisi voinut määrittää uuden eloonjäämistä kuvaavan käyrän, josta laskettua AUC-arvoa olisi voinut verrata jo saatuun tulokseen ja tämän perusteella miettiä sädehoitoa ihan yleisesti levyepiteelikarsinooman hoitomuotona. Myöhemmin luettuani säderesistenssikokeista,

joissa yhdisteltiin kemoterapeuttisia lääkkeitä sekä siRNA-tekniikkaa, mielenkiintoni heräsi myös näihin koejärjestelyihin. Erityisesti Lun ryhmänsä kanssa tekemät kokeet HNSCC-solujen kanssa, jossa tarkasteltiin solujen ekspressioprofiilin vaikutuksia Cetuximabin herkistysvaikutuksiin sekä sädehoidon tehokkuuteen, olisi ollut kiintoisaa toteuttaa pro gradu-tutkielman UT-SCC-linjan soluilla (Lu ym 2012).

Pro gradu – tutkielmassa päätarkastelun kohteena oli hypoksia ja siihen liittyvä HIF-1 α :n geeniekspressio, sen tutkiminen ja todentaminen molekyylibiologisin menetelmin. Monien lähdemateriaalien päähypoteesi oli, että hypoksia aiheutti pään ja kaulan alueen syöpäkasvaimissa sädehoitoresistenssiä. Hypoksian oli osoitettu aktivoivan solun sisällä HIF-1-transkriptiofaktoridimeerin, jonka alayksiköistä α -domeenin oli osoitettu olevan reaktioketjussa hapen säätelemän hajotuksen alaisuudessa. Prosessiin osallisina mainittiin erityisesti prolyylylihydroksylaasi-1 – 3-proteiinit (PHD1-3) sekä VHL-tekijän merkitys (engl. von Hippel-Lindau tumour-suppressor protein) post-translaationaalisessa HIF-1 α muokkaamisessa, jotta kyseinen alayksikkö ohjautuisi hajotettavaksi. Alun perin pro gradu-tutkielman koejärjestelysuunnitelmassa oli alustavasti harkittu siRNA-vaimennuksen toteuttaminen HIF-1 α :n lisäksi myös PHD2- ja PHD3-geeneille. Vaimennuksen jälkeen koejärjestelyn solut olisi altistettu hypoksialle ja tuloksia olisi tarkasteltu western blot-analyysillä. Ajan puutteen ja solulinjan haastavuuden vuoksi geenihiljennös toteutettiin vain HIF-1 α :lle. Olisikin ollut mielenkiintoista tarkastella myös näiden muiden proteenien ekspressiotason muutosta sekä niiden liittymistä varsinaisen HIF-1 α :n stabiliteettiin proteiinitasolla vasta-aineleimausten ja western blot-analyysin avulla.

HIF-1-transkriptiofaktori indusoi soluissa monia hypoksisiin olosuhteisiin sopeuttavia proteiineja, joiden tehtävä oli parantaa niiden selviytymismahdollisuuksia näissä olosuhteissa. Monissa lähdemateriaaleissa oli listattu useita eri aineenvaihduntaan vaikuttavia, ionitasapainoa ylläpitäviä, kasvutekijöiden signaaleihin reagoivia ja metastasointiin liittyviä proteiineja. Olisi ollut mielenkiintoista tarkastella UT-SCC-linjan soluja, joista olisi todennettu HIF-1-aktiivisuus hypoksia-altistuksen jälkeen perusteellisemmalla molekyylibiologisella analyysillä. Tämä olisi kuitenkin kasvattanut tutkielman koejärjestelyjen määrää niin suureksi, että ajankäytöllisesti tämä osa rajattiin tutkielmasta kokonaisuudessaan pois. Myös diagnostiikkaan liittyvä hypoksian kuvantaminen radioaktiivisin merkkiainein jätettiin pois tutkielmasta.

Tästä huolimatta perustutkimusta proteiinien ekspressiotasojen määrittämisestä hypoksisissa kasvaimissa on syytä jatkaa yhdistäen tähän hoidon suunnitteluun liittyvän perspektiivin, joka käsittää sekä sädehoidon että kemoterapian. Hypoksian on osoitettu olevan huono prognostinen merkki. Tämä itsessään tukee olemassa olevaa näkemystä havainnoida kokonaisvaltaisemmin kasvaimen fysiologista ympäristöä kudostasolla sekä sitä, mitä solujen sisäisessä koneistossa tapahtuu syövän edetessä. Ympäristö, jossa solut elävät vaikuttaa niiden homeostasiaan, jota vastaavasti genotyyppi ohjaa. Ymmärrys tästä voi mahdollistaa tarkempien potilaskohtaisten syöpähoitojen suunnittelua ja lisätä hoidon onnistumisen todennäköisyyttä. Jo pitkään on puhuttu syövän markkerien eli syövässä normaalia ekspressiotasoa runsaammin ilmentyvien proteiinien diagnostisesta merkityksestä. Hypoksisen kasvaimen havainnointi kuvantamisella ja tästä parempien radioaktiivisten merkkiaineiden kehittäminen – kasvaimen proteiiniekspression tarkastelu ja siitä yhtenäisten linjausten löytyminen. Nämä voivat mahdollisesti parantaa monen pään ja kaulan alueen syöpää sairastavan potilaan elämän laatua.

KIITOKSET

Sanotaan, että pro gradu-tutkielman kirjoittaminen on oppimisprosessi ja matka. Koen, että omalla kohdallani se oli juurikin sitä: reitti voi olla joskus mutkia ja hankalia taipaleita täynnä. Niistä kuitenkin aina selviää, kunhan ei vain anna periksi ja malttaa olla vastaanottavainen hyvälle neuvoille.

Ensimmäkin haluan lausua kiitokseni Jonna Silénille, jonka ohjaamana aloitin tutkielmani. Jonna soi minulle mahdollisuuden työskennellä innostavassa Turun yliopiston valtakunnallisen PET-keskuksen prekliinisessä tutkimusyksikössä Medicity PET:ssä. Olen hänelle tästä tilaisuudesta sekä hänen kärsivällisyydestään erittäin kiitollinen ja toivon hänelle menestystä omalle uralleen. Lisäksi haluan kiittää myös toista ohjaajaani Tove Grönroosia opastuksesta sekä kaikesta tuesta Medicity PET:ssä.

Erityisen suuren kiitoksen ansaitsee Turun yliopiston lehtori Tiina Henttinen, joka jatkoi pro gradu-ohjaajanani Jonnan siirryttyä muihin toimiin. Olen kiitollinen hänelle ajastaan, yhtälailla kärsivällisyydestään ja – viisaista neuvoista. Ilman Tiinan apua, en välttämättä katsoisi tätä valmista pakettia vielä tälläkään hetkellä.

Haluan kiittää myös muita tutkielmani kokeellisissa osuuksissa minua avustaneita henkilöitä: te opetitte minulle solubiologiasta käytännön sanelemana paljon ja avullanne sain pro graduni koejärjestelyt mahdollistettua. Kiitos Jarmo Kulmalalle sekä Sami Suilamolle TYKS:n onkologian osastolle säteilyttämiskokeista sekä laskennallisesta avusta. Haluan lisäksi kiittää BTK:n Heidi Högeliä molekyylibiologisten töiden käytäntöihin liittyvistä neuvoista ja ajastaan. Haluan kiittää myös Heikki Minniä, Reidar Grénmania sekä muita Medicity PET:n henkilöstön jäseniä avustanne.

Kiitos minua tukeneelle lähipiirilleni. Ystävät – ilman teitä sekä kahvia, tästä hommasta ei olisi tullut mitään. Jaksoitte kannustaa ja tukea minua näinä kuluneina viime vuosina, jotka ovat olleet tähänastisen elämäni vaikeimmat. Hanna, Kaisa, Heidi, Tiina, Ulpu, Laura, Pauli L., fysiikan laitoksen pojat, Turun yliopistoliikunnan porukat, Ossi, Olavi ja ”stadin jengi” – kiitti!

Viimeisimpänä se tärkein: kiitos perheelleni tuesta. Olitte aina mukana tällä matkalla – Kontion ja Soljan sisulla, se saatettiin loppuun ja on nyt tässä! Matka jatkuu.

Riina

KIRJALLISUUSLÄHTEET

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008) Head and neck cancer. *Lancet* 371:1695-1709.

Bernier J, Hall EJ, Giaccia A (2004) Radiation oncology: a century of achievements. *Nature Reviews Cancer* 4:737-747.

Boerner LK (2010) Of HeLa and Human Lives. *Science* 327:1081-1082.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D (1995) Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine* 332:712-717.

Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257.

Chaudary N, Hill RP (2007) Hypoxia and metastasis. *Clinical Cancer Research* 13:1947-1949.

Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, Shockley WW, Weissler MC, Dressler LG, Shores CG, Yarbrough WG, Perou CM (2004) Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 5:489-500.

Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Reviews Cancer* 8:425-437

Erjala K (2006) *Head and neck cancer : chemosensitivity to vinorelbine concomitant with radiation and gefitinib in vitro*. Turun yliopisto. Turku.

Ferrara N (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer* 2:795-803.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001) Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine* 345:1890-1900.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

Harris AL (2002) Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer* 2:38-47.

- Harrison L, Blackwell K (2004) Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy. *The Oncologist* 9(5):31-40.
- Huang Y, Yu J, Yan C, Hou J, Pu J, Zhang G, Fu Z, Wang X (2012) Effect of small interfering RNA targeting hypoxia-inducible factor-1 α on radiosensitivity of PC3 cell line. *Urology* 79:744.e17-744.e24.
- Hudson TJ (2013) Genome variation and personalized cancer medicine. *Journal of Internal Medicine* 274:440 – 450.
- Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR (2005) Profiling early head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 5:127-135.
- Höckel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93:266-276.
- Isa AY, Ward TH, West CM, Slevin NJ, Homer JJ (2006) Hypoxia in head and neck cancer. *The British Journal of Radiology* 79:791-798.
- Karpala AJ, Doran TJ, Bean AG (2005) Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. *Immunology and Cell Biology* 83:211-216.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- La Fleur L, Johansson A-C, Roberg K (2012) A CD44^{high}/EGFR^{low} subpopulation within head and neck cancer cell lines shows an epithelial-mesenchymal transition phenotype and resistance to treatment. *PlosOne* 7(9): e44071.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 11:9-22.
- Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, Ferris RL, Lai SY (2007) Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head And Neck* 29: 163-188.
- Lu H, Liang K, Lu Y, Fan Z (2012) The anti-EGFR antibody cetuximab sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma cells to radiation in part through inhibiting radiation-induced upregulation of HIF-1 α . *Cancer Letters* 322:78-85.
- Malaise EP, Fertil B, Chavaudra N, Guichard M (1986) Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: comparison of in vitro to in vivo data. *International Journal of Radiation Oncology* 12:617-624.
- Mandic R, Rodgarkia-Dara CJ, Krohn V, Wiegand S, Grénman R, Werner JA (2009) Cisplatin resistance of the HNSCC cell line UT-SCC-26A can be overcome by stimulation of the EGF-Receptor. *Anticancer Research* 29:1181-1188.

Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, Jelkmann, W Jaakkola P.; Metzen E (2004) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *The Biochemical Journal* 381:761-767.

Minn H, Gronroos TJ, Komar G, Eskola O, Lehtio K, Tuomela J, Seppänen M, Solin O (2008) Imaging of tumor hypoxia to predict treatment sensitivity. *Current Pharmaceutical Design* 14:2932-2942.

Mocellin S, Provezano M (2004) RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of Translational Medicine* 2:39.

Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW (1955) Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Research* 15:598-602.

Nguyen PT, Tsunematsu T, Yanagisawa S, Kudo Y, Miyauchi M, Kamata N, Takata T (2013) The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal–epithelial transition through the transcription factor AP-1. *British Journal of Cancer* 109:2248–2258.

Pai SI, Westra WH (2009) Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annual Review of Pathology* 4:49-70.

Patel SH, Shah JP (2005) TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *A Cancer Journal for Clinicians* 55:242-258.

Pekkola-Heino K (1992) *Radiation response of squamous cell carcinoma : in vitro studies with cell lines in a 96-well plate clonogenic assay*. Turun yliopisto. Turku.

Pekkola-Heino K, Jaakkola M, Kulmala J, Grénman R (1995) Comparison of cellular radiosensitivity between different localizations of head and neck squamous-cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 121:452-456.

Pekkola-Heino K, Kulmala J, Grénman R (1992) Sublethal damage repair in squamous cell carcinoma cell lines. *Head and neck* 14: 196-199.

Pomp J, Wike JL, Ouwerkerk IJM, Hoogstraten C, Davelaar J, Schrier PI, Leer JWH, Thames HD, Brock WA (1996) Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiotherapy and Oncology* 40:121-125.

Raitanen M, Pulkkinen J, Kulmala J, Grénman R (2004) Head and neck squamous cell carcinoma cell lines are highly sensitive to the new taxanes, BMS-184476, BMS-188797, *in vitro*. *Anticancer Research* 24:3769-3774.

- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3:721-732.
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1):76-85.
- Sotiriou C, Lothaire P, Dequanter D, Cardoso F, Awada A (2004) Molecular profiling of head and neck tumors. *Current Opinion in Oncology* 16:211-214.
- Sun X, Niu G, Chan N, Shen B, Chen X (2011) Tumor hypoxia imaging. *Molecular Imaging and Biology* 13:399-410.
- Vandersickel V, Slabbert J, Thierens H, Vral A (2011) Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. *Radiation Measurements* 46:72-75.
- Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H, Chindavijak K, Sontipong S, Sriamporn H, Parkin DM, Ferlay J (1995) Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 4:475-483.
- Vaupel P (2004) Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Seminars in Radiation Oncology* 14:198-206.
- Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan S, Zabolotny D, Kienzer H-R, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemayer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R (2008) Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine* 359:1116-1127.
- Vermorken JB, Specenier P (2010) Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Annals of Oncology* 21(7):252-261.
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993) Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine* 328:184-194.
- Voorhoeve PM, Agami R (2003) Knockdown stands up. *Trends in Biotechnology* 21:2-4.
- Wilson WR, Hay MP (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 11:393-410.

MENETELMÄOHJEET SOLUVILJELYYN

Solujen sulatus ja viljelmän perustaminen

1. Sulata soluampulli käsissä, kunnes sen sisältö muuttuu hileiseksi. Yhdistä sen sisältö laminaarissa falcon-putkeen, johon on valmiiksi pipetoitu 5 ml lämmintä kasvatusmediumia. Sekoita varovasti pipetoimalla edes ja takaisin.
2. Sentrifugoi 1400 rpm / 5min. Kaada supernatantti pois ja resuspendoi pelletti 2 ml:aan kasvatusmediumia.
3. Jaa solususpensio pienempinä tilavuuserinä T25-kasvatuspulloihin (pohjan pinta-ala 25 cm²) ja lisää tähän määrään suhteutettu tilavuus kasvatusmediumia. Jakosuhte riippuu solujen kasvunopeudesta.
4. Merkitään kasvatuspulloon solulinjan nimi ja tiedot, passage-numero ja päivämäärä.
5. Siirretään kasvatuspullot soluviljelykaappiin, jossa kosteus on säädetty milliQ-vesi-tuuletusjärjestelmällä (vaiheittain suodatettua vettä, jonka ominaisvastustuskyky on 18,2 MΩ / + 25 °C), lämpötila on + 37 °C ja CO₂-pitoisuus on 5 %.

On syytä merkitä soluviljelytilan pakastuskirjanpitoon, mitä solulinjoja on aktivoitu pakastuksesta. Näin voidaan seurata tarpeen vaatiessa kunkin solulinjan varastotilannetta pakastettujen solujen suhteen.

Soluviljelmien ylläpito

Kasvatusmediumin vaihtovälit soluviljelmissä olivat joko maanantai-torstaisin tai tiistai-perjantaisin. Vanha kasvatusmedium poistettiin varovasti kääntämällä viljelypulloa lievästi kyljelleen ja pipetoimalla katon kautta. T25-kasvatuspulloihin lisättiin 5 ml ja suurempiin T75-pulloihin 15 ml tuoretta mediumia. Vaihdon jälkeen pullot suljettiin ja laitettiin takaisin soluviljelykaappiin.

Viljelmien pakastaminen

Soluviljelmät jaettiin aina, kun kolonnit peittivät pullon pohjasta noin 60–80 %. Solujen jakautumisnopeus oli jokaisessa linjassa yksilöllinen, mutta siirrostaminen ja jakaminen tehtiin aina samalla periaatteella.

1. Huuhtelee solut lisäämällä 2 × PBS.
2. Lisää 3 ml trypsiini-EDTA-irrotusliuosta (T75-pulloon 5 ml) ja anna entsyymien vaikuttaa lämpökaapissa (+ 37 °C, 5 % CO₂) 6-8 min. Tarkastele mikroskoopilla, että kaikki solut ovat irronneet pullon pohjasta.
3. Inaktivoi irrotusliuos lisäämällä 10 ml kasvatusmediumia (T75-pulloon 15 ml) kasvatuspulloon.
4. Pipetoi solususpensio falcon-putkeen ja sentrifugoi 1400 rpm / 5min.
5. Kaada supernatantti pois ja resuspendoi pelletti 2 ml kasvatusmediumia.
6. Jaa solususpensio pienempinä tilavuuserinä uusiin kasvatuspulloihin ja lisää tähän määrään suhteutettu tilavuus kasvatusmediumia. Jakosuhte riippuu solujen kasvunopeudesta.

7. Merkitse pulloon solulinjan nimi ja tiedot, passage-numero ja päivämäärä. Laita kasvatuspullo pystyasentoon.
8. Siirrä kasvatuspullo soluviljelykaappiin (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Solujen pakastaminen

1. Valmista pakastusliuos: 500 µl pakastusliuosta kohden riittää sama tilavuus solususpensiota (suhde 1: 1). Laita valmis liuos jäälle viilentymään.
2. Merkitse cryo-ampulleihin pakastettavan solulinjan nimi sekä tiedot, passage-numero sekä pakastuspäivämäärä.
3. Pipetoi kasvatusmedium katon kautta pois.
4. Huuhtelee solut lisäämällä 2 × PBS.
5. Lisää pulloon 5 ml trypsiini-EDTA-liuosta ja anna entsyymien vaikuttaa lämpökaapissa (+ 37 °C, 5 % CO₂) 6-8 min. Tarkastele irrotusliuoksen vaikutusta soluihin mikroskoopin avulla.
6. Inaktivoi irrotusliuos lisäämällä T75-pulloon 15 ml kasvatusmediumia.
7. Pipetoi solususpensio falcon-putkeen ja sentrifugoi 1400 rpm / 5min.
8. Kaada supernatantti pois ja resuspendoi pelletti 1850 µl kasvatusmediumia.
9. Pipetoi 500 µl solususpensiota cryo-ampulliin ja tämän jälkeen lisää varovasti 500 µl pakastusliuosta suspensioerän päälle. Sulje pakastusputki ja siirrä se välittömästi jäälle.
10. Aseta soluampullit nopeasti styroksiseen pakastusrasiaan pystyasentoon tukevasti ja sulje se tiiviisti teippaamalla. Kirjaa kanteen kuinka monta soluampullia se sisältää, solulinjan nimet sekä pakastuspäivämäärä. Pakastusrasia siirretään pystyasennossa vuorokaudeksi -70 °C pakkaseen.
11. Seuraavana päivänä soluampullit siirretään pakastusrasiasta syväpakkastimeen (-135 °C tai -150 °C). Pakkaseen siirretyt solut merkitään soluviljelytilan kirjanpitoon.

TUTKIELMAN KOKEELLISISSA OSUUKSISSA KÄYTETYT LIUOKSET

Soluviljely**DMEM 1X** (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Gibco 42430**L-Glutamiini** 100× 200 mM, Gibco 25030**MEM NEAA** 100× (MEM Non-Essential Amino Acids), Gibco 11140**Penisiliini-Streptomysiini** (penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 µg/ml),
Gibco 15140**FBS** (Foetal Bovine Serum), Gibco 10106**HBSS** 1× (Hanks' Balanced Salt Solution), Gibco 14170**0.5 % Trypsiini-EDTA** 10×, Gibco 15400**PBS 1X** (Phosphate-Buffered Saline pH 7.2), Gibco 20012 / Lonza N°: 5605**Dimetyylisulfoksidi DMSO**

KASVATUSMEDIUM

- 500 ml DMEM
- 50 ml FBS
- 5 ml L-Glutamiini
- 5 ml MEM NEAA
- 640 µl Penisiliini-Streptomysiini

IRROTUSLIUOS

- 500 ml HBSS
- 50 ml 0,5 % Trypsiini-EDTA

PAKASTUSLIUOS

DMSO-pitoisuus 20 % kokonaistilavuudesta, loppu täydennetään kasvatusmediumilla. Esimerkiksi 1 ml valmistetaan seuraavasti:

- 200 µl DMSO
- 800 µl kasvatusmedium }
⇒ 1000 µl pakastusliuos

96-kuoppalevyn klonogeeninen määrittäminen

Ham's F-12 Nutrient Mix 1× (F-12 Nutrient mixture (Ham), with stable glutamine), Gibco 21765

FBS (Foetal Bovine Serum), Gibco 10106

96-KUOPPALEVYN KLONOGEENISEN MÄÄRITYKSEN LIUOS:
HAM'S F-12 (15 % FBS)

- 500 ml Ham's F-12
- 75 ml FBS

Geenin hiljennyksen siRNA-sekvenssit

Scr (non-target) 5'-CCUACAUCCCGAUCGAUGAUG(dTdT)-3'

siHIF-1 α 5'-AACUAACUGGACACAGUGUGU(dTdT)-3'

Proteiinityöskentelyliuokset

10 % APS

- 5 g ammoniumpersulfaatti
- 50 ml H₂O (tislattu)

EROTUSGEELI: 10 % SDS-PAGE

- 6,2 ml H₂O
- 6,7 ml 30 % akryyliamidi
- 5 ml näytegeelin puskuriliuos
- 100 μ l 10 % APS
- 10 μ l TEMED

EROTUSGEELIN PUSKURILIUOS, 500 ml

- 90,75 mg Tris
- 20 ml 10 % SDS
- 400 ml H₂O

Säädetään pH 8,8:ksi. Täytetään vedellä 500 ml:ksi.

LATAUSGEELI: 10 % SDS-PAGE

- 6,5 ml H₂O
- 1,3 ml 30 % akryyliamidi (National Diagnostics)
- 2,5 ml latausgeelin puskuriliuos
- 90 µl 10 % APS
- 10 µl TEMED

LATAUSGEELIN PUSKURILIUOS, 500 ml

- 30,3 mg Tris
- 20 ml 10 % SDS
- 400 ml H₂O

Säädetään pH 6,8:ksi. Täytetään vedellä 500 ml:ksi.

5 % MAITOJAUHE-PBST–PBST, 500 ml

- 25 g rasvaton maitojauhe (Valio)

Täytetään 1xPBST:llä 500 ml:ksi.

10 X PBS, 1 litra

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 26,8 g Na₂PO₄·7 H₂O
- 2,4 g KH₂PO₄
- 800 ml H₂O

Säädetään pH 7,4:ksi. Täytetään 1 litraksi vedellä.

1 X PBST, 10 litraa

- 10 ml Tween-20 (Fluka)
- 1000 ml 10xPBS
- 8990 ml MQ-H₂O

SDS-PAGE 4 X ELEKTRODIPUSKURI ELI AJOLIUOS, 4 litraa

- 456 g glysiiniä
- 97 g Tris
- 160 ml 10 % SDS
- 64 ml 0,5 M EDTA

Täytetään vedellä 4 litraksi.

6 X SDS-NÄYTEPUSKURI

- 35 ml latausgeelin puskuriliuos
- 15 ml glyseroli
- 5 g SDS
- 3 ml β -merkaptoetanol
- 6 mg bromifenolisininen

10 X WESTERN-SIIRROSTUSPUSKURI, 1 litra

- 38,75 g Tris
- 187,5 g glysiini

Täytetään vedellä 1 litraksi.

1 X WESTERN-SIIRROSTUSPUSKURI, 1 litra

- 100 ml 10xWestern-siirrostuspuskuri
- 900 ml MQ-H₂O

Käyttöliuosta varten:

- 800 ml 1xWestern-siirrostuspuskuri
- 200 ml metanoli

Primääriset vasta-aineliuokset

WESTERN-BLOT, β -AKTIINIVASTA-AINE, 5 ml

- 5 ml 5 % maito-PBST
- 1 μ l Ac-74 –vasta-aine (Sigma-Aldrich)

WESTERN-BLOT, HIF-1 α –VASTA-AINE, 5 ml

- 5 ml 5 % maito-PBST
- 1,5 μ l HIF-1 α –vasta-aine (BD Biosciences)

Sekundääriset vasta-aineliuokset

HIIREN IgG-VASTA-AINELIUOS

- 5 ml 5 % maito-PBST
- 1 μ l polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP (DakoCytomation)

SÄDERESISTENSSI MÄÄRITYKSEN LAIMENNOSLASKUT KOEJÄRJESTELYIHIN

Esimerkkilasku, miten määritettin jokainen säderesistenssimittauksen koesarjaan pipetoitavan kantaliuoksen tilavuus. Laskuissa käytetään pääasiassa vain kaavaa 5. yhdellä yhdisteellä.

$$c = \frac{n}{V} \quad (\text{kaava 5., muokattu})$$

$$\Leftrightarrow n = c \times V \quad (\text{kaava 5.1})$$

$$\Leftrightarrow V = n \times c \quad (\text{kaava 5.2})$$

Laskuissa esiintyi muutama numeroarvo, joka koeasetteluista johtuen pidettiin vakioina. Näitä olivat:

96-kuoppalevyn yhteen kuoppaan pipetoitavan solususpension tilavuus

- $V(\text{solususpensio})_{96\text{-kuoppal.}} = 200 \mu\text{l}$

solususpension kokonaistilavuus (kokonaistilavuus, josta $V(\text{solususpensio})_{96\text{-kuoppal.}}$ pipetoitiin lopulta)

- $V(\text{laimennos})_{\text{susp.}} = 50 \text{ ml}$

alkuperäisen kantaliuoksen solupitoisuus millilitraa kohden

- $c(\text{solupitoisuus})_{\text{stokki}} = 4167 \text{ solua/ml}$

Loput laskuissa käytetyt sekä näiden avulla määritetyt muuttujat on luetteloitu taulukossa 6. Samassa taulukossa on esitetty myös kullekin solumäärälle optimoidut säteilyannokset.

Ensin määritetään vain yhteen 96-kuoppalevyn kuoppaan pipetoivan solumäärän pitoisuus millilitraa kohden.

$$\left. \begin{array}{l} n(\text{solumäärä})_{96\text{-kuoppal.}} = 2 \text{ solua} \\ V(\text{solususpensio})_{96\text{-kuoppal.}} = 200 \mu\text{l} \end{array} \right\} (\text{Kaava 5})$$

$$\begin{aligned} c(\text{solupitoisuus})_{96\text{-kuoppal.}} &= \frac{2 \text{ solua/kuoppa}}{200 \mu\text{l/kuoppa}} \\ &= 0,01 \text{ solua}/\mu\text{l} \Leftrightarrow 10 \text{ solua/ml} \end{aligned}$$

Seuraavaksi lasketaan kuinka monta solua sisältäisi tilavuudeltaan 50 ml:n suspensiolaimennos, jonka solupitoisuus määritettiin edellisessä laskussa.

$$\begin{array}{l}
 c(\text{solumäärä})_{96\text{-kuoppal.}} = 10 \text{ solua/ml} \\
 V(\text{laimennos})_{\text{susp.}} = 50 \text{ ml} \\
 n(\text{solumäärä})_{\text{susp.}} = 10 \text{ solua/ml} \times 50 \text{ ml} \\
 = 500 \text{ solua}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} c(\text{solumäärä})_{96\text{-kuoppal.}} = 10 \text{ solua/ml} \\ V(\text{laimennos})_{\text{susp.}} = 50 \text{ ml} \end{array}} \right\} \text{(Kaava 5.1)}$$

Tämän jälkeen voidaan laskea, kuinka suuri tilavuus kantaliuksesta on pipetoitava, jotta valmistettavassa solususpensiolaimennoksessa olisi lopulta oikea määrä soluja.

$$\begin{array}{l}
 n(\text{solumäärä})_{\text{susp.}} = 500 \text{ solua} \\
 c(\text{solupitoisuus})_{\text{stokki}} = 4167 \text{ solua/ml} \\
 V_{\text{stokki}} = 500 \text{ solua} \times 4167 \text{ solua/ml} \\
 = 0,11999 \text{ ml} \Leftrightarrow 120 \mu\text{l}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} n(\text{solumäärä})_{\text{susp.}} = 500 \text{ solua} \\ c(\text{solupitoisuus})_{\text{stokki}} = 4167 \text{ solua/ml} \end{array}} \right\} \text{(Kaava 5.2)}$$

Muut koejärjestelyssä tarvittavat laimennokset lasketaan samalla periaatteella.

SÄTEILYTYS-PROTOKOLLA

Solujen irrotus

- 2 × (2 – 3) ml PBS
- 1 × 2 ml trypsiini/EDTA-irrotusliuos + 6 – 8 min. inkubaatio lämpökaapissa
- fuugaus: 1400 rpm/5 min., kaada supernatantti pois ja säilytä pelletti

Solujen laskeminen

- resuspendoi pelletti 850 µl kasvatusmediumia:sekoita hyvin, mutta älä vaahdota
- pipetoi bürker-laskukammioon 28 µl solususpensiota ja laske solut, tee tämä 3 kertaa
- laske näiden kolmen keskiarvo: tuloksena on solumäärä/ml

Ensiökantaliuoksen valmistus

- a.) suspension kokonaistilavuus on solulaskujen jälkeen:

$$1000 \mu\text{l} - (3 \times 28 \mu\text{l}) = \underline{916 \mu\text{l}} \Leftrightarrow 0,916 \text{ ml}$$

- b.) kokonaissolumäärä (suspensiosta):

$$0,916 \text{ ml} \times \text{solumäärä/ml} = \text{tot.solumäärä}$$

soluja kokeeseen vähintään:

$$3 \text{ ml} \times 4167 \text{ solua/ml} = 12501 \text{ solua}$$

- c.) lopullisen ensiökantaliuoksen tilavuus = 3 ml

Huomioi:

- jos kohdan b. tot.solumäärä on selvästi suurempi: pipetoi 12501 solua uuteen falcon-putkeen ja täydennä 3 ml:iin
- jos kohdan b. tot.solumäärä on melkein sama kuin 12501 solua (esim.13000 solua), niin lasketilavuus, joka on pipetoitava pois, jotta solumäärä täsmäisi (=12501 solua). Vasta tämän jälkeen täydennä 3 ml:iin.
- jos soluja on liian vähän, niin irrotetaan yksi 6-kuoppalevyn kuoppa

Koeputkien valmistus ja merkitseminen

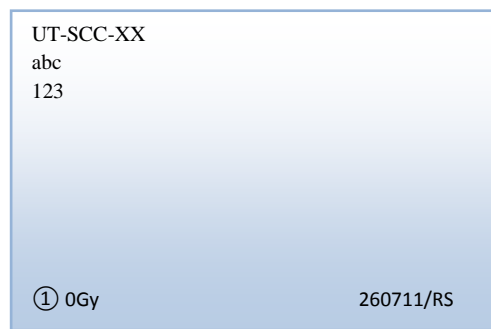
- pipetoidaan 6 × Falcon-putkiin 50 ml Ham's F-12 – mediumia, jossa 15 % FBS:ää
- putket numeroidaan (1 – 6) ja merkitään säteilytysannokset ja pipetoidaan taulukossa luetellut tilavuudet ensiökantaliuoksesta:

koeputkinumero	1	2	3	4	5	6
säteilyannos (Gy)	0	0,75	1,25	2,5	5	7,5
<i>V</i> _{ensikantaliuos} (μl)	120	180	240	480	600	960

- putket kuljetetaan T-sairaalaan onkologian osastolle säteilytettäväksi
Huomioi: putkia heiluteltava tasaisin väliajoin koko matkan aikana: sekä menettä paluumatkalla

96-kuoppalevyille pipetointi

- alkuvalmistelut:
 - o iso dekka jäteastiaksi pipetinkärkeä varten (laminaariin)
 - o liekitetään kukin Falcon-putki ennen kun se kaadetaan kanavapipetin autoklaavattuun kaukaloon
 - o tarkista, että pipetti on säädetty 200μl:an tilavuuteen
- pipetoi 96-kuoppalevyille 200 μl:n tilavuus näytettä
- merkitse kuoppalevyt kuvan mukaisesti: solulinja, Falcon-putken numero, sädeannos, pvm: KUOPPALEVYJÄ TULEE 2 × SÄTEILYANNOS



- kääri muovipussiin tiiviisti teipaten
- anna olla soluviljelykaapissa 3 – 4 viikkoa

SF-TEKIJÄN LASKEMINEN, esimerkki

Pro gradu-tutkielman SF-tekijä laskettiin kaavan 3. mukaisesti:

$$SF = \frac{\left(\frac{\text{positiivisten kaivojen lkm}}{\text{kaivoon siirrostettujen solujen lkm}} \right) \times \text{kontrollikaivoon siirrostettujen solujen lkm}}{\text{positiivisten kontrollikaivojen lkm}}$$

(kaava 3.)

Laskuissa käytetyt arvot on listattu taulukoissa 6. ja 9., joista seuraavaksi lasketaan esimerkkinä taulukon 10. tuloksista kohta 2011/1. seuraavilla tiedoilla:

- säteilyannoksen suuruus 0,75 Gy
- positiivisten kaivojen lukumäärä: 57 (taulukko 9.)
- kaivoon siirrostettujen solujen lukumäärä: 3 (taulukko 6.)
- kontrollikaivoon siirrostettujen solujen lukumäärä: 2 (taulukko 6.)
- positiivisten kontrollikaivojen solujen lukumäärä: 53 (taulukko 9.)

$$SF(0,75 \text{ Gy}) = \frac{\left(\frac{57}{3} \right) \times 2}{53} = 0,717$$

Muut taulukossa 10. esitetyt arvot on laskettu vastaavalla tavalla ja kaikki tulokset sijoittuvat suljetulle välille [0: 1].