

**Estetrolin vaikutus rintasyöpäkudokseen *ex vivo*  
eksplanttilviljelmissä ja organotyyppisissä 3D-soluviljelmissä**

Jasmin Kaivola

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto  
Biokemian laitos  
09.02.2019

Tutkinto-ohjelma: Biokemia  
Laajuus: 20 op

**TURUN YLIOPISTO**  
**Biokemian ja elintarvikekemian laitos**  
**Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta**

**KAIVOLA, JASMIN: Estetrolin vaikutus rintasyöpäkudokseen *ex vivo***  
**eksplanttilviljelmissä ja organotyyppisissä 3D-soluviljelmissä**

**Pro gradu -tutkielma, 67 s., 2 liitettä**  
**Biokemia**  
**Helmikuu 2019**

.....  
Tiivistelmä

Estetroli on heikko naishormoni, jota sikiön maksa tuottaa raskauden aikana. Syntymän jälkeen maksan kyky tuottaa tätä hormonia häviää. Estetrolia voidaan mitata raskaana olevan äidin verestä, sillä sitä siirtyy sinne mitattavissa olevia määriä istukan kautta, mutta sen fysiologisia vaikutuksia sikiössä tai äidissä ei tunneta. Estetrolia tutkitaan mahdollisena hormonihoidona rintasyövässä, hormonaalisen ehkäisykomponenttina sekä vaihdevuosien hormonihoidona. Estetrolilla on vähemmän sivuvaikutuksia kuin nykyisissä hormonaalisissa hoidoissa ja ehkäisyuodoissa käytetyssä estradiolissa. Erikoistyössä estetrolin vaikutuksia tutkittiin rintasyöpäleikkauksista ja rinnan pienennysleikkauksista saatujen potilaiden kudoksenäytteiden avulla sekä organotyyppisissä 3D-soluviljelmissä.

Aikaisemmissa tutkimuksissa estetrolin on osoitettu toimivan estradiolin toimintaa estävästi, joten näiden kahden hormonin vaikutuksia rintakudoksessa ja soluviljelmissä selvitettiin yksinään sekä yhdistelmänä. Tutkimuksessa havaittiin, että estetroli ei vaikuttanut merkitsevästi syöpäkudoksen eikä normaalin kudoksen solujen proliferaatioon eikä apoptoosiin. Estetroli vaikutti kuitenkin eräiden estrogeenille sensitiivisten geenien ilmenemiseen. Näistä geneistä eniten muutoksia näkyi TFF1-geenissä, joka on estrogeenireseptorin toiminnallinen markkeri. Pieniä muutoksia oli havaittavissa estrogeenireseptori alfan ilmentymisessä. 3D-viljelmissä estetroli lisäsi solujen kykyä muodostaa organoideja, mutta yhdessä estradiolin kanssa se ei kyennyt lisäämään estradiolin vaikutusta tai toimimaan sen tehokkaana antagonistina. Tutkimuksen perusteella estetroli ei estä tehokkaasti rintasyövän kasvua, mutta rintakudokseen kohdistuvan heikon estrogeenisen vaikutuksensa perusteella se saattaisi sopia turvalliseksi vaihdevuosien hormonaaliseksi hoidoksi.

**ASIASANAT: rintasyöpä, hormonihoido, estradioli, estetroli**

## SISÄLLYS

Lyhenteet.....	1
1 Johdanto.....	2
1.1 Rintasyöpä.....	2
1.1.1 Rintasyövän syyt, kasvu ja eteneminen.....	2
1.1.2 Geneettinen tausta.....	4
1.1.3 Hormonaalinen säätely.....	4
1.1.4 Rintasyöpätyypit.....	5
1.2 Estrogeenien ja estrogeenireseptoreiden merkitys rintasyövässä.....	7
1.2.1 Estradioli E2.....	7
1.2.2 Estrogeenireseptorit.....	8
1.2.3 Estrogeenireseptoreiden vaikutusmekanismi.....	9
1.3 Muiden steroidihormonireseptoreiden aktiivisuus rintasyövässä.....	11
1.3.1 Progesteronireseptori.....	11
1.3.2 Androgeenireseptori.....	12
1.4 Rintasyövän lääkehoito.....	13
1.4.1 Sädehoito.....	13
1.4.2 Kemoterapia.....	13
1.4.3 Hormonaalinen hoito.....	14
1.4.3.1 Tamoksifeeni ja toremifeeni.....	14
1.4.3.2 Selektiiviset estrogeenireseptorin modulaattorit.....	15
1.4.3.3 Aromataasi-inhibiittorit.....	16
1.4.3.4 Kehitteillä olevat hoidot – Estetrolin potentiaali rintasyövän hoidossa	
17	
1.5 Rintasyöpätutkimuksen mallit.....	18
2 Tutkielman tarkoitus ja tavoitteet.....	20
3 Aineisto ja menetelmät.....	21
3.1 Rintakudosnäytteiden keräys ja viljely.....	21

3.2	Immunohistokemialliset värjäykset .....	22
3.3	Immunohistokemiallisten värjäysten kvantitointi .....	23
3.4	RNA:n eristys ja komplementaarisen DNA:n synteesi .....	23
3.5	Kvantitatiivinen PCR .....	24
3.6	Soluviljely .....	25
3.6.1	Solujen kasvun määrittäminen .....	25
3.6.2	Solujen elinkyvyn määrittäminen .....	26
3.7	Solujen kolmiulotteiset (3D) organoidiviljelmät .....	26
3.8	Tilastolliset menetelmät .....	27
4	Tulokset .....	29
4.1	Estetrolin vaikutus solujen kasvuun .....	29
4.2	Estetrolin vaikutus 3D-viljelmissä .....	32
4.3	Estetrolin vaikutus maitorauhas- ja rintasyöpäkudoksen <i>ex vivo</i> -viljelmissä .....	36
4.3.1	Estetrolin vaikutus solujen proliferaatioon ja apoptoosiin .....	36
4.3.2	Estetrolin vaikutus ER $\alpha$ :n ja ER $\beta$ :n ilmentymiseen .....	43
4.3.3	Estetrolin vaikutus ER:n säätelemien geenien ilmentymiseen .....	48
4.3.3.1	TFF1 ja amfireguliinin ilmentyminen mRNA-tasolla .....	48
4.3.3.2	Progesteronireseptorin ilmentyminen mRNA- ja proteiinitasolla sekä androgeenireseptorin ilmentyminen mRNA-tasolla .....	51
4.3.3.3	Kasvuhormonireseptorin ilmentyminen mRNA-tasolla .....	55
5	Tulosten tarkastelu ja pohdinta .....	57
5.1	Estetrolin on heikko estrogeeni, joka ei antagonisoi estradiolia tehokkaasti .....	57
5.2	Estetrolin vaikuttaa vaihtelevasti solujen proliferaatioon, elinkyvyn ja apoptoosiin .....	59
5.3	Estetrolin lisää merkittävästi solujen 3D kasvua .....	60
5.4	Käytettyjen menetelmien sopivuus ja rajoitteet tutkimusasetelmassa .....	61
5.4.1	Proliferaatio- ja elinkyvykokeet .....	61
5.4.2	3D-soluviljely .....	62

5.4.3	Kudosviljely .....	63
5.4.4	Immunohistokemialliset värjäykset .....	65
5.4.5	Kvantitatiivinen PCR .....	66
5.5	Johtopäätelmät tuloksista .....	66
6	Lähteet .....	68
7	Liitteet .....	87

## Lyhenteet

<b>ACTB</b>	Beeta-aktiini
<b>AR</b>	Androgeenireseptori
<b>AREG</b>	Amfireguliini
<b>CASP-3</b>	Kaspaasi-3
<b>E2</b>	Estradioli
<b>E4</b>	Estetroli
<b>ECM</b>	Soluväliaine (engl. extracellular matrix)
<b>EGF</b>	Epidermaalinen kasvutekijä (engl. epidermal growth factor)
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Estrogeenireseptori alfa
<b>ER<math>\beta</math></b>	Estrogeenireseptori beeta
<b>FBS</b>	Naudan sikiön seerumi (engl. fetal bovine serum)
<b>HER2</b>	Ihmisen epidermaalinen kasvureseptori 2 (engl. human epidermal growth factor receptor 2)
<b>IHC</b>	Immunohistokemia (engl. immunohistochemistry)
<b>PBS</b>	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. phosphate buffered saline)
<b>PCR</b>	Polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)
<b>PR</b>	Progesteronireseptori
<b>SERD</b>	Selektiivinen estrogeenireseptorin hajottaja
<b>SERM</b>	Selektiivinen estrogeenireseptorin modulaattori
<b>TAM</b>	Tamoksifeeni
<b>TFF1</b>	Trefoilfaktori 1
<b>PDE</b>	Potilasperäinen eksplantti (engl. patient derived explant)
<b>PDX</b>	Potilasperäinen ksenografti (engl. patient derived xenograft)
<b>POS</b>	Menestymisen todennäköisyys (engl. probability of success)

# 1 Johdanto

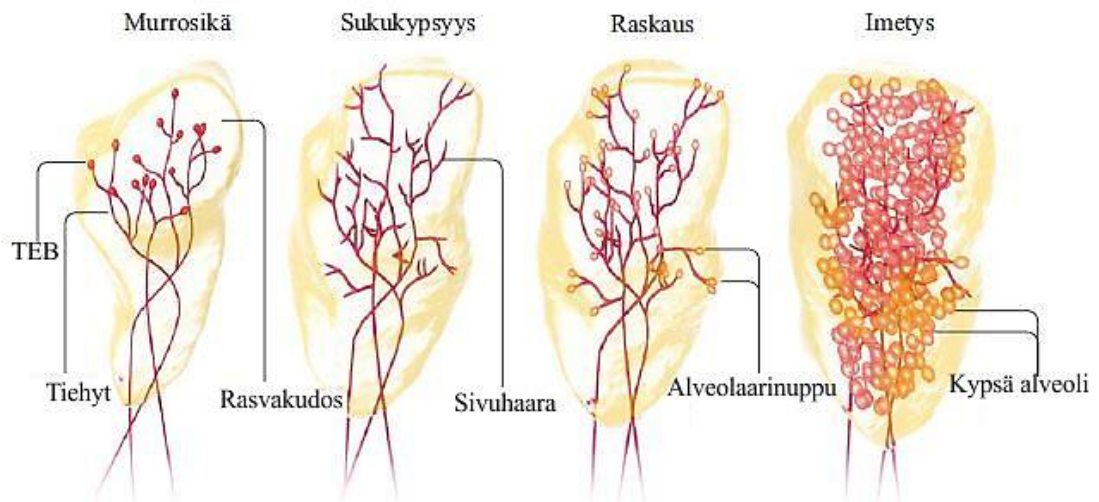
## 1.1 Rintasyöpä

Rintasyöpä on Pohjoismaissa yleisin naisten sairastama syöpäsairaus. Jopa 30% kaikista naisten sairastamista syöpätapauksista ovat rintasyöpää (Engholm ym. 2018). Samaan lukemaan päästään Yhdysvalloissa (Siegel ym. 2018), joten rintasyöpä on globaali syöpäsairaus, joka koskettaa erityisesti ikääntyviä, tyypillisesti 60 vuotta täyttäneitä naisia. Yhdysvalloissa 14% rintasyöpätapauksista johtaa kuolemaan ja Pohjoismaissa taas 14,9% (Siegel ym. 2018; Engholm ym. 2018). Kliinisesti rintasyöpää seulotaan mammografian avulla ja riskiryhmässä myös geeniseulonnan avulla (Li ym. 2018).

### 1.1.1 Rintasyövän syyt, kasvu ja eteneminen

Rinta koostuu rasvakudoksesta ja maitoa tuottavista maitorauhasyksiköistä, alveoleista, joista lähtee maitotiehyet nänneihin. Maitorauhanen on alun perin kehittynyt hikirauhasesta ja se koostuu yhden maitotiehytuuston ympärille muodostuneista lohkoista, joissa on tiehytuuston lisäksi ympäröivää sidekudosta ja rasvaa. Maitorauhasen tiehyiden ja alveolien kaksikerroksinen epiteeli muodostuu luminaalisista ja basaalisista soluista. Epiteelin basaalisessa solukerroksessa on epiteelisolujen esiasteita (prekursoreita), jotka voivat erilaistua eri solutyypeiksi mukaan lukien epiteeliä ympäröiviksi myoepitelialisoluiksi. Luminaalinen epiteelisolukko verhoaa maitorauhasen rauhaspuustoa sisältäpäin ja erilaistuu alveoleissa maitoa tuottaviksi soluiksi. Maitorauhasen toimintaa säätelevät munasarjan ja lisämunuaisen kuoren erittämät estrogeeni, progesteroni ja androgeenit sekä aivolisäkkeen erittämät kasvuhormoni ja prolaktiini (Oftedal 2002; Macias ym. 2012).

Maitorauhaset erilaistuvat erittäviksi rauhasiksi raskauden myötä, jolloin keho valmistautuu imetykseen, mutta muutoin ne ovat melko inaktiivisia. Estrogeenin, progesteronin ja prolaktiinin säätelemänä rauhasrakenne proliferoituu tiheäksi tiehytuustoksi ja alveoleiksi, jotka aktivoituvat ja kypsyvät maitoa erittäviksi rauhasyksiköiksi (Kuva 1). Imetyksen päätyttyä alveolit ja suuri osa tiehyistä kuihtuu (Macias ym. 2012).



**Kuva 1. Maitorauhasen kehitys murrosiästä imetykseen.** Murrosiässä maitorauhasen tiehyet alkavat haarautua ja niiden päissä on päätenuppuja (engl. terminal end bud, TEB). Raskauden aikana haaroittuneisiin tiehyisiin muodostuu alveolaarinappuja, jotka imetyksen myötä erilaistuvat kypsiksi alveoleiksi. Mukailten: Malec 2014.

Rintasyövän syntyyn vaikuttavat perinnölliset sekä ympäristöstä peräisin olevat tekijät. Haitalliset elintavat kuten ylipaino, runsas alkoholin käyttö ja tupakoiminen voivat altistaa rintasyöväälle, mutta monitekijäisenä sairautena yksittäinen tekijä ei laukaise syövän syntyä ja sen riskiin voidaan vaikuttaa elintavoilla (Howell ym. 2014). Hormonaalisilla tekijöillä on kuitenkin tärkein merkitys syövän syntyyn, sillä ne lisäävät soluproliferaatiota eli solumäärän lisääntymistä, mikä puolestaan altistaa soluja pahanlaatuisille muutoksille. Esimerkiksi vaihdevuosien oireiden lievittämiseksi käytetyt hormonihoitot (Million Women Study Collaborators 2003) samoin kuin varhainen ensimmäisten kuukautisten alkamisajankohta ja myöhäinen synnytysikä voivat vaihtelevasti lisätä riskiä sairastua rintasyöpään (Li ym. 2008; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002). Vaihdevuosien hormonihoitossa erityisesti estrogeenin ja progesteronin yhdistelmähoito lisää huomattavasti riskiä sairastua rintasyöpään, koska molemmat hormonit stimuloivat maitorauhasepiteelisolujen proliferaatiota (Million Women Study Collaborators 2003).

Rintasyövän taustalla on epiteelisolujen hallitsematon jakautuminen (Joshi ym. 2010) ja se on usein riippuvainen hormonaalisesta säätelystä, erityisesti syöpäsolujen vastaanottamista estrogeenin aiheuttamista signaaleista. Hoitamaton tai hoitoon reagoimaton rintasyöpä muodostaa etäpesäkkeitä muualle elimistöön. Etäpesäkkeitä voi

muodostua myös vuosia myöhemmin primäärisen tuumorin poiston jälkeen, sillä osa syöpäsoluista voi jäädä ns. lepotilaan, jossa ne eivät jakaudu vaan pysyvät solusyklin G<sub>0</sub>-vaiheessa (Luzzi ym. 1998). Hoitamattomana jopa 25-50% rintasyöpätapauksista johtaa tappavan etäpesäkkeen muodostumiseen (Minn ym. 2005).

Syöpäsolu käy läpi ns. metastaattisen kaskaadin, jossa primäärituumorista siirtyy soluja verenkiertoon ja verenkierron välityksellä soluja leviää sekundäärisille paikoilla eri elimiin muodostamaan uusia tuumoreita (Minn ym. 2005). Luuhun ja maksaan syntyy eniten etäpesäkkeitä, sillä syöpäsolut pystyvät helposti läpäisemään niiden ohuet verisuonien seinämät. Myös aivoihin syntyvät etäpesäkkeet ovat yleisiä, mutta syöpäsolujen on läpäistävä veri-aivoesteen kapillaarien tiivis endoteelikerros, mikä tapahtuu leukosyyttien ja verihytaleiden avustamana. Nämä solut muodostavat adheesiosta vastaavien L- ja P-selektiinien avulla komplekseja tuumorisolujen kanssa, jolloin syöpäsolut pääsevät leviämään verenkierron avulla aivoihin ja muodostamaan etäpesäkkeitä (Laubli ym 2010).

#### 1.1.2 Geneettinen tausta

Mutaatiot kasvunrajoitegeneissä BRCA1 ja BRCA2, jotka osallistuvat DNA:n virheiden korjaukseen, ovat suuri riski rintasyövän kehitykselle. Nämä geenit löydettiin vuosina 1994-1995 (Miki ym. 1994, Wooster ym. 1995). Jos lähisukulaiselta löytyy mutaatio näissä geneissä, on hyvin todennäköistä, että sukusolulinjassa tapahtunut vallitseva mutaatio periytyy jälkeläisille (Schubert ym. 1997). Rintasyöpätapauksista 5-10 % johtuu geenivirheestä BRCA1- tai -2 geenissä ja suuri osa näistä virheistä on tunnistettu (Antoniou ym. 2003). BRCA-mutaatioiden tunnistamiseksi on kehitetty erilaisia geenitestejä, joten jos suvussa esiintyy tämän geenin suhteen mutaatioita, voivat lähisukulaiset testata geeniperimänsä ja havaita rintasyövän tai riskin sairastua rintasyöpään ajoissa (Nanda ym. 2005).

#### 1.1.3 Hormonaalinen säätely

Rintasyövän hormonaalisesta säätelystä vastaavat pääasiassa estrogeenit ja progesteroni suoran transkriptionaalisen säätelyn sekä parakriinisen säätelyn kautta. Estrogeenit ovat naihormoneja, jotka osallistuvat naisen sekundääristen sukupuoliominaisuuksien kehitykseen kuten rintojen kasvuun murrosiässä sekä naisen lisääntymiseen (Tomas ym. 1962; Mallepell ym. 2006). Kuukautisten alkaessa keskimäärin 13 vuoden iässä, aivojen

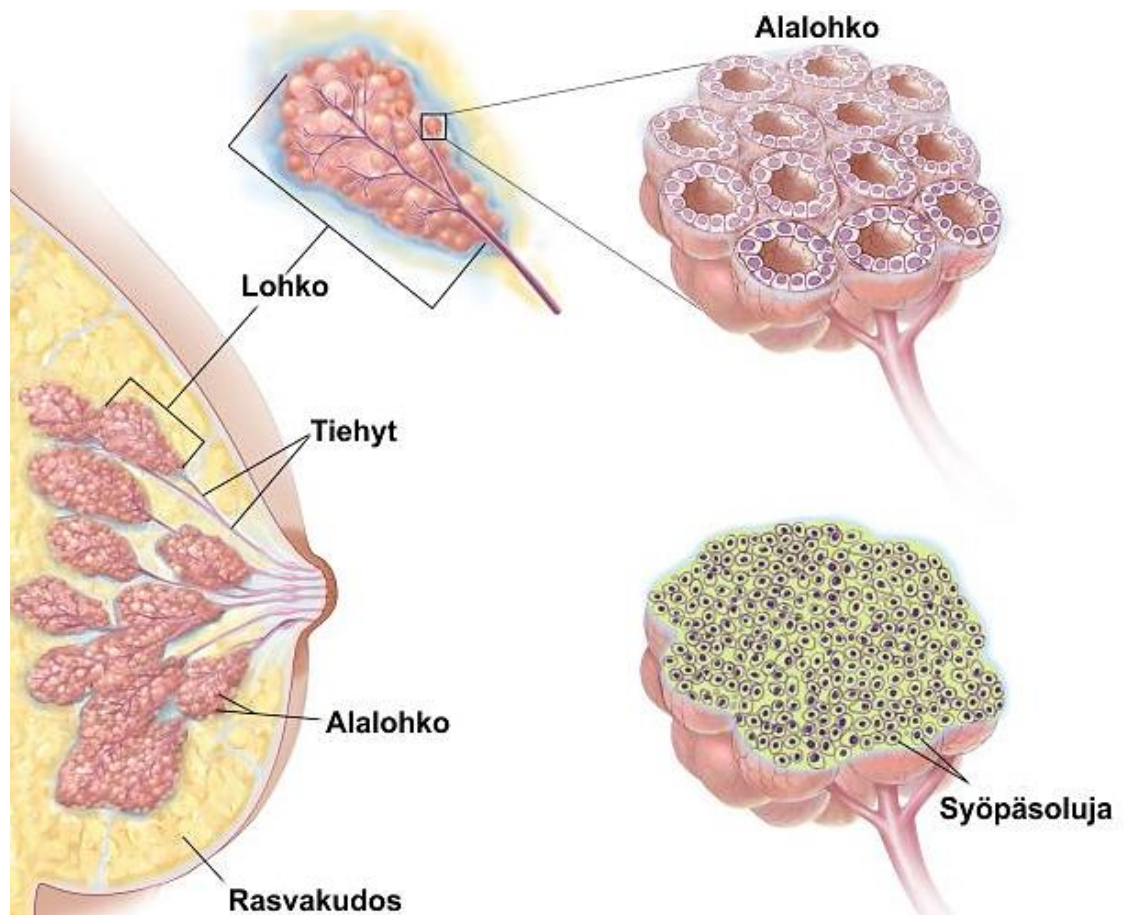
hypotalamus stimuloi aivolisäketä vapauttamaan estradiolia ja progesteronia munarauhasista (Rees ym 1995). Näiden hormonien tuotto jatkuu kehossa aina vaihdevuosiin saakka ja ne säätelevät munarakkulan kehitystä ja munasolun kypsymistä kerran kuukaudessa mahdollista hedelmöittymistä varten. Mitä aiemmin kuukautiset ja siten naisen kehon hormonitoiminta ovat alkaneet, sitä suurempi riski on sairastua myöhemmällä iällä rintasyöpään. Jokainen vuosi lisää rintasyövän riskiä viidellä prosentilla, mitä nuorempaan kuukautiskierto alkaa (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2012). Keho tarvitsee estrogeeneja ylläpitääkseen normaalia toimintaansa, mutta näitä hormoneja eritetään niin pienissä pitoisuuksissa, että pienetkin muutokset ovat merkittäviä kehon säätelyssä. Estrogeenit aiheuttavat rintarauhasen solujen proliferaatiota estrogeenireseptoreiden kautta ja ne lisäävät progesteronireseptorin ilmentymistä kuukautiskierron loppupuolella (Fata ym.2002).

Naisilla erittyy myös androgeeneja lisämunuaisista. Androgeenit pääasiassa estävät estrogeenin vaikutuksia rintarauhasessa ja vähentävät soluproliferaatiota (Eigélie ym. 2012), mutta erityis laskee iän myötä ja seerumissa nähdään selkeä androgeenitason lasku ennen vaihdevuosisia. Vaihdevuosien seurauksena elimistön estrogeenien ja androgeenien pitoisuuksien lasku muuttaa myös niiden keskinäistä suhdetta, mikä voi vaikuttaa rintasyövän kehitykseen. Androgeenien kohdereseptorit eli androgeenireseptorit osallistuvat myös rintasyövän kehitykseen ja esimerkiksi osassa kolmoisnegatiivisesta rintasyövästä yliexpressoidaan androgeenireseptoria (Longcope ym. 1986; Lea ym. 1989).

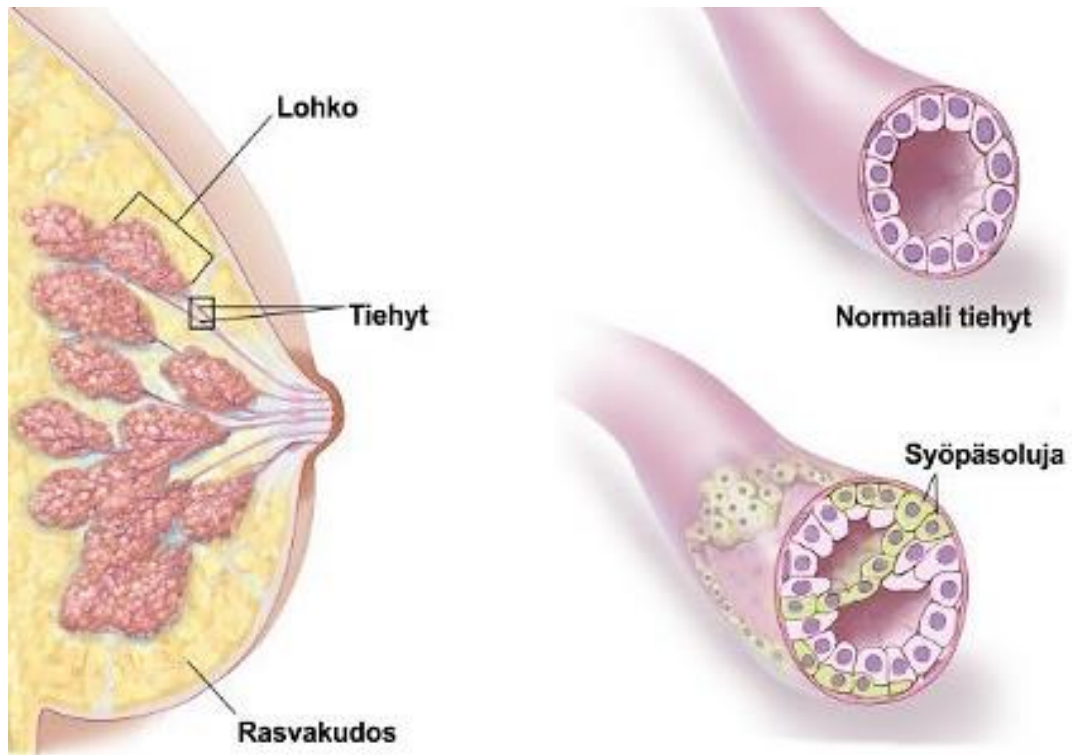
#### 1.1.4 Rintasyöpätyypit

Yleisimmät rintasyöpätyypit ovat invasiivinen duktaalinen karsinooma (IDC, engl. invasive ductal carcinoma) ja invasiivinen lobulaarinen karsinooma (ILC, engl. invasive lobular carcinoma). Rintasyöpätapauksista suurin osa on duktaalista ja noin 10 % on lobulaarista syöpää (Li ym. 2003) ja näistä ILC on yhdistetty parempaan ennusteeseen IDC:hen verrattuna (Toikkanen ym. 1997). IDC on tiehytperäinen syöpä, joka muodostaa selkeärajaisen kasvaimen, jonka kasvu rajoittuu tiehyeseen tai sen välittömässä läheisyydessä olevaan ympäristöön (Bellamy ym. 1993). ILC taas on rauhasperäinen syöpä ja se ei muodosta yhtä selvärajaisia rakenteita. Tämän syövän leviäminen on yleisempää ja histologisissa näytteissä nähdään pitkiä nauhamaisia rakenteita, mikä

johtuu e-kadheriinin puutteesta (Vos ym. 1997). E-kadheriini osallistuu epiteelisolujen solujen välisiin liitoksiin muodostamalla vyöliitoksia solujen pinnalla (Gumbiner 1996). In situ karsinomia esiintyy lobulaarisessa (Kuva 2) sekä duktaalissa syövässä (Kuva 3). In situ- kasvaimissa syöpäsolut eivät ole tunkeutuneet stroomaan eivätkä metastatoi (Marshall ym. 1997). Rintakudoksen epiteelisolun kehitys syöpäsoluksi käy läpi erilaiset vaiheet; normaali, hyperplastinen, dysplastinen, neoplastinen ja invasiivinen. Invasiiviseksi solu muuttuu, kun se tunkeutuu tyvikalvon läpi ja voi tällöin levitä muualle elimistöön muodostamiensa etäpesäkkeiden avulla (Liotta ym. 1984; Turner-Ivey ym. 2017).



**Kuva 2. Lobulaarinen in situ karsinooma (LCIS).** LCIS on rauhasperäinen syöpä, jonka kasvu rajoittuu rinnan lohkoihin. Mikroskooppikuvissa syöpäkudoksen lohkoissa nähdään useita pyöreitä soluja, jotka eivät ole tarttuneena toisiin soluihin solujen välisiin liitoksiin osallistuvan E-kadheriinin puutteen vuoksi. Mukaillen; PDQ Adult Treatment Editorial Board 2002.



**Kuva 3. Duktaalinen in situ karsinooma (DCIS).** DCIS on tiehytperäinen syöpä, jonka kasvu rajoittuu rintatiehyisiin. Mikroskooppikuvissa syöpäkudoksen rintatiehyissä nähdään muuntuneita soluja, joiden tumen koko vaihtelee normaalista solusta poiketan hyvin pienestä laajaan. Mukailten Mukailten PDQ Adult Treatment Editorial Board 2002.

## 1.2 Estrogeenien ja estrogeenireseptoreiden merkitys rintasyövässä

Estrogeeneihin kuuluu yleisin estrogeeni eli estradioli (E2), estroni (E1) estroli (E3) ja estetroli (E4) (Hagen ym. 1965; Sasson ym. 1983; Tomas ym. 1962; Wu ym. 1976). Estrogeenit kuuluvat steroidihormoneihin, joten niiden synteessin prekursorina toimii maksan tuottama kolesteroli (Hanukoglu 1992). Estrogeenit osallistuvat naisen sukupuolisten ominaisuuksien kehitykseen kuten rintojen kasvuun murrosiässä (Daniel ym. 1987; Mallepell ym. 2006). Kuitenkin jos estrogeenejä on elimistössä jatkuvasti suuria pitoisuuksia, joissa ei nähdä esimerkiksi kuukautiskierron aiheuttamia laskuja, se voi altistaa rintasyövän synnylle. Estrogeenit saavat aikaan solujen proliferaatiota ja altistavat epiteelisoluja siten transformaatioon ja tuumoreiden muodostukseen (Pike ym. 1993; Johansson ym. 1998; Russo ym. 2006).

### 1.2.1 Estradioli E2

Estradioli eli  $17\beta$ -estradioli on tärkein estrogeeneistä. Hormonia erittyy munarakkulasta, rasvakudoksessa, aivokuorelta sekä osittain kiveksissä, joten sitä erittyy vähissä määrin

myös miehissä (Nelson ym. 2001). Estradiolin toiminta välittyy estrogeenireseptoreiden kautta, joiden ligandina se toimii. Estradiolitasot vaihtelevat iän ja sukupuolen mukaan. Naisilla estradiolin määrä lisääntyy murrosikään tultaessa, kun nainen tulee sukukypsäksi. Tällöin estradiolin määrä vaihtelee kuukautisten eri vaiheiden mukaan, jolloin suurin pitoisuus on ovulaatiovaiheessa ja pienin follikulaarivaiheessa, vaihteluvälin ollessa noin 5-300 pg/ml. (Hubert ym. 2014). Estradiolin pitoisuuteen vaikuttaa fyysinen aktiivisuus siten, että runsas fyysinen aktiivisuus laskee estradiolin määrää ja voi jopa viivästyttää kuukautisten alkamisajankohtaa ja laskea syöpäriskiä (Jasienska ym. 2006).

Estradiolin määrä laskee vaihdevuosien jälkeen, kun kuukautiskierto lakkaa ja munasoluja ei enää kypsy (Burger ym. 1999). Naisilla estradiolin määrä ennen tätä on riittävä suojaamaan osteoporoosilta, mutta vaihdevuosien jälkeen luun tiheys voi laskea ja murtumat lisääntyä (Ettinger ym. 1998; Payne ym. 1999). Vaihdevuosien jälkeen seerumista mitattavaa estradiolia havaitaan vähemmän kuin 30 pg/ml (Berrino ym. 1996). Estradiolia käytetään usein hormonihoidona vaihdevuosien jälkeisten oireiden lievittämiseksi, mutta hormonin käyttö on yhdistetty myös lisääntyneeseen rintasyöpäriskiin (Beral ym. 2002; Hein ym. 2013).

Miehillä estrogeenitaso nousee murrosikään tultaessa ja aikuisena seerumin estradiolitaso on noin 10-80 pg/ml (Yamamoto ym. 1999). Estradioli säätelee miehillä muun muassa seksuaalista halukkuutta (Carani ym. 1999), spermatogeneesiä (Guido ym. 2011) ja estää sulusolujen apoptoosia kiveksissä (Pentikäinen ym. 2000). Estradiolin tasolla ei ole huomattu yhteyksiä seksuaalisen suuntautumisen kanssa, mutta sillä voi olla yhteys masentuneisuuteen (Carani ym. 1999; Stanikova ym. 2018).

### 1.2.2 Estrogeenireseptorit

Tumaan siirtyvistä estrogeenireseptoreista löytyy kaksi eri geenien koodaamaa reseptoria,  $\alpha$  ja  $\beta$ . Reseptorit ovat homologisia keskenään ja molemmat koostuvat viidestä domeenista (Walter ym. 1985; Kuiper ym. 1996). Lisäksi on ryhmä solukalvoreseptoreita eli mER:iä (engl. membrane estrogen receptors), joita ovat GPER, ER-X, ja Gq-mER. Nämä reseptorit välittävät signaalejaan G-proteiinireseptoreiden toiminnan kautta (Pappas ym. 1995; Maggiolini ym. 2004; Toran-Allerand ym. 2002; Qiu ym. 2006).

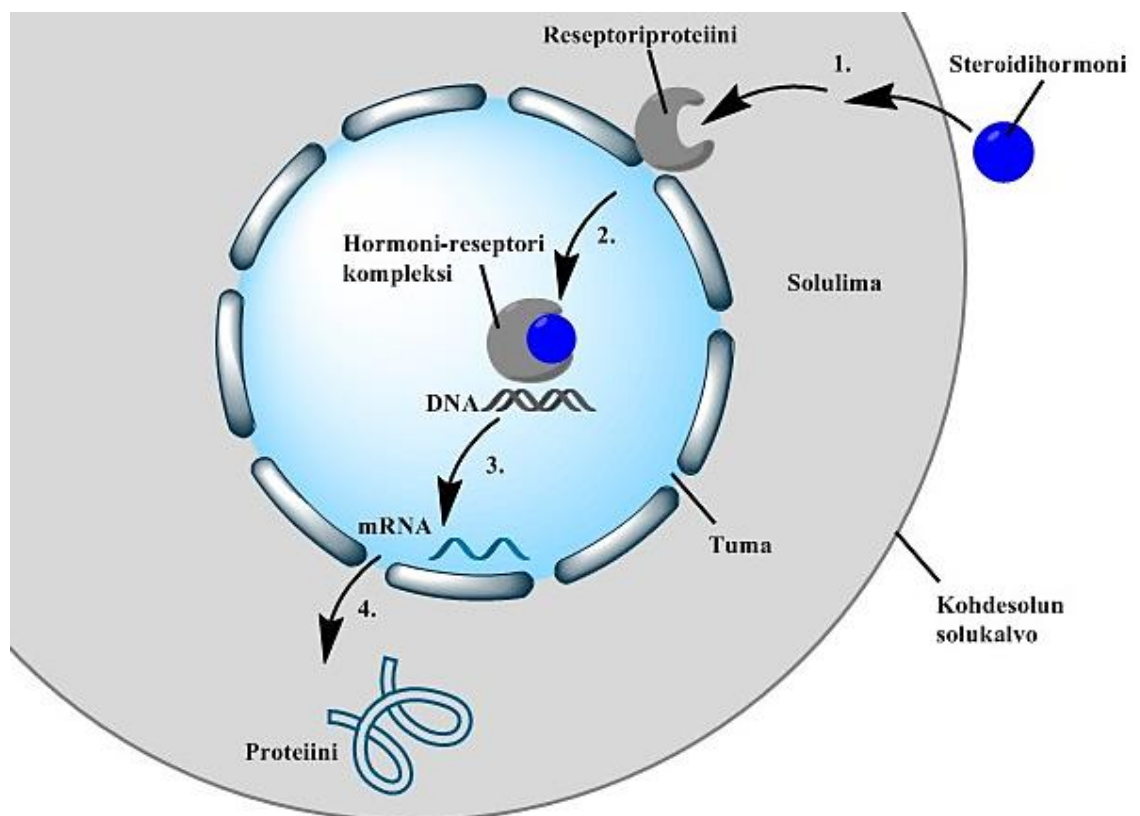
Estradioli toimii näiden reseptoreiden tärkeimpänä ligandina ja ne sitovat sitä yhtä tehokkaasti (Zhu ym. 2006).

Estrogeenireseptoreja yliekspressoidaan noin 75 %:ssa rintasyöpätapauksista ja näitä syöpiä kutsutaan yleisesti ER+ rintasyöviksi. ER+ rintasyöpä hyötyy hormonaalisesta hoidosta, jossa käytetään joko estrogeenireseptorin modulaattoreita kuten tamoksifeenia tai erilaisia aromataasi-inhibiittoreita, jotka estävät estradiolin synteesin (Brodie ym. 1977; Perou ym. 2000). Kuitenkin estrogeenireseptoreiden välillä on myös eroja. Esimerkiksi reseptoria  $\alpha$  ilmennetään munasarjoissa, rintakudoksessa sekä hypotalamuksessa ja reseptoria  $\beta$  ilmennetään munasarjoissa, munuaisessa, luissa ja aivoissa (Brandenberger ym. 1997; Shughrue ym. 1998). Reseptoreiden ilmentyminen eroaa eri rintasyöpätyyppienkin välillä, minkä huomioiminen voisi auttaa syövän hoidossa. Duktaalisen syövän varhaisissa vaiheissa ER $\alpha$ :n ilmentyminen on korkeaa ja ER $\beta$ :n ilmentyminen hyvin vähäistä, mutta lobulaarisen syövän kohdalla molempia reseptoreita ilmennetään (Bo ym. 2014).

### 1.2.3 Estrogeenireseptoreiden vaikutusmekanismi

Estrogeenireseptori kuuluu steroidihormonireseptoreihin, jotka ovat joko nukleaarisia tai sytoplasmisia reseptoreja. Steroidihormonireseptori muodostuu neljästä domeenista; DNA:ta sitovasta domeenista, hormonia sitovasta domeenista, muuttuvasta domeenista ja sarana-alueesta. Steroidihormonin sitoutuessa reseptoriin se aktivoituu, muodostaa joko homo- tai heterodimeerejä ja estää tai aloittaa geenin transkription (Gorski 1987; Norman ym. 2004).

Estrogeenin sitouduttua estrogeenireseptoriin solun sisällä, se aktivoi reseptorin, joka puolestaan dimerisoituu ja siirtyy tumaan. Estrogeenit ovat rasvaliukoisia, joten ne siirtyvät tumaan solukalvon läpi diffundoitumalla. Tumassa hormoni-reseptori -kompleksin sitoutuminen kohdegeenien säätelyalueille sijoittuviin estrogeenien vastelementteihin (ERE, Estrogen response element) johtaa kohdegeenien transkription muutokseen (Kuva 4).



**Kuva 4. Steroidihormonireseptoreiden vaikutusmekanismi.** 1. Steroidihormoni diffundoituu solukalvon läpi ja sitoutuu kohdereseptoriinsa. 2. Hormoni-reseptori kompleksi siirtyy tumaan. 3. Tumassa kompleksi sitoutuu kohdegeeniensä säätelyalueelle ja estää tai aktivoi transkription, jolloin tuotteena muodostuvasta lähetti-RNA:sta valmistetaan solulimassa proteiini.

Eri signalointireittien aktivoituminen johtaa solujen proliferaation lisääntymiseen sekä migraatioon (Gottlicher ym. 1998; Pike ym. 1993). Solussa tapahtuu proliferaation kasvun myötä enemmän virheitä DNA:n kopioinnissa ja syntyy mutaatioita. Näistä mutaatioista voi seurata elimistön kontrollin ulkopuolelle joutunut solu, josta kehittyy syöpäsolu. Estrogeenimetabolian tuloksena elimistöön muodostuu soluille haitallisia sivutuotteita, jotka voivat myös edistää mutaatioiden muodostumista (Lieber 1990). Solusyklin häiriintymisen, DNA:n kahdentumisessa tapahtuneiden virheiden ja apoptoosin myötä solun säätely joutuu epänormaaliin tilaan ja tuumorin muodostuminen mahdollistuu (Russo ym. 2006).

Estrogeenien kohdegeenejä on useita satoja (Frasor ym. 2003), joista osa osallistuu syövän kehitykseen. Näistä esimerkiksi tuumorisuppressiogeneeni *TFF1* stimuloi syöpäsolujen migraatiota (Prest ym. 2002), rintarauhasen kehityksestä vastaava amfiireguliini lisää estrogeeniriippuvaisen rintasyövän solujen proliferaatiota, (Esther ym.

2015) ja *GHR*:n ilmentyminen korreloi käänteisesti tuumorin erilaistumisasteen kanssa (Gebre-Medhin ym. 2001). Rintasyövässä proliferaation markkerigeenina käytetään MKI67:ää ja se on vakiinnuttanut asemansa niin tutkimuksessa kuin rintasyövän proliferaatiomarkkerina sairaaloissa (Inwald ym. 2013).

### 1.3 Muiden steroidihormonireseptoreiden aktiivisuus rintasyövässä

Steroidihormonit ovat umpirauhasissa kolesterolista muokattuja hormoneja, jotka osallistuvat elimistön normaaliin säätelyyn (Hanukoglu 1992). Rintasyövässä steroidihormonireseptoreja ilmennetään enemmän kuin normaalissa kudoksessa. Näitä hormonireseptoreja ovat mm. estrogeenireseptorit alfa ja beeta, progesteroni- sekä androgeenireseptori.

#### 1.3.1 Progesteronireseptori

Progesteronireseptori on tumareseptori, josta tunnetaan kolme eri muotoa; A, B ja C. Tunnetuimmat muodot ovat A ja B, jotka syntyvät samasta geenistä eri aloituskohdasta (Tsai ym. 1998). Progesteronireseptorit A ja C voivat estää tai muokata reseptorin B toimintaa (Condon ym. 2006). Reseptoreita A ja B ilmennetään eri suhteessa rintasyövässä ja tuumorit ilmentävät useimmiten hyvin vähän PR-B:tä ja PR-A/B -suhdeluku on hyvin korkea (Graham ym. 1995). Progesteronireseptorin aktivoituminen säätelee positiivisesti rintasyöpäsolujen proliferaatiota esimerkiksi aktivoimalla Src/p21<sup>ras</sup>/Erk -signalointireitin estrogeenireseptorin välityksellä, kun ER aktivoi c-SRC:n (Migliaccio ym 1998; Faivre ym. 2007).

Progesteroni osallistuu rintarauhasen kehitykseen ja maidon tuottamisen estämiseen raskauden yhteydessä. Munasarjoissa se muun muassa edesauttaa munarakkulan kiinnittymistä, aloittaa kuukautiskierron luteaalisen vaiheen ja ylläpitää raskautta (Graham ym. 1997). Progesteroni voi edistää tuumorin kasvua, sillä se lisää solujen proliferaatiota sykliini D1:n ja NF- $\kappa$ B-ligandin välityksellä (Beleut ym. 2010).

Progesteronireseptoria ilmennetään usein estrogeenipositivisessa rintasyövässä jopa viidelläkymmenellä prosentilla eli kaikista rintasyöpätapauksista noin 35% on PR+ (McGuire ym. 1978). Progesteronireseptori toimii estrogeenireseptorin säätelyn alaisena ja on siten myös osittain riippuvainen estrogeenista. ER+ rintasyövän hoidossa käytetyt selektiiviset estrogeenireseptorin modulaattorit eivät tehoa yhtä tehokkaasti ER+/PR-

kuin ER+/PR+- syöpiin, kun taas aromataasi-inhibiittorit tehoavat tähän ER+/PR-syöpään (Ravdin ym 1992). Täten progesteronireseptori voi toimia hoitovasteen ennusteena ja markkerina (Bardou ym. 2003).

Eräänä rintasyövän edistäjänä voi olla progesteronireseptoria koodaavassa geenissä esiintyvät polymorfismit, erityisesti reseptorissa B (De Vivo ym. 2003). Hormoniriippuvaista rintasyöpää on yritetty hoitaa progesteronin johdannaisilla, mutta vielä ei ole löytynyt tehokasta hoitoa. Esimerkiksi onapristonea käytettiin progesteronireseptorin antagonistina, mutta lääkkeestä luovuttiin, sillä se aiheutti potilailla maksan toimintahäiriöitä, vaikka tuumorin kehitys pysähtyikin (Robertson ym. 1999). Progesteroni-inhibiittoreita kehitetään rintasyövän hoidossa kohdentamalla niiden toiminta estrogeenireseptorin signaalitireitteihin. Progesteronireseptoreiden eri muotojen välilläkin on eroja ja esimerkiksi A-muoto inhiboi huomattavasti paremmin estrogeenireseptorin toimintaa kuin B- ja C-muodot (Singhal ym. 2017).

### 1.3.2 Androgeenireseptori

Androgeenireseptori on tumareseptori, jonka ligandina toimivat androgeenit kuten testosteroni. Androgeenit osallistuvat miehen sukupuolisia ominaisuuksia ilmentävien geenien toimintaan, mutta androgeenejä esiintyy myös naisissa munasarjojen ja lisämunuaisten erittämänä (Brown ym. 1989; Longcope 1986). Jopa 60-80 % rintasyöivistä ekspressoi androgeenireseptoria ja sitä pidetäänkin mahdollisena rintasyöpämarkkerina ja hoidon kohteena (Isola 1993). On kuitenkin myös tutkimuksia, joissa niiden on huomattu estävän estradiolin toimintaa normaalissa kudoksessa ja toimivan inhibiittoreina rintasyövässä (Poulin ym. 1988; Eigélieiné ym. 2012). Tämä ero voidaan selittää potilaiden erilaisen estrogeenireseptorin ilmentymisen perusteella (ER+ tai ER-) sekä androgeenireseptoria koodaavan geenin eri varianttien avulla (Hickey ym. 2015).

Tietyissä alaryhmissä rintasyövän kehitys voi olla riippuvainen androgeenireseptorista, sillä androgeenit osallistuvat rintasyöpäsolujen proliferaation stimuloimiseen (Birrell ym. 1995). Androgeenien vaikutuksesta rintasyöpään on monta erilaista näkemystä, mutta selvää korrelaatiota ei vielä ole löytynyt androgeenin ilmentymisen ja rintasyöpärisikin välillä (Kensler ym. 2018). Androgeeneihin tai androgeenireseptoriin kohdentuvaa rintasyövän hoitoa tutkitaan ER+ ja ER- syövässä, mutta erityisesti tutkimus keskittyy

kolmoisnegatiivisen rintasyövän hoitoon. Kolmoisnegatiivisessa rintasyövössä ei ilmennetä estrogeeni-, progesteroni- tai HER-reseptoria, mutta usein androgeenireseptoria yliekspressoidaan (O'Shaughnessy ym. 2016; Bonnefoi ym. 2016).

#### 1.4 Rintasyövän lääkehoito

Kaikkien eri rintasyöpätyyppien ensisijaisena hoitona on primaarisen tuumorin poistoleikkaus. Syövän levinneisyydestä riippuen voidaan poistaa koko rinta tai jättää tervettä kudosta tuumorin ympärille. Leikkaus poistaa vain primäärisen tuumorin, mutta usein tuumori on ehtinyt lähettää muualle elimistöön verenkierron ja imusolmukkeiden kautta etäpesäkkeitä, joita voidaan hoitaa sädehoidolla, kemoterapialla tai hormonihoidoilla (Buchholz ym. 2002; Chen ym. 2018).

##### 1.4.1 Sädehoito

Syöpäsolujen jakautumista voidaan estää säteilyttämällä syöpäkudosta. Röntgensäteet vaikuttavat erityisesti jakautumisvaiheessa oleviin soluihin ja siten vaikutukset kohdistuvat hyvin juuri syöpäsoluihin. Sädehoito toimii paikallisena hoitona, sillä se kohdistetaan tiettyyn alueeseen, jotta haitat terveeseen kudokseen saadaan minimoitua. Sädehoitoa voidaan käyttää ennen tuumorin poistamista sen koon pienentämiseksi ja yksittäisten tuumorin ulkopuolella olevien solujen jakautumisen estämiseksi (Fisher ym. 2002; Belletti ym. 2008). Rintasyövän vaeltavat tuumorisolut eli CTC:t (engl. circulating tumor cells) ovat peräisin primäärisestä tuumorista ja ne siirtyvät sieltä potilaan verenkiertoon. CTC:tä ei tavata terveillä potilailla, joten ne voivat toimia biomarkkerina sekä taudin etenemisen ennusteena. CTC:t metastasoivat uusiin paikkoihin ja voivat muodostaa tuumoreita (Allard ym. 2004; Sleijfer ym. 2007). Syöpäsolut voivat kuitenkin kehittää resistenssin säteilyä vastaan, jolloin tarvitaan muita hoitoja solujen jakaantumisen estämiseksi. Hormonaalisen syövän hoidossa hyvä ennuste on saatu käyttämällä sädehoitoa yhdessä tamoksifeenin kanssa (Fisher ym. 2002).

##### 1.4.2 Kemoterapia

Kemoterapiaa käytetään edenneen rintasyövän primaarihoidossa. Sen avulla myös primaarin tuumorin koko saadaan pienennettyä (Fisher ym. 2002), leikkauksesta paranemista nopeutettua (Pyfer ym. 2016) ja siirrettyä leikkauksen ajankohtaa myöhemmäksi, mikäli se on tarpeellista. Leikkauksen siirtoa voidaan pitää tarpeellisena esimerkiksi, jos potilas polttaa tupakkaa, sillä tupakanpolto on yhdistetty

huonontuneeseen haavan paranemiseen (Møller ym. 2002). Kemoterapiaa annetaan myös leikkauksen jälkeen estämään syövän uusiutumista. Kemoterapiassa käytettyjä lääkkeitä on useita, joista käytetyimpiä ovat taksaani, syklofosfamidi, antrasykliinit ja fluorourasiili. Hoidon haittapuolena on monet sivuvaikutukset, joista yleisimmät ovat hiusten lähtö, lihassärky, väsymys, pahoinvointi ja verenvuoto. Myös pitkäaikaisia sivuvaikutuksia voi ilmetä, kuten kardiomyopatiaa, aikaiset vaihdevuodet ja neurolokognitiivisia toimintahäiriöitä (Palmer ym. 1980; Veroneseym 2018).

### 1.4.3 Hormonaalinen hoito

Hormonaalisen syövän hoito ja leviämisen estäminen kohdennetaan steroidihormonireseptoreihin. Niiden toimintaan voidaan vaikuttaa antiestrokeeneilla, jotka usein kuuluvat joko selektiivisiin estrogeenireseptorin modulaattoreihin tai selektiivisiin estrogeenireseptorin hajottajiin. Antiestrokeenit estävät estrogeenien toimintaa muun muassa kilpailevalla inhibitiolla sitoutumalla samaan kohdereseptoriin ja ne toimivat tärkeimpänä rintasyövän endokriinisena hoitomenetelmänä (Berry ym 2006). Estradioli lisää kohdereseptoriensa kautta solujen proliferaatiota sekä migraatiota ja siten syövän kasvua (Hartman ym. 2009; Casolari ym. 2011). Kun estradiolin kohdereseptoreiden konformaatio saadaan muutettua antiestrokeenin sitoutumisen myötä ja estradioli ei kykene enää sitoutumaan yhtä tehokkaasti niihin, estradiolin säätelemien kohdegeenien alavirran signalointireitit estyvät (Shiau ym 1998). Tämä taas johtaa solujen proliferaation ja migraation laskuun (Katzenellenbogen ym 1985). Antiestrokeeneilla on myös itsessään proliferaatiota estävä vaikutus rintasyöpäsoluihin. Toinen hormonaalisessa hoidossa käytetty steroidihormonireseptoreiden aktiivisuuteen kohdentuva menetelmä on aromataasi-inhibiittoreiden käyttö. Niiden avulla voidaan estää suoraan estrogeenien synteesiä (Chen ym. 1997).

#### 1.4.3.1 Tamoksifeeni ja toremifeeni

Estrogeenipositiivisen rintasyövän tärkeimpänä lääkehoitona toimii oraalisesti nautittava tamoksifeeni. Hormonaalisen syövän hoidossa yhtä hyvä pitkäaikaisennuste on saatu käyttämällä pelkästään tamoksifeenia, kun vertailukohteena oli ryhmä, jonka syöpä oli ensin leikattu ja hoitoa jatkettu tamoksifeenilla (Mustacchi ym. 2003). Tamoksifeeni löydettiin vuonna 1962, jolloin sen oli tarkoitus toimia hormonaalisena ehkäisyinä, mutta myöhemmin sen havaittiin estävän estradiolin sitoutumista estrogeenireseptoriin ja siten estävän syövän kehityksen jatkumisen (Harper ym. 1966 & 1997; Cole ym. 1971)

Tamoksifeenin sitoutuminen aiheuttaa reseptorin konformaation muutoksen, jolloin se inhiboi alavirran geenien aktivoitumisen (Shiau ym 1998).

Tamoksifeeni kuuluu SERM-yhdisteisiin eli selektiivisiin estrogeenireseptorin modulaattoreihin ja sitä käytetään ER+ rintasyövän hoidossa. Elimistössä maksassa toimivat entsyymit CYP2D6 ja CYP3A4 muuttavat tamoksifeenin aktiiviseen muotoonsa, jolloin syntyneet tuotteet sitoutuvat estrogeenireseptoreihin ja estävät DNA-synteesin (Desta ym. 2004). Tamoksifeeni estää solujen proliferaatiota ja solut jäävät solusykliin G<sub>1</sub>-vaiheeseen (Johnson ym. 1989 Lykkesfeldt ym. 1984). Kuitenkin tamoksifeenin pitkäaikainen käyttö kaksinkertaistaa riskin sairastua kohdun limakalvon syöpään, sillä se toimii estrogeeniagonistina kohdun limakalvon soluissa, joissa se aktivoi hTERT:in eli ihmisen telomeraasi käänteiskopioijan ilmentymisen ja siten stimuloi proliferaatiota (Wang ym. 2002).

Toremifeeni kuuluu tamoksifeenin tavoin SERM-yhdisteisiin ja sillä on antiestrogeeninen vaikutus rintakudoksessa sen sitoutuessa estrogeenireseptoriin (Lerner ym. 1990). Toremifeeni muistuttaa tamoksifeenia monilta osin. Toremifeenin vaikutukset on todettu olevan yhtä hyvät kuin tamoksifeenilla ER+ syövän hoidossa postmenopausaalisilla potilailla (Pyrhönen ym. 1997). Myös näiden metaboliittien toksisuus on samaa luokkaa (Kirk ym. 1993). Kuitenkin tamoksifeenilla ja toremifeenilla on erilainen affiniteetti estrogeenireseptoreihin, sillä toremifeenilla on 100-kertainen affiniteetti estrogeenireseptoriin ja toremifeenia siedetään myös paljon suuremmissa pitoisuuksissa kuin tamoksifeenia (Jordan ym. 1980; Kohler ym. 1990). Toremifeeniä voidaan käyttää yhdessä aromataasi-inhibiittorin kanssa hormonaalisen syövän hoidossa (Goss ym. 2007).

#### 1.4.3.2 Selektiiviset estrogeenireseptorin modulaattorit

Selektiiviset estrogeenireseptorin modulaattorit eli SERM:it ovat ER+ rintasyövän hoitoon käytettyjä synteettisiä lääkkeitä, jotka nimensä mukaisesti toimivat muokkaamalla estrogeenireseptorin toimintaa. SERM:ien toiminta voi olla joko estrogeenista (luu) ja antiestrogeenista (rintakudos) kohdekudoksesta riippuen. Rintasyövässä niiden toiminta on antiestrogeenista, jos niitä käytetään hormoniriippuvaisen rintasyövän ennaltaehkäisyyn ja hoitoon (Frasor ym. 2004). SERM:in sitoutuessa estrogeenireseptoriin alfa, beeta tai molempiin, reseptori-ligandi -

kompleksin konformaatio muuttuu (Brzozowski ym. 1997; Paige ym 1999). Selektiivisiä estrogeenireseptorin modulaattoreita on kolmea eri sukupolvea; ensimmäisen sukupolven SERM:it ovat tamoksifeeni ja toremifeeni, toisessa sukupolvessa raloksifeeni ja kolmannessa sukupolvessa bazedoksifeeni, lasofoksifeeni sekä ospemifeeni (Pinkerton ym. 2014). Ensimmäisen sukupolvien SERM:ien on todettu olevan agonistisia kohdunlimakalvolla ja altistavan syöpämuutoksille, joskin toremifeenilla vaikutukset olivat vähäisemmät. Toisen ja kolmannen sukupolven SERM:ien etuna onkin, että ne eivät aiheuta agonistisia vaikutuksia kohdun limakalvolla ja samaan aikaan säilyttävät agonistiset vaikutukset luustoon (Marttunen ym. 1998).

#### 1.4.3.3 Aromataasi-inhibiittorit

Aromataasi-inhibiittoreita tutkittiin 1970-luvulla hormonaalisen ehkäisyn komponenttina, mutta niiden huomattiin estävän hiirten tuumoreiden kasvua. Rintasyöpäkudoksen kasvua rajoittavan ominaisuutensa myötä aromataasi-inhibiittoreiden käyttö yleistyi rintasyövän hoidossa (Schwarzel ym. 1973; Brodie ym. 1977; Brodie ym. 1981). Aromataasientsyymiä tuotetaan rintakudoksessa ja aromataasi-inhibiittorit estävät tämän toiminnan. Aromataasi (=CYP19A1, cytochrome P450 – geeniperheen jäsen) katalysoi elimistössä estradiolin synteessin testosteronista. Entsyymiä tuotetaan normaalissa rintakudoksessa sekä rintasyöpäkudoksessa. (Thompson ym. 1974; Amarneh ym. 1993; Harada ym. 1997; Means ym. 1989). Tällä tavoin estrogeenia ei muodostu eikä se pääse vaikuttamaan kohdereseptoreihinsa ja sitä kautta ylläpitämään syövän kasvua. Aromataasia ilmentävästä CYP19 geenistä löytyy useita muotoja, mikä voi vaikuttaa aromataasi-inhibiittoreiden tehokkuuden vaihteluun potilaiden välillä (Sebastian ym. 2001; Leyland-Jones ym 2015). Myös aromataasi-entsyymien aktiivisuus voi toimia merkinä aromataasi-inhibiittorin toiminnan vaikutuksista siten, että korkea pitoisuus korreloi hyvän aromataasi-inhibiittorivasteen kanssa. (Yue ym. 2001).

Aromataasi-inhibiittorit laskevat veressä kiertävän estrogeenin tasoa ja vaikuttavat haitallisesti luustoon, aivoihin ja verenkiertoelimistöön, joihin estrogeeni vaikuttaa positiivisesti (Burstein ym. 2014). Aromataasi-inhibiittorit ovat käytössä erityisesti postmenopausaalisten potilaiden rintasyövän hoidossa ja niitä voidaan käyttää yksinään tai yhdistelmähoitona esimerkiksi CDK4/6-inhibiittorien kanssa. CDK4/6 on sykliiniriippuvainen kinaasi, joka osallistuu solusyklin säätelyyn (Goetz ym. 2017).

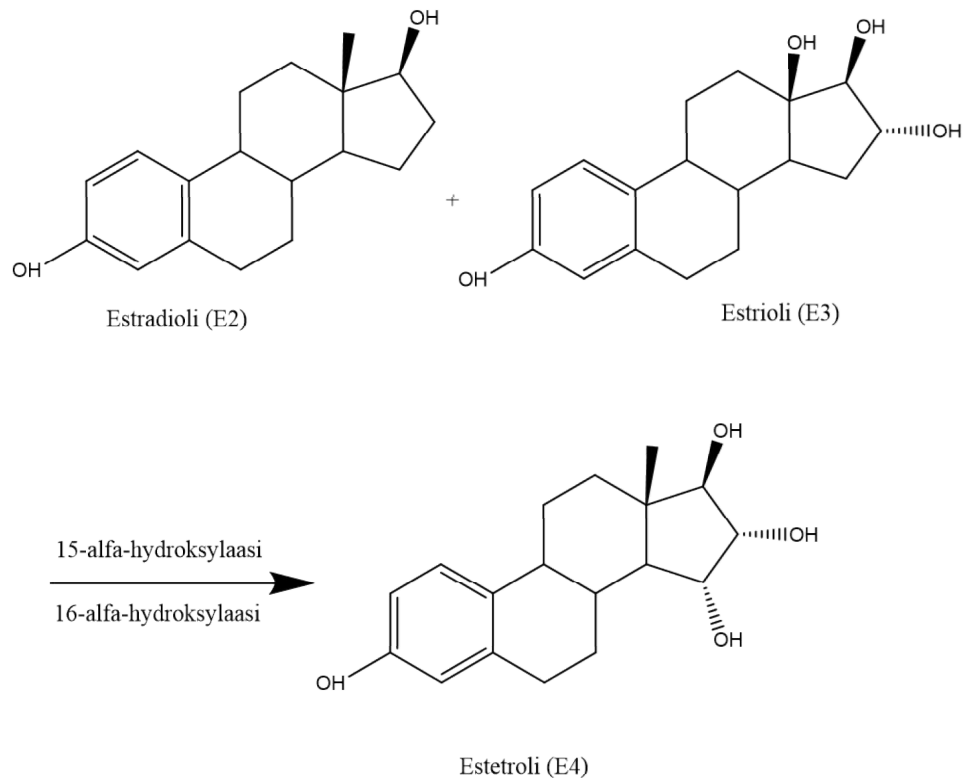
Kuitenkin 30 % aromataasi-inhibiittoreita käyttävistä potilaista kärsii lihas- ja nivel särystä (Liedke ym. 2012).

#### 1.4.3.4 Kehitteillä olevat hoidot – Estetrolin potentiaali rintasyövän hoidossa

Uusia hoitoja ja lääkkeitä rintasyöpää vastaan kehitetään jatkuvasti, sillä tehokkaampia lääkkeitä tarvitaan ja eri hoitoja vastaan voi kehittyä resistenssi. Monet uusista hoidoista inhiboivat solusykliä, angiogeneesiä tai lisäävät apoptoosia. Kliinisissä kokeissa rintasyöpälääkkeiden kohteena ovat muun muassa CDK4/6 (Finn ym 2015), mTOR (Yardley ym. 2013) Pi3K (Krop ym. 2015) VEGF (Martin ym. 2015) ja BCL2 (Adelson ym. 2015).

Lisääntyneen estrogeenitason säätelyyn on kehitetty SERD:t eli selektiiviset estrogeenireseptorin hajottajat, jotka saavat aikaan estrogeenireseptorin hajotuksen, mikä voi toimia ratkaisuna ER+ syövän hoitoresistenssiin (Bergh ym. 2012; Johnston ym. 2013). Tällä hetkellä ainoa markkinoilla oleva kliiniset tutkimukset läpäissyt SERD on fulvestrantti (Robertson ym. 2009). Androgeenireseptorin roolia rintayövässä ja sen hoidossa on alettu myös tutkimaan enemmän ja sitä vastaan onkin kehitetty selektiivisiä androgeenireseptorin hajottajia (Lai ym. 2016).

Eräänä uutena hormonihoidona tutkitaan estetrolia (E4), joka löydettiin vuonna 1965 (Hagen ym. 1965). E4 on heikko estrogeeni, jota sikiön maksa tuottaa raskauden aikana ja sitä siirtyy äidin verenkiertoon mitattavissa olevia määriä istukan kautta, jolloin sitä voidaan käyttää sikiön hyvinvoinnin merkinä (Zucconi ym. 1967; Tulchinsky ym. 1975). Syntymän jälkeen sikiön maksan kyky tuottaa tätä hormonia häviää eikä syytä tähän vielä tunneta kuten ei myöskään tiedetä sen fysiologisia vaikutuksia sikiössä tai äidissä. Estetroli syntetisoidaan estradiolista ja estriolista raskausviikosta 10 lähtien. Synteesistä vastaa kaksi entsyymiä, 15-alfa-hydoksyylaasi ja 16-alfa-hydroksylaasi (Schwers ym. 1965; Zucconi ym. 1967). Nimensä mukaisesti nämä entsyymit lisäävät rakenteeseen ylimääräisen hydroksyyliyhymän (Kuva 5).



**Kuva 5. Estetrolin biosynteesi maksan 15 $\alpha$ - ja 16 $\alpha$ -hydroksylaasien avulla.** Estetrolia (E4) tuottaa maksan 15-alfa-hydroksylaasi ja 16-alfa-hydroksylaasi estradiolista (E2) ja estriolista (E3). Lyhenteet nimillä tulee yhdisteessä olevan hydroksyyli­ryhmän määrän mukaan ja yhdisteet ovat kemialliselta rakenteeltaan muuten täysin samanlaisia.

Estetrolin on raportoitu toimivan antagonistisesti estradiolin kanssa ja sitä tutkitaan mahdollisena hormonihoidona rintasyövässä sekä vaihdevuosien hormonihoidona. Sillä ei ole yhtä suurta vaikutusta verenhyytymiseen kuten estradiolilla, joten se ei aiheuta veritulpariskiä (Gérard ym. 2015 B; Singer ym. 2014). Estetrolin kohdereseptoreja ovat estrogeenireseptorit alfa ja beeta, mutta estradiolista poiketen se ei sitoudu muihin sukupuolihormonireseptoreihin (Visser ym. 2008).

### 1.5 Rintasyöpätutkimuksen mallit

Rintasyöpää tutkitaan maailmanlaajuisesti solu- ja hiirikokeiden avulla. Kasvattamalla rintasyöpäkudoksesta eristettyjä ja karakterisoituja solulinjoja, voidaan tutkia *in vitro* muun muassa syöpäsolujen proliferaatiota, migraatiota, elinkykyä ja invaasiota. Nämä kokeet tehdään tyypillisesti 2D-viljelmänä petri­maljalla, jossa solut kasvavat pohjaan kiinnittyneinä. *In vitro* -kokeita voidaan myös tehdä 3D:nä, jolloin solut voivat muodostaa luonnollisen kaltaisia kolmiuloitteisia rakenteita kiinnittyessään toisiinsa. Organotyyppisissä 3D-soluviljelmissä solut muodostavat kudoksenkaltaisia rakenteita,

koska ne kasvavat biologisesti aktiivisen soluväliaineen (ECM) ympäröiminä. Tutkimuksessa useimmin käytettyjä ECM-kasvu ympäristöjä ovat esimerkiksi tyvikalvon proteiinikomponentteja sisältävä Matrigel ja tyypin I kollageeni. Viljelmiin on mahdollista lisätä myös muita syöpäkudoksessa esiintyviä strooman solutyyppejä (kuten fibroblasteja, endoteelisoluja, tulehdussoluja) ja siten voidaan mallintaa syöpäsolujen kasvua ja invaasiota in vivo –tilannetta jäljittelevissä olosuhteissa esimerkiksi erilaisten kemoatraktanttien avulla (Moriah ym. 2016).

*In vivo* -kokeet tehdään elävässä organismissa kuten hiiressä tai rotassa. Eräänä mallina toimivat potilasperäiset ksenograftit eli PDX:t (patient derived xenografts), joissa heikentyneen immunitetin omaaviin hiiriin injektoidaan syöpäsoluja. Tällä menetelmällä voidaan seurata esimerkiksi tuumorin koon kasvua ja mahdollisten etäpesäkkeiden muodostumista. Elimiä tai niiden osia voidaan viljellä myös *ex vivo* potilasperäisten eksplanttien avulla (Morton ym. 2007; Centenera ym. 2018). Potilaista peräisin olevien kudosten viljelyn avulla voidaan nähdä paremmin kuinka erilaisia vasteita eri potilasnäytteet voivat antaa syöpäkudoksen heterogeenisyyden vuoksi, ja siten mallintaa todennukaisempaa tilannetta karakterisoiutuihin solulinjoihin verrattuna, joissa kaikki solut ovat samaa alkuperää. Kudosviljelyllä voidaan myös välttää eläinkokeet ja ihmisperäisillä näytteillä tehtävä kudosviljely luo tutkimukselle hyvän pohjan kliinisiin kokeisiin.

Solu- ja eläinkokeiden perusteella voidaan selvittää syövän synnyn, ehkäisyn ja estämisen taustalla vaikuttava biokemia, molekyylibiologia ja fysiologia tutkimalla esimerkiksi erilaisten geenien toimintaa ja aktiivisuutta, signaalintireittejä ja niihin vaikuttavia transkriptiotekijöitä sekä proteiinien välisiä vuorovaikutuksia.

## 2 Tutkielman tarkoitus ja tavoitteet

Estetrolia on tutkittu sekä vaihdevuosien hormonihoidon että rintasyövän hoitona (Coelingh ym. 2016). Tutkielmassa selvitetään estetrolin agonistisia ja antagonistisia ominaisuuksia yksinään ja yhdessä estradiolin kanssa normaalissa rintakudoksessa, rintasyöpäkudoksessa sekä rintasyöpäsoluissa. Estetrolin on osoitettu toimivan syöpäsoluviljelmissä estradiolin toimintaa estävästi, jolloin sitä voitaisiin tulevaisuudessa käyttää mahdollisena rintasyövän tai vaihdevuosien hormonihoidon (Singer ym. 2014; Gérard ym. 2015 A). Markkinoilla olevat hormonihoidot sisältävät vaikuttavana aineenaan estradiolia tai synteettistä etinyliestradiolia, jotka stimuloivat rintarauhasen epiteelin proliferaatiota ja joiden käyttö on yhdistetty mm. suurentuneeseen veritulppariskiin. Estetrolilla on kuitenkin huomattavasti pienempi vaikutus verenhiyytymiseen ja se voisi siten toimia turvallisempana hoitona (Gérard ym. 2015 C). Ennen estetrolin toiminnan selvittämistä ihmisillä tehtävissä kliinisissä kokeissa tulee tämän hormonin vaikutukset tutkia solu- tai eläinkokeilla. Tässä tutkimuksessa tutkittiin estetrolin vaikutusta normaalissa rintakudoksessa, rintasyöpäkudoksessa ja rintasyöpäsoluissa *ex vivo* sekä *in vitro*. *Ex vivo* -osuudessa rintakudosta viljellään käyttäen muokattua Trowell'in viljelymenetelmää (Trowell 1959; Eigélieiné ym. 2012). Eksplanttiviljelyiden avulla voidaan välttää eläinkokeiden käyttöä ja pystytään tutkimaan estetrolin vaikutuksia kudostasolla ihmisestä peräisin olevissa näytteissä. Tutkielman kudosviljelyosuus liittyy estetrolin rintasyöpävaikutuksia selvittävään yhteistyöprojektiin Pantarhei Bioscience BV:n (Zeist, Hollanti) kanssa.

*In vitro* -osuudessa 2D- ja 3D-soluviljelykokeilla selvitettiin, miten estetrolia vaikuttaa solujen kasvuun ja elossa pysymiseen ja miten kasvuympäristö vaikuttaa estetrolin kykyyn stimuloida solujen kasvua. 3D-soluviljely mallintaa paremmin solujen luonnollista kasvutapaa, sillä solut pääsevät kasvamaan niiden luonnollista kasvuympäristöä simuloivissa ympäristöissä, kun taas 2D-kokeessa solut kasvavat muovisen solumaljan pohjaan kiinnittyneinä (Pampaloni ym. 2007).

### 3 Aineisto ja menetelmät

#### 3.1 Rintakudosnäytteiden keräys ja viljely

Tutkimusta varten kerättiin Auria biopankin kautta potilaiden rintakudosnäytteitä Turun yliopistollisen keskussairaalan patologian osastolta. Potilaita hoitava lääkäri pyysi heiltä biopankkiluvan kudosnäytteitten antamisesta. Tietoa potilaan iästä, näytteen histologisesta tyypistä ja asteesta sekä estrogeenireseptoreiden aktiivisuudesta käytettiin tutkimuksessa (Liite 1). Normaalia rintakudosta rinnanpienennysleikkauksista (n=8) ja rintasyöpäkudosta tuumorin poistoleikkauksista (n=22, duktaalinen tai lobulaarinen syöpä) saatiin 38–90 vuotiailta naisilta, joista enemmistö oli postmenopausaalisia. Jotta potilaan aikaisemmat hoidot eivät vaikuttaisi tutkimuksen hormonikäsittelyiden tuloksiin, valitut potilaat eivät olleet saaneet neoadjuvanttihoitoa ennen leikkausta. Histologisilta parametreiltään kudoksen tuli ilmentää estrogeenireseptoria ja progesteronireseptoria, mutta HER2-reseptoria ei tullut ilmentyä kudoksessa.

Suoraan leikkauksesta saadut kudospalat kuljetettiin käsiteltäväksi kylmässä steriilissä PBS:ssä. Kudospaloista poistettiin ylimääräinen rasvakudos ja näyte leikattiin halkaisijaltaan noin 2 mm kokoisiksi paloiksi, joita viljeltiin linssipaperin peittämän metallisen rutilän päällä 24-kuoppalevyllä elatusliuoksessa (väritön HEPES-puskuroitu DMEM/F12 jossa L-glutamiini (Gibco, 11039021), 100 IU/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä, 0.25 µg/ml amfoterisiini B:tä (Gibco, 15240062), 10 % lämpökäsittelyllä inaktivoitua FBS:ää, 10 nM hydrokortisonia (Sigma-Aldrich, H4001), 0.25 % insuliini-transferriini-seleniumia (Gibco, 41400045) ja 10 ng/ml EGF:ää (ihmisperäinen rekombinantti)). Ennen viljelyä näytteet huuhdeltiin pesuliuoksessa (väritön DMEM/F12, jossa L-glutamiini (Gibco, 11039021100), 100 IU/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä, 0.25 µg/ml amfoterisiini B:tä (Gibco, 15240062)). Elatusliuoksissa käytettiin erilaisia estradioli- sekä estetrolipitoisuuksia (Estetrol saatu Pantarhei Bioscience BV:ltä, Alankomaat) yksinään tai yhdistelminä ja kontrollina toimi etanoli. Neljästä viiteen kudospalaa viljeltiin rutilän päällä kolmena rinnakkaisena kasvatuksena ja elatusliuos vaihdettiin joka kolmas päivä. Kasvatuksia ylläpidettiin 5 % CO<sub>2</sub>:ssa 37 °C:ssa inkubaattorissa (CO<sub>2</sub> Incubator MCO-20AIC, Sanyo). Kahdeksantena päivänä viljely lopetettiin ja näytteet kerättiin joko nestetyypeen tai 10% neutraalipuskuroituun formaliiniin.

### 3.2 Immunohistokemialliset värjäykset

Viljellyistä kudospalaoista valmistettiin leikkeet, joista tunnistettiin ER $\alpha$ :n, ER $\beta$ :n, PR:n, KI67:n ja Casp3:n antigeeniekspressio immunohistokemiallisen värjäyksen avulla. Viljeltyjen kudospalojen annettiin fiksoitua yön yli 10%:ssa neutraalipuskuroidussa formaliinissa, minkä jälkeen ne dehydroitiin 70% etanolissa. Etanolissa näytteet olivat keskimäärin viikon, ennen kuin niistä valettiin parafiiniblokki ja leikattiin 5  $\mu$ m leikkeet mikroskooppilaseille (Thermo Scientific™ SuperFrost Ultra Plus™ Adhesion Slides) immunohistokemiallisia värjäyksiä varten. Parafinoituja kudospalaita lämmitettiin tunti 60 °C:ssa kudospaloihin kiinnittymisen varmistamiseksi. Näytteet deparafinoitiin ksyleenissä ja nousevassa etanolisarjassa (70 %, 96 % 100 %). Deparafinoitujen näytteiden huuhdeltiin vedellä ja käsiteltiin 5 minuuttia 3 %:lla vetyperoksidilla epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi. Peroksidaasiblokkauksen jälkeen lasia kuumennettiin mikroaaltouunissa 800W teholla kolme kertaa 10 minuutin ajan 10 nM sitraattipuskurissa (pH 6) ja annettiin jäähtyä huoneenlämmössä. Jäähtyneisiin lasiin lisättiin primäärivasta-ainetta (Taulukko 1.) vaikuttamaan yön yli + 4 °C:ssa kostutettujen papereiden päällä suljetussa astiassa haihtumisen estämiseksi. Kontrollina toimi näyte, jossa käytettiin PBS:ää primäärivasta-aineen sijasta.

**Taulukko 1. Immunohistokemiassa käytettyjen vasta-aineiden tiedot ja laimennossuhteet.**

Kohde	Valmistaja	Laji	Kloonit	Laimennos
Ki67	DAKO, M7240	Hiiri	MIB1	1:200
Caspase 3	Cell signaling; 9664	Kani	5A1	1:500
ER $\alpha$	DAKO, M7047	Hiiri	1D5	1:500
PR	Novocastra; NCL-L-PGR-AB	Hiiri	C16/SAN27	1:50
ER $\beta$	Abcam; Ab288	Hiiri	14C8	1:500-1:1000
ER $\beta$	Perseus proteomics	Hiiri	PPZ0506	1:1000

Seuraavana päivänä näytteiden annettiin lämmitä huoneenlämpöiseksi ennen primäärivasta-aineen huuhtelua PBS:llä. Viiden minuutin huuhtelu toistettiin kolme kertaa. Biotinyloidun sekundäärivasta-aineen (laimennettu 1:200; Vector Laboratories, USA) annettiin vaikuttaa leikkeillä tunnin ajan huoneen lämmössä. Lasin värjäämisessä käytettiin kromogeenistä HRP-konjugoitua diaminobentsidiiniin perustuvaa menetelmää (Vecstasin Elite ABC Kit, Vector Laboratories, USA). Tämä avidiini-biotiiniliuos valmistettiin puoli tuntia ennen sen käyttöä ja sen annettiin vaikuttaa leikkeillä vähintään tunti huoneenlämmössä, minkä jälkeen lasit huuhdeltiin kolmesti PBS:llä kuten

edellä. Väriin muodostuminen tapahtui DAB-seoksella (3,3'-diaminobentsidiini), joka oli laimennettu veteen. Eri vasta-aineilla on erilainen DAB-värjäysaika, joka optimoitiin seuraamalla mikroskoopilla värjäyksen vahvuutta. DAB:n vaikutusajan päätyttyä se huuhdeltiin pois vedellä ja vastavärjäyksenä käytettiin Mayers'in hematoksyliiniliuosta. Vedellä huuhdelluista värjäytyistä näytteistä poistettiin vesi ja ne fiksattiin käymällä läpi sama sarja etanolia ja ksyleeniä kuten deparafinoinnissa, mutta vastakkaiseen suuntaan aloittamalla 100 % etanolilla. Ksyleenillä käsitellyt lasit päällystettiin peitinlaseilla ja jätettiin kuivumaan yön yli vetokaappiin.

### 3.3 Immunohistokemiallisten värjäysten kvantitointi

Värjätyt lasit skannattiin Panoramic 250 Slide Scanner -laitteella (3DHitech, Unkari). Skannatuista näytteistä otettiin 20-kertaisella suurennoksella kustakin potilasnäytteestä ja käsittelystä 1-3 kuvaa, joista laskettiin positiivisten solujen suhteellinen osuus (DAB-värjäytyjen tuma-alueiden pinta-alan suhde koko kuvan tumapinta-alaan) Immuno ratio-ohjelmalla (<http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>) verraten alkuperäistä kuvaa ohjelman pseudovärjättyyn tulokuvaan. Näistä arvoista laskettiin kunkin vasta-aineen ja hormonaalisen käsittelyn kohdalla keskiarvot.

### 3.4 RNA:n eristys ja komplementaarisen DNA:n synteesi

Kvantitatiivista PCR:ää varten nestetyppellä jäädytetyistä ja -70 °C:ssa säilytyistä näytteistä eristettiin RNA fenoli-kloroformiutolla valmistajan ohjeen mukaan (TRI<sup>sure</sup>™ solution, Bionline, BIO-32033). Näytteet homogenoitiin ennen eristystä UltraTurrax®:illa. Eristetty RNA eluoitiin 30 µl:aan RNAasi-vapaata vettä ja konsentraatio mitattiin NanoDrop® 2000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific). Eristettyjä RNA-näytteitä säilytettiin -70 °C:ssa.

Komplementaarisen DNA:n synteesissä käytettiin 1 µg RNA:ta. Synteesin ensimmäisessä vaiheessa eristetty RNA, RNAasi vapaa vesi, oligo d(T)<sub>18</sub> mRNA aluke (New England Biolabs, S1316S) ja deoksinukleotidisekoitus (Thermo scientific, R1121) ajettiin 5 minuutin ohjelmalla (5min +65 °C, ∞ + 8 °C). Käänteistranskriptaasipuskuri, Maxima käänteistranskriptaasi (Thermo scientific, EP0743) ja RiboLock RNAasi-inhibiittori (Thermo scientific, EO0382) lisättiin seuraavaa tunnin ajoa varten kuhunkin näytteeseen; +50°C 30min, +85°C 5min, +8°C ∞. Kontrollina oli näyte, jossa RNA oli korvattu RNA-

vapaalla vedellä. PCR laitteena toimi Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Massachusetts, Yhdysvallat).

### 3.5 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiivisessa PCR:ssä tutkittiin eri geenien mRNA:n ilmentymistä SYBR Green:in avulla. SYBR Green on fluoresenssiin perustuva menetelmä, jossa SYBR Green -reagenssi sitoutuu PCR-tuotteisiin ja qPCR-ajosta saadut Ct-arvot kertovat missä PCR-syklissä fluoresenssi ylittää asetetun kynnyksarvon (Heid ym. 1996). Kvantitatiivisia PCR-kokeita varten komplementaarinen DNA laimennettiin veteen 1:10. Näyte valmistettiin RNAasi vapaaseen veteen lisäämällä alukkeet (Oligomer, Finland tai Metabion, Germany; Taulukko 2.) ja DyNAmo HS SYBR Green qPCR master mix (Thermo Scientific, F410).

**Taulukko 2. Kvantitatiivisessa PCR:ssä käytettyjen ihmisen kohdegeenien alukkeiden sekvenssit 5'-3'-suunnassa.**

Kohdegeeni	Forward	Reverse
<i>ACTB</i>	CGT GGG GCG CCC CAG GCA CCA	TTG GCC TTG GGG TTC AGG GGG
<i>AR</i>	CTC ACC AAG CTC CTG GAC TC	CAG GCA GAA GAC ATC TGA AAG
<i>AREG</i>	GTG GTG CTG TCG CTC TTC ATA	ACT CAC AGG GGA AAT CTC ACT
<i>ER<math>\alpha</math></i>	GCC ATC AGG TGG ATC AAA	TGG AGA TCT TCG ACA TGC TG
<i>ER<math>\beta</math></i>	AAA ACC GGC GCA AGA GCTG	TGC TCG TCG GCA CTT CTC TG
<i>GHR</i>	ACT GAG GCC ACA GCA GCT	AGG TGA ACG GCA CTT GGT
<i>KI67</i>	ACG AGA CGC CTG GTT ACT ATC	GCT CAT CAA TAA CAG ACC CAT TTA
<i>PR</i>	AGC ATG TCG CCT TAG AAA GTG C	TAG GGC TGT GCT TTC ATT TG
<i>TFF1</i>	GGT GTC CAT GCT GGC CCT CG	ACA CTC CTC TTC TGG AGG GAC GTC

Näytteet ajettiin C1000 Thermal cyclerillä (CFX96™Real-Time System C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Kalifornia, Yhdysvallat) seuraavalla ohjelmalla; aloitus denaturaatio 95 °C 4 min, denaturaatio 95 °C 5 sekuntia, alukkeiden liittyminen 55/60/62 °C 15 sekuntia ja elongaatio 72 °C 20 sekuntia. Syklejä ajettiin 39 ja viimeisessä

elongaatioissa 72 °C 3 min, sekä 65 °C 1 sekunti ja viimeinen denaturaatio 95 °C 5 sekuntia. Ajosta saaduista Ct-arvoista (Cycle threshold) laskettiin geenien ilmentyminen seuraavan kaavan mukaisesti;  $2^{-(\Delta C_{t\text{näyte}} - \Delta C_{t\text{kontrolli}})}$ . Kohdegeenien Ct-arvoista laskettiin keskiarvot, joista miinustettiin kontrollina toimivan beeta-aktiinin keskiarvo. Tätä arvoa verrattiin viljelyiden kontrolliin, jolloin lopputuloksena saatiin laskettua geenien suhteelliset ilmentymistasot kaavan mukaisesti.

### 3.6 Soluviljely

Soluviljelykokeissa käytettiin estrogeeneihin reagoivaa rintasyöpäsolulinjaa MCF-7, joka oli testattu mykoplasmaakontaminaation varalta (PromoKine PCR Mycoplasma Test Kit, PromoCell). Soluja viljeltiin Ø 10 cm petrimaljoilla noin 80 % konfluenssiin DMEM-elatusliuoksessa, joka sisälsi 10 % FBS:ää, 1 % L-glutamiinia sekä 100 µg/ml insuliinia. Solujen saavutettua noin 80% konfluenssin ne jaettiin huuhtelemalla maljaa PBS:llä ja irrottamalla solut trypsiini-EDTA-liuoksella. Solut sentrifugoitiin pohjaan 160 x g 3 min ja jaettiin uudelle maljalle 1:10. Kokeita varten solumäärä laskettiin solukammion avulla solulaskurissa (Counting Slides Dual Chamber for Cell Counter, Bio-Rad). Solujen kunto tarkistettiin kolmen päivän välein ja samalla elatusliuos vaihdettiin uuteen tai solut jaettiin.

#### 3.6.1 Solujen kasvun määrittäminen

MCF-7 solujen jakautumista ja kasvua seurattiin kuvantamalla soluja kasvun aikana ja määrittämällä solujen konfluenssia maljalla IncuCyte® ZOOM:n (Essen Bioscience) avulla. Solut viljeltiin ensin 96-kuoppalevyllä 2000 solua/kaivo elatusliuoksessa ja annettiin kiinnittyä yön yli kaivon pohjaan 5%:ssa hiilidioksidissa 37 °C:ssa inkubaattorissa (CO2 Incubator MCO-20AIC, Sanyo). Seuraavana päivänä solut herkistettiin tulevalle hormonikäsittelylle vaihtamalla soluille elatusliuos, jossa oli vähemmän kasvutekijöitä (DMEM/F12, jossa L-glutamiini (Gibco, 11039021) ja 10 % Sigma stripped serum). Solujen annettiin kasvaa kasvutekijöistä köyhdytetyssä elatusliuoksessa yön yli, minkä jälkeen soluille vaihdettiin estetrolia, estradiolia ja/tai tamoksifeenia sisältävä elatusliuos. Solut siirrettiin IncuCyte® ZOOM:iin (Essen Bioscience) ja niiden annettiin kasvaa viiden päivän ajan. IncuCyte® ZOOM otti automaattisesti kuvan kuoppalevystä kahden tunnin välein ja kokeen loputtua kuvat käsiteltiin ja analysoitiin IncuCyte® ZOOM:lla. Koe toistettiin kolme kertaa.

### 3.6.2 Solujen elinkyvyn määrittäminen

MCF7 –solujen kasvukokeessa seurattuja 96-kuoppalevyjä käytettiin kokeen päätyttyä solujen elinkyvyn määrittämiseen mittaamalla solujen dehydrogenaasi-entsyymin aktiivisuutta. Dehydrogenaasit pelkistävät WST-8-reagenssin ((2-(2-methoxy-4-nitrofenyyli)-3-(4-nitrofenyyli)-5-(2,4-disulfofenyyli)-2H-tetrazolium), (Dojindo Laboratories)) veteen liukenemattomaksi formatsaaniksi. Aktiivisesti kasvavat tuottavat pelkistysreaktioissaan formatsaania, joten WST-8:lla voidaan mitata elossa olevien solujen suhteellista määrää (Mosmann 1983). Kokeessa kuoppalevyille lisättiin 1:10 WST-8-reagenssia ja sen annettiin vaikuttaa soluihin kahden tunnin ajan, minkä jälkeen kuoppalevystä mitattiin absorbanssi aallonpituudella 450 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™). Koe toistettiin kolme kertaa.

### 3.7 Solujen kolmiulotteiset (3D) organoidiviljelmät

Solujen käyttäytymistä organotyyppisessä 3D-soluviljelmässä seurattiin IncuCyte® ZOOM:lla. Näissä kokeissa 96-kuoppalevyille ( $\mu$ -Plate Angiogenesis, ibidi GmbH) valmistettiin Matrigeelistä (BD Biosciences) kudoksia jäljittelevä kasvuympäristö (Härmä ym. 2010), josta nähtiin, miten solujen kasvu ja selviytyminen eroavat perinteisestä 2D-kuoppalevyillä viljelystä. Oleellisena erona 2D- ja 3D-viljelmissä on solujen kasvutapa; 2D-viljelmissä solut kasvavat pohjaan kiinnittyneinä yhdessä kerroksessa, kun taas 3D-viljelmissä solut voivat kasvaa organoideiksi muodostaen erilaistuneitakin kolmiulotteisia solurakenteita. Ensin kuoppalevyn pohja täytettiin elatusliuokseen sekoitetulla Matrigeelillä (4mg/ml) sentrifugoimalla kuopan pohjalle (200G 20 min) ja antamalla sen polymerisoitua 37 °C:ssa tunnin ajan. Seuraaviksi solut upotettiin yksittäisinä soluina Matrigeeliä sisältävässä elatusliuoksessa (1mg/ml) sentrifugoimalla solu-Matrigeeli -suspensio 100 G 10 minuutin ajan ja inkuboimalla kuoppalevyä yön yli 5%:ssa hiilidioksidissa 37 °C:ssa inkubaattorissa (CO2 Incubator MCO-20AIC, Sanyo). Soluja viljeltiin 14 päivän ajan eri hormonipitoisuuksissa (Taulukko 3). Hormoneja sisältävä elatusliuos vaihdettiin kolmen päivän välein ja viimeisenä päivänä mitattiin solujen elossa pysyminen WST-8-reagenssilla kuten edellä.

**Taulukko 3. Solujen kolmiulotteisessa organoidiviljemässä käytetyt estradioli (E2) ja estetroli (E4) konsentraatiot (c).**

Hormoni	c1 (nM)	c2 (nM)	c3 (nM)	c4 (nM)	c5 (nM)	c6 (nM)
E2	1	10	-	-	-	-
E4	10	100	1000	-	-	-
E2 + E4	1 + 10	1 + 100	1 + 1000	10 + 10	10 + 100	10 + 1000

Mikroskooppikuvantamista varten solut värjättiin live-soluväriaineilla, jotta voitiin visualisoida elävät ja kuolleet solut 3D-viljelmissä. Hormoneja sisältävä elatusliuos vaihdettiin elatusliuokseen, joka sisälsi 1  $\mu\text{M}$  kahta soluja värjäävää reagenssia, Kalseiini-AM:ää ja Etidiumhomodimeeri-1:tä (EthD1) (Thermo Fisher Scientific). Väriin annettiin vaikuttaa kuoppalevyllä 30 min ajan. EthD1 kulkeutuu osittain hajonneiden solujen epästabiilimman solukalvon kautta solun sisään, jossa se sitoutuu DNA-molekyyleihin ja värjää ne punaiseksi. Elävien solujen solunsisäinen esteraasi hydrolysoi Kalseiini-AM:n vihreää väriä fluoresoivaksi kalseiiniksi.

Värjätyistä soluista otettiin konfokaalikuvat Zeiss Axiovert-200M mikroskoopilla. Mikroskooppiin oli liitettyä Yokogawa CSU22 spinning disc konfokaaliyksikkö, jossa Zeiss Plan-Neofluar 5x objektiivi. Työssä käytetyt eksitaatioaallonpituudet olivat 488nm ja 561nm. Valotusaika asetettiin välillä 300-400 ms. Kustakin kuopasta otettiin neljä kuvaa peräkkäisiltä leiketasoilta 40  $\mu\text{m}$  tasoväleillä. Kuvien intensiteetti-projektioit tehtiin SlideBook ohjelmistolla (Intelligent Imaging Innovations Inc.). Maksimaalisen intensiteetin projektioita käytettiin kuvien segmentaatioon ja fenotyypin analyysiin hyödyntämällä AMIDA – ohjelmiston “batch-mode” –toimintoa (Härmä ym. 2014). Tausta poistettiin normalisaatiolla käyttäen joko Slidebook ohjelmistoa. Segmentaatioissa punaiseksi ja vihreäksi värjäytyneet solut tunnistettiin taustasta ja segmentaatiokuvat käytiin läpi verraten niitä alkuperäiseen kuvaan, jotta voitiin poistaa mahdolliset virheellisesti analysoidut rakenteet.

### 3.8 Tilastolliset menetelmät

Immunoratio-ohjelmassa kvantitoidut immunohistokemian tulokset sekä excelillä käsitellyt qPCR-datat analysoitiin GraphPadPrism® -ohjelmalla (GraphPad Software Inc., Kalifornia, Yhdysvallat, versiolla 6.05) sekä SPSS-ohjelmistolla (IBM Corp. SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY). Molempien menetelmien mittausravot olivat vinosti oikealla jakautuneita, joten jokaiselle muuttujalle laskettiin

logaritmuunnos. Käsittelyjä verrattiin kontrolliin ja toisiinsa toistettujen mittausten varianssianalyysillä (repeated measures analysis of variance (ANOVA), sillä havainnot olivat toisistaan riippuvaisia. Lopuksi parittaisille näytteille laskettiin p-arvo käyttäen Bonferronin korjausta, jossa p-arvot kerrottiin käsittelyiden lukumäärällä. Merkitsevän eron rajana käytettiin  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

3D-soluviljelmien organoidien tilastollinen analysointi Slidebookilla ja AMIDA:lla käsitellyistä kuvista tehtiin R-koodin avulla REX-ohjelmistossa (<http://cran.r-project.org>). Tilastollisena testinä käytettiin t-testiä, jossa verrattiin kontrollia käsittelyihin määriteltyjen parametrien perusteella (rakenteen pinta-ala (Area) ja kuolleiden solujen osuus rakenteen pinta-alasta (Area Ratio Red)). Saadulle p-arvolle tehtiin vielä Bonferronin korjaus. Tuloksien visualisoinnissa käytettiin REX: iä.

## 4 Tulokset

Työn tarkoituksena oli selvittää estetrolin vaikutusta normaalissa rintakudoksessa, rintasyöpäkudoksessa sekä MCF7-rintasyöpäsolulinjassa. Ihmisen sikiö tuottaa estetrolia kehittyessään, mutta syntymään mennessä sen tuotanto lakkaa. Estetrolin fysiologisesta roolista ei vielä ole selkeää tietoa, mutta sen arvellaan voivan toimia farmakologisesti osana hormonaalista ehkäisyä, hormonihoidona vaihdevuosiin sekä rintasyövän hoidossa. Estetrolia on erityisen kiinnostava sen takia, että sen sivuvaikutukset ovat lievempiä kuin nykyisin käytössä olevien estrogeenihormonivalmisteiden, sillä se muun muassa aiheuttaa vähemmän verenhiyytymistä.

### 4.1 Estetrolin vaikutus solujen kasvuun

Solujen proliferaatiota seurattiin IncuCyte® ZOOM:illa 2D-solukokeissa. IncuCyte® ZOOM laskee kuoppalevyllä solujen konfluenssin prosentteina eri aikapisteissä ja tästä voidaan laskea IncuCyte® ZOOM:n oman ohjelman avulla kasvukäyrät, määrittelemällä ensin tietyt parametrit kuten pienin ja suurin mukaan laskettava solukoko, jolla saadaan minimoitua esimerkiksi soluroskat varsinaisesta analyysistä.

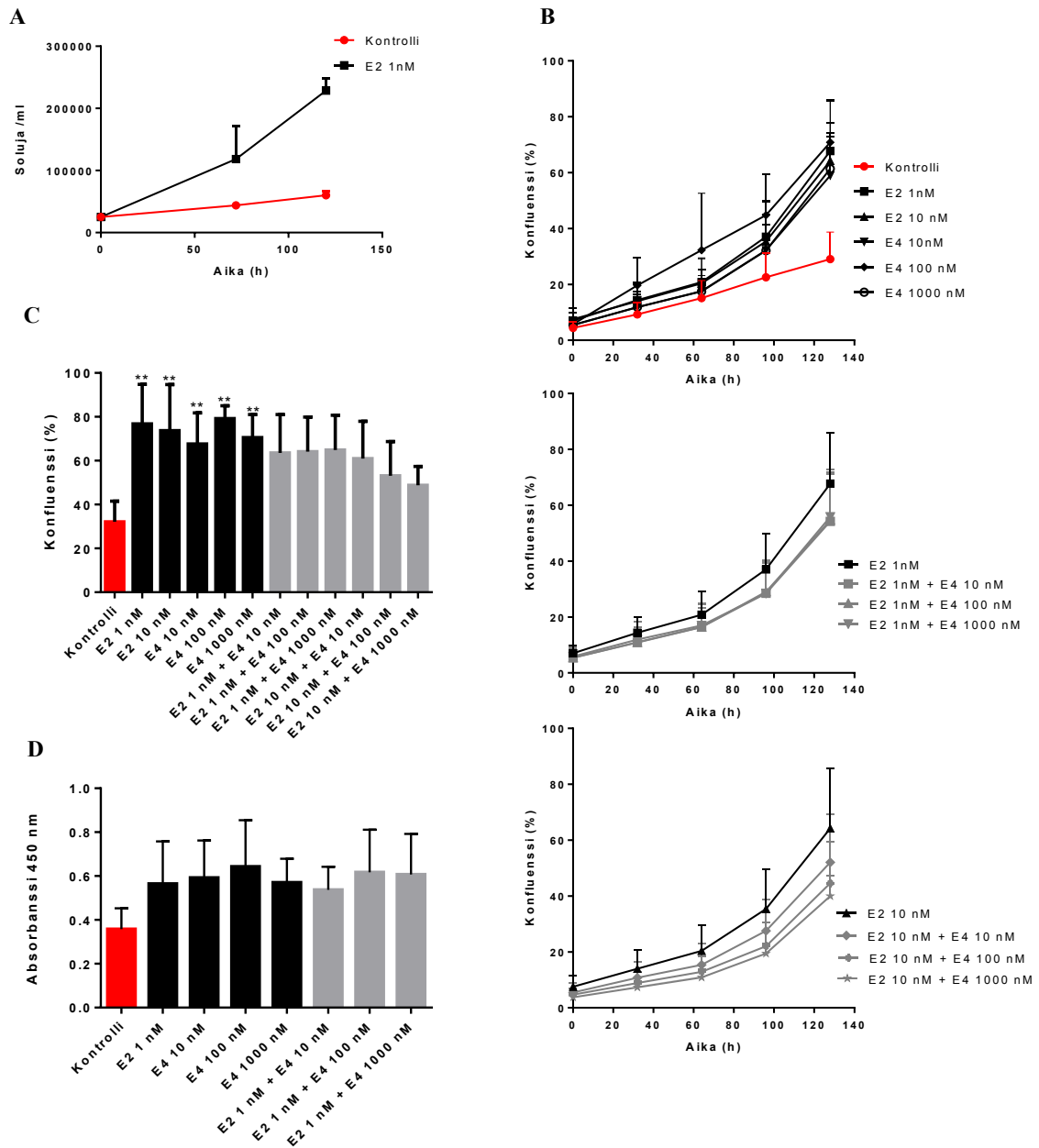
Ennen estetrolin (E4) vaikutuksen selvittämistä MCF-7 -solujen kasvuun, solujen vaste estradioliin (E2) testattiin kasvattamalla soluja 12-kuoppalevyllä viiden päivän ajan. Estetrolin vaikutukset ilmenevät estrogeenireseptorin kautta ja estradiolivasteen perusteella saatiin varmuus estrogeenireseptorin toiminnasta, sillä solujen ominaisuudet voivat muuttua, kun samaa solustokkia kasvatetaan ja jaetaan useita kertoja. Kuoppalevyllä laskettiin solut kolmen päivän ja viiden päivän jälkeen. Kasvukäyrästä nähdään, että 1 nM estradiolilla kasvaneiden solujen proliferaatio lisääntyi huomattavasti kontrolliin verrattuna (Kuva 5A).

2D-proliferaatiokokeen kasvukäyrästä nähdään, että estetrolia lisäsi yksinään solujen kasvua. Estetrolia (10, 100 tai 100 nM) yhdessä 1 nM estradiolin kanssa hidasti hieman estradiolin stimuloimaa kasvua, mutta konsentraatiopriippuvuutta ei ollut havaittavissa. Estetrolia (10, 100 tai 100 nM) yhdessä 10 nM estradiolin kanssa myös hidasti hieman estradiolin stimuloimaa kasvua ja tällä estradiolin konsentraation yhdistelmällä nähdään estetrolin konsentraatiopriippuvainen kasvun esto. Kasvukäyrät tukevat teoriaa, että estetrolia estäisi estradiolin toimintaa (antagonistinen vaikutus). Kasvukäyrästä käy ilmi

myös että, estetrolin kasvua stimuloiva (agonistinen) vaikutus on noin kymmenen kertaa heikompi kuin estradiolin (Kuva 5B).

Viimeisen aikapisteen konfluenssissa nähdään, että estradiolilla ja estetrolilla käsitellyillä soluilla on päätepisteessä noin 40-50 prosenttiyksikköä korkeampi konfluenssi kontrollikäsitelyyn verrattuna (Kuva 5C). Estetroli yhdessä estradiolin kanssa laski konfluenssia hieman verrattuna 1 nM estradiolilla käsitelyihin soluihin, mutta saman verran eri pitoisuuksissa. Estetroli yhdessä 10 nM estradiolin kanssa taas laski konfluenssia konsentraatioriippuvaisesti ja lasku oli suurempi kuin 1nM estradiolikäsittelyissä.

Estetroli ei vaikuttanut merkittävästi solujen elinkykyyn WST-8-reagenssin avulla tehdyissä elinkykykokeissa 2D-soluviljelmissä. Kontrolliin verrattuna estradiolilla ja/tai estetrolilla käsitellyt solut olivat hieman elinkykyisempiä, mutta kombinaatiokäsittelyt olivat samaa luokkaa pelkällä estetrolilla tai estradiolilla käsitelyjen solujen kanssa (Kuva 5D). Estetroli ei kyennyt estämään estradiolin vaikutusta solujen elinkykyyn 2D-kokeissa, vaan se toimi estradiolin tavoin elinkykyä lisäävänä tekijänä. Erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä kontrolliin tai estradiolikäsittelyyn verrattuna kombinaatioiden kohdalla.



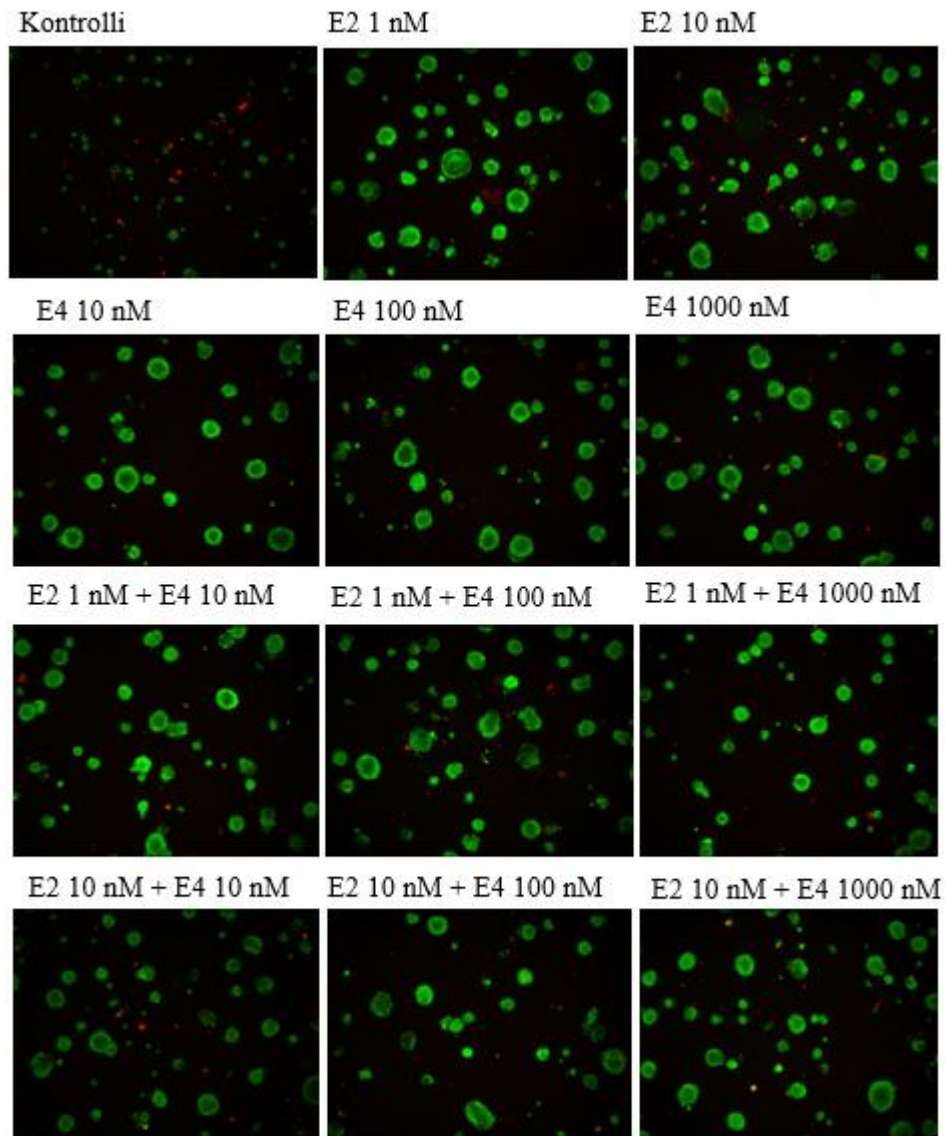
**Kuva 5. A) Estradiolilla (E2) käsiteltyjen MCF-7 solujen kasvu solulaskurin avulla mitattuna kahdessa aikapisteessä (70 h ja 120 h). B) Estetrolilla ja/tai estradiolilla (E2) käsiteltyjen MCF-7 solujen kasvu ajan funktiona kahden tunnin aikapisteissä 138 tunnin ajan. C) Estetrolilla ja/tai estradiolilla käsiteltyjen solujen viiden päivän kasvukäyrän päätepisteiden konfluenssit. D) Estetrolin ja/tai estradiolin vaikutus solujen elinkykyyn 2D-soluviljelmissä. Kuvissa A-D punainen väri edustaa hormonitonta kontrollia, musta vastaa eri estradioli- tai estetrolipitoisuuksia ja harmaalla on esitetty estradioli yhdessä estetrolin kanssa. Kuvissa C ja D tilastollinen merkitsevyys laskettu epäparametrisellä t-testillä (Mann-Whitney), jossa kutakin käsittelyä on verrattu kontrolliin (\*) ja estetrolin ja estradiolin kombinaatiota vastaavaan estradiolikäsittelyyn (ei tilastollisia merkitsevyyksiä). Kuvissa A-D esitettyinä keskiarvo +/- keskihajonta ja kukin koe toistettiin kolme kertaa.**

## 4.2 Estetrolin vaikutus 3D-viljelmissä

3D-kokeissa MCF7-soluja kasvatettiin kuoppalevyillä Matrigeelistä valmistetun geelimäisen matriksin sisällä. Matriksin rakenne sekä sen biologisesti aktiiviset molekyylikomponentit edesauttavat soluja kasvamaan pallomaisiksi, monisoluisiksi rakenteiksi. Kokeessa hormonittoman kontrollin ja hormonia saaneiden solujen välillä oli selkeä ero muodostuneiden organoidien koossa ja kuolleiden solujen suhteellisessa osuudessa organoidissa. Kuitenkaan estradiolin ja estetrolin eri konsentraatioiden välillä ei ollut suuria eroja eikä estradiolilla sekä estetrolilla käsitellyillä soluilla ollut merkittäviä eroja vastaavaan 1 tai 10 nM estradiolikontrolliin verrattuna. Tämä viittaisi siihen, että estetrolin antagonistiset vaikutukset eivät tule ilmi 3D-viljelmissä.

Tutkimusasetelmassa mitä isompi organoidin koko on, sitä paremmin solut kasvavat. Organoidien koon lisäksi kvantitoitiin kuolleiden solujen suhteellinen osuus organoidissa. Estetrolilla ja/tai estradiolilla käsitellyt solut muodostivat selkeitä organoideja, joiden koko oli huomattavasti isompi hormonittomaan kontrolliin verrattuna.

3D-soluviljelystä otettiin konfokaalimikroskoopilla kuvat solujen muodostamista organoideista ja näistä kuvista nähdään selkeä ero hormonittomien kontrollisolujen ja hormoneilla käsiteltyjen solujen välillä, mutta eri hormonikäsittelyiden välillä ei nähdä huomattavia eroja (Kuva 6). Vastaavat tulokset ilmenevät myös laatikkojanakuvaajissa ja lasketuissa p-arvoissa, joissa ero kontrolliin on jokaisen käsittelyn kohdalla tilastollisesti merkitsevä (Kuva 7A).



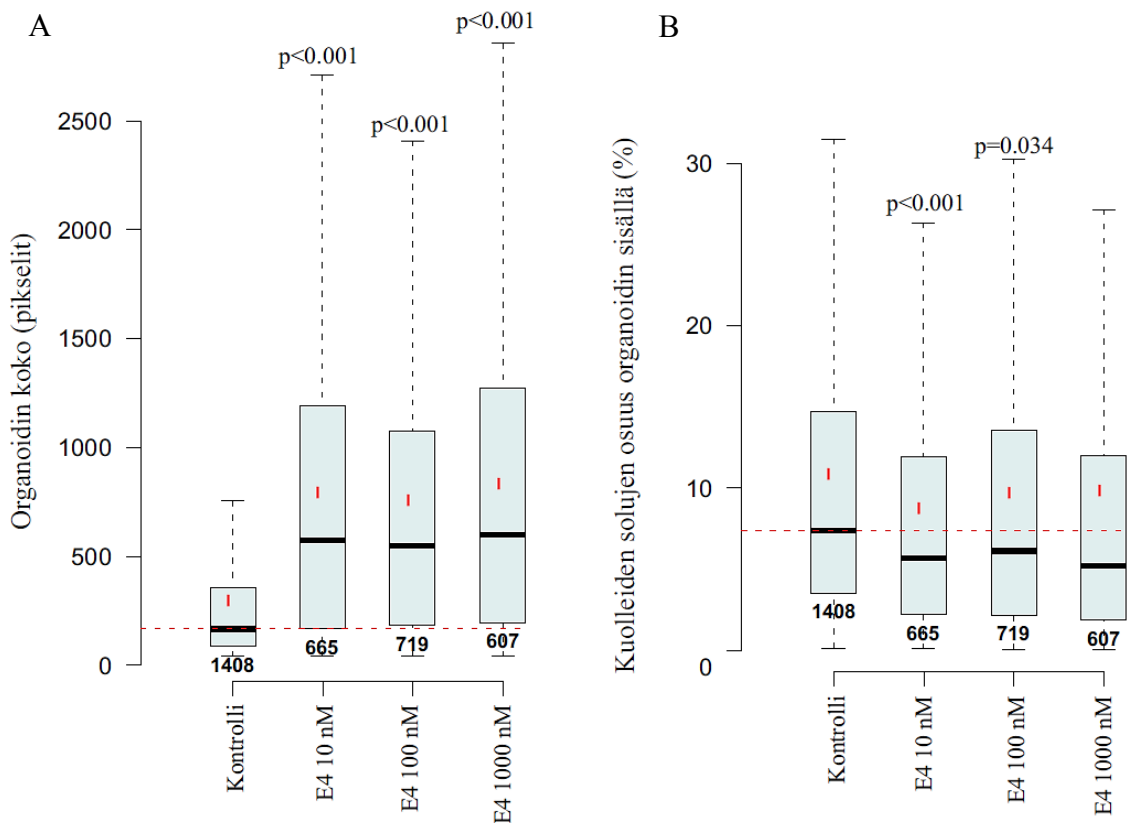
**Kuva 6. Konfokaalimikroskooppikuvia estetrolilla ja estradiolilla käsitellyistä MCF-7 soluista 3D-viljelmässä.** Solut muodostavat pallolina näkyviä organoideja (vihreät rakennelmat) ja kuolleet solut näkyvät pieninä punaisina pisteinä. Kuvat otettu 12 päivää kestävästä viljelystä päätyttyä.

Estetrolilla ja/tai estradiolilla käsitellyt solut, jotka olivat elinvoimaisia, muodostivat isoja organoideja, kun taas kuolleet solut jäivät lähinnä yksittäisiksi pieniksi rakenteiksi. Kuolleiden solujen osuus (punainen väri) määritettiin kuva-analyysissä suhteellisenä prosentiosuutena kunkin rakenteen sisällä. Ero hormonittomaan kontrolliin oli kahden käsittelyn kohdalla tilastollisesti merkitsevä (Kuva 7B).

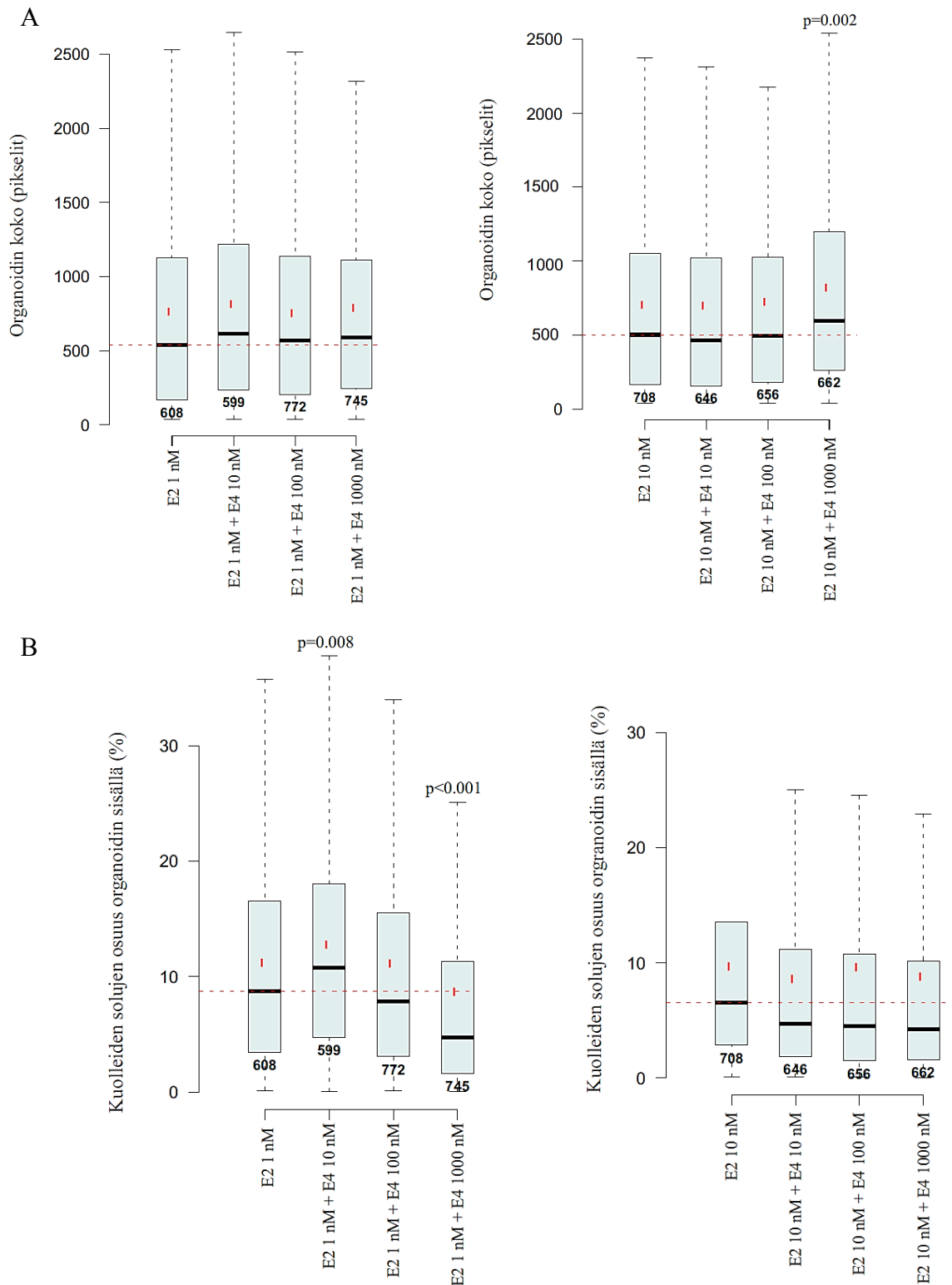
Tutkimuksessa oletettiin, että estetrolilla ja estradiolilla käsiteltyjen solujen kohdalla ilmeni paljon kuolleita soluja ja organoidit olisivat pieniä, jos esteroli estää estradiolin toimintaa. Kuitenkaan hormoneilla käsiteltyjen solujen organoidien kanssa ei nähty huomattavia eroja. Organoidin kokoa analysoitaessa tilastollinen merkitsevyys ilmeni E2

10 nM + E4 1000 nM käsittelyllä, mutta koko kasvoi, mikä on vastakkainen tulos tutkimuksen hypoteesille (Kuva 8A).

Kuolleiden solujen suhteellisessa osuudessa havaittiin muutama tilastollisesti merkitsevä ero (Kuva 8B). E2 1 nM + E4 10 nM nosti kuolleiden solujen määrää tilastollisesti merkitsevästi, mutta kun estroliin konsentraatiota kasvatettiin kuolleiden solujen osuus laski konsentraatiiriipuvaisesti ja tilastollinen merkitsevyys ilmeni E2 1 nM + E4 1000 nM -käsittelyssä. Tutkimuksen organotyyppisissä 3D-viljelmissä estetroli lisäsi organoidien kokoa ja vähensi kuolleiden solujen määrää (apoptoosia) tilastollisesti merkittävästi.

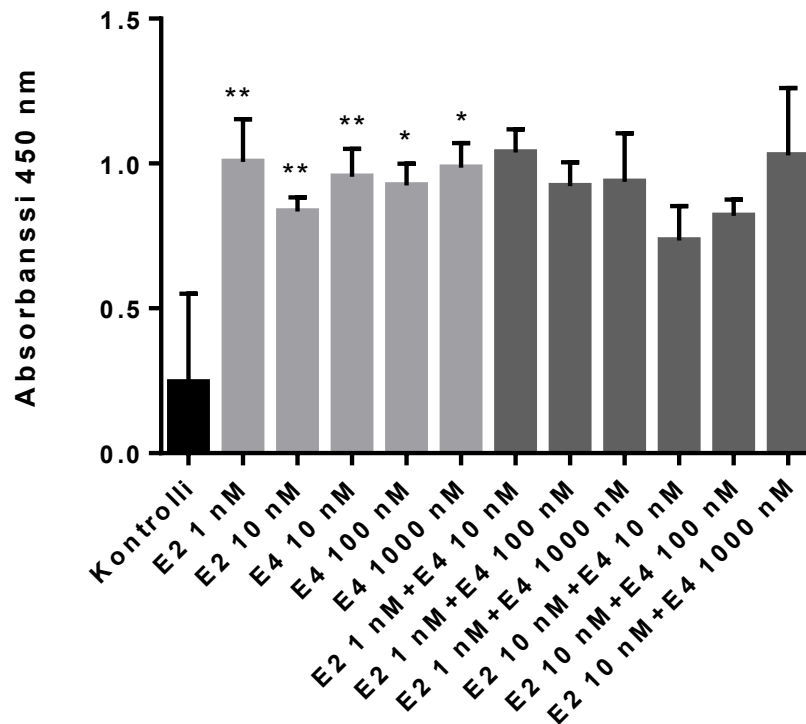


**Kuva 7. Estetrolilla käsiteltyjen solujen muodostamien organoidien koko (A) sekä kuolleiden solujen suhteellinen osuus organoidien sisällä (B).** Organoidin koko mitattu pikselinä ja kuolleiden solujen osuus laskettu prosentteina. Kuvassa esitettynä keskiarvot keskihajonnalla ja kunkin laatikkoajan keskellä oleva viiva kuvaa mediaania. Kontrolli esitetty lisäksi punaisella katkoviivalla. Laatikoiden alla oleva numero kertoo analysoidujen organoidien lukumäärän.



**Kuva 8. Estetrolilla ja/tai estradiolilla käsiteltyjen solujen muodostamien organoidien koko (A) sekä kuolleiden solujen suhteellinen osuus organoidien sisällä (B) Organoidin koko mitattu pikseleinä ja kuolleiden solujen osuus laskettu prosentteina. Hormonikombinaatiota verrattu 1 tai 10 nM estradioliin. Kuvassa esitettynä keskiarvot keskihajonnalla ja kunkin laatikkojangan keskellä oleva viiva kuvaa mediaania. Kontrolli esitetty lisäksi punaisella katkoviivalla. Laatikoiden alla oleva numero kertoo analysoidujen organoidien lukumäärän.**

Estetroli lisäsi 3D-soluviljelmien solujen elinkykyä. Hormonittomaan kontrolliin verrattuna estetrolilla ja/tai estradiolilla käsitellyt solut olivat tilastollisesti merkitsevästi elinkykyisempiä. Kombinaatiokäsittelyissä 10-1000 nM esteroli ei vähentänyt 1nM estradiolin aiheuttamaa stimulaatiota. 10-1000 nM estetroli kuitenkin esti 10 nM estradiolin aiheuttamaa elinkyvyn lisäystä konsentraatioriippuvaisesti, joskin tilastollista merkitsevyyttä ei ollut havaittavissa (Kuva 9).



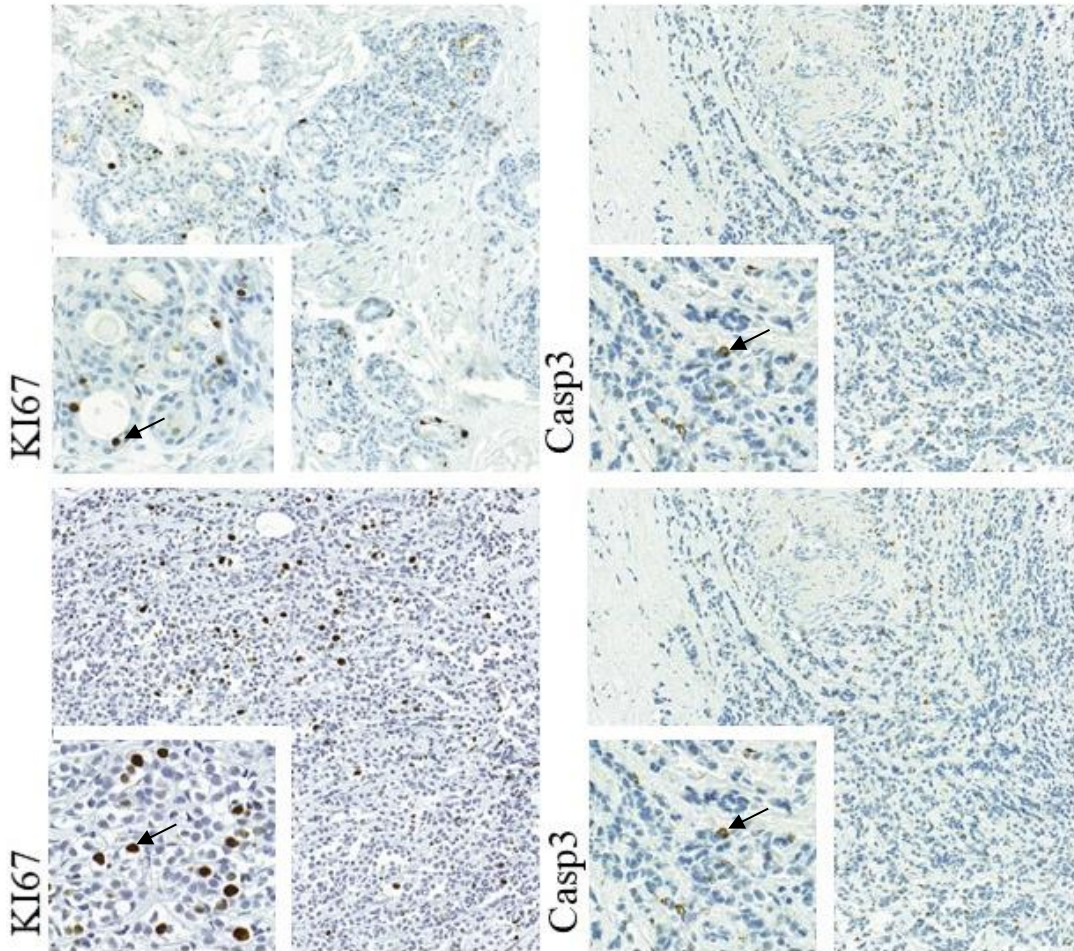
**Kuva 9. Estetrolin ja/tai estradiolin vaikutus solujen elinkykyyn 3D-soluviljelmissä.** Kuvassa esitettyinä yhden 3D-kokeen keskiarvot keskijajonnalla. Solujen elinkykyä on mitattu 12 päivän jälkeen wst-8-reagenssin 450 nm aallonpituudella antaman absorbanssin arvon mukaan. Tilastollinen merkitsevyys laskettu epäparametrisellä t-testillä (Mann-Whitney), jossa kutakin käsittelyä on verrattu kontrolliin (\*) ja esterolin ja estradiolin kombinaatiota vastaavaan estradiolikäsittelyyn (ei tilastollisia merkitsevyyksiä).

### 4.3 Estetrolin vaikutus maitorauhas- ja rintasyöpäkudoksen *ex vivo* -viljelmissä

#### 4.3.1 Estetrolin vaikutus solujen proliferaatioon ja apoptoosiin

Estetrolin vaikutusta solujen proliferaatioon selvitettiin tutkimalla proliferaatiomarkkerin Ki67:n ilmentymistä mRNA-tasolla kvantitatiivisella PCR:llä ja proteiinitasolla immunohistokemian avulla. Estradioli lisää solujen proliferaatiota ja estää apoptoosia, joten estetrolilla oletettiin olevan samanlaisia vaikutuksia rintakudokseen.

Ki67 ja Casp3 vasta-aineella värjätyt estetrolia ja/tai estradiolia sisältävällä kasvatusliuoksella viljeltyt potilasperäiset rintakudosleikkeet värjäytyivät oletetusti (Kuva 10), mutta immunohistokemiallisten värjäyksiä kvantitoiduista tuloksista nähdään, että vaikutus proliferaatioon ja apoptoosiin on vähäinen sekä syöpä- että normaalissa kudoksessa.



**Kuva 10.** Immunohistokemiassa käytettyjen proliferaatiomarkkerin (KI67) ja apoptoosimarkkerin (Casp3) värjäytyvyys kudosleikkeissä. Immunohistokemian värjäyksiä edustavat mikroskooppikuvat normaalista rintakudoksesta (ylärivi) ja rintasyöpäkudoksesta (alarivi). Kuvissa 10x suurennoksella otettu kuva koko leikkeen värjäytyvyydestä sekä 40x suurennos, jossa näkyy yksittäisten epiteelisolujen värjäytyvyys. Positiiviset solut näkyvät ruskealla (DAB-värjäys) ja tausta sinisenä (vastavärjäys hematoksyliini-eosiinilla). Esimerkkejä positiivisista soluista on osoitettu nuolella.

Immunohistokemiallisten värjäyksiä perusteella estetrolilla ei ollut merkittäviä vaikutuksia solujen proliferaatioon. Estetrolia yksinään lisäsi syöpäkudoksessa joidenkin potilaiden näytteiden värjäytymistä, mutta kokonaisuudessaan estetrolilla ei ollut merkittäviä eroja proliferaatioon (Kuva 11A). Yksittäisten potilaiden kohdalla ilmeni

korrelaatiota patologin määrittämän KI67 tason kanssa (Liite 2.) ja immunohistokemiassa ilmenevät potilaskohtaiset korkeat tai matalat ilmenemistasot toistuivat qPCR-analyyseissä. Kuitenkaan potilaiden kohdalla korrelaatiota ER- ja Ki67-ilmentymistason välillä ei ollut havaittavissa. Normaalissa rintakudoksessa estetroli lisäsi solujen proliferaatiota, konsentraatioriippuvaisesti (Kuva 11B).

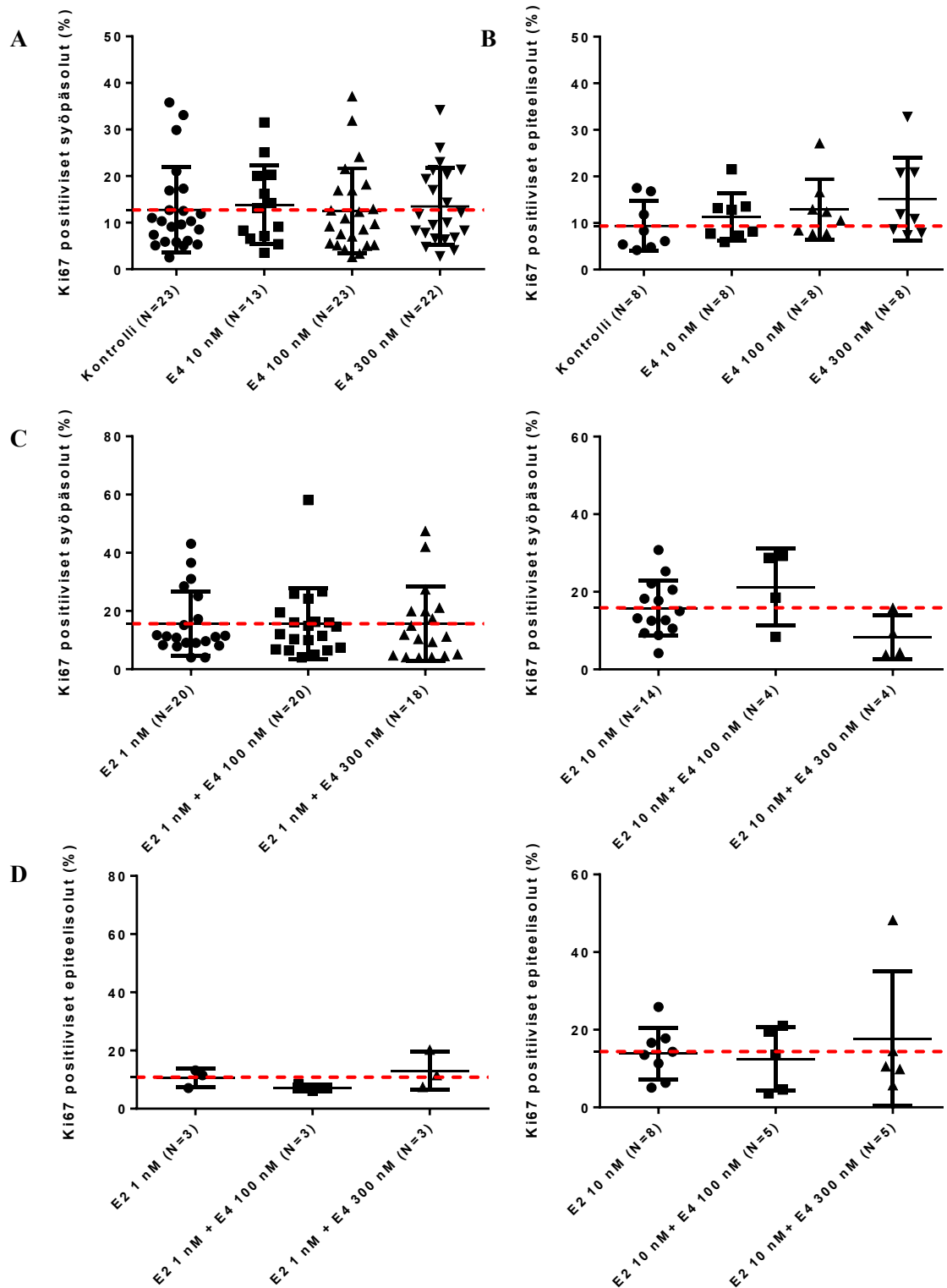
Estetrolikäsitteily ei vähentänyt tilastollisesti merkitsevästi estradiolin stimuloimaa proliferaatiota normaalissa eikä syöpäkudoksessa. 100 nM ja 300 nM estetroli yhdessä 10 nM estradiolin kanssa näytti toimivan hieman antagonistisesti rintasyöpäkudoksessa, mutta tuloksen luotettavuutta rajoittaa näytemäärään pienuus. Samat estetroli konsentraatiot 1 nM estradiolin kanssa eivät toimineet antagonistina normaalissa tai syöpäkudoksessa (Kuva 11C-D).

KI67 proteiinia koodaavan geenin mRNA:ssa ei myöskään nähdä merkitseviä eroja, vaikkakin geenitasolla nähdään jossakin määrin estetrolin proliferaatiota lisäävä vaikutus syöpäkudoksessa (Kuva 12A). Normaalissa kudoksessa Ki67 ilmentymisessä ei ole eroja eri konsentraatioiden välillä (Kuva 12B).

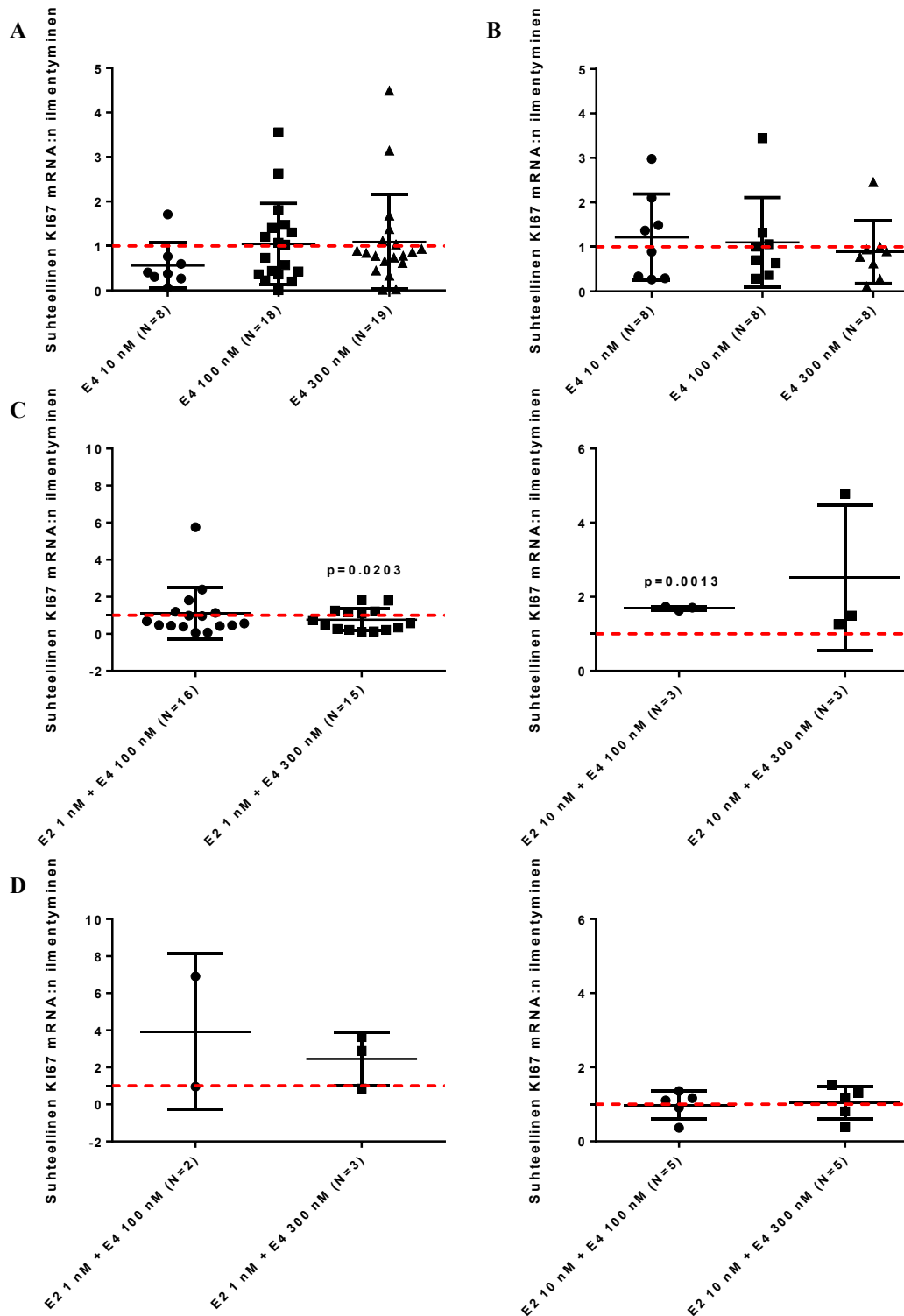
Estradioli lisää solujen proliferaatiota, mikä ilmenee KI67:n ilmentymisen kasvuna. Yhdessä estradiolin kanssa estetroli ei kyennyt estämään estradiolin estrogenistä, proliferaatiota lisäävää vaikutusta. Syöpäkudoksessa 100 tai 300 nM estetroli ei vaikuttanut 1nM estradiolin aiheuttamaan proliferaatioon, mikä näkyy näiden kombinaatiokäsittelyiden ilmentymistasossa, mikä on estradiolikontrollin (E2 1 nM) luokkaa. 100 tai 300 nM estetroli yhdessä 10 nM estradiolin kanssa taas näyttävät lisäävän solujen proliferaatiota estradiolikontrolliin (E2 10 nM) verrattuna, mutta näytteiden suuri hajonta ja pieni lukumäärä tekevät tuloksista epäluotettavia (Kuva 12C). Normaalissa kudoksessa 100 ja 300 nM estetrolin kombinaatio 1 nM estradiolin kanssa näyttää lisäävän proliferaatiota, joskin 300 nM pitoisuudella vähemmän kuin 100 nM:lla. Kyse voi olla kuitenkin suuren hajonnan vaikutuksesta ja pienestä näytemäärästä (Kuva 12D).

Estetrolin vaikutusta solujen apoptoosiin tutkittiin immunohistokemian avulla. Casp3 on proteaasi, joka muiden kaspasien aktivoimana käynnistää ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin. Apoptoosi käynnistyy spesifisten proteaasien, kaspasien vaikutuksesta. Viljellyistä kudospaloista tehdyt leikkeet värjättiin casp3-vasta-aineella. Estradioli estää

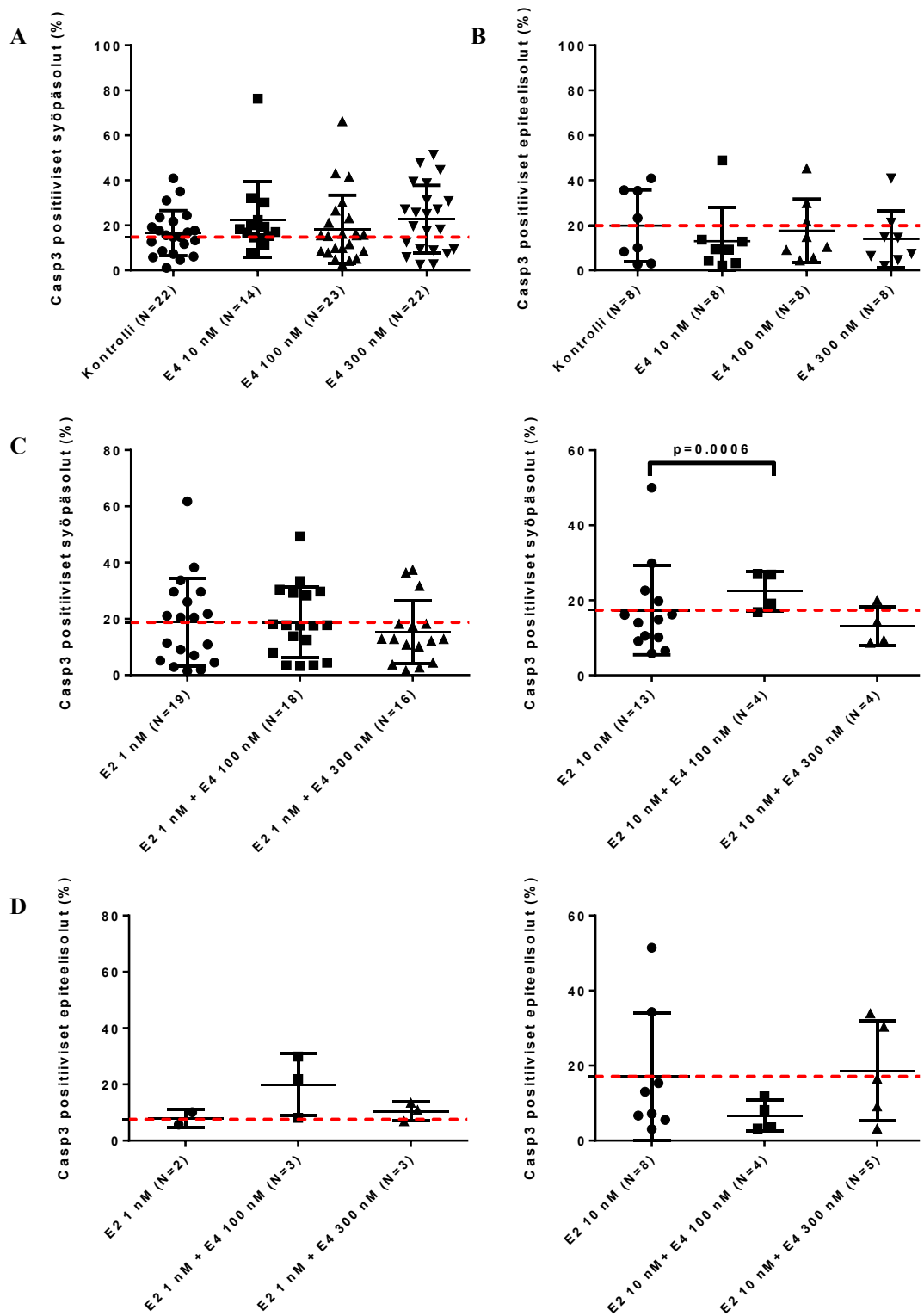
rintasyöpäsolujen apoptoosia, sillä se osallistuu apoptoosiin liittyvien signalointireittien säätelyyn (Casolari ym. 2011). Näiden signalointireittien toiminta välittyy osittain estrogeenireseptorin toiminnan kautta. Oletuksena oli, että estetrolilla olisi vastaavanlainen apoptoosia laskeva vaikutus. Estetroli näytti hieman laskevan solujen apoptoosia normaalissa kudoksessa (Kuva 13B), mutta sillä ei ollut samanlaista vaikutusta syöpäkudoksessa (Kuva 13B). Kombinaatioviljelmissä estetrolilla ei ollut vaikutusta apoptoosin tasoon normaalissa tai syöpäkudoksessa, jota viljeltiin 1 tai 10 nM estradiolin kanssa (Kuva 13C ja D).



**Kuva 11.** Ki67:n ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyn rintasyöpäkudoksen epiteelisoluissa (A, C) ja normaalin rintakudoksen epiteelisoluissa (B, D). Kuvissa A-D esitettyinä yksittäiset potilasarvot symboleilla ja viivoina keskiarvo sekä keskihajonta. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyitä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitteilyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.



**Kuva 12.** KI67:n mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D) Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyitä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitelyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.

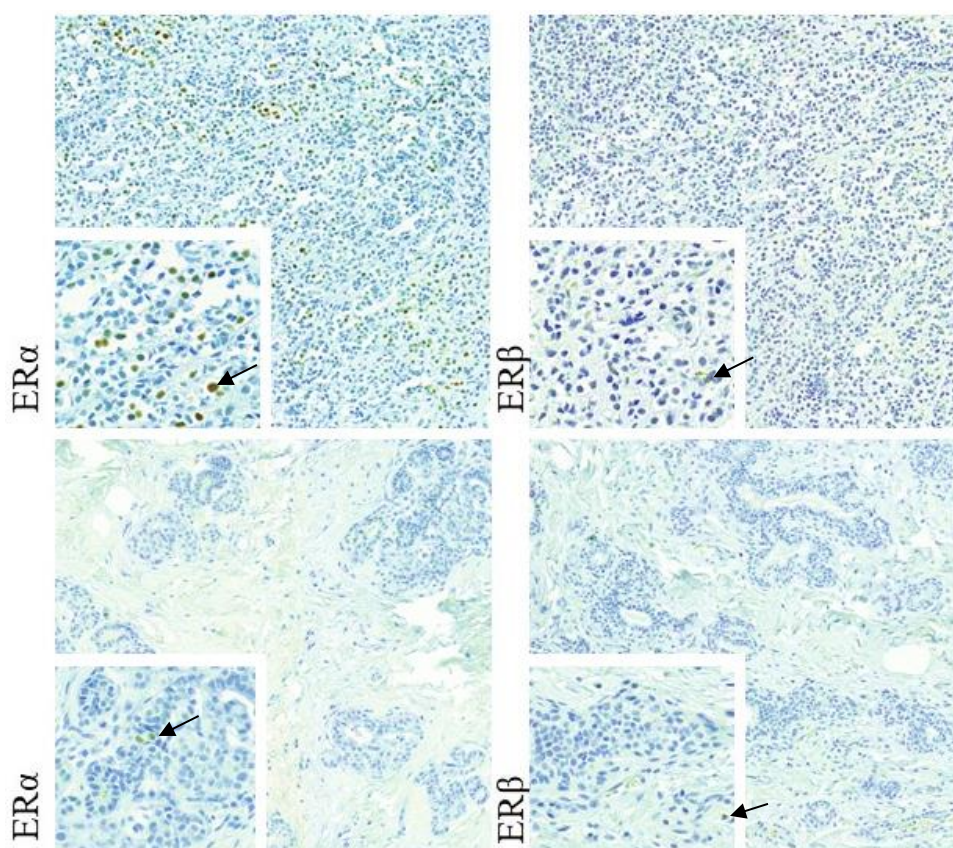


**Kuva 13.** Casp3:n ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyn rintasyöpäkudoksen epiteelisoluissa (A, C) ja normaalin rintakudoksen epiteelisoluissa (B, D). Kuvissa A-D esitettyä yksittäiset potilasarvot symboleilla ja viivoina keskiarvo sekä keskihajonta. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyt on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitelyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.

#### 4.3.2 Estetrolin vaikutus ER $\alpha$ :n ja ER $\beta$ :n ilmentymiseen

Estrogeenireseptoreiden ilmentymistä tutkittiin mRNA-tasolla kvantitatiivisella PCR:llä ja proteiinitasolla immunohistokemian avulla. Immunohistokemian värjäyksissä ei nähdä selkeää eroa kontrolliin verrattuna estrogeenireseptoreiden ilmentymisessä eikä estetrolilla näytä olevan antagonistista vaikutusta estradiolilla käsitellyn kudoksen estrogeenireseptoreiden ilmentymiseen.

Estrogeenireseptori alfan värjäytyminen immunohistokemiassa oli oletetun mukainen, mutta estrogeenireseptori beetan kohdalla oli ongelmia vasta-aineen kanssa (Kuva 14).



**Kuva 14. Immunohistokemian värjäyksiä edustavat mikroskooppikuvat Estrogeenireseptoreiden alfa (DAKO) ja beeta (Perseus proteomics) ilmentymisestä normaalissa rintakudoksessa (ylärivi) ja rintasyöpäkudoksessa (alarivi). Kuvissa 10x suurennoksella otettu kuva koko leikkeen värjäytyvyydestä sekä 40x suurennos, jossa näkyy yksittäisten epiteelisolujen värjäytyvyyden. Positiiviset solut näkyvät ruskealla (DAB-värjäys) ja tausta sinisenä (vastavärjäys hemotaksyliini-eosinilla). Esimerkkejä positiivisista soluista on osoitettu nuolella.**

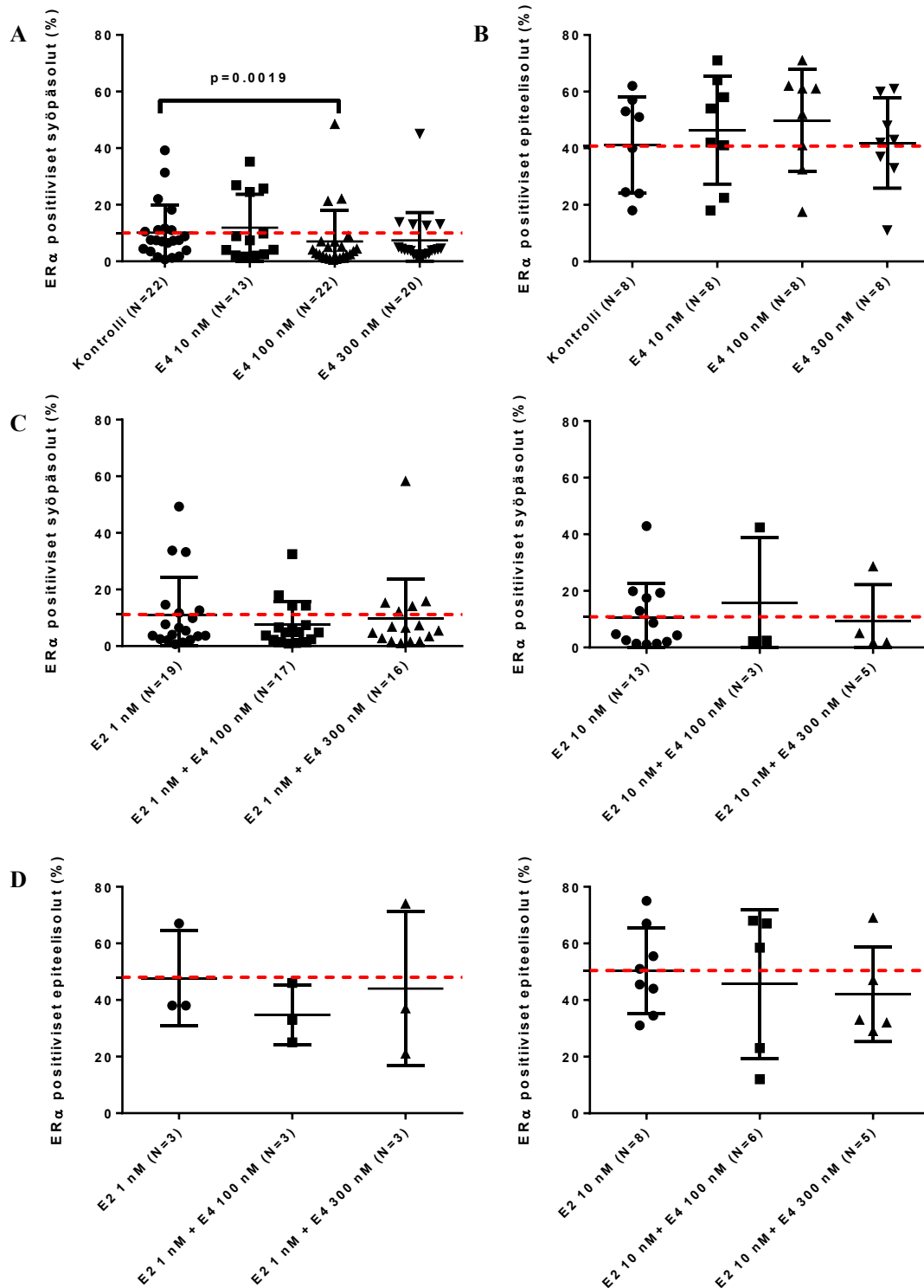
Yhteensä viittä eri vasta-ainetta testattiin, mutta ne kaikki värjäisivät kudokset eri tavalla. Andersson ym. 2017 mukaan Perseus proteomicsin vasta-aine antoi spesifisimmät tulokset, mutta sillä värjäytyminen oli lähes negatiivisen kontrollin tasoa.

Tutkimuksen aikana julkaistujen eri vasta-aineiden spesifisyyttä koskevien ristiriitaisten tietojen (Andersson ym. 2017; Nelson ym. 2017) ja niillä saatujen ristiriitaisten värjäystulosten takia ER $\beta$  -kokeitten tulokset jätettiin pois tutkimuksesta.

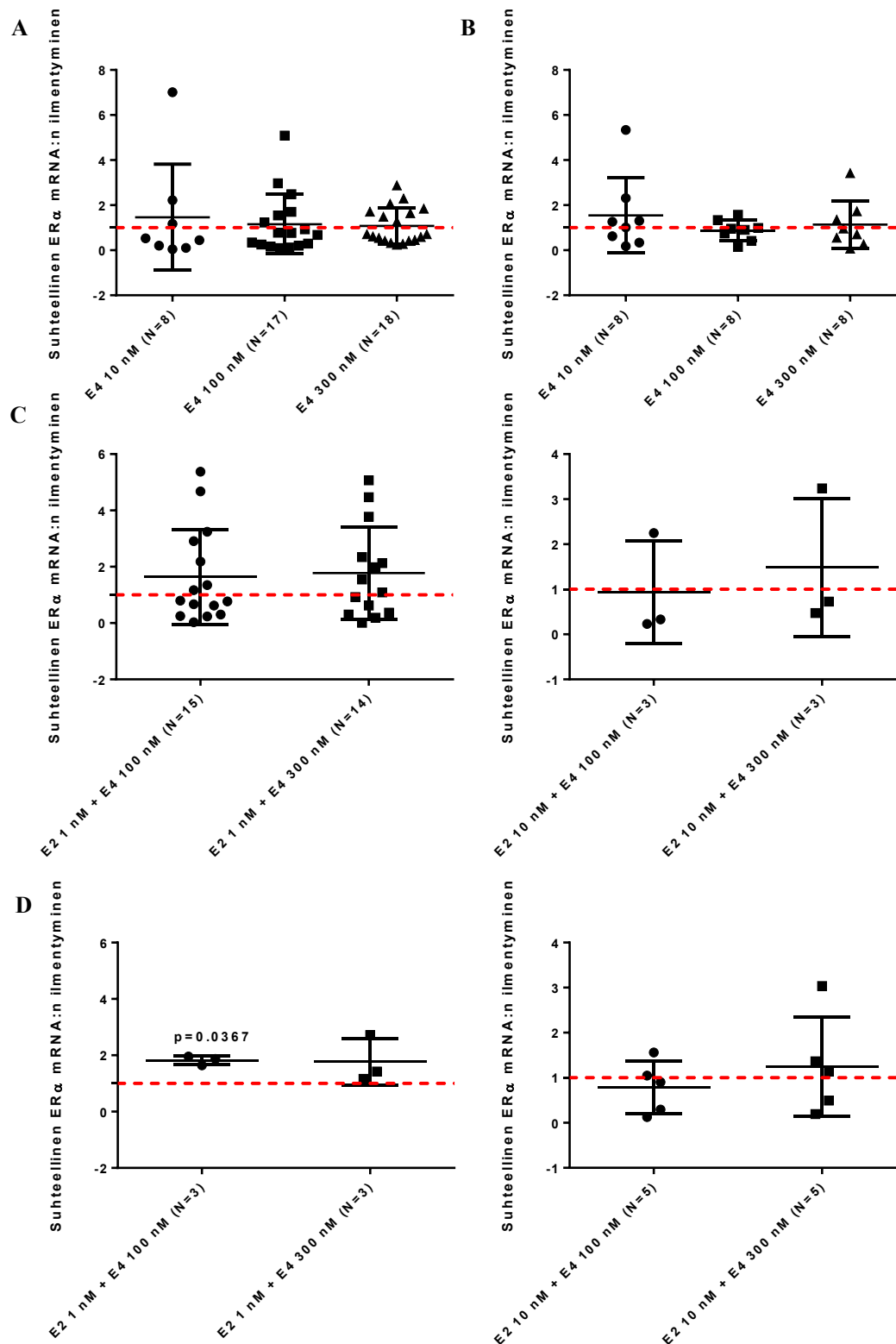
Estrogeenireseptori alfan ilmentyminen estetrolilla käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa ja normaalissa kudoksessa oli lähellä kontrollin tasoa immunohistokemiallisissa värjäyksissä sekä qPCR:n tuloksissa. Estetroli lisäsi ER $\alpha$  immunopositiivisten solujen määrää hieman normaalissa kudoksessa (Kuva 15B) ja qPCR tuloksien perusteella ER $\alpha$ :n ilmentyminen lisääntyi syövän ja normaalin kudoksen kohdalla (Kuva 16A-B). Estetroli yhdessä estradiolin kanssa näytti laskevan ER $\alpha$  immunopositiivisten solujen määrää verrattuna estradiolin kanssa viljeltyyn kontrolliin, mutta vastaavaa laskua ei nähty qPCR-tuloksissa (Kuva 15C-D ja Kuva 16C-D).

Estrogeenireseptori beetan ilmentyminen pysyi hormonittoman kontrollin tasolla estetrolilla käsitellyssä normaalissa kudoksessa (Kuva 17B). Syöpäkudoksen kohdalla ilmentyminen oli kontrolliin verrattuna korkeampaa, mutta eri konsentraatioiden välillä ei ollut selkeää eroa (Kuva 17A).

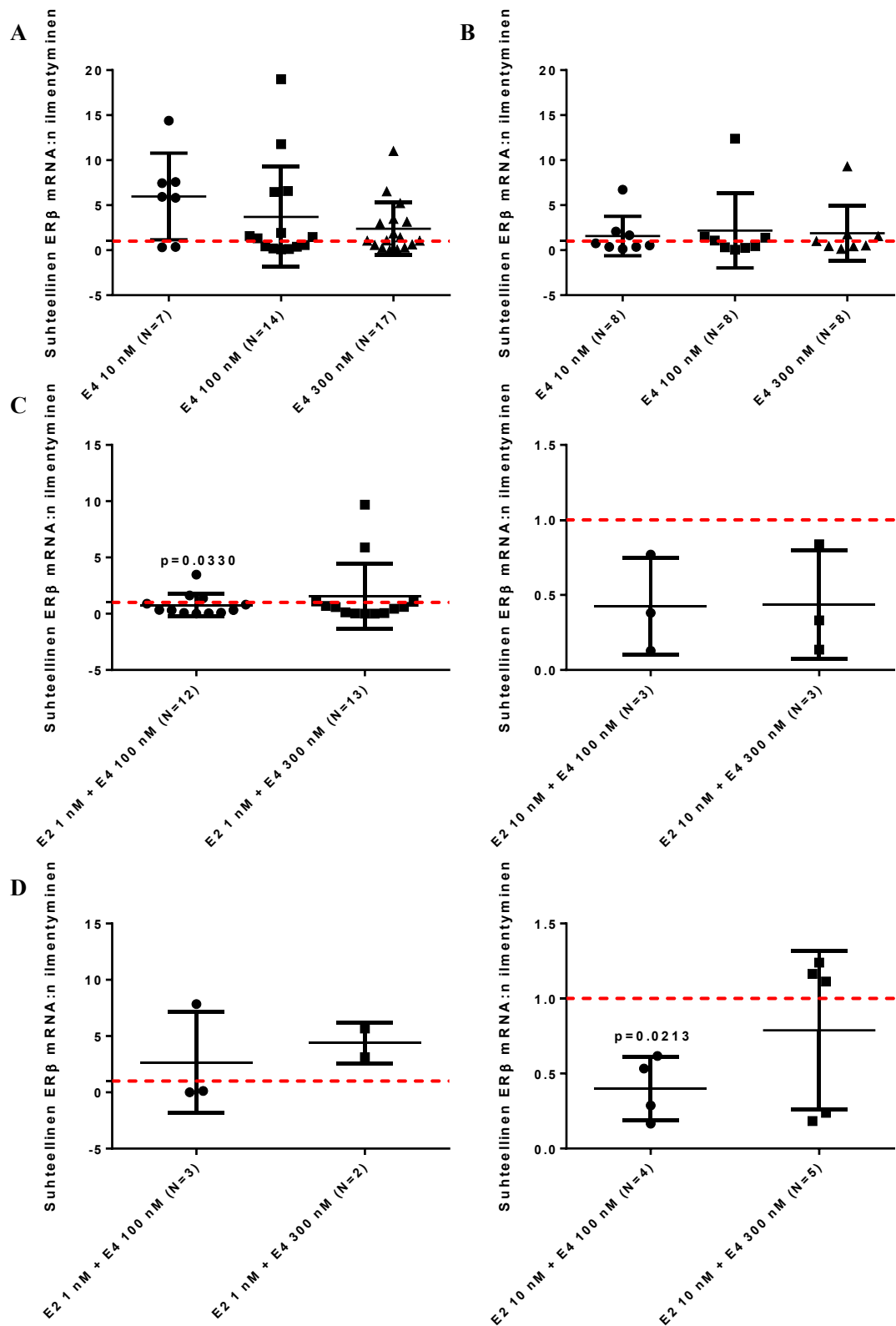
Estetroli ei estänyt 1 nM estradiolin vaikutusta ER $\beta$ :aan, mutta 10 nM estradiolilla ja 100 tai 300 nM estetrolilla käsiteltyjen normaalien kudosten ER $\beta$  ilmentyminen laski. 1nM estradioli 100 nM estetrolilla jopa lisäsi ER $\beta$ :n ilmentymistä tilastollisesti merkitsevästi syöpäkudoksessa ( $p=0.0330$ ). 10 nM estradioli yhdessä 100 nM estetrolin kanssa laski estrogeenireseptori beetan ilmentymistä tilastollisesti merkitsevästi ( $p=0.213$ ) 10 nM estradioliin verrattuna normaalissa kudoksessa. Samoin syöpäkudoksessa 10 nM estradioli 100 nM estetrolilla laski ER $\beta$ :n ilmentymistasoa estradiolikontrollin (E2 10 nM) alapuolelle, mutta lasku ei ollut tilastollisesti merkitsevä suuren hajontansa vuoksi. Näyteiden lukumäärä 10 nM estradiolin kombinaationa 100 tai 300 nM estetrolin kanssa on kuitenkin pieni (N=3-5), joten tuloksista ei voida tehdä selkeää johtopäätöstä (Kuva 17C-D).



**Kuva 15.** Estrogeenireseptori alfan ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyn rintasyöpäkudoksen epiteelisoluissa (A, C) ja normaalin rintakudoksen epiteelisoluissa (B, D). Kuvissa A-D esitettyinä yksittäiset potilasarvot symboleilla ja viivoina keskiarvo sekä keskihajonta. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitteilyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.



**Kuva 16.** Estrogeenireseptori alfan mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D) Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitteilyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.



**Kuva 17.** Estrogeenireseptori beetan mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D) Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitelyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.

### 4.3.3 Estetrolin vaikutus ER:n säätelemien geenien ilmentymiseen

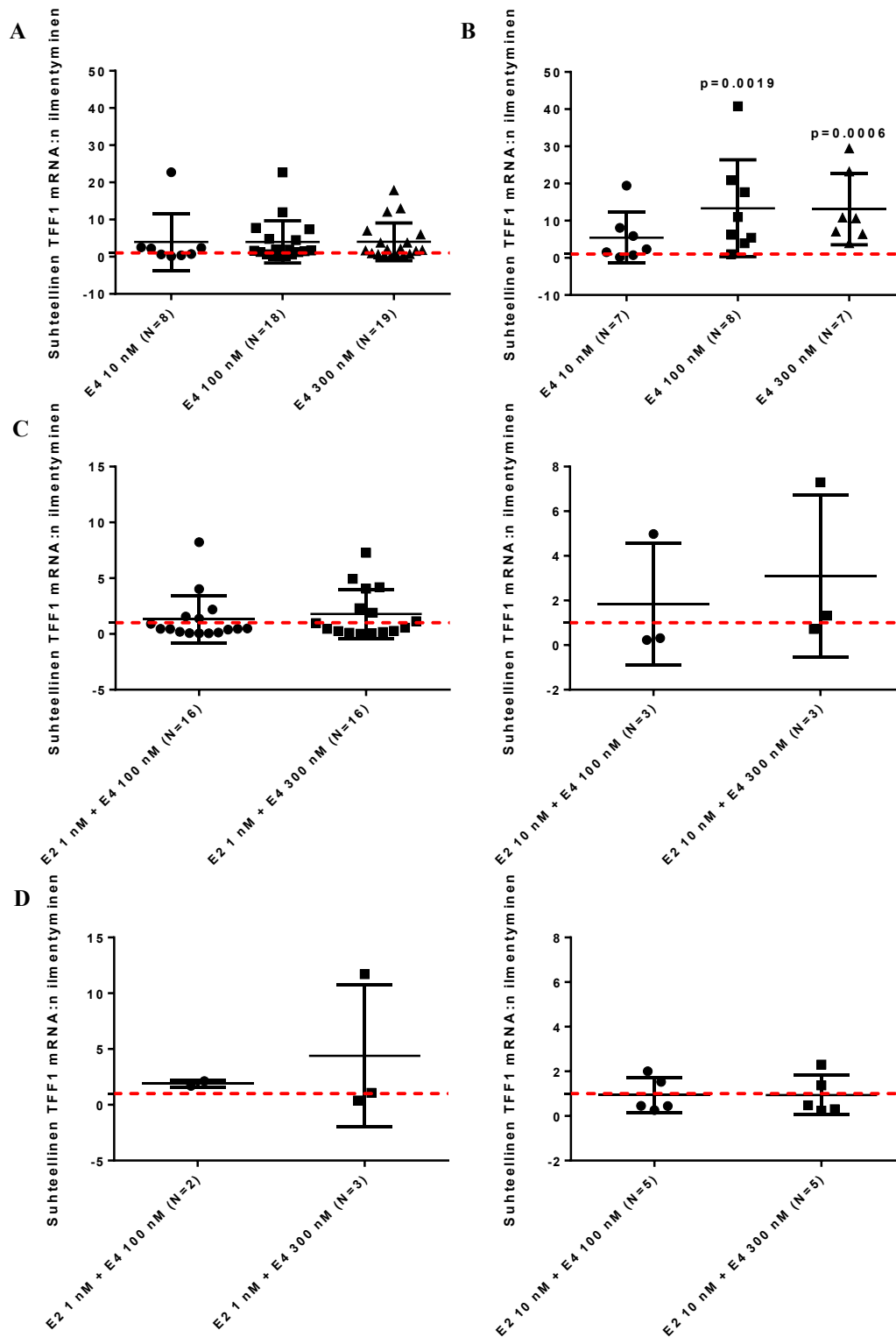
Tutkimuksessa selvitettiin esterolin vaikutusta viiden eri geenin ilmentymiseen, joista geeneistä progesteronireseptori, TFF1 ja amfireguliini ovat ER:n säätelemiä rintakudoksessa (Prest ym. 2002, Esther ym. 2015). Lisäksi tutkittiin, androgeenireseptorin (AR) ja kasvuhormonireseptorin (GHR) ilmentymistä, mihin estrogeeneilla on havaittu olevan vaikutusta. Tuloksien mukaan estetrolin vaikutus oli pieni ja antagonistinen vaikutus ei tullut selkeästi ilmi.

#### 4.3.3.1 TFF1 ja amfireguliinin ilmentyminen mRNA-tasolla

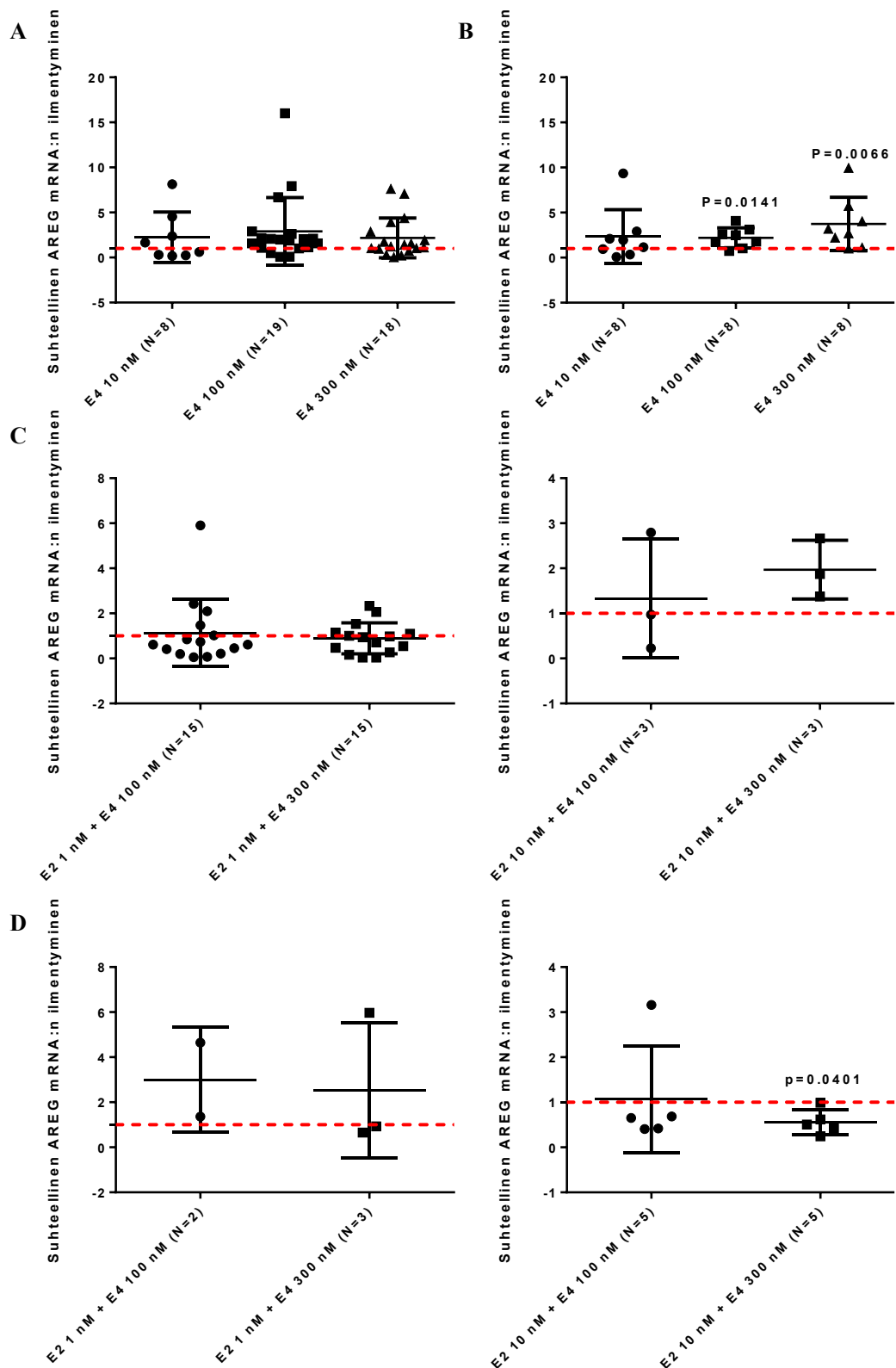
Estetroli lisäsi qPCR:ssä amfireguliinin ja TFF1:n ilmentymistä sekä normaalissa että syöpäkudoksessa. Amfireguliini osallistuu maitorauhasen kehitykseen ja rintasyövässä tämän reseptorin yliekspressio voi aiheuttaa solujen invasiivisuutta. TFF1 on rintakudoksessa ER:n kohdegeeni, jonka ilmentyminen toimii sensitiivisenä ER-aktiivisuuden markkerina. Joissakin kudoksissa se toimii tuumorisuppressiogeneeninä ja joissakin sen yliekspressio taas lisää solujen migraatiota.

Estetroli ei lisännyt TFF1:n ilmentymistä syöpäkudoksessa, mutta normaalissa kudoksessa nähdään konsentraatioriippuvainen tilastollisesti merkitsevä nousu (Kuva 18A-B). Samanlainen vaikutus ilmenee amfireguliinin kohdalla, joskin estetrolin tilastollisesti merkitsevä stimuloiva vaikutus normaalissa kudoksessa on pienempi TFF1:n ilmentymisen muutokseen verrattuna (Kuva 19A-B).

Estetroli yhdessä estradiolin kanssa ei vaikuttanut merkitsevästi TFF1:n (Kuva 18C-D) ja amfireguliinin (Kuva 19C-D) ilmentymiseen mRNA-tasolla verrattuna estradiolin kanssa viljeltyyn kudokseen. Ilmentyminen näytti lisääntyvän joidenkin käsittelyiden kohdalla, mutta hajonta ja otosmäärä ovat niiden kohdalla niin pienet, että kyse voi olla hajonnan vääristämistä tuloksista. Syöpäkudoksessa TFF1 ilmentyminen lisääntyi E2 10 nM + E4 300 nM -käsittelyssä (Kuva 18C) ja normaalissa kudoksessa E2 1nM + E4 300 nM -käsittelyssä verrattuina vastaavaan 1 nM E2 -käsittelyyn (Kuva 18D). Amfireguliinin ilmentyminen lisääntyi syöpäkudoksessa E2 10 nM + E4 300 nM -käsittelyssä 10 nM E2-käsittelyyn verrattuna (Kuva 19C), mutta normaalissa kudoksessa vastaavilla konsentraatioilla ilmenee tilastollisesti merkitsevä lasku amfireguliinin mRNA-tasossa (Kuva 19D).



**Kuva 18.** Trefoil factor 1:n mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D) Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitelyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.



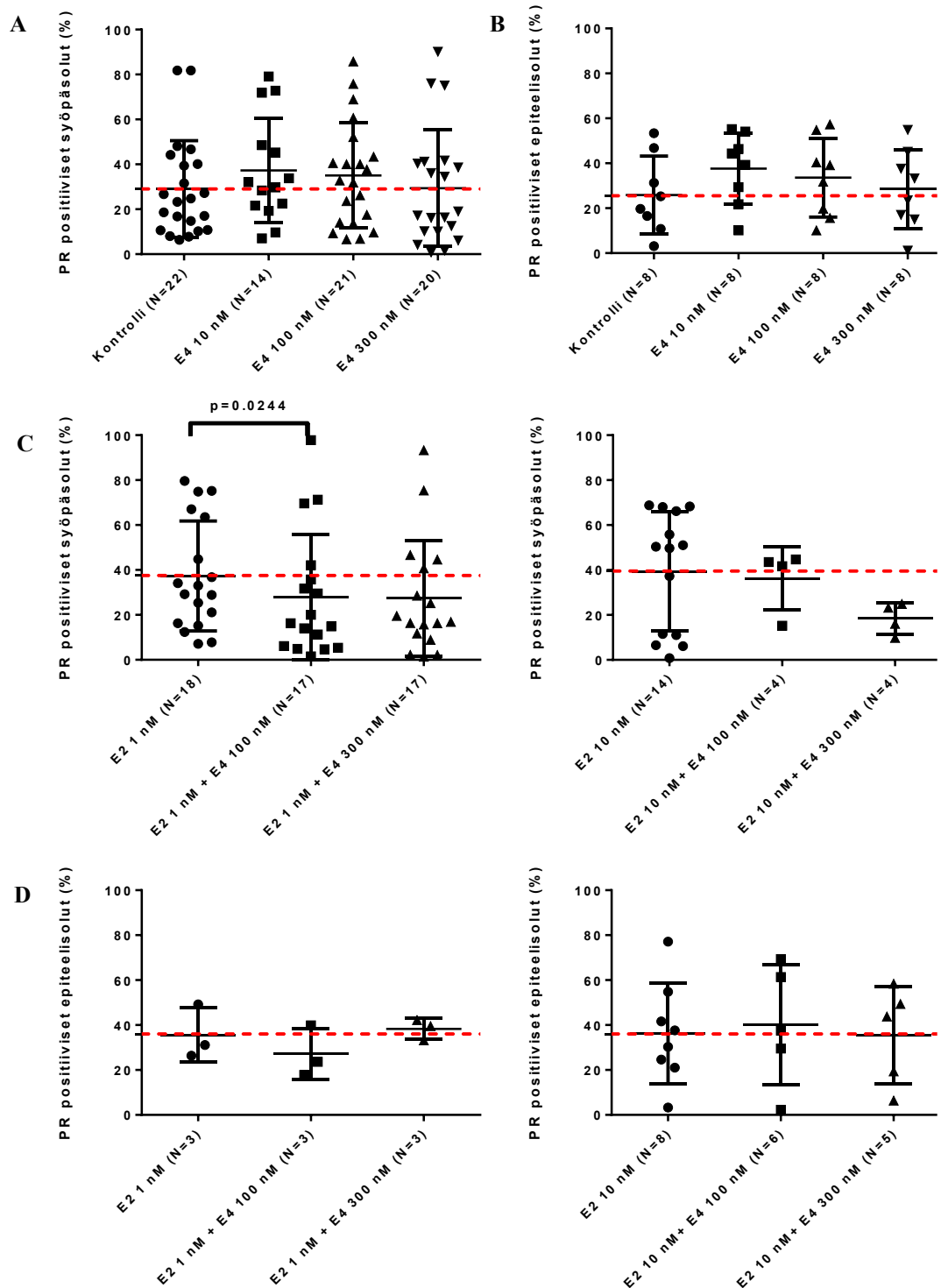
**Kuva 19. Amfireguliinin mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D)** Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyitä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitteilyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.

#### 4.3.3.2 Progesteronireseptorin ilmentyminen mRNA- ja proteiinitasolla sekä androgeenireseptorin ilmentyminen mRNA-tasolla

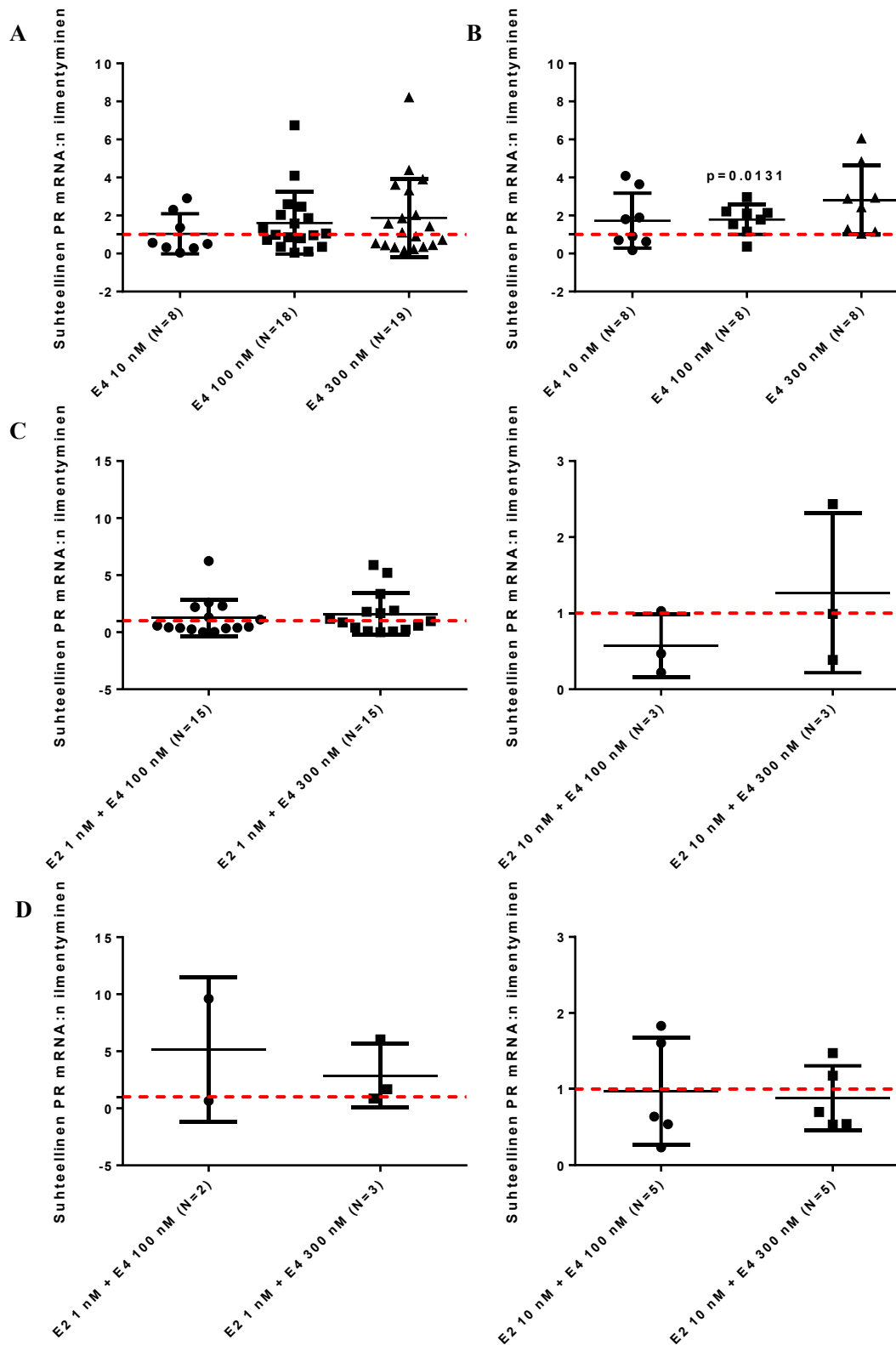
Estetrolin vaikutukset progesteronireseptoriin ja androgeenireseptoriin olivat hyvin pienet. Progesteronireseptorin ilmentyminen oli suhteellisen korkea, mutta ilmentymistaso pysyi samana käsittelystä riippumatta immunohistokemiallisissa värjäyksissä. Estetrolilla käsitellyssä syöpäkudoksessa nähdään hajontaa ja eri estetrolin käsittelyiden antama vaste on samaa tasoa (Kuva 20A). Normaalissa kudoksessa estetrolin eri konsentraatiot anavat myös saman tasoiset vasteet, mutta hajonta on pienempää syöpäkudokseen verrattuna (Kuva 20B). 100 nM ja 300 nM estetrolin näytti laskevan PR positiivisten epiteelisolujen määrää rintasyöpäkudoksessa yhdistettynä 10 nM estradiolin kanssa, mutta suuren hajonnan vuoksi tilastollisia merkitsevyyksiä ei havaita. Yhtä selkeää laskua ei nähdä samoilla estetrolin konsentraatioilla 1 nM estradiolin kanssa, mutta 1 nM estradioli 100 nM estetrolilla laskee PR positiivisten solujen määrää tilastollisesti merkitsevästi ( $p=0.0244$ , Kuva 20D). Normaalissa kudoksessa ilmentymistaso pysyi käsittelystä riippumatta samalla tasolla eikä estetrolin siten estänyt estradiolin vaikutusta (Kuva 20C).

Estetrolilla käsitellyissä kudoksissa mRNA-tasolla progesteronireseptorin ilmentymisessä nähdään pieni nousu sekä normaalissa kudoksessa että rintasyöpäkudoksessa (Kuva 21A-B). Yhdessä estradiolin kanssa estetrolilla ei ole antagonistisia vaikutuksia, mutta tuloksiin on suhtauduttava kriittisesti hyvin pienen näyttemäärän vuoksi (Kuva 21C-D).

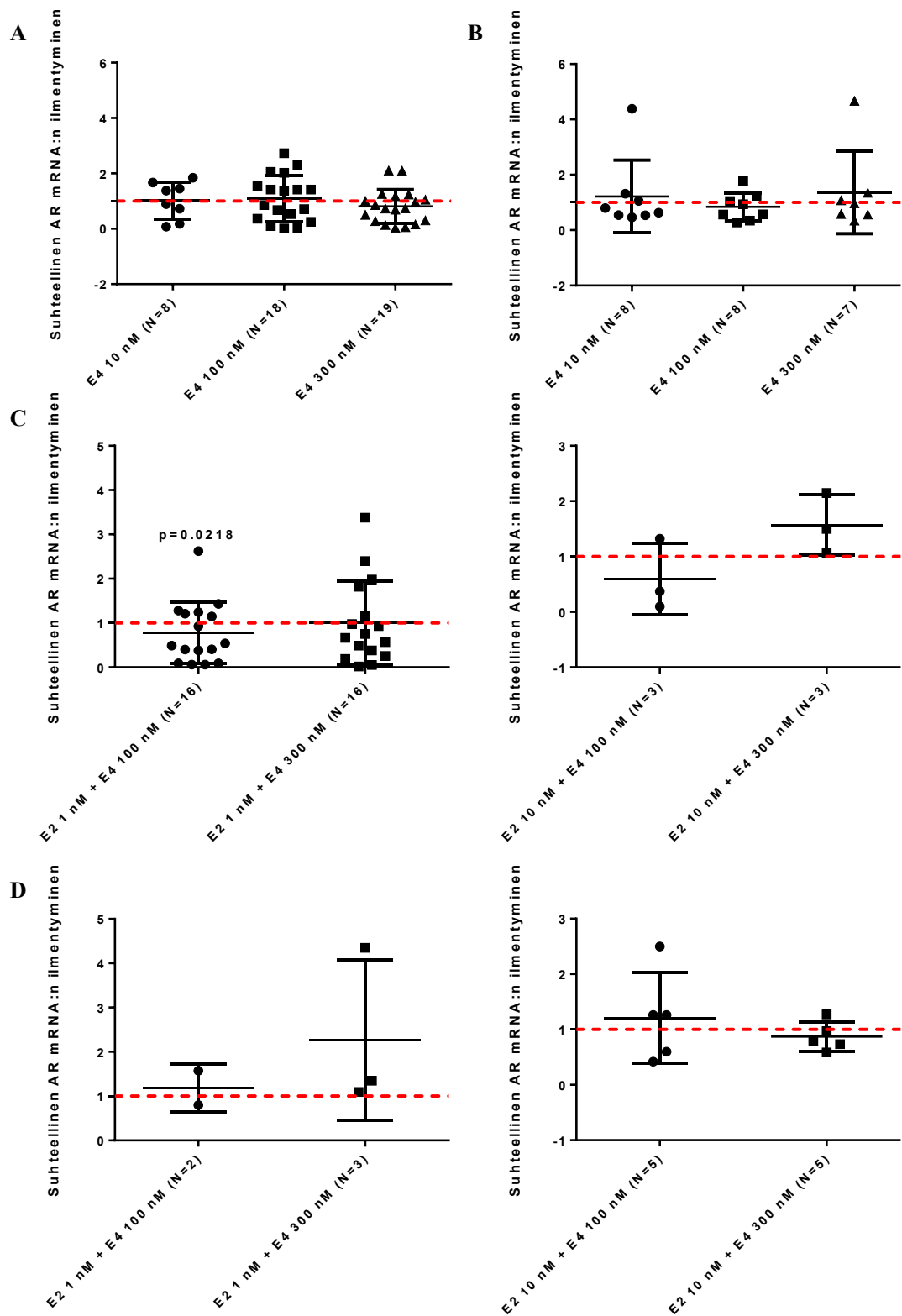
Androgeenireseptorin ilmentyminen estetrolilla käsitellyssä normaalissa ja syöpäkudoksessa on kontrollin tasoa eli ilmentymistasossa ei nähdä muutoksia. (Kuva 22A-B). Estetrolilla ja estradiolilla käsiteltyjen kudosten androgeenireseptorin ilmentyminen näytti nousevan hieman (Kuva 22C-D), mutta syöpäkudoksessa 1 nM estradioli 100 nM estetrolilla laski androgeenireseptorin ilmentymistä tilastollisesti merkitsevästi ( $p=0.0218$ ). Estetrolin ei kuitenkaan estänyt tehokkaasti estradiolin toimintaa, vaan pikemminkin näiden kahden hormonin yhteisvaikutus oli synergistinen.



**Kuva 20.** Progesteronireseptorin ilmentyminen estetrolilla (E4) käsitellyn rintasyöpäkudoksen epiteelisoluissa (A) ja normaalin rintakudoksen epiteelisoluissa (B) sekä estetrolilla (E4) ja estradiolilla (E2) käsitellyn rintasyöpäkudoksen epiteelisoluissa (C) ja normaalin kudoksen epiteelisoluissa (D) Kuvissa A-D esitettyä yksittäisiä potilasarvoja symboleilla ja viivoina keskiarvo sekä keskihajonta. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitteilyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.



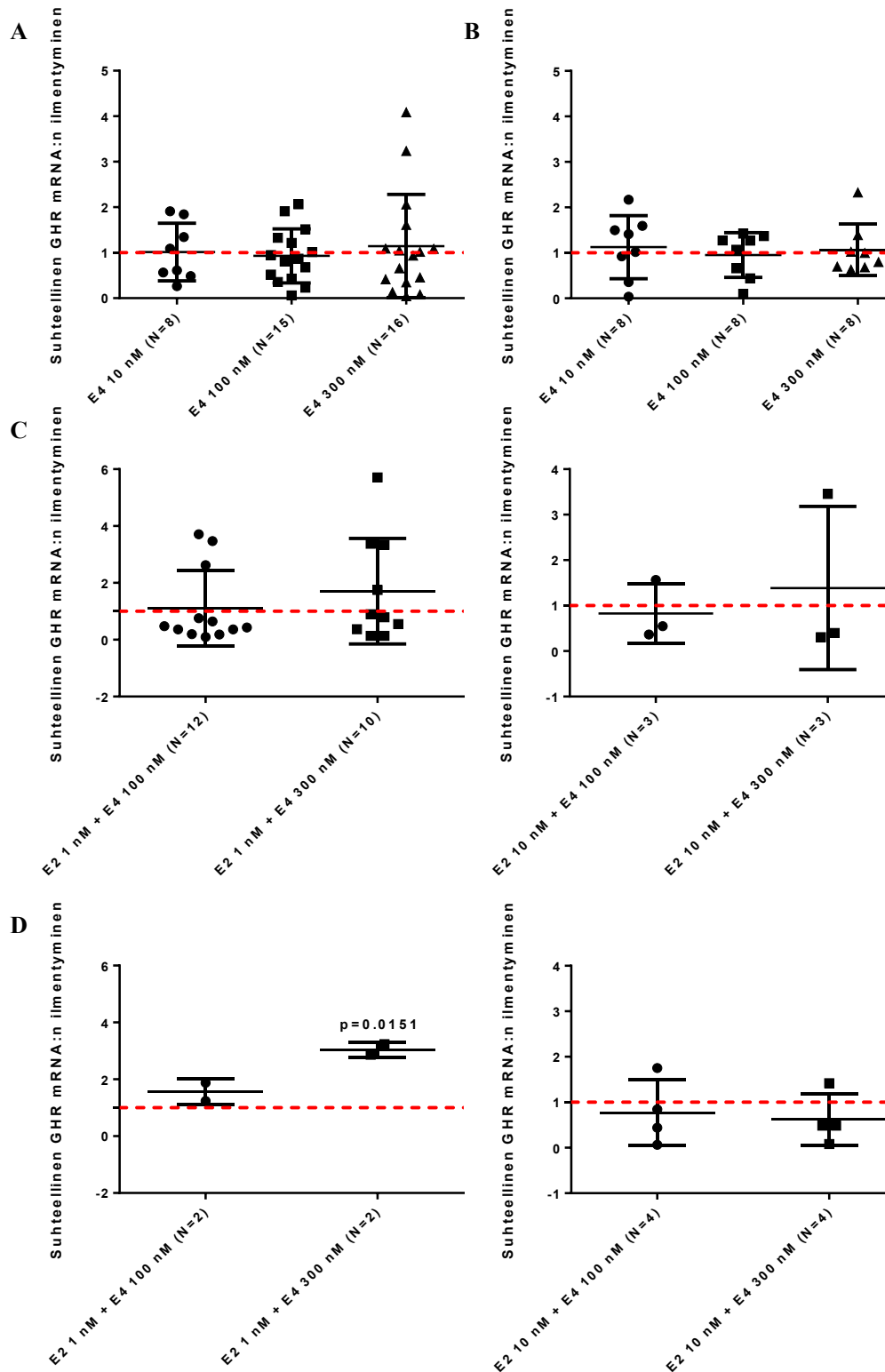
**Kuva 21. Progesteronireseptorin mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D)** Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitellyitä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitelyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.



**Kuva 22.** Androgeenireseptorin mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D) Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitteilyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.

#### 4.3.3.3 Kasvuhormonireseptorin ilmentyminen mRNA-tasolla

Estetoli yksinään ei lisännyt kasvuhormonireseptorin ilmentymistä normaalissa tai rintasyöpäkudoksessa. Ilmentyminen on molemmissa kudoksissa samaa tasoa kontrollin kanssa, joskin syöpäkudoksessa ilmenee enemmän hajontaa (Kuva 23A-B). Yhdessä estradiolin kanssa esteroli ei estänyt estradiolin vaikutuksia vaan pikemminkin lisäsi osittain estrogeenista stimulaatiota jokaisen käsittelyn kohdalla, erityisesti 1nM estradiolin kohdalla (Kuva 23C-D). Normaalissa kudoksessa nähdään jopa tilastolisesti merkitsevä nousu ilmentymistasossa 1nM estradiolin + 300 nM estetrolin kohdalla (Kuva 23D). Samanlainen agonistinen vaikutus nähtiin mm. androgeenireseptorin kohdalla.



**Kuva 23.** Kasvuhormonireseptorin mRNA:n suhteellinen ilmentyminen estetrolilla (E4) ja/tai estradiolilla (E2) käsitellyssä rintasyöpäkudoksessa (A, C) ja normaalissa rintakudoksessa (B, D) Kuvissa A-D symbolit ovat yksittäisiä potilasnäytteitä ja keskiarvo sekä keskihajonta on merkitty viivojen avulla. Kuvissa A ja B punainen viiva tarkoittaa hormonitonta kontrollia, johon estetrolikäsitteilyä on verrattu. Kuvissa C ja D punainen viiva tarkoittaa hormonia sisältävää kontrollia eli vastaavaa estradioli käsitelyä (E2 1nM tai E2 10 nM), johon kombinaatioita on verrattu.

## 5 Tulosten tarkastelu ja pohdinta

Tutkimus tehtiin osana laajempaa projektia, jonka tarkoituksena oli selvittää estetrolin vaikutusta rintakudokseen eksplanttiviljelmissä. Pro gradu - tutkielmassa selvitettiin lisäksi estetrolin vaikutusta 2D- ja 3D-soluviljelmissä.

Rintasyöpä on hyvin yleinen erityisesti naisia koskettava sairaus, johon on kehitetty useita erilaisia lääkkeitä, mutta johon tarvitaan jatkuvasti uusia hoitoja tehokkaamman hoitovasteen saamiseksi ja resistenssin välttämiseksi. Hormonaalisen rintasyövän hoidon kehittäminen on erityisen tärkeää, sillä tämä syöpä tyyppi kattaa noin 75% rintasyöpätapauksista. Estetrolin on todistettu toimivan estradiolin toimintaa estävästi (Gérard ym. 2015 B; Singer ym. 2014), joten tässä tutkimuksessa selvitettiin estääkö se estradiolin toimintaa rintakudoksessa ja syöpäsolujen 3D-soluviljelmissä. Hormonaalisessa rintasyövässä estradioli vaikuttaa rintasyövän kehitykseen ja useat lääkkeet kohdentuvat estradiolin toiminnan tai synteessin estämiseen (Berry ym 2006). Estetroli voisi toimia samalla periaatteella, kilpailemalla estradiolin kanssa sitoutumiskohdista kudoksessa ja siten estäen sen toiminnan. Estetrolin antagonistisen toiminnan tuloksena potilaiden estradiolitaso laskisi ja rintasyövän kehitys ja leviäminen voisi pysähtyä.

Estetrolia on myös tutkittu vaihdevuosien hormonaalisessa hoidossa (Coelingh ym. 2016). Jotta estetroli olisi potilailla turvallinen vaihtoehto vaihdevuosien aiheuttaman estrogeenitason laskun korvaamaksi estrogeenihoidoksi, sen ei tulisi lisätä solujen proliferaatiota ja siten riskiä rintasyövän kehittymiseksi. Tutkimuksessa havaittiin, että estetroli oli hyvin heikko estrogeeni, sillä se ei suurillakaan pitoisuuksilla lisännyt solujen proliferaatiota merkittävästi ja siten toimisi turvallisena estrogeenihoitona postmenopausaalisille naisille.

### 5.1 Estetroli on heikko estrogeeni, joka ei antagonisoi estradiolia tehokkaasti

Estetroli toimi tutkimuksen tulosten perusteella heikkona estrogeeninä solu- sekä kudostasolla ja sen estrogeeninen stimulaatio on noin 10-kertaa pienempi estradioliin verrattuna. Estetrolin vaikutukset olivat kuitenkin hyvin pienet kontrolliin verrattuna eivätkä erot keskimäärin olleet tilastollisesti merkitseviä. Gérard ym. 2015 A tutkimuksen mukaan estetrolilla on heikompi stimulatorinen vaikutus kuin estradiolilla, mutta estetrolilla havaittiin myös olevan antagonistisia vaikutuksia estradioliin

konsentraatiiriippuvaisesti. Tässä tutkimuksessa estradiolin antagonistiset vaikutukset eivät kuitenkaan tulleet selkeästi esille 2D-proliferaatiokoetta ja muutamaa steroidihormonireseptorin aktiivisuutta lukuun ottamatta. Joidenkin käsittelyjen kohdalla estetrolia näytti estävän estradiolin vaikutusta, mutta konsentraatiiriippuvuutta ei esiintynyt. Estrogeenit ovat usein pienillä konsentraatioilla agonisteja, mutta suuremmilla konsentraatioilla tämä agonistinen luonne häviää ja ne toimivatkin antagonistina. Tällainen toimintatapa näytti koskevan myös estetrolia, sillä kokeissa ei havaittu selkeää antagonismia estradiolin vaikutuksille.

Gérard ym. 2015 B julkaiseman tutkimuksen mukaan estetrolia lisää estrogeenireseptori alfan transkriptiota ja sitä kautta vaikuttaa solujen proliferaatioon positiivisesti. Tässä tutkimuksessa estetrolia stimuloi heikosti kudoksissa solujen proliferaatiota ja apoptoosiin sillä ei ollut juurikaan vaikutusta. Joidenkin geenien ilmentyminen lisääntyi estetrolin vaikutuksesta (ER $\alpha$ , PR, TFF1 ja AREG), mutta muutos kontrolliin verrattuna ei ollut kaikkien käsittelyiden kohdalla tilastollisesti merkittävä. Yhdessä estradiolin kanssa estetrolia ei kyennyt estämään estradiolin toimintaa tehokkaasti. Estrogeenireseptori alfan ja progesteronireseptorin kohdalla estetrolilla näytti olevan agonistinen vaikutus, mutta androgeenireseptorin ja kasvuhormonireseptorin kohdalla taas estetrolilla yhdessä estradiolin kanssa vaikutti pikemminkin olevan synergistinen vaikutus. Kuitenkin muutokset estrogeenireseptori alfan kohdalla olivat huomattavasti pienemmät kirjallisuuteen verrattuna (Gérard ym. 2015 B; Liu ym. 2015). Näiden julkaisujen tutkimuksissa on käytetty kloonattuja syöpäsolulinjoja, joissa ER $\alpha$ :n ilmentymistason voidaan ajatella olevan vakio kussakin solussa saman alkuperän vuoksi. Tämän tutkimuksen potilasnäytteissä taas nähdään suuria eroja ER $\alpha$ :n ilmentymistasoissa potilaiden välillä ja saman potilaan syöpäkudoksen eri osien välillä, mikä voi selittää, miksei nousua ilmentymisessä nähty. Potilasmäärää kasvattamalla tai asettamalla jokin ER $\alpha$ :n ilmentymisen raja-arvo voitaisiin nähdä paremmin estetrolin vaikutukset estrogeenireseptori alfan ilmentymiseen. Singer ym. 2014 tutkimuksessa 14 päivän ajan estetrolia saaneiden rintasyöpäpotilaiden ER $\alpha$ :n ilmentyminen tuumoreissa laski tilastollisesti merkitsevästi. ER $\beta$ :n ilmentyminen taas näytti nousevan estetrolin vaikutuksesta. Tämän tutkimuksen potilasnäytteiden ja soluilla tehtyjen kokeiden välillä on päinvastainen tulos julkaisujen perusteella, mutta koska potilasnäytteet edustavat todellista tilannetta ja suurta vaihtelua eri ihmisten välillä, niiden tulokset mahdollisesti antavat todenmukaisemman tuloksen estetrolin vaikutuksista. Kuitenkin tavoitteena on

kehittää potilaille sopivia lääkkeitä ja hoitoja, joten vaikutus potilaissa on tärkein kriteereistä, vaikka solukokeissa olisi saatu eriäviä tuloksia.

## 5.2 Estetroli vaikuttaa vaihtelevasti solujen proliferaatioon, elinkyyn ja apoptoosiin

Estrogeenireseptori ligandiensa sitoutumisen myötä aktivoi tai estää kohdegeenien transkriptiota sitoutumalla estrogeenin vaste-elementteihin. Estrogeenireseptori osallistuu signalointireitteihin, jotka lisäävät solujen proliferaatiota, migraatiota ja invasiivisuutta. Tutkimuksessa estetroli vaikutti vaihtelevasti solujen proliferaatioon. 2D-kasvukäyrissä estetrolilla nähdään selkeä estrogeeninen vaikutus, mutta kudosisviljelyiden immunohistokemiallisissa värjäyksissä ja qPCR:ssä vaikutus proliferaatiomarkkeriin KI67 oli vähäinen, joskin myös näiden menetelmien tuloksissa nähdään pieni kasvu proliferaatioissa. Estetroli lisäsi proliferaatiota etenkin normaalissa kudoksessa, mutta syöpäkudoksessa proliferaatio lisääntyi vain joidenkin potilaiden kohdalla. Singer ym. 2014 julkaisussa havaittiin, että estetrolilla oli merkittävä pro-apoptoottinen vaikutus rintasyöpätuumoreihin, mutta Ki67:n ilmentyminen ei muuttunut. Tämän tutkimuksen tulokset tukevat näitä havaintoja myös sen puolesta, että erot eri potilaiden välillä aiheuttivat suuren hajonnan.

2D- ja 3D-soluviljelmissä solujen elinkyky parani kaikissa estradioli- ja estetrolikäsitellyissä soluissa kontrolliin verrattuna, mutta erot eri käsittelyjen välillä olivat hyvin pieniä eikä estetrolin antagonistinen luonne tullut selkeästi ilmi elinkykykokeissa. Tian ym. 2018 julkaisussa estradiolilla käsiteltyjen MCF-7 solujen vialibiteetti parani tilastollisesti merkitsevästi samaa elinkykyä mittaavaa menetelmää käyttäen. Erona oli, että reagenssin annettiin vaikuttaa soluissa neljän tunnin ajan, kun taas näissä kokeissa jo kahden tunnin inkubaation jälkeen selkeä värireaktio oli havaittavissa. Sopivaa reagenssin inkubointiaikaa määrittäessä solujen annettiin reagoida WST-8:n (CCK) kanssa myös 4 h ajan, mutta tällöin absorbanssi nousi yli detektorajan, joten tulos ei enää ollut luotettava. Vaikka tutkimuksissa käytettiin samalta toimittajalta (ATCC) hankittuja MCF-7 soluja, on mahdollista, että solulinjojen ominaisuudet ovat muuntuneet käytön myötä, mikä voi laskea estrogeenisensitiivisyyttä.

Estradioli estää solujen apoptoosia estrogeenireseptoriin liittyvien signalointireittien kautta, joissa apoptoosi voi käynnistyä sisäisesti mitokondrion kautta tai ulkoisesti pro-

apoptoottisten ligandien sitoutuessa solun pinnalla oleviin ns. kuolemadomeeneihin. Estradioli muun muassa lisää apoptoosin estämiseen osallistuvaa bcl-2 geenin ilmentymistä ja indusoi NF- $\kappa$ B:n sekä PI3K/Akt:n välittämiä selviytymistä lisääviä signalointireittejä (Lewis-Wambi ym. 2009). Koska estetrolin on todistettu olevan heikko estrogeeni ja sitoutuvan estrogeenireseptoriin, sen oletettiin myös estävän apoptoosia. Tutkimuksessa estetrolin laski hieman solujen apoptoosia normaalissa kudoksessa, mutta ei syöpäkudoksessa. Yhdessä estradiolin kanssa estetrolin ei kyennyt estämään solujen apoptoosia normaalissa eikä syöpäkudoksessa verrattaessa vaikutusta yksin estradiolin kanssa käsiteltyyn kudokseen. Gérard ym. 2015 B julkaisun mukaan estetrolin kykeni aktivoimaan PI3K/AKT signalointireittiä ja siten estämään apoptoosia syöpäkudoksessa. Kuitenkin casp3 vaikuttaa eri signalointireitin kautta apoptoosiin, mikä voi selittää erot tuloksissa. Toisaalta Singer ym. 2014 tutkimuksessa estetrolin saaneiden potilaiden tuumoreissa oli havaittavissa tilastollisesti merkitsevä nousu apoptoottisessa indeksissä.

### 5.3 Estetrolin lisää merkitsevästi solujen 3D kasvua

Estetrolin lisäsi tilastollisesti merkitsevästi solujen kykyä muodostaa organoideja hormonittomaan kontrolliin verrattuna eli estetrolilla oli 3D-viljelmissä selkeä estrogeeninen vaikutus. Konsentraatioriippuvuutta ei kuitenkaan ollut havaittavissa. Yhdessä estradiolin kanssa organoidien koot pysyivät suhteellisen vakiona estetrolin konsentraatiosta riippumatta, mutta kuolleiden solujen suhteellinen osuus organoidin sisällä laski vasteena estetrolikonsentraation nousulle. Estetrolilla ja estradiolilla käsiteltyjen solujen elinkyvyssä nähtiin 3D-viljelmässä kuitenkin 10 nM estradiolin kohdalla selkeä konsentraatioriippuvainen lasku, mikä ei näkynyt organoidien kokoa analysoitaessa.

2D- ja 3D-viljelmissä kasvaneiden solujen geenien ilmentymisessä on raportoitu olevan eroja. Vantangoli ym. 2015 julkaisussa tutkittiin 3D-viljelmissä kasvaneiden estradiolilla käsiteltyjen solujen estrogeenin kohdegeenien ilmentymistä. Kontrolliin verrattuna esimerkiksi PGR- ja GREB-geenien ilmentymisessä oli selkeä lisääntyminen, mutta kuitenkin 2D-viljelmissä näiden kohdegeenien ilmentymisessä oli suurempi kasvu havaittavissa. Tämä voisi selittää, miksei 3D-viljelmissä nähty eroa eri estetrolin konsentraatioiden välillä tai miksei antagonistinen vaikutus tullut selkeästi ilmi, vaikka estrogeeniresponsiivisuus olikin selvää. Vantagolin tutkimuksen mukaan hydrogeelissä kasvaneiden MCF-7 solujen estrogeenireseptoriin beetan ilmentyminen laskee

merkitsevästi, vaikkakin estrogeeniresponsiivisuus viljelmien soluissa säilyy. Tähän voi vaikuttaa solujen differentioituminen 3D-viljelmissä, mikä voi puolestaan vaikuttaa proliferaation ja invasiivisuutta säätelevien geenien ilmentymiseen. Tässä tutkimuksessa solut kasvoivat erilaisissa materiaaleissa, jolla voi olla myös vaikutus tuloksiin. Kuitenkin solut reagoivat hyvin lisättyyn estrogeeniin ja muodostivat kaikilla estradioli- ja estetrolikäsittelyillä suurempia organoideja kontrollikäsittelyyn verrattuna. 12 päivän kontrolliviljelmissä solut muodostivat pieniä organoideja ja kuolleita soluja oli estrogeenikäsiteltyihin organoideihin verrattuna enemmän eli estetrolilla on selkeä kasvua lisäävä vaikutus 3D-viljelmissä.

## 5.4 Käytettyjen menetelmien sopivuus ja rajoitteet tutkimusasetelmassa

### 5.4.1 Proliferaatio- ja elinkykykokeet

Solujen kasvua kuoppalevyllä seurattiin automatisoidun mikroskooppikameran kahden tunnin välein ottamien kuvien avulla (IncuCyte® ZOOM). Kameran ottamista kuvista laskettiin solujen peittämä pinta-ala prosentteina. Jos kokeen alussa kuopissa oli vaihtelevat määrät soluja, se lisäsi hajonnan määrää. Epätasainen solujen jakaantuminen kuoppalevyllä aiheuttaa myös hajontaa. Kamera kuvaa tietyt pisteet kuoppalevystä pyrkien saamaan koko levyn kuvattua, mutta jos solut olivat pääasiassa kerääntyneet kuopan reunoille, ne saattoivat jäädä mikroskooppikameran ottamasta kuvasta pois. Kokeessa käytetty MCF7-solulinja muodostaa helposti aggregaatteja, mikä vaikeutti solujen pipetoimista tasaisesti kuopan pohjalle. Kuitenkin nämä seikat on pyritty huomioimaan tuloksissa, poistaen selkeästi epäonnistuneet kaivot. Rinnakkaisten näytteiden lukumäärä onkin pidettävä suhteellisen korkeana, jotta voidaan poistaa epäonnistuneita kaivoja tuloksia analysoitaessa.

Solujen elinkykyä määrittävässä kokeessa WST-8 reagenssin avulla tulisi paremmin huomioida solujen kasvukäyrän vaikutus mittauksen lopputulokseen. 2D-kokeessa elinkyky mitattiin viidentenä päivänä, kun taas 3D-kokeessa kahdentenatoista päivänä. Näitä tuloksia olisi hyvä verrata kasvukäyrän muotoon, sillä elinkyvyn määrittämisessä tulee eroja, jos solut ovat kasvaneet eri tahtiin ja siten mittaus tapahtuu kasvukäyrän eri vaiheissa. Myös WST-8 -reagenssin inkubaatioaika voi olla yhtenä virhelähteenä. Reagenssin on annettu vaikuttaa kuoppalevyllä 2 tuntia, mutta kuitenkin se on lisätty eri kaivoihin vähän eri aikaan, sillä koko levyä ei pysty pipetoimaan kerralla. Tämä voi

vaikuttaa lopputulokseen, kun lisäksi mittauksen suorittamiseen menee aikaa, joka voi vaihdella laitteessa ilmenevien ongelmien vuoksi.

#### 5.4.2 3D-soluviljely

Yksi syöpätutkimuksen käytetyimmistä tutkimusmenetelmistä on solulinjoilla tehtävät 2D in vitro -kokeet. Solulinjat voivat jakaantua rajattomasti, sillä solut on tehty kuolemattomiksi sopivilla käsittelyillä. Kuolemattomuus voidaan saavuttaa tuomalla soluihin telomeraasiaktiivisuus tai TERT-ensyymiaktiivisuus (Klingelutz ym. 1994; Tsai ym. 2014), mutatoimalla solusykliä säätelevät p53- ja pRb-geenit (Lundberg ym. 2002) tai transformoimalla soluun onkogeeni (Oh ym. 2003; Artero-Castro ym. 2009). Perinteisesti soluja kasvatetaan muovisilla petrimaljoilla, joiden pohjaan solut kiinnittyvät ja kasvavat yksinkertaisena kerroksena. Kuitenkin solujen kasvutapa maljalla on hyvin erilainen kudoksiin verrattuna, joissa solut pääsevät kasvamaan kolmiulotteisesti ja onkin huomattu selkeitä eroja 2D- ja 3D-kokeiden tuloksien välillä (Ohmori ym. 1998; Hongisto ym. 2003).

Erot tuloksissa voidaan selittää muun muassa erilaisen mikroympäristön avulla, sillä kudoksissa solu-solukontaktin muodostuminen, solujen välinen signaalointi ja kommunikointi soluväliaineen kanssa eroavat 2D-mallista (Tasdemir ym. 2018; Riedl ym. 2017). Tämän takia on tärkeää löytää uusia keinoja tutkia syöpäsolujen toimintaa niille ominaisessa ympäristössä. Soluja voidaan kasvattaa erilaisilla hydrogeeleillä kuten esimerkiksi matrigeelillä. Matrigeeli™ sisältää tyvikalvolle tyypillisiä komponentteja, kuten laminiinia, kollageeni IV: ää sekä entaktiinia, ja se on alun perin eristetty Englebreth-Holm-Swarm -tautia sairastavien hiirten tuumoreista (Orkin ym. 1977). Matrigeelissä solut pääsevät kasvamaan ja jakaantumaan kaikkiin suuntiin, jolloin ne voivat muodostaa organoideja (Olea ym. 1992; Rensburg ym. 2018). Tällä kasvutavalla voidaan myös tutkia solujen invasiivisuutta, kun jakaantuvat ja vaeltavat solut tunkeutuvat esimerkiksi proteolyysin avulla matrigeelissä uusiin kasvupaikkoihin (Zaman ym. 2006; Zhu ym. 2015).

3D-kokeessa seurattiin yksittäisten solujen kykyä jakaantua ja muodostaa organoideja matrigeelissä. Jos kuoppalevyn kuoppiin on alun perin tullut eri määrä soluja, se lisää hajontaa kokeessa suuresti. MCF7-solut ovat hyvin aggregoituvia soluja, mikä piti huomioida solukokeissa sekoittamalla solut mahdollisimman hyvin

elatusliuokseen, jotta ne saataisiin yksittäisiksi soluiksi. Jos kuoppalevyn matrigeliin laitetaan jo valmiiksi soluaggregaatteja, voi olla vaikea verrata solujen kykyä muodostaa organoideja, kun lähtökohdat ovat olleet erilaiset kaivojen välillä. Kokeessa on hyvä pitää rinnakkaisten käsittelyjen määrä suurena, jotta tarvittaessa voidaan poistaa analyyseistä kaivot, jotka sisältävät paljon soluaggregaatteja.

#### 5.4.3 Kudosisviljely

Ennen uuden lääkkeen tai hoidon siirtymistä markkinoille sen on käytävä läpi prekliiniset ja kliiniset tutkimukset (Läkelaki 1987/395; 2005/853). Prekliiniset tutkimukset voidaan suorittaa esimerkiksi solukokeilla ja eläinkokeilla ennen ihmisillä tehtäviä kliinisiä kokeita. In vitro -mallit ovat kuitenkin rajallisia ja vaikka eläinkokeissa käytetyt hiiret muistuttavatkin genomiltaan ihmistä, useat prekliinisissä kokeissa hyväksi havaitut lääkkeet eivät läpäise kliinistä vaihetta. Kliinisissä kokeissa oleville lääkkeillä voidaankin määrittää ns. menestyksen todennäköisyys eli POS-arvo (engl. The probability of success). Esimerkiksi Wong ym. 2018 tekemän tutkimuksen mukaan uusien syöpälääkkeiden menestymistodennäköisyys kliinisissä kokeissa on vain 3,4 %.

Tarve paremmille tutkimusmalleille on siis olemassa ja esimerkiksi potilasperäiset eksplantit (PDE:t) kudosisviljelyssä voisivat toimia luotettavana tutkimusmallina prekliinisessä vaiheessa. Tässä mallissa potilaista saadaan leikkauksen yhteydessä kudospala ja kudosta voidaan pitää hengissä laboratorio-olosuhteissa, kun sille annetaan sopivia kasvutekijöitä (Centenera ym. 2018; Eigeliené ym. 2016). Kudoksen tai elimen viljely ei ole uusi menetelmä, sillä jo vuonna 1970 Trowell kehitti menetelmän elinten viljelemiseksi. Potilaasta leikattu kudospala voidaan esimerkiksi viljellä metallisen ritilän päällä (Eigeliené ym. 2006) tai sienellä (Centenera ym. 2013). Tällä tavoin luodaan potilaista peräisin oleva ex vivo malli, jonka avulla saadaan tietoa tutkittavan aineen vaikutuksista ihmiskudokseen. Ihmisperäinen tutkimus jo prekliinisessä vaiheessa voisi pienentää epäonnistuneiden kliinisten kokeiden todennäköisyyttä ja samalla saavutettaisiin taloudellinen säästö. Ihmisperäisten näytteiden viljelyssä tulee kuitenkin huomioida eettisyys ja lääkärin on konsultoitava potilasta ennen näytteen luovuttamista tutkimuskäyttöön.

Vaikka kudosisviljely toimisikin parempana mallina 2D- ja 3D- soluviljelykokeisiin verrattuna, tälläkin menetelmällä on rajoituksensa. Elimien erilaisia toimintoja,

säätelyjärjestelmiä ja niiden poikkeavuuksia ei voida tutkia. Syövän kohdalla esimerkiksi verenkierron tutkiminen olisi tärkeää, sillä tuumorin kasvu ja leviäminen on riippuvainen angiogeenisistä. Jos syöpäsolut eivät saa happea ja muita verenkierron välityksellä saatavia aineita, ne eivät voi levitä muualle elimistöön ja solut voivat mennä apoptoosiin. Kudostutkimuksessa ei myöskään pystytä tutkimaan hermotusta ja suurimolekyyllisten yhdisteiden vaikutuksia kuten proteiinien vuorovaikutuksia voi olla haastavaa tutkia.

Syöpä on luonteeltaan hyvin heterogeeninen, mikä näkyy myös tämän tutkimuksen tuloksissa. Yksittäisten potilaiden vasteet hormoneihin voivat olla täysin päinvastaisia, mikä vaikeuttaa estrogeenin vaikutuksen arvioimista. Samoin kuin potilasnäytteiden määrän tulisi olla todella suuri, jotta voitaisiin tehdä selkeä päätelmä kokeiden perusteella. Ongelmia voi esiintyä myös patologian antamassa histopatologisessa määrityksessä. Potilasnäytteen kriteerinä oli, että kudostutkimus ilmentää estrogeenireseptoria. Kuitenkaan ilmentymistasolle ei anneta mitään raja-arvoa, jolloin jotkin tutkimuksen potilailta saadut kudostutkimukset ilmentävät reseptoria 99 prosenttisesti, kun taas joidenkin kohdalla ilmentyminen on vain prosentin luokkaa (Liite 2). Estrogeenireseptorin ilmentymisen määrä voi vaikuttaa kudoksen estrogeenivasteeseen, mikä tässä tutkimuksessa vaikuttaisi estrogeenin vasteen suuruuteen. Tämä näkyy selkeästi immunohistokemiallisten värjäyksiensä kohdalla, sillä samalla vasta-aineella ja samalla kerralla värjätty potilasnäytteet värjäytyvät hyvin vaihtelevalla tavalla. Joidenkin potilasnäytteiden tulokset ovat värjäytyvyydeltään lähellä negatiivista kontrollia. Tämä taas vaikuttaa koko potilasdatan kvantitoinnin lopputulokseen, jolloin estradiolin tai estrogeenin vaikutukset voivat peittyä. Tulokseen voi myös vaikuttaa syöpäsolujen muuntunut vaste estrogeenireseptoriin.

Sairaalaan saatu kudostutkimus koostuu tuumorista, normaalista rintakudoksesta sekä rasvakudoksesta. Joissakin tapauksissa tuumori on selkeästi käsin kosketeltaessa erottuva kiinteämpi osa näytettä, kun taas joskus tuumoria on hyvin vaikea erottaa normaalista kudoksesta. Tuumorin välissä voi olla paljon sidekudosta ja rasvakudosta, jotka on vaikea poistaa pienistä kudospaloista. Tällöin lopputuloksena voi olla huono kudostutkimus jatkokäsittelyä varten. Syöpäkudosta oli myös saatavilla vaihtelevat määrät; tuumorin koko vaihteli useammasta senttimetrinä muutamaan millimetriin. Pienempien tuumoreiden kohdalla näytettä ei saatu kaikkiin hormonikäsittelyihin tai rinnakkaisten

käsittelyiden määrä jäi pieneksi. Tämä puolestaan lisää rinnakkaistenkin näytteiden vaihtelun mahdollisuutta.

#### 5.4.4 Immunohistokemialliset värjäykset

Immunohistokemiallinen värjäys on menetelmänä suhteellisen helppo suorittaa ja värjäyksen lopputulos on varsin tasalaatuinen. Tässä menetelmässä ongelmia aiheuttavat etenkin erilaiset vasta-aineet. Eri valmistajien tuottamien, samoja kohdeproteiineja tunnistavien vasta-aineitten spesifisyydessä voi olla suuria eroja. Esimerkkinä estrogeenireseptori beeta, josta on julkaisuja, joiden mukaan suurin osa käytetyistä ER $\beta$  vasta-aineista ovat epäspesifisiä (Andersson ym. 2017; Nelson ym. 2017). Ennen tutkimusta testattiin viittä eri ER $\beta$  vasta-ainetta, jotka antoivat hyvin erilaisen lopputuloksen rintakudoksen värjäytyvydessä. Joillakin vasta-aineilla peräkkäisten kudოსleikkeitten epiteelisoluja värjäytyi hyvin paljon, kun taas joillakin suurin osa näytteistä näytti negatiiviselta. Koska tässä tutkimuksessa ei ollut mahdollista ryhtyä vasta-aineitten spesifisyyden perusteelliseen selvittämiseen, immunohistokemialliset värjäykset jätettiin pois tuloksista. Negatiivinen värjäytyvyys näyttää kuitenkin tällä hetkellä tämänkin työn immunovärjäysten perusteella luotettavammalta tulokselta, sillä kvantitatiivisen PCR:n tulosten mukaan estrogeenireseptori beetaa ilmennetään hyvin vähän rintakudoksessa.

Toinen haaste immunohistokemiassa on kudოსnäytteiden laatu. Kun kudოსpalasta leikataan ohuet leikkeet lasille, ne voivat kiinnittyä huonosti rintakudoksen seassa olevan rasvakudoksen takia ja rullautua lasille kasaksi. Rasvakudos on pyritty poistamaan jo kokeen alussa kudოსpalan paloittelun yhteydessä, mutta tuumoriin voi silti jäädä pieniä määriä rasvakudosta. Kuitenkin rintasyöpäkudosta voi olla vaikea erottaa normaalista kudoksesta, jos se ei ole vielä lähtenyt metastasoimaan muualla, vaan pysyy vielä rauhasepiteelin tyvikalvon rajaamalla alueella, vaikka se onkin jo muuntunut normaalista solusta syöpäsolun suuntaan. Normaalit epiteelisolut eivät pysty tunkeutumaan rasvakudokseen toisin kuin syöpäsolut. Jos kudოსpalan rasvasolujen seassa on epiteelisoluja, voidaan varmuudella todeta ne syöpäsoluiksi, mikä taas varmistaa, että kvantitoinnissa lasketaan juuri syöpäsolujen positiivinen värjäytyvyys eikä normaalin rintakudoksen. Kuitenkaan hyvien näytteiden tekemiseksi, ei kudoksen saisi olla liian paljon rasvakudosta.

#### 5.4.5 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiivinen PCR on erittäin herkkä menetelmä, jossa kontaminaation riski on suuri. Käsittelijän oman DNA:n lisäksi ongelmaksi voi myös muodostua genomisen DNA:n amplifikointi kohde-DNA:n sijaan. Vaikka yksittäiset qPCR -ajo-ohjelmat ovatkin identtiset, jokainen ajokerta voi kuitenkin vaikuttaa lopputulokseen, mikä lisää virheen ja hajonnan määrää. Yksittäiset potilassarjat on tutkimuksessa ajettu samalla levyllä samassa ajossa, mutta erot eri potilaiden välillä voivat lisääntyä eri ajojen takia. Kuitenkin suhteellisen suuren potilasnäyttemäärän ja useamman hormonikäsittelyn takia, ei ole mahdollista ajaa kaikkia potilasnäytteitä samassa ajossa. Kriteerinä tulosten analysoinnissa on pidetty, että rinnakkaisten näytteiden Ct-arvot eivät saisi erota toisistaan yli 0,5 yksikköä. Matalien Ct-arvojen kohdalla hajonnat eivät olleet niin suuri ongelma, mutta korkeiden Ct-arvojen (arvot välillä 32-39) kohdalla hajonnan määrä lisääntyi selkeästi.

Rintakudospaloissa on pyritty leikkaamaan tuumorin keskeltä pienemmät kudospalat, jotta viljeltävät näytteet sisältäisivät mahdollisimman paljon syöpäkudosta. Kuitenkin varsinkin lobulaarisessa syövässä, tuumorin seassa on normaalia kudosta, joten tämä vaikuttaa myös tutkittavan näytteen tuloksiin. Kvantitatiivisessa PCR:ssä ei voida varmuudella sanoa, onko ilmentynyt geeni peräisin syöpäkudoksesta vai normaalista kudoksesta ja missä määrin se vaikuttaa lopputulokseen. Tämän takia on välttämätöntä, että tutkimuksessa katsotaan myös erikseen geenien ilmentymistä normaalissa kudoksessa. Kvantitatiivisen PCR:n tuloksia ei myöskään voi verrata suoraan immunohistokemiallisten värjäykseen tuloksiin, sillä menetelmät mittaavat eri asioita.

#### 5.5 Johtopäätelmät tuloksista

Tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että estetrol on hyvin heikko estrogeeni, joka ei aiheuta merkittävää proliferaation lisäämistä rintakudoksessa, mikä voisi mahdollistaa sen käytön tulevaisuudessa esimerkiksi vaihdevuosien hormonihoidoissa estradiolin ja sen johdannaisen sijasta. Estetrolin kyky estää solujen proliferaatiota yksin tai estradiolistimulaation antagonistina on myös heikko, minkä perusteella yhdiste ei ainakaan yksin näytä tehokkaalta rintasyövän kasvun estossa. Kuitenkin estetrol saattaisi sopia vaihdevuosien hormonaalisen hoidon lisäksi myös rintasyöpäpotilaiden antiestrogeenihoidon yhteyteen vähentämään syöpähoidon aiheuttamia haitallisia sivuvaikutuksia. Lisäksi estetrolin vaikutukset normaalissa rintakudoksessa olivat

vähäiset. Tutkimalla tarkemmin estetrolin vaikutusmekanismeja voitaisiin saada varmuus sen biologisesta roolista ja siten tietoa siitä, miten tätä hormonia voitaisiin hyödyntää lääkehoidoissa.

## 6 Lähteet

Allard W.J., Matera J., Miller M.C., Repollet M., Connelly M.C., Rao C., Tibbe A.G., Uhr J.W. & Terstappen L.W. (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, 10: 6897-6904.

Amarneh B., Corbin C.J., Peterson J.A., Simpson E.R. & Graham-Lorence S. (1993) Functional domains of human aromatase cytochrome P450 characterized by linear alignment and site-directed mutagenesis. *Molecular Endocrinology*, 7(12):1617–1624.

Andersson S., Sundberg M., Pristovsek N., Ibrahim A., Jonsson P., Katona B., Clausson C.M., Zieba A., Ramström M., Söderberg O., Williams C. & Asplund A. (2017) Insufficient antibody validation challenges oestrogen receptor beta research. *Nature Communications*, 8:15840.

Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S., Risch H.A., Eyfjord J.E., Hopper J.L., Loman N., Olsson H., Johannsson O., Borg A., Pasini B., Radice P., Manoukian S., Eccles D.M., Tang N., Olah E., Anton-Culver H., Warner E., Lubinski J., Gronwald J., Gorski B., Tulinius H., Thorlacius S., Eerola H., Nevanlinna H., Syrjäkoski K., Kallioniemi O.P., Thompson D., Evans C., Peto J., Lalloo F., Evans D.G., Easton D.F. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Society of Human Genetics*, 72(5):1117-30.

Artero-Castro A., Kondoh H., Fernandez-Marcos P.J., Serrano M., Ramon y, Cajal S. & Leonart M.E. (2009b) Rplp1 bypasses replicative senescence and contributes to transformation. *Experimental Cell Research*, 315: 1372–83.

Barbara Belletti B., Vaidya J.S., D'Andrea S., Entschladen F., Roncadin M., Lovat F., Berton S., Perin T., Candiani E., Reccanello S., Veronesi A., Canzonieri V., Trovo M.G., Zaenker K.S., Colombatti A., Baldassarre G. & Massarut S. (2008) Targeted Intraoperative Radiotherapy Impairs the Stimulation of Breast Cancer Cell Proliferation and Invasion Caused by Surgical Wounding. *Clinical Cancer Research*, 14:1325-1332.

Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K. & Clark G.M. (2003) Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology*, 21:1973-1979.

Beleut M., Rajaram R.D., Caikovski M., Ayyanan A., Germano D., Choi Y., Schneider P. & Briskena C. (2010) Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7): 2989–2994.

Bellamy C.O.C., McDonald C., Salter D.M., Chetty U. & Anderson T.J. (1993) Noninvasive ductal carcinoma of the breast: the relevance of histologic characterization. *Human Pathology*, 24: 16–23.

Beral V., Banks E. & Reeves G. (2002) Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet*, 360: 942–44.

Bergh J., Jonsson P.E., Lidbrink E.K., Trudeau M., Eiermann W., Brattström D., Lindemann J.P., Wiklund F., Henriksson R. (2012) FACT: an open-label randomized phase III study of fulvestrant and anastrozole in combination compared with anastrozole alone as first-line therapy for patients with receptor-positive postmenopausal breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30: 1919–25.

Berrino F., Muti P., Micheli A., Bolelli G., Krogh V., Sciajno R., Pisani P., Panico S. & Secreto G. (1996) Serum sex hormone levels after menopause and subsequent breast cancer. *Journal of The National Cancer Institute*, 88(5):291-6.

Berry D.A., Cirincione C., Henderson I.C., Citron M.L., Budman D.R., Goldstein L.J., Martino S., Perez E.A., Muss H.B., Norton L., Hudis C., Winer E.P. (2006) Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *Journal of the American Medical Association*, 295: 1658–1667.

Birrell S.N., Bentel J.M., Hickey T.E., Ricciadelli C., Weger M.A., Horsfall D.J. & Tilley W.D. (1995a). Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52, 459-467.

Bonnefoi H., Grellety T., Tredan O., Saghatchian M., Dalenc F., Mailliez A., L'Haridon T., Cottu P., Abadie-Lacourtoisie S., You B., Mousseau M., Dauba J., Del Piano F., Desmoulins I., Coussy F., Madranges N., Grenier J., Bidard F.C, Proudhon C., MacGrogan G., Orsini C., Pulido M., & Gonçalves A. (2016) A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Annals of Oncology*, 27(5):812-8.

Brandenberger A.W., Tee M.K., Lee J.Y., Chao V. & Jaffe R.B. (1997) Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(10):3509-12.

Brodie A.M., Garrett W.M., Hendrickson J.R., Tsai-Morris C.H., Marcotte P.A. & Robinson C.H. (1981) Inactivation of aromatase in vitro by 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione and 4-acetoxy-4-androstene-3,17-dione and sustained effects in vivo. *Steroids*, 38(6):693–702.

Brodie A.M., Schwarzel W.C., Shaikh A.A. & Brodie H.J. (1977) The effect of an aromatase inhibitor, 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione, on estrogen-dependent processes in reproduction and breast cancer. *Endocrinology*, 100(6):1684–1695.

Brown C. J., Goss S. J., Lubahn D. B., Joseph D. R., Wilson E. M., French F. S., & Willard H. F. (1989) Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization and description of a DNA polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 44:264-269.

Brzozowski A.M., Pike A.C., Dauter Z., Hubbard R.E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G.L., Gustafsson J.-Å. & Carlquist M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389:753–758.

Buchholz T.A., Katz A., Strom E.A., McNeese M.D., Perkins G.H., Hortobagyi G.N., Thames H.D., Kuerer H.M., Singletary S.E., Sahin A.A., Hunt K.K., Buzdar A.U., Valero V., Sneige N. & Tucker S.L. (2002) Pathologic tumor size and lymph node status predict for different rates of locoregional recurrence after mastectomy for breast cancer patients treated with neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, 53(4):880-888.

Burger H.G., Dudley E.C., Hopper J.L., Groome N., Guthrie J.R., Green A. & Dennerstein L. (1999) Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84:4025–4030.

Burstein H.J., Termin S., Anderson H., Buchholz T.A., Davidson N.E., Gelmon K.E., Giordano S.H., Hudis C.A., Rowden D., Solky A.J., Stearns V., Winer E.P. & Griggs J.J (2014) Adjuvant endocrine therapy for women with hormone-receptor positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology*, 32(21), 2255–2269.

Carani C., Rochira V., Faustini-Fustini M., Balestrieri A. & Granata A.R. (1999) Role of oestrogen in male sexual behaviour: insights from the natural model of aromatase deficiency. *Clinical Endocrinology*, 51(4):517-24.

Casolari D.A., Pereira M.C., de Bessa Garcia S.A. & Nagai M.A. (2011) Insulin-like growth factor-1 and 17 $\beta$ -estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, Sep;28(3):337-42.

Centenera M.M., Hickey T.E., Jindal S., Ryan N. K., Ravindranathan P., Mohammed H., Robinson J.L., Schiewer M.J., Ma S., Kapur P., Sutherland P.D., Hoffmann C.E., Roehrborn C. G., Gomella L.G., Carroll J.S., Birrell S.N., Knudsen K.E., Raj G.V., Butler M.L. & Tilley W.D. (2018) A patient-derived explant (PDE) model of hormone-dependent cancer. *Molecular Oncology*, 12 1608–1622.

Centenera M.M., Raj G.V., Knudsen K.E., Tilley W.D., Butler L.M. (2013) Ex vivo culture of human prostate tissue and drug development. *Nature Reviews Urology*, 10, 483–487.

Chen S., Kao Y.C. & Laughton C.A. (1997) Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Apr;61(3-6):107-15.

Chen X., Xia F., Luo J., Ma J., Yang Z., Zhang L., Feng Y., Shao Z., Yu X. & Guo X. (2018) Postmastectomy radiotherapy reduces locoregional and disease recurrence in patients with stage II-III triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and mastectomy. *OncoTargets and Therapy*, 11:1973-1980.

Coelingh Bennink H.J.T., Verhoeven C., Zimmerman Y., Visser M., Foidart J.M. & Gemzell-Danielsson K. (2016) Clinical effects of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Maturitas*, 91, 93-100.

Cole M. P., Jones C. T. & Todd I. D. (1971) A new antioestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *British Journal of Cancer*, 25, 270–275.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2012) Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncology*, 13:1141.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002) Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 360(9328):187-95.

Condon J.C., Hardy D.B., Kovacic K., Mendelson C.R (2006) Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Molecular Endocrinology*, 20(4):764-75.

Cornil C.A., Dalla C., Papadopoulou-Daifoti Z., Baillien M. & Balthazart J. (2006) Estradiol rapidly activates male sexual behavior and affects brain monoamine levels in the quail brain. *Behavioural Brain Research*, 166(1):110-23.

Daniel C.W., Silberstein G.B. & Strickland P. (1987) Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. *Cancer Research*, 47:6052–6057.

De Vivo I., Hankinson S.E., Colditz G.A. & Hunter D.J. (2003) A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Research*, 63(17):5236-8.

Desta Z., Ward B.A., Soukhova N.V. & Flockhart D.A. (2004) Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310: 1062–1075.

Desta Z., Ward B.A., Soukhova N.V. & Flockhart D.A. (2004) Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310:1062–75.

Domchek S.M., Friebel T.M., Singer C.F., Evans D.G., Lynch H.T., Isaacs C., Garber J.E., Neuhausen S.L., Matloff E., Eeles R., Pichert G., Van 't'veer L., Tung N., Weitzel J.N., Couch F.J., Rubinstein W.S., Ganz P.A., Daly M.B., Olopade O.I., Tomlinson G., Schildkraut J., Blum J.L. & Rebbeck T.R. (2010) Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *Journal of the American Medical Association*, 304:967-75.

Eigélienė N., Elo T., Linhala M., Hurme S., Erkkola R. & Härkönen P. (2012) Androgens Inhibit the Stimulatory Action of 17 $\beta$ -Estradiol on Normal Human Breast Tissue in Explant Cultures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(7): E1116–E1127.

Eigélienė N., Erkkola R. & Härkönen P. (2016) Comparison of the effects of the selective estrogen receptor modulators ospemifene, raloxifene and tamoxifen on breast tissue in ex vivo culture. *Methods in Molecular Biology*, 1366:327-36.

Eigeliene N., Härkönen P. & Erkkola R. (2006) Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology, proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. *BMC cancer*, 6:246.

Engholm G., Ferlay J., Christensen N., Hansen H.L., Hertzum-Larsen R., Johannesen T.B., Kejs A.M.T., Khan S., Ólafsdóttir E., Petersen T., Schmidt L.K.H., Virtanen A. & Storm H.H. (2018) Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in the Nordic Countries, Version 8.1 (18.10.2018)

Ettinger B., Pressman A., Sklarin P., Bauer D.C., Cauley J.A. & Cummings S.R. (1998) Associations between low levels of serum estradiol, bone density, and fractures among elderly women: The study of osteoporotic fractures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83:2239–2243.

Faivre E.J. & Lange C.A. (2007) Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(2):466-80.

Fata J.E., Chaudhary V. & Khokha R. (2001) Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 65:680–8.

Finn R.S., Crown J.P., Lang I. Boer K., Bondarenko I.M., Kulyk S.O., Ettl J., Patel R., Pinter T., Schmidt M., Shparyk Y., Thummala A.R., Voytko N.L., Fowst C., Huang X., Kim S.T., Randolph S. & Slamon D.J. (2015) The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncology*, 16: 25–35.

Fisher B., Bryant J., Dignam J.J., Wickerham D.L., Mamounas E.P., Fisher E.R., Margolese R.G., Nesbitt L., Paik S., Pisansky T.M. & Wolmark N. (2002) Tamoxifen, radiation therapy, or both for prevention of ipsilateral breast tumor recurrence after lumpectomy in women with invasive breast cancers of one centimeter or less. *Journal of Clinical Oncology*, Oct 15;20(20):4141-9.

Fisher B., Bryant J., Dignam J.J., Wickerham D.L., Mamounas E.P., Fisher E.R., Margolese R.G., Nesbitt L., Paik S., Pisansky T.M. & Wolmark N. (2002) Tamoxifen, radiation therapy, or both for prevention of ipsilateral breast tumor recurrence after lumpectomy in women with invasive breast cancers of one centimeter or less. *Journal of Clinical Oncology*, 20(20):4141-9.

Fisher B., Jeong J.-H., Anderson S., Bryant J., Fisher E.R. & Wolmark N. (2002) Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *The New England Journal of Medicine*, 347(8):567-575.

Frasor J., Danes J. M., Komm B., Chang K.C.N., Lyttle C.R. & Katzenellenbogen B.S. (2003) Profiling of Estrogen Up- and Down-Regulated Gene Expression in Human Breast Cancer Cells: Insights into Gene Networks and Pathways Underlying Estrogenic Control of Proliferation and Cell Phenotype. *Endocrinology*, 144(10):4562– 4574.

Frasor J., Stossi F., Danes J.M., Komm B., Lyttle C.R. & Katzenellenbogen B.S. (2004) Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Research*, 64:1522–33.

Gebre-Medhin M., Kindblom L.G., Wennbo H., Törnell J., Meis-Kindblom J.M. (2001) Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer. *American Journal of Pathology*, 158(4):1217-22.

Geiger A.M., Yu O., Herrinton L.J., Barlow W.E., Harris E.L., Rolnick S., Barton M.B., Elmore J.G. & Fletcher S.W. (2005) A population-based study of bilateral prophylactic mastectomy efficacy in women at elevated risk for breast cancer in community practices. *Archives of internal medicine American Medical Association*, 165(5):516-20.

Gérard C., Blacher S., Communal L., Courtin A., Tskitishvili E., Mestdagt M., Munaut C., Noel A., Gompel A., Pe'queux C. & Foidart J. M. (2015 A). Estetrol is a weak estrogen antagonizing estradiol-dependent mammary gland proliferation. *Journal of Endocrinology*, 224, 85–95.

Gérard C., Mestdagt M., Tskitishvili E., Communal L., Gompel A., Silva E., Arnal J. F., Françoise Lenfant, Noel A., Foidart J. M. & Péqueux C. (2015 B) Combined estrogenic and anti-estrogenic properties of estetrol on breast cancer may provide a safe therapeutic window for the treatment of menopausal symptoms. *Oncotarget*, Vol. 6, No. 19.

Goetz M.P., Toi M., Campone M., Sohn J., Paluch-Shimon S., Huober J., Park I.H., Trédan O., Chen S.C., Manso L., Freedman O.C., Garnica Jaliffe G., Forrester T., Frenzel M., Barriga S., Smith I.C., Bourayou N. & Di Leo A. (2017) MONARCH 3: Abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35:3638–46.

Gorski J. (1987) The nature and development of steroid hormone receptors. In: Csaba G. (eds) Development of Hormone Receptors. EXS 53: Experientia Supplementum, vol 53. Birkhäuser Basel.

Goss P., Bondarenko I. N., Manikhas G. N., Pendergrass K. B., Miller Jr W.H., Langecker P. & Blanchett D. (2007) Phase III, Double-Blind, Controlled Trial of Atamestane Plus Toremifene Compared With Letrozole in Postmenopausal Women With Advanced Receptor-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25:4961-4966.

Gottlicher M., Heck S. & Herrlich P. (1998) Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *The Journal of Molecular Medicine*, 76:480–489.

Graham J.D., Clarke C.L. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 18(4):502-19.

Graham J.D., Yeates C., Balleine R.L., Harvey S.S., Milliken J.S., Bilous A.M. & Clarke C.L. (1995) Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Research*, 55(21):5063-8.

Guido C., Perrotta I., Panza S., Middea E., Avena P., Santoro M., Marsico S., Imbrogno P. Andò S. & Aquila S. (2011) Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *Journal of Cellular Physiology*, 226(12):3403-12.

Gumbiner B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3):345-57.

Hanukoglu I. (Dec 1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43 (8): 779–804.

Harada N. (1997) Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61(3–6):175–184.

Harper M. J. & Walpole A. L (1966). Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature*, 212, 87.

Harper, M. J. & Walpole, A. L. (1967) A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 13, 101–119.

Hartman J., Lam E.W., Gustafsson J.A. & Ström A. (2009) Hes-6, an inhibitor of Hes-1, is regulated by 17beta-estradiol and promotes breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Research*, 11(6): R79.

Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak & P. M. Williams (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.

Hein R., Flesch-Janys D., Dahmen N., Beckmann L., Lindström S., Schoof N., Czene K., Mittelstraß K., Illig T., Seibold P., Behrens S., Humphreys K., Li J., Liu J., Olson J.E., Wang X., Hankinson S.E., Truong T., Menegaux F., dos Santos Silva I. & Johnson N. (2013) A genome-wide association study to identify genetic susceptibility loci that modify ductal and lobular postmenopausal breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy use: a two-stage design with replication. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(2): 529–542.

Hickey T.E., Irvine C.M., Dvinge H., Tarulli G.A., Hanson A.R., Ryan N.K., Pickering M.A., Birrell S.N., Hu D.G., Mackenzie P.I., Russell R., Caldas C., Raj G.V., Dehm S.M., Plymate S.R., Bradley R.K., Tilley W.D. & Selth L.A. (2015) Expression of androgen receptor splice variants in clinical breast cancers. *Oncotarget*, 6(42):44728-44.

Hongisto V., Jernstrom S., Fey V., Mpindi J.P., Kleivi Sahlberg K., Kallioniemi O. & Perälä M. (2013) High-throughput 3D screening reveals differences in drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells. *PLoS One*, 8(10):e77232.

Howell A., Anderson A.S., Clarke R.B., Duffy S.W., Evans D.G., Garcia-Closas M., Gescher A.J., Key T.J., Saxton J.M. & Harvie M.N. (2014) Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 16: 446.

Huang B., Omoto Y., Iwase H., Yamashita H., Toyama T., Coombes R. C., Filipovic A., Warner M. & Gustafsson J.-Å. (2014) Differential expression of estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta 1$ , and  $\beta 2$  in lobular and ductal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 5. 1933–1938.

Härmä V., Schukov H.P., Happonen A., Ahonen I., Virtanen J., Siitari H., Åkerfelt M., Lötjönen J. & Nees M. (2014) Quantification of dynamic morphological drug responses in 3D organotypic cell cultures by automated image analysis. *PLoS One*. 2014, 9(5):e96426

Härmä V., Virtanen J., Mäkelä R., Happonen A., Mpindi J.P., Knuutila M., Kohonen P., Lötjönen J., Kallioniemi O. & Nees M. (2010) A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS One*, 5(5):e10431.

Inwald E. C., Klinkhammer-Schalke M., Hofstädter F., Zeman F., Koller M., Gerstenhauer M. & Ortmann O. (2013) Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(2): 539–552.

Isola J.J. (1993). Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *The Journal of Pathology*, 170, 31-35.

Janse van Rensburg H.J., Lai D., Azad T., Hao Y. & Yang X (2018) TAZ enhances mammary cell proliferation in 3D culture through transcriptional regulation of IRS1. *Cellular Signalling*, 52:12-22.

Jasienska G., Ziolkiewicz A., Thune I., Lipson S.F. & Ellison P.T. (2006) Habitual physical activity and estradiol levels in women of reproductive age. *European Journal of Cancer Prevention*, 15(5):439-45.

Jiangrui Z., Long L., Yang J. & Liu, Liyu L. (2015). Enhanced Invasion of Metastatic Cancer Cells via Extracellular Matrix Interface. *PloS one*, 10. e0118058. 10.1371/journal.pone.0118058.

Johansson C.M., Anderson T.J., Bergstrom R., Lindgren A. & Persson I.R. (1998) Epithelial proliferation in the normal human breast in relation to endogenous hormones and oral contraceptive use. *The Breast*, 7:162–167.

Johnson M.D., Westley B.R. & May F.E.B. (1989) Oestrogenic activity of tamoxifen and its metabolites on gene regulation and cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 59, 727-738.

Johnston S.R., Kilburn .L.S., Ellis P. Dodwell D., Cameron D., Hayward L., Im Y.H., Braybrooke J.P., Brunt A.M., Cheung K.L., Jyothirmayi R., Robinson A., Wardley A.M., Wheatley D., Howell A., Coombes G., Sergenson N., Sin H.J., Folkerd E., Dowsett M. & Bliss J.M. (2013) Fulvestrant plus anastrozole or placebo versus exemestane alone after progression on non-steroidal aromatase inhibitors in postmenopausal patients with hormone-receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer (SoFEA): a composite, multicentre, phase 3 randomised trial. *Lancet Oncology*, 2013; 14: 989–98.

Jordan V.C., Allen K.E. & Dix C.J. (1980) Pharmacology of tamoxifen in laboratory animals. *Cancer Treatment Reports*, 64, 745-759.

Joshi P.A., Jackson H.W., Beristain A.G., Di Grappa M.A., Mote P.A., Clarke C.L., Stingl J., Waterhouse P.D. & Khokha R. (2012) Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*, 465(7299):803-7.

Katzenellenbogen B.S., Miller M.A., Mullick A. & Sheen Y.Y. (1985) Antiestrogen action in breast cancer cells: modulation of proliferation and protein synthesis, and interaction with estrogen receptors and additional antiestrogen binding sites. *Breast Cancer Research and Treatment*, 5(3):231-43.

Kensler K.H., Beca F., Baker G.M., Heng Y.J., Beck A.H., Schnitt S.J., Hazra A., Rosner B.A., Eliassen A.H., Hankinson S.E., Brown M. & Tamimi R.M. (2018) Androgen receptor expression in normal breast tissue and subsequent breast cancer risk. *NPJ Breast Cancer*, 4:33.

Kirk J., Houlbrook S., Stuart N.S.A., Stratford I.J., Harris A.L. & Carmichael J. (1993) Differential modulation of doxorubicin toxicity to multidrug and intrinsically drug resistant cell lines by anti-oestrogens and their major metabolites. *British Journal of Cancer*, 67, 1189-1195.

Klingelutz A.J., Barber S.A., Smith P.P., Dyer K. & McDougall J.K. (1994) Restoration of telomeres in human papillomavirus immortalized human anogenital epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 961-9.

Kohler P.C., Hamm J.T., Wiebe V.J., Degregori M., Shemano I. & Tormey D.C. (1990) Phase I study of the tolerance and pharmacokinetics of toremifene in patients with cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 16, S19-S26.

Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 5925-5930.

Lai A.C., & Crews C.M. (2016) Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16: 101-114.

Laubli H. & Borsig L. (2010) Selectins promote tumor metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 20(3):169-77.

Lea O.A., Kvinnsland S. & Thorsen T. (1989) Improved measurement of androgen receptors in human breast cancer. *Cancer Research*, 49(24 Pt 1):7162-7.

Lerner L.J. & Jordan V.C. (1990) Development of antioestrogens and their use in breast cancer: Eighth Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, 50, 4177-4189.

Lewis-Wambi, J. S., & Jordan, V. C. (2009). Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast cancer research*: 11(3), 206.

- Leyland-Jones B., Gray K.P., Abramovitz M., Bouzyk M., Young B., Long B., Kammler R., Dell'Orto P., Biasi M.O., Thürlimann B., Lyng M.B., Ditzel H.J., Harvey V.J., Neven P., Treilleux I., Rasmussen B.B., Maibach R., Price K.N., Coates A.S., Goldhirsch A., Pagani O., Viale G., Rae J.M. & Regan M.M. (2015) CYP19A1 polymorphisms and clinical outcomes in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer in the BIG 1–98 trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, 151:373–84.
- Li C.I., Anderson B.O., Daling J.R. & Moe R.E. (2003) Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *Journal of the American Medical Association*, 289(11):1421-4.
- Li C.I., Malone K.E., Daling J.R., Potter J.D., Bernstein L., Marchbanks P.A., Strom B.L., Simon M.S., Press M.F., Ursin G., Burkman R.T., Folger S.G., Norman S., McDonald J.A. & Spirtas R. (2008) Timing of Menarche and First Full-Term Birth in Relation to Breast Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology*, 167(2): 230–239.
- Li J., Wen W.X., Eklund M., Kvist A., Eriksson M., Christensen H.N., Torstensson A., Bajalica-Lagercrantz S., Dunning A.M., Decker B., Allen J., Luccarini C., Pooley K., Simard J., Dorling L., Easton D.F., Teo S.H., Hall P., Borg Å., Grönberg H. & Czene K. (2018) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants in a large, unselected breast cancer cohort. *International Journal of Cancer*, Sep 2.
- Liotta L. A. (1984) Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. *The American Journal of Pathology*, 117(3): 339–348.
- Liedke P.E.R. & Goss P.E. (2012) Aromatase inhibitors and musculoskeletal adverse events. *Lancet Oncology*, 13:333–4.
- Liehr J.G. (1990) Genotoxic effects of estrogens. *Mutation Research*, 238(3):269-76.
- Longcope C. (1986) Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 15(2):213-28.
- Liu S., Ruan X., Schultz S., Neubauer H., Fehm T., Seeger H. & Mueck A.O. (2015) Oestrol stimulates proliferation and oestrogen receptor expression in breast cancer cell lines: Comparison of four oestrogens. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*, 20:1, 29-35.
- Lundberg A.S., Randell S.H., Stewart S.A., Elenbaas B., Hartwell K.A., Brooks M.W., Fleming M.D., Olsen J.C., Miller S.W., Weinberg R.A., & Hahn W.C. (2002) Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene*, 21: 4577–86.
- Luzzi K.J., MacDonald I.C., Schmidt EE, Kerkvliet N., Morris V.L., Chambers A.F. & Groom A.C. (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology*, 153: 865-873.

Lykkesfeldt A.E., Larsen J.K., Christensen I.J. & Briand P (1984) Effects of the antioestrogen tamoxifen on the cell cycle kinetics of the human breast cancer cell line, MCF-7. *British Journal of Cancer*, 49, 717-722.

Macias H. & Hinck L. (2012) Mammary Gland Development. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology*, 1(4): 533–557.

Maggiolini M., Vivacqua A., Fasanella G., Recchia A.G., Sisci D., Pezzi V., Montanaro D., Musti A.M., Picard D. & Andò S. (2004) The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279:27008–27016.

Malec C. (2014) A new paradigm for Mammary Glands. *Advances at Mass General Cancer Center*.

Mallepell S., Krust A., Chambon P. & Briskin C. (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:2196–2201.

Marshall L.M., Hunter D.J., Connolly J.L., Schnitt S.J., Byrne C., London S.J. & Colditz G.A. (1997) Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 6:297–301.

Martin M., Loibl S., von Minckwitz G. Morales S., Martinez N., Guerrero A., Anton A., Aktas B., Schoenegg W., Muñoz M., Garcia-Saenz J.Á., Gil M., Ramos M., Margeli M., Carrasco E., Liedtke C., Wachsmann G., Mehta K. & De la Haba-Rodriguez J.R. (2015) Phase III trial evaluating the addition of bevacizumab to endocrine therapy as first-line treatment for advanced breast cancer: the letrozole/fulvestrant and avastin (LEA) study. *Journal of Clinical Oncology*, 33: 1045–52.

Marttunen M.B., Hietanen P., Tiitinen A. & Ylikorkala O. (1998) Comparison of effects of tamoxifen and toremiphen on bone biochemistry and bone mineral density in postmenopausal breast cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(4): 1158–1162.

McGuire W.L. (1978) Hormone receptors: Their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy. *Seminars in Oncology*, 5:428-433.

Means G.D., Mahendroo M.S., Corbin C.J., Mathis J.M., Powell F.E., Mendelson C.R. & Simpson E.R. (1989) Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 19385–19391.

Migliaccio A., Piccolo D., Castoria G., Di Domenico M., Bilancio A., Lombardi M., Gong W., Beato M. & Auricchio F. (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *The EMBO Journal*, 17(7):2008-18.

Million Women Study Collaborators. (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 362: 419–27.

Minn A.J., Kang Y., Serganova I., Gupta G.P., Giri D.D. & Doubrovin M. (2005) Distinct organspecific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(1):44–55.

Morato T., Raab K., Brodie H. J, Hayano M., & Dorfman R. I. (1962) The Mechanism of Estrogen Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 84 (19), 3764-3766.

Mustacchi G., Ceccherini R., Milani S., Pluchinotta A., De Matteis A., Maiorino L., Farris A., Scanni A. & Sasso F. (2003) Tamoxifen alone versus adjuvant tamoxifen for operable breast cancer of the elderly: long-term results of the phase III randomized controlled multicenter GRETA trial. *Annals of Oncology*, 14: 414–420.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *The Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.

Moriah E.K., Placone A.L., Wong A.D., Xu Z.S. & Searson P.C. (2016) In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4:12.

Morton C.L. & Houghton P.J. (2007) Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature Protocols*, 2: 247–250.

Møller A.M., Villebro N., Pedersen T. & Tønnesen H. (2002) Effect of preoperative smoking intervention on postoperative complications: a randomised clinical trial. *Lancet*, 359(9301):114-7.

Nanda R., Schumm L.P., Cummings S., Fackenthal J.D., Sveen L., Ademuyiwa F., Cobleigh M., Esserman L., Lindor N.M., Neuhausen S.L. & Olopade O.I. (2005) Genetic testing in an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry. *Journal of the American Medical Association*, 294(15):1925-33.

Nelson L.R., & Bulun S.E. (2001) Estrogen production and action. *The American Academy of Dermatology*, 45(3 Suppl): S116-24.

Nelson A.W., Groen A.J., Miller J.L., Warren A.Y., Holmes K.A., Tarulli G.A., Tilley W.D., Katzenellenbogen B.S., Hawse J.R., Gnanapragasam V.J. & Carroll J.S. (2017) Comprehensive assessment of estrogen receptor beta antibodies in cancer cell line models and tissue reveals critical limitations in reagent specificity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 440:138e150.

Norman A.W., Mizwicki M.T. & Norman D.P. (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (1): 27–41.

Oftedal O.T. (2002) The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(3):225-52.

Oh H.M., Oh J.M., Choi S.C., Kim S.W., Han W.C., Kim T.H., Park D.S. & Jun C.D. (2003) An efficient method for the rapid establishment of Epstein–Barr virus immortalization of human B lymphocytes. *Cell Proliferation*, 36: 191–7.

Ohmori T., Yang J.L., Price J.O. & Arteaga C.L. (1998) Blockade of tumour cell transforming growth factor-betas enhances cell cycle progression and sensitizes human breast carcinoma cells to cytotoxic chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 245(2):350–9.

Olea N., Villalobos M., Ruiz de Almodóvar J. M. & Pedraza V. (1992) MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 beta-estradiol. *International Journal of Cancer*, 50(1): 112–117.

Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R. Valentine T. & Swarm R. (1997), A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *Journal of Experimental Medicine*, 145, 204–220.

O'Shaughnessy J., Campone M., Brain E., Neven P., Hayes D., Bondarenko I., Griffin T.W., Martin J., De Porre P., Kheoh T., Yu M.K., Peng W. & Johnston S. (2016) Abiraterone acetate, exemestane or the combination in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 27(1):106-13.

Paige L.A., Christensen D.J., Gron H., Norris J.D., Gottlin E.B., Padilla K.M., Chang C.-Y., Ballas L.M., Hamilton P.T., McDonnell D.P. & Fowlkes D.M. (1999) Estrogen receptor modulators each induce distinct conformational changes in ER  $\alpha$  and ER $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:3999–4004.

Palmer B.V., Walsh G.A., McKinna J.A. & Greening W.P. (1980) Adjuvant chemotherapy for breast cancer: side effects and quality of life. *British medical journal*, 281(6255).

Pampaloni F., Reynaud E.G. & Stelzer E.H. (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10):839–45.

Pappas T.C., Gametchu B., Yannariello-Brown J., Collins T.J. & Watson C.S. (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded ligand binding. *The FASEB Journal*, 9:404–410.

Payne J.B., Reinhardt R.A., Nummikoski P.V. & Patil K.D. (1999) Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporosis International*, 10:34–40.

PDQ Adult Treatment Editorial Board. Breast Cancer Treatment During Pregnancy (PDQ®): Health Professional Version. 2017 Dec 22. In: PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.

Pentikäinen V., Erkkilä K., Suomalainen L., Parvinen M. & Dunkel L. (2000) Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(5):2057-67.

Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O. & Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797):747-52.

Peterson E.A., Jenkins E. C., Lofgren K.A., Chandiramani N., Liu H., Aranda E., Barnett M., & Kenny P.A. (2015) Amphiregulin is a critical downstream effector of estrogen signaling in ER $\alpha$ -positive breast cancer. *Cancer Research*, 75(22): 4830–4838.

Pike M.C., Spicer D.V., Dahmouch L. & Press M.F. (1993) Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiologic reviews*, 15:17–35.

Pinkerton J.V. & Thomas S. (2014) Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 142:142-54.

Poulin R., Baker D. & Labrie F. (1988) Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Breast Cancer Research and Treatment*, 12(2):213-25.

Prest S.J., May F.E. & Westley B.R. (2002) The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *The FASEB journal*, 16(6):592-4.

Pyfer B., Chatterjee A., Chen L., Nigriny J., Czerniecki B., Tchou J. & Fisher C. (2016) Early Postoperative Outcomes in Breast Conservation Surgery Versus Simple Mastectomy with Implant Reconstruction: A NSQIP Analysis of 11,645 Patients. *Annals Of Surgical Oncology*, 23(1):92-8

Pyrhonen S., Valavaara R., Modig H., Pawlicki M., Pienkowski T., Gundersen S., Bauer J., Westman G., Lundgren S., Blanco G., Melia O., Nilsson I., Hietanen T., Hindy I., Vuorinen J. & Hajba A. (1997) Comparison of toremifene and tamoxifen in postmenopausal patients with advanced breast cancer: a randomized double-blind, the 'nordic' phase III study. *British Journal of Cancer*, 76(2), 270-277.

Qiu J., Bosch M. A., Tobias S.C., Krust A., Graham S.M., Murphy S.J., Korach K.S., Chambon P., Scanlan T.S., Rønnekleiv O.K. & Kelly M.J. (2006) A G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Is Involved in Hypothalamic Control of Energy Homeostasis. *Journal of Neuroscience*, 26 (21) 5649-5655.

Ravdin P.M., Green S., Dorr T.M., McGuire W.L., Fabian C., Pugh R.P., Carter R.D., Rivkin S.E., Borst J.R. & Belt R.J. (1992) Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: Results of a prospective Southwest Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 10:1284-1291.

Rees M. (1995) The age of menarche. *ORGYN*, (4):2-4.

Riedl A., Schleder M., Pudelko K., Stadler M., Walter S., Unterleuthner D., Unger C., Kramer N., Hengstschläger M., Kenner L., Pfeiffer D., Krupitza G. & Dolznig H. (2017) Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *Journal of Cell Science*, 1;130(1):203-218.

Robertson J. F. R., Llombart-Cussac A., Rolski J., Felt D., Dewar J., Macpherson E., Lindemann J. & Ellis M. J. (2009) Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: results from the FIRST study. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 4530–4535.

Robertson J.F., Willsher P.C., Winterbottom L., Blamey R.W. & Thorpe S. (1999) Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer. *European Journal of Cancer*, 35(2):214-8.

Russo J., Fernandez S.V., Russo P.A., Fernbaugh R., Sheriff F.S., Lareef H.M., Garber J. & Russo I.H. (2006) 17-Beta-estradiol induces transformation, tumorigenesis in human breast epithelial cells. *The FASEB Journal*, 20(10):1622–1634.

Sasson S. & Notides A.C. (1983) Estriol and estrone interaction with the estrogen receptor. II. Estriol and estrone-induced inhibition of the cooperative binding of [3H] estradiol to the estrogen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 258 (13): 8118–22.

Schubert E.L., Lee M.K., Mefford H.C., Argonza R.H., Morrow J.E., Hull J., Dann J.L. & King M.C. (1997) BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *The American Journal of Human Genetics*, 60, 1031–1040.

Schwarz W.C., Kruggel W.G. & Brodie H.J. (1973) Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta. *Endocrinology*, 92(3):866–880.

Schwers J., Eriksson G., Wiquist N. & Diczfalusy E. (1965) 15 $\alpha$ -Hydroxylation: a new pathway of estrogen metabolism in the human fetus and newborn. *Biochimica et Biophysica Acta*, 100 313–316.

Sebastian S. & Bulun S.E. (2001) A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10):4600–4602.

Shiau A.K., Barstad D., Loria P.M., Cheng L., Kushner P.J., Agard D.A. & Greene G.L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7):927-37.

Shughrue P.J., Lane M.V., Scrimo P.J. & Merchenthaler I. (1998) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids*, 63(10):498-504.

Siegel R. L., Miller K. D. & Jemal A. (2018) Cancer statistics. *A cancer journal for clinicians*, 68:7–30.

Singer C.F., Coelingh Bennink H.J.T., Natter C., Steurer S., Rudas M., Moinfar F., Appels N., Visser M. & Kubista E. (2014) Antiestrogenic effects of the fetal estrogen estetrol in women with estrogen-receptor positive early breast cancer. *Carcinogenesis*, vol.00 no.00 p.1 of 5.

Singhal H., Greene M.E., Zarnke A.L., Laine M., Al Abosy R., Chang Y.F., Dembo A.G., Schoenfelt K., Vadhi R., Qiu X., Rao P., Santhamma B., Nair H.B., Nickisch K.J., Long H.W., Becker L., Brown M. & Greene G.L. (2017) Progesterone receptor isoforms, agonists and antagonists differentially reprogram estrogen signaling. *Oncotarget*, 9(4):4282-4300.

Sleijfer S., Gratama J.W., Sieuwerts A.M., Kraan J., Martens J.W. & Foekens J.A. (2007) Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? *European Journal of Cancer*, 43: 2645- 2650.

Stanikova D., Luck T2, Bae Y.J., Thiery J., Ceglarek U., Engel C., Enzenbach C., Wirkner K., Stanik J., Kratzsch J. & Riedel-Heller S.G. (2018) Increased estrogen level can be associated with depression in males. *Psychoneuroendocrinology*, 87:196-203.

Tasdemir N., Bossart E. A., Li Z., ZhU L., Sikora M. J, Levine K. M., Jacobsen B.M., Tseng G.C., Davidson N. E. & Oesterreich S. (2018) Comprehensive phenotypic characterization of human invasive lobular carcinoma cell lines in 2D and 3D cultures. *Cancer Research*, September 18.

Thompson E.A. & Siiteri P.K. (1974) Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *Journal of Biological Chemistry*, 249(17):5364–5372.

- Tian, J. M., Ran, B., Zhang, C. L., Yan, D. M., & Li, X. H. (2018). Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Brazilian journal of medical and biological research*, 51(3), 1-7.
- Toikkanen S., Pylkänen L. & Joensuu H. (1997) Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. *British Journal of Cancer* ,76;1234–1240.
- Toran-Allerand C.D., Guan X., MacLusky N.J., Horvath T.L., Diano S., Singh M., Connolly E.S., Nethrapalli I.S. & Tinnikov A.A. (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *Journal of Neuroscience*, 22 (19): 8391–401.
- Trowell O. A. (1959) The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental Cell Research*, 16, 118-147.
- Tsai C.C., Chen C.L., Liu H.C., Lee Y.T., Wang H.W., Hou L.T. & Hung S.C. (2010) Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *Journal of Biomedical Science*, 17: 64.
- Tsai S.Y., Carlstedt-Duke J., Weigel N.L., Dahlman K., Gustafsson J.A., Tsai M.J. & O'Malley B.W. (1988) Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell*, 55(2):361-9.
- Tulchinsky D., Frigoletto F.D., Ryan K.J. & Fishman J. (1975) Plasma estretol as an index of fetal well-being. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 40 560–567.
- Turner-Ivey B., Smith E.L., Rutkovsky A.C., Spruill L.S., Mills J. N. & Ethier S.P. (2017) Development of mammary hyperplasia, dysplasia, and invasive ductal carcinoma in transgenic mice expressing the 8p11 amplicon oncogene NSD3. *Breast Cancer Research and Treatment*, 164(2): 349–358.
- Vantangoli, M. M., Madnick, S. J., Huse, S. M., Weston, P., & Boekelheide, K. (2015). MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. *PLoS one*, 10(8), e0135426.
- Veronese P., Hachul D.T., Scanavacca M.I., Hajjar L.A., Wu T.C., Sacilotto L., Veronese C. & Darrieux F.C.D.C. (2018) Effects of anthracycline, cyclophosphamide and taxane chemotherapy on QTc measurements in patients with breast cancer. *PLoS One*, 13(5): e0196763.
- Vos C.B., Cleton-Jansen A.M., Berx G., de Leeuw W.J., ter Haar N.T., van Roy F., Cornelisse C.J., Peterse J.L. & van de Vijver M.J. (1997) E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis. *British Journal of Cancer*, 76(9):1131-3.

- Walter P., Green S., Greene G., Krust A., Bornert J. M., Jeltsch J. M., Staub A., Jensen E., Scrace G. & M Waterfield. (1985) Cloning of the human estrogen receptor Cdna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82 (23) 7889-7893.
- Wang Z., Kyo S., Maida Y., Takakura M., Tanaka M., Yatabe N., Taro Kanaya<sup>1</sup>, Nakamura M., Koike K., Hisamoto K., Ohmichi M. & Inoue M. (2002) Tamoxifen regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression differently in breast and endometrial cancer cells. *Oncogene*, 21, 3517-3524.
- Vesper H.W., Botelho J.C., Vidal M.L., Rahmani Y., Thienpont L.M., & Caudill S.P. (2014) High variability in serum estradiol measurements in men and women. *Steroids*, 82: 7–13.
- Visser M., Foidart J.-M. & H. J. T. Coelingh Bennink (2008) In vitro effects of estetrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. *Climacteric*, 11:sup1, 64-68.
- Wong C.H., Siah K.W. & Andrew W. L.O. (2018) Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics*, 00, 00, pp. 1–14.
- Wu C.H., Motohashi T., Abdel-Rahman H.A., Flickinger G.L. & Mikhail G. (1976) Free and protein-bound plasma estradiol-17 beta during the menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 43 (2): 436–45.
- Yamamoto M., Hibi H., Katsuno S. & Miyake K. (1995) Serum estradiol levels in normal men and men with idiopathic infertility. *International Journal of Urology*, 2(1):44-6.
- Yue W., Berstein L.M., Wang J.P., Clark G.M., Hamilton C.J., Demers L.M. & Santen R. J. (2001) The potential role of estrogen in aromatase regulation in the breast. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 79: 157–164.
- Zaman M.H., Trapani L. M., Sieminski A. L., MacKellar D., Gong H., Kamm R.D., Alan Wells, Lauffenburger D. A. & Paul Matsudaira P. (2006) Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (29) 10889-10894.
- Zhu B.T., Han G.Z., Shim J.Y., Wen Y. & Jiang X.R. (2006) Quantitative structure-activity relationship of various endogenous estrogen metabolites for human estrogen receptor alpha and beta subtypes: Insights into the structural determinants favoring a differential subtype binding. *Endocrinology*, 147 (9): 4132–50.
- Zucconi G., Lisboa B.P., Simonitsch E., Roth L., Hagen A.A. & Diczfalusy E. (1967) Isolation of 15a hydroxyl-oestriol from pregnancy urine and from the urine of newborn infants. *Acta Endocrinologica*, 56 413–423.

## 7 Liitteet

*Liite 1 Potilaiden ikä ja rintakudoksen histologinen tyyppi sekä aste (N/A=ei sovellettavissa).*

Tunniste	Ikä	Histologinen tyyppi	Histologinen aste
E4-100	60	Duktaalinen	2
E4-200	67	Normaali	N/A
E4-300	62	Normaali	N/A
E4-400	69	Normaali	N/A
E4-500	53	Normaali	N/A
E4-600	61	Normaali	N/A
E4-700	47	Lobulaarinen	2
E4-800	47	Duktaalinen	2
E4-900	62	Lobulaarinen	2
E4-1000	90	Duktaalinen	2
E4-1100	61	Normaali	N/A
E4-1200	61	Duktaalinen	2
E4-1300	69	Lobulaarinen	2
E4-1400	52	Normaali	N/A
E4-1500	68	Duktaalinen	N/A
E4-1600	68	Lobulaarinen	2
E4-1700	56	Duktaalinen	3
E4-1800	70	Normaali	N/A
E4-1900	84	Duktaalinen	1
E4-2000	85	Duktaalinen	2
E4-2100	38	Duktaalinen	2
E4-2200	86	Duktaalinen	3
E4-2300	79	Duktaalinen	3
E4-2400	78	Duktaalinen	3
E4-2500	65	Duktaalinen	3
E4-2600	78	Duktaalinen	2
E4-2700	60	Lobulaarinen	2
E4-2800	53	Lobulaarinen	2
E4-2900	82	Duktaalinen	2
E4-3000	68	Lobulaarinen	2
E4-3100	67	Duktaalinen	3
E4-3200	90	Duktaalinen	2
E4-3300	76	Duktaalinen	2
E4-3400	77	Duktaalinen	2
E4-3500	42	Duktaalinen	3
E4-3600	90	Duktaalinen	2

***Lüite 2. Potilaiden estrogeenireseptori alfan, progesteronireseptorin ja KI67-reseptorin ilmentyminen rintakudoksessa (N/A=ei sovellettavissa).***

Tunniste	ER $\alpha$	PR	KI67
E4-100	99	98	24
E4-200	N/A	N/A	N/A
E4-300	N/A	N/A	N/A
E4-400	N/A	N/A	N/A
E4-500	N/A	N/A	N/A
E4-600	N/A	N/A	N/A
E4-700	95	95	30
E4-800	98	95	30
E4-900	95	15	7
E4-1000	98	98	20
E4-1100	N/A	N/A	N/A
E4-1200	95	85	6
E4-1300	99	99	5
E4-1400	N/A	N/A	N/A
E4-1500	95	95	15
E4-1600	0	80	20
E4-1700	98	90	25
E4-1800	N/A	N/A	N/A
E4-1900	99	99	11
E4-2000	99	85	6
E4-2100	98	99	20
E4-2200	99	92	40
E4-2300	99	99	15
E4-2400	95	50	20
E4-2500	1	2	50
E4-2600	99	95	50
E4-2700	95	95	10
E4-2800	95	98	5
E4-2900	0	0	18
E4-3000	99	99	5
E4-3100	0	0	80
E4-3200	95	95	8
E4-3300	99	95	14
E4-3400	99	00	6
E4-3500	0	9	80
E4-3600	98	95	22