

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytikkokoulutus  
NBIOAK13  
2016

Anu Wiklund

# MYELOIDIEN SOLUJEN TULEHDUSVASTEEN ESTROGEENIRESEPTORI- VÄLITTEISEN SÄÄTELYN TUTKIMINEN

**TURKU AMK**   
TURKU UNIVERSITY OF  
APPLIED SCIENCES

Anu Wiklund

# MYELOIDIEN SOLUJEN TULEHDUSVASTEEN ESTROGEENIRESEPTORIVÄLITTEISEN SÄÄTELYN TUTKIMINEN

Tulehdus on immuunijärjestelmän aikaansaama reaktio, jonka avulla elimistö pyrkii vastaamaan infekioon tai kudოსvaurioon ja korjaamaan sen. Matala-asteinen krooninen tulehdus on häiriötila, joka voi ylläpitää tulehdusvasteita kudoksissa aineenvaihdunnan muutosten kautta ja johtaa edelleen kudოსvaurioihin sekä altistaa monille sairauksille, kuten astmalle, Alzheimerin taudille, sydän- ja verisuonitaudeille ja erilaisille syöville. Tulehdukselliset sairaudet ovat yleisiä länsimaissa, minkä vuoksi on tärkeää pyrkiä kehittämään niille uusia ja entistä tehokkaampia hoitomuotoja.

Estrogeeneillä ja niiden reseptoreilla on todettu olevan tärkeä merkitys kroonisten tulehduksellisten sairauksien kehittymisessä, sillä ne säätelevät osaltaan immuunijärjestelmän solujen toimintaa ja niillä tiedetään myös olevan anti-inflammatorisia vaikutuksia. Selektiiviset estrogeenireseptorimodulaattorit (SERM) ovat ryhmä yhdisteitä, jotka sitoutuvat valikoivasti estrogeenireseptoreihin. SERM-yhdisteet ovat kiinnostava vaihtoehto erilaisille estrogeenikorvaushoidoille, sillä SERM:ien avulla voidaan pyrkiä kohdistamaan estrogeenien hyödyt tiettyihin kudoksiin, minimoiden estrogeenien mahdolliset haittavaikutukset.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tarkastella erilaisten SERM-yhdisteiden soveltuvuutta makrofaagisolujen tulehdusvasteen säätelyyn. Opinnäytetyö suoritettiin osana laajempaa Turun yliopistolla tehtävää tutkimushanketta SERM:ien vaikutuksesta immuunijärjestelmän toimintaan. Tutkimuksessa havaittiin, että estrogeenien ja SERM-yhdisteiden avulla voidaan vaikuttaa makrofaagien reportterigeenien tulehdusvasteisiin eli IFR- ja NF-κB-aktiivisuuteen. Fysiologiset 0,01–10 nM estradiolipitoisuudet toimivat niin sanottuna ylläpitoaktivaattorina normaaleissa soluissa, eivätkä suuremmat pitoisuudet vaikuttaneet merkittävästi reportterigeenien toimintaan. Tulosten mukaan estradiolin läsnäolo muutti tiettyjen SERM-yhdisteiden vaikutuksia.

## ASIASANAT:

Tulehdus, monosyytti-makrofaagijärjestelmä, estradioli, estrogeenireseptorit, selektiiviset estrogeenireseptorimodulaattorit (SERM), IRF, NF-κB

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Science

2016 | 44 + 7

Anu Wiklund

# ANALYZING THE ESTROGEN RECEPTOR MEDIATED REGULATION OF MYELOID CELL INFLAMMATORY RESPONSE

Inflammation is an immune system reaction, which is used to counter infection or tissue damage and to repair it. Low-grade chronic inflammation is a state where the natural balance of the immune system is disrupted. It can maintain inflammatory responses via changes in the metabolism and lead to tissue damage and increase vulnerability to many diseases, for example asthma, Alzheimer's disease, cardiovascular disease and various cancers. Inflammatory disorders are common in developed countries, and it is important to pursue new and more effective treatments for these diseases.

Estrogen and estrogen receptors have an important role in the development of inflammatory diseases, because they have a regulatory effect on the cells of the immune system and are thought to have anti-inflammatory roles as well. Selective estrogen receptor modulators (SERM) are a group of compounds that selectively bind on estrogen receptors. SERMs are an interesting alternative for different estrogen replacement treatments, because SERMs could be used for targeting estrogen's benefits to certain tissues, while minimizing possible disadvantages.

The purpose of this thesis was to study the suitability of various SERMs on macrophage inflammatory response regulation. The thesis was conducted as a part of a wider research project studying the effects of SERMs on the functions of the immune system. The results showed that estrogens and SERM-compounds can be used to regulate macrophage inflammatory responses via IRF- and NF- $\kappa$ B-reporter gene activities. Physiological 0,01–10 nM estradiol levels maintained low levels of reporter gene activity and increasing the amounts of estradiol did not have notable effects on reporter gene activity. Estradiol seemed to alter the functions of some specific SERM-compounds and their effects on IRF- and NF- $\kappa$ B-reporter activity.

## KEYWORDS:

Inflammation, monocyte-macrophage system, estradiol, estrogen receptors, selective estrogen receptor modulators (SERM), IRF, NF- $\kappa$ B

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA</b>	<b>3</b>
2.1 Tutkimuksen keskeiset käsitteet	3
2.1.1 Myeloidit solut, immuunipuolustus ja tulehdusvaste	3
2.1.2 Sytokiinit ja kemokiinit	5
2.1.3 Monosyytti-makrofaagijärjestelmä	6
2.1.4 Tulehdusta säätelevät transkriptiotekijät IRF ja NF-κB	8
2.1.5 Estrogeenit ja estrogeenireseptorit immuunijärjestelmässä	9
2.1.6 Selektiiviset estrogeenireseptorimodulaattorit, SERM:t	12
2.2 Menetelmäteoria	13
2.2.1 Soluviljely	13
2.2.2 Reportterigeenien aktiivisuuden mittaaminen	15
2.2.3 Proteiinimääritys	16
2.2.4 Nitriittipitoisuuden mittaaminen	16
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT</b>	<b>18</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>19</b>
4.1 Tutkimuksen suoritus	19
4.1.1 Soluviljely	19
4.1.2 Solujen käsittelyt	21
4.1.3 Tulehdusvasteiden määritykset	22
4.2 Metodologiset lähtökohdat	23
4.3 Eettiset näkökulmat	24
<b>5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>25</b>
5.1 Estradiolin vaikutus tulehdusvasteeseen	25
5.2 SERM-yhdisteiden vaikutus IRF-aktiivisuuteen	28
5.3 SERM-yhdisteiden vaikutus NF-κB-aktiivisuuteen	32
5.4 SERM-yhdisteiden vaikutus typpioksidipitoisuuteen	35
<b>6 POHDINTA</b>	<b>38</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Toimeksiantosopimus
- Liite 2. Solujen kasvatusliuokset (mediumit)
- Liite 3. Solulaskut
- Liite 4. Työohje lusiferaasi- ja SEAP-mittaukset
- Liite 5. Työohje NO<sub>2</sub>-määritys
- Liite 6. Työohje proteiinimääritys
- Liite 7. ALP-lyysispuskuri

## KUVAT

- Kuva 1. Kroonisen tulehduksen mahdolliset vaikutusreitit mutaatioiden ja sairauksien syntyyn (Muokattu: Ferguson 2010). 9

## KUVIOT

- Kuvio 1. Eri E2-pitoisuuksien vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa, vehikkeliin verrattuna 26
- Kuvio 2. Eri E2-pitoisuuksien vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-aktiivisuuteen SEAP-mittauksessa, vehikkeliin verrattuna 27
- Kuvio 3. Eri E2-pitoisuuksien vaikutus J774-Dual-solujen erittämän nitriitin määrään verrattuna vehikkeliin 28
- Kuvio 4. Lääkeaineiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa 29
- Kuvio 5a. 0,3 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa 30
- Kuvio 5b. 1 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa 30
- Kuvio 6. 1 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa, ilman E2:ta 31
- Kuvio 7. Lääkeaineiden vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa 32
- Kuvio 8a. 0,3 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa 33
- Kuvio 8b. 1 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa 34
- Kuvio 9. 1 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa, ilman E2:ta 35
- Kuvio 10a. 0,3 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen erittämän nitriitin määrään 36

Kuvio 10b. 1  $\mu$ M SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen erittämän nitriitin määrään

36

## TAULUKOT

Taulukko 1. Esimerkki tyypillisestä pipetointikartasta.

22

## KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

Agonistinen yhdiste	Reseptorinaktivoija
Antagonistinen yhdiste	Reseptorinsalpaaja
ALP	Alkalinen fosfataasi -lyysispuskuriliuos
Anti-inflammatorinen	Tulehdusta lievittävä
BCA	Bisinkoniinihappo (engl. bichoninic acid)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium -ravintoliuos
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
E2	Estradioli
ER	Estrogeenireseptori
Fagosytoosi	Solusyönti, partikkeleiden otto solun sisään
GPÉR	G-proteiiniin kytketty estrogeenireseptori
iFBS	Inaktivoitu naudan sikiön seerumi (engl. fetal bovine serum)
IFN	Interferoni
In vitro	Koe, joka suoritetaan elävän organismin ulkopuolella
In vivo	Elävässä organismissa tehty tutkimus
IRF	Interferonin säätelytekijä (engl. interferon regulatory factor)
J774-Dual	Hiiren makrofaagisolusta J774.1 johdettu solulinja
LPS	Lipopolysakkaridi, gram-negatiivisten bakteerien soluseinämän rakenneosaa
NED	N-(1-naftyyli)-etyleenidiamiinidihydrokloridiliuos
NF-κB	Tumatekijä-κB-transkriptiofaktori (engl. nuclear factor κB)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. phosphate-buffered saline)

Proinflammatorinen	Tulehdusta edistävä
SEAP	Eritetty istukan alkalinen fosfataasi (engl. secreted embryonic alkaline phosphatase)
SERM	Selektiivinen estrogeenireseptorimodulaattori (engl. selective estrogen receptor modulator)



# 1 JOHDANTO

Tulehdus on immuunijärjestelmän aikaansaama reaktio, jonka tarkoituksena on suojella elimistöä infektioilta ja vaurioilta (Kidd & Dudley 2016). Akuutti tulehdus aiheuttaa terveissä kudoksissa muutoksia, kuten punoitusta, kuumotusta, turvotusta ja kipua, jotka johtuvat tulehduspaikalle saapuvista tulehdussoluista sekä alueella tapahtuvista verisuonimuutoksista ja kudosten kertymisestä. Mikäli akuutti tulehdusreaktio ei pysty poistamaan tulehduksen aiheuttajaa tai tulehduksen paraneminen on häiriytynyt, voi syntyä pitkittynyt eli krooninen tulehdus. (Gilroy & De Maeyer 2015, Headland & Norling 2015.) Kroonisia matala-asteisia tulehduksia esiintyy paljon länsimaissa ja niillä voi olla merkittävä rooli erilaisten sairauksien, kuten monien syöpien, sepelvaltimotaudin ja Alzheimerin taudin kehittämisessä (Ferguson 2010, Egger 2012).

Myeloidisista kantasoluista peräisin olevien monosyyttien saapuminen tulehduspaikalle ja niiden erilaistuminen makrofaageiksi on yksi tärkeimmistä tulehdusvasteen tapahtumista. Makrofaagien toiminta ja niiden erittämät välittäjäaineet käynnistävät tulehduksen paranemisreaktiot, jotka pyrkivät palauttamaan kudoksiin tasapainotilan. (Headland & Norling 2015.) Näiden mekanismien ymmärtäminen ja niiden toimintaan vaikuttaminen ovat erittäin merkittäviä tulehduksellisten sairauksien hoidon ja uusien lääkkeiden kehityksen kannalta (Gilroy & De Maeyer 2015, Villa ym. 2015).

Solujen toimintaan ja geenien ilmentymiseen voidaan vaikuttaa reseptoreiden kautta. Fysiologisesti tärkeällä estrogeenilla, estradiolilla, ja estrogeenireseptoreilla on tärkeä merkitys tulehduksellisten kroonisten sairauksien kehittämisessä, sillä ne säätelevät osaltaan immuunijärjestelmän solujen muodostumista ja toimintaa (Härkönen & Väänänen 2006, Kovats 2015, Villa ym. 2015). Estrogeenien vaikutukset elimistössä ovat hyvin moninaisia, mutta niillä on todettu olevan tulehdusta lievittäviä eli anti-inflammatorisia vaikutuksia (Villa ym. 2015). Naisilla iän myötä tapahtuva estrogeenituotannon hiipuminen voikin edesauttaa monien rappeumasairauksien, kuten osteoporoosin, hermoston tulehdustilojen ja sydän- ja verisuonitautien kehittymistä (Härkönen & Väänänen 2006).

Estrogeenilääkitystä tai hormonikorvaushoitoja käytetään tällä hetkellä pääasiassa vaihdevuosisoireiden lievittämiseen sekä postmenopausaalisen osteoporoosin ehkäisyyn (Bakour & Williamson 2015, Umland ym. 2016). Anti-inflammatoristen

ominaisuuksiensa vuoksi estradioli ja estrogeenireseptorit ovat kuitenkin kiinnostavia uusia tutkimuskohteita myös laaja-alaisten kroonisten tulehdustilojen hoidon kannalta (Villa ym. 2015). Selektiiviset estrogeenireseptorimodulaattorit (SERM) ovat ryhmä yhdisteitä, jotka sitoutuvat estrogeenireseptoreihin estrogeenien sijaan ja aktivoivat tai estävät reseptorien toimintaa kudostyypistä riippuen. Tällöin estrogeenireseptorien aktivoitumista voidaan pyrkiä kohdistamaan tiettyihin kudoksiin ja estämään niiden toimintaa esimerkiksi rintakudoksessa ja kohdussa. Tällä hetkellä SERM-yhdisteitä käytetäänkin pääasiassa rintasyövän ja osteoporoosin hoidossa. (Umland ym. 2016, Xu ym. 2016.)

Tämä opinnäytetyö suoritettiin osana Turun yliopistolla tehtävää laajempaa tutkimushanketta estrogeenireseptorien ja erilaisten SERM-yhdisteiden vaikutuksesta makrofaagisolujen tulehdusvasteen säätelyyn. Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia erilaisten kaupallisten ja vielä ainoastaan tutkimuskäytössä olevien SERM-yhdisteiden vaikutusta makrofaagisolujen tulehdusvasteisiin *in vitro* -malleissa. Opinnäytetyön tavoitteena oli tarkastella tutkittavien SERM-yhdisteiden sopivuutta tulehdusvasteiden säätelijöiksi.

## 2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 Tutkimuksen keskeiset käsitteet

#### 2.1.1 Myeloidit solut, immuunipuolustus ja tulehdusvaste

Elimistön immuunipuolustusreaktiot voidaan jakaa luontaiseen immunitettiin ja hankittuun eli adaptiiviseen immunitettiin (Male ym. 2006). Suurin osa patogeeneista tuhoutuu luontaisen immuunijärjestelmän mekanismein, joihin lukeutuvat fysikaaliset esteet kuten iho ja limakalvot, epäspesifit eli tiettyyn taudinaiheuttajaan erikoistumattomat verisolut kuten makrofaagit ja granulosyytit, fagosytoosi eli solusyönti sekä tulehdusreaktiot (Moticka 2016). Mikäli luontainen immuunijärjestelmä ei pysty käsittelemään tulehduksen aiheuttajaa, käynnistyy adaptiivinen immuunijärjestelmä, joka perustuu lymfosyyttien toimintaan ja spesifisiin puolustusmekanismeihin. Sekä luontaisen että adaptiivisen immuunijärjestelmän puolustusreaktiot liittyvät läheisesti toisiinsa ja ne toimivatkin usein yhdessä. (Male ym. 2006).

Elimistön sisäisestä immuunijärjestelmästä huolehtivat verisolut kehittyvät luuytimen yhteisistä multipotenteista kantasoluista, joista erilaistuu joko lymfaattisia tai myeloidisia kantasoluja. Lymfaattisen linjan kantasoluista muodostuvat T- ja B-lymfosyytit ja myeloidisen linjan kantasoluista taas punasolut, verihiutaleet, granulosyytit (neutrofiilit, basofiilit ja eosinofiilit) ja monosyytit. (Heino & Vuento 2010.) Luontaisen immuunijärjestelmän solutason toiminta perustuu granulosyyttien, fagosytoivien solujen (monosyytit, makrofaagit ja dendriittisolut) sekä sytotoksisten lymfosyyttien toimintaan (Moticka 2016).

Tulehdus on immuunijärjestelmän puolustusreaktio, jonka avulla elimistö pyrkii vastaamaan infektiin tai kudolvaurioon ja korjaamaan sen. Tulehdusreaktio on monimutkainen ja tarkoin säädely prosessi, joka käynnistää useita solun sisäisiä viestiketjuja sekä edistää solujen ja kudosten välistä kommunikaatiota, mutta voi samalla vaurioittaa normaaleja terveitä soluja ja kudoksia. (Gilroy & De Maeyer 2015, Kidd & Dudley 2016.) Tulehdusreaktio alkaa liukoisten välittäjäaineiden, kuten sytokiinien, kemokiinien ja paikallishormonien tuotannolla infektoituneen/vaurioituneen kudoksen soluissa, esimerkiksi makrofaageissa, dendriittisoluissa, lymfosyyteissä,

endoteelisoluissa ja fibroblasteissa. Tulehdusta edistävät eli proinflammatoriset välittäjäaineet saavat kudoksessa aikaan tulehdusreaktion: verisuonet laajenevat paikallisesti ja niiden pinta muuttuu läpäisevämmäksi, verenkierto lisääntyy, kudokset turpoaa ja siinä syntyy lämpöä. Lisäksi fagosytoivia eli partikkeleita sisään ottavia leukosyyttejä, kuten neutrofiilejä ja monosyyttejä, saapuu veren mukana tulehduspaikalle. (Male ym. 2006, Gilroy & De Maeyer 2015.)

Tulehdusreaktio ja fagosytoosi ovatkin tärkeimmät mekanismit, joilla luontainen immuunijärjestelmä pyrkii eliminoimaan patogeenejä (Moticka 2016). Infektion/vaurion aiheuttajan onnistunut poisto käynnistää signaaliketjun, jossa proinflammatoristen välittäjäaineiden synteesi loppuu ja niiden määrät laskevat normaalitasolle. Tämä pysäyttää uusien leukosyyttien saapumisen tulehduspaikalle ja laskee tulehdusalueen turvotusta. Kun inflammatorisia leukosyyttejä ei enää tarvita parantuneessa kudoksessa, ne siirtyvät takaisin verenkiertoon ja imunesteeseen tai niissä käynnistyy ohjattu solukuolema (apoptoosi). (Gilroy & De Maeyer 2015, Headland & Norling 2015.)

Kun tulehdusreaktio johtaa patogeenin poistoon ja vaurion korjautumiseen sekä kudoksen normaalin toiminnan palautumiseen, on kyseessä akuutti tulehdus (Male ym. 2006). Mikäli akuutti tulehdusreaktio ei pysty poistamaan tulehduksen aiheuttajaa tai jos tulehdusreaktion päättämismekanismien toiminta häiriytyy, voi syntyä krooninen eli pitkittynyt tulehdus (Gilroy & De Maeyer 2015, Headland & Norling 2015). Systeeminen krooninen tulehdus on usein matala-asteinen tulehdustila, jossa kudoksiin kertyy suuria määriä inflammatorisia välittäjäaineita ja immuunijärjestelmän soluja, kuten makrofaageja, kudoksen jatkaessa näennäisesti normaalia toimintaansa (León-Pedroza ym. 2015). Pitkäkestoinen kemikaalialtistus, pysyvät vieraspartikkelit tai tietyt patogeenit, uusiutuvat akuutit tulehdukset sekä geneettiset tekijät voivat altistaa kroonisille tulehduksille (Ferguson 2010).

Matala-asteinen krooninen tulehdus voi edistää ja ylläpitää tulehdusvasteita kudoksissa aineenvaihdunnan muutosten kautta (León-Pedroza ym. 2015). Tämä saattaa johtaa patologisiin kudovaurioihin ja siten osaltaan altistaa yksilöä erilaisille sairauksille, kuten astmalle, Alzheimerin taudille, sydän- ja verisuonitauksille, syöville, osteoporoosille ja tyypin 2 diabetekselle (Ferguson 2010, León-Pedroza ym. 2015). Krooniseen tulehdukseen liittyvät DNA- ja kudovauriot johtuvat todennäköisesti pääasiassa tulehdusreaktiossa leukosyyttien vapauttamien reaktiivisten happi- ja typpiradikaalien kertymisestä kudoksiin (oksidatiivinen stressi). Reaktiiviset radikaalit ovat tärkeitä monissa fysiologissa prosesseissa ja solut pystyvät normaalisti

säätlemään niiden määriä. Mikäli radikaalien tuotto ylittää solun kyvyt sietää ja käsitellä oksidatiivista stressiä, radikaalit voivat kertyä soluihin ja aiheuttaa vaurioita kaikkiin solun rakenteisiin, myös nukleiinihappoihin, mikä voi edelleen johtaa mutaatioiden ja sairauksien kehittymiseen. (Ferguson 2010.)

### 2.1.2 Sytokiinit ja kemokiinit

Sytokiinit ovat proteiineja, jotka toimivat elimistössä solujen toimintoja ohjaavan säätelyjärjestelmän viestinkuljettajina ja sen kautta myös keskeisinä puolustusreaktioiden säätelijöinä (Silvennoinen & Hurme 2003). Sytokiinit ohjaavat muun muassa kaikkien immuunijärjestelmän solujen erilaistumista, kasvua ja toimintaa (Silvennoinen & Hurme 2003) sekä elimistön immuunivasteen syntymistä (Male ym 2006). Sytokiinit voidaan jakaa useaan eri alaryhmään, joista merkittävimpiä ovat interferonit, interleukiinit sekä kolonioita stimuloivat tekijät (engl. colony stimulating factors) (Silvennoinen & Hurme 2003, Male ym. 2006).

Monet eri solut voivat erittää sytokiineja, mutta niiden tärkeimpiä tuottajia ovat makrofaagit ja T-lymfosyytit (Zhang & An 2007). Immuunivasteen aikana ja infektioiden sytokiinituotanto lisääntyy, mikä johtaa edelleen elimistön puolustusreaktion voimistumiseen. Tällaisissa toiminnoissa vaikuttavat sytokiinit ovat pääasiassa proinflammatorisia sytokiineja, jotka systeemisellä tasolla aiheuttavat muun muassa kuumetta. (Silvennoinen & Hurme 2003.) Bakteerien rakenneosat, kuten lipopolysakkaridit (LPS), toimivat voimakkaina proinflammatoristen sytokiinien tuoton aktivoijina. Proinflammatoristen sytokiinien vastetta seuraa tulehdusta vähentävien eli anti-inflammatoristen sytokiinien tuotto. Anti-inflammatoriset sytokiinit tasapainottavat tulehdusvastetta ja estävät proinflammatoristen sytokiinien toimintaa. (Järveläinen & Miettinen 2001.)

Kemokiinit ovat sytokiiniperheeseen kuuluvia proteiineja, joiden tärkein tehtävä on säädellä solujen liikkumista verenkierrosta kudoksiin suurempaa kemokiinipitoisuutta kohti tai siitä poispäin (kemotaksia) (Zhang & An 2007). Kemokiinisäädely leukosyyttien ja muiden tulehdussolujen siirtyminen infektiokohtaan vaikuttaa myös inflammatoristen sytokiinien paikalliseen ilmentymiseen ja siten edelleen taudin kulkuun ja kroonisuusasteeseen. Esimerkiksi monissa kroonisissa tulehduksellisissa sairauksissa ja autoimmuunisairauksissa on havaittu sytokiinien ja kemokiinien normaalia suurempia määriä ja aktiivisuutta. (Turner ym. 2014.)

### 2.1.3 Monosyytti-makrofaagijärjestelmä

Monosyytti-makrofaagijärjestelmä koostuu monista erilaisista solutyypeistä, joihin lukeutuvat verenkierron mukana kiertävät monosyytit, niiden esiasteet luuytimessä sekä erilaiset kudostymakrofaagit, jotka ovat joko vapaana kiertäviä tai kudossidonnaisia. Solujen lopullinen ilmiasu riippuu kohdekudoksesta, vaikka erilaisilla makrofaageilla on useita samankaltaisia toiminnallisia piirteitä. (Härkönen & Väänänen 2006.)

Immuunijärjestelmän vartijasoluina makrofaagit pystyvät reagoimaan infektoiviin mikro-organismeihin ja kudostyvaurioihin sekä ylläpitämään kudosten tasapainotilaa muun muassa tuhoamalla tarpeettomia molekyylejä ja kuolleita soluja fagosytoosin avulla (Lavin ym. 2015). Tällöin fagosytoivassa solussa käynnistyy tulehdusvasteita välittävien molekyyliden, kuten sytokiinien ja kemokiinien synteesi ja erityisesti. Tulehdusreaktio houkuttelee tulehduspaikalle muita soluja, jotka auttavat patogeenin tai vaurion eliminoinnissa. (Moticka 2016.)

Monosyytit ovat makrofaagien esiasteita ja ne erilaistuvat myeloidisista kantasoluista lymfaattisissa elimissä, sekä alkionkehityksen aikana että aikuisen verisolujen muodostuksessa eli hematopoiesisissa. Ihmisellä monosyyttejä on noin 10 % kaikista tumallisista verisoluista ja lisäksi niitä on erityisesti pernassa ja keuhkoissa, joista ne voidaan tarpeen vaatiessa ottaa käyttöön. (Ginhoux & Jung 2014.) Monosyytit voidaan jakaa kolmeen alatyyppiin niiden pintareseptorien ja toiminnan perusteella. Niin kutsutut klassisesti aktivoituvat monosyytit muodostavat terveillä henkilöillä valtaosan kiertävistä monosyyteistä ja tuottavat eniten sytokiinia, joka edesauttaa kudosten korjaantumista. Vaihtoehtoisesti aktivoituvilla monosyyteillä on tärkeä merkitys verisuonen sisäpinnan epiteelin eli endoteelin tarkkailussa ja ne tuottavat eniten inflammatorisia sytokiineja. Välimuotoisesti aktivoituvat monosyytit taas tuottavat vähiten sytokiineja ja kemokiineja. (Ravi ym. 2014.)

Monosyytit kiertävät veressä ja endoteelissä tulehduksia etsien noin 20 tuntia ja päätyvät sen jälkeen kudoksiin tai kuolevat ohjatusti (Heino & Vuento 2010, Ravi ym. 2014). Kudoksiin ohjautuminen tapahtuu vasteena tulehdusreaktion tai kudostyvaurioon ja sen seurauksena monosyyteistä kehittyvät kudoksessa kasvutekijöiden vaikutuksen myötä makrofaageja tai muita toiminnallisesti erilaisia soluja, kuten dendriittisoluja ja osteoklasteja (Zhang ym. 2015). Viime aikoihin asti on van Furthin (1968) dogman mukaan uskottu, että kaikkien kudosten makrofaagit ovat loppuun asti erilaistuneita

soluja, joiden määrät riippuvat verenkierron mukana kudoksiin kulkeutuvista monosyyteistä. Tutkimuksessaan van Furth ja Cohn (1986) vertailivat hiirten vatsaontelon, veren ja luuytimen leimattuja mononukleaarisia fagosyyttejä ja päättelivät, että tutkittujen solujen elinkaari on seuraava: promonosyyttivaihe luuytimessä, monosyyttivaihe verenkierrossa ja makrofaagivaihe kudoksissa.

Uusien tutkimusten mukaan monosyytti-makrofaagijärjestelmää ei kuitenkaan voida yleistää van Furthin dogman mukaisesti, vaan on havaittu, että elimistön tasapainotilassa: 1) monosyytit eivät vaikuta useimpien kudosten makrofaagien määriin; 2) aikuisten kudosten makrofaagit ovat erilaistuneet alkionkehityksen aikana ja kulkeutuneet kudoksiin ennen syntymää; ja 3) kudosten makrofaagit pystyvät ylläpitämään populaatioitaan itsenäisesti uusiutumalla. Tiettyjen kudosten makrofaagipopulaatiot kuitenkin ovat riippuvaisia monosyyteistä. Tällaisia ovat muun muassa suolisto, iho ja pernan marginaalivyöhyke, jotka altistuvat usein vaihteleville määrille mikro-organismeja ja niiden tuottamia yhdisteitä. Lisäksi tulehdusreaktioiden ja syövän yhteydessä sekä kudosten kasvun ja kehityksen aikana kudoksissa on paljon monosyyteistä erilaistuneita makrofaageja. (Ginhoux & Jung 2014, Lavin ym. 2015.)

Kun monosyytti kehittyy makrofaagiksi, useat sen ominaisuudet muuttuvat; solun koko kasvaa ja sen kyky liikkua, korjata kudonvaurioita sekä tuhota tulehduksen aiheuttajia paranee (Heino & Vuento 2010). Syntyneet makrofaagit voidaan luokitella karkeasti kahteen erilaiseen ryhmään, riippuen niiden altistuksesta vallitsevaan tulehdukselliseen mikroympäristöön. Sytokiinit, kudoksen aineenvaihduntatuotteet ja patogeenit säätelevät makrofaagien muuntumista M1- tai M2-fenotyyppisiin. (Ravi ym. 2014.) M1-makrofaagit ovat klassisesti aktivoituvia ja proinflammatorisia eli niillä on immuunivastetta stimuloivia ja sytotoksisia ominaisuuksia (Zhang ym. 2015), kun taas vaihtoehtoisesti aktivoituvat M2-makrofaagit ovat luonteeltaan anti-inflammatorisia ja erittävät sytokiineja, jotka avustavat kudonvaurioiden korjaamisessa (Ravi ym. 2014). Makrofaagit ovat dynaamisia ja voivat muuttua eri tyypiksi sekä muuntaa aineenvaihduntaansa tulehdusreaktion vaiheesta riippuen (Ravi ym. 2014, Lavin ym. 2015).

Monosyytti-makrofaagijärjestelmällä on tärkeä rooli luontaisten immuunivasteiden säätelyssä akuuteissa ja kroonisissa tulehdistiloissa (Zhang ym. 2015) sekä tulehdistilojen paranemisessa (Headland & Norling 2015). Kudosten makrofaagit voivat aktivoitua monin eri tavoin ja erittää vastaavasti lukuisia erilaisia tulehdusvälittäjäaineita, jotka voivat olla pro- tai anti-inflammatorisia (Headland &

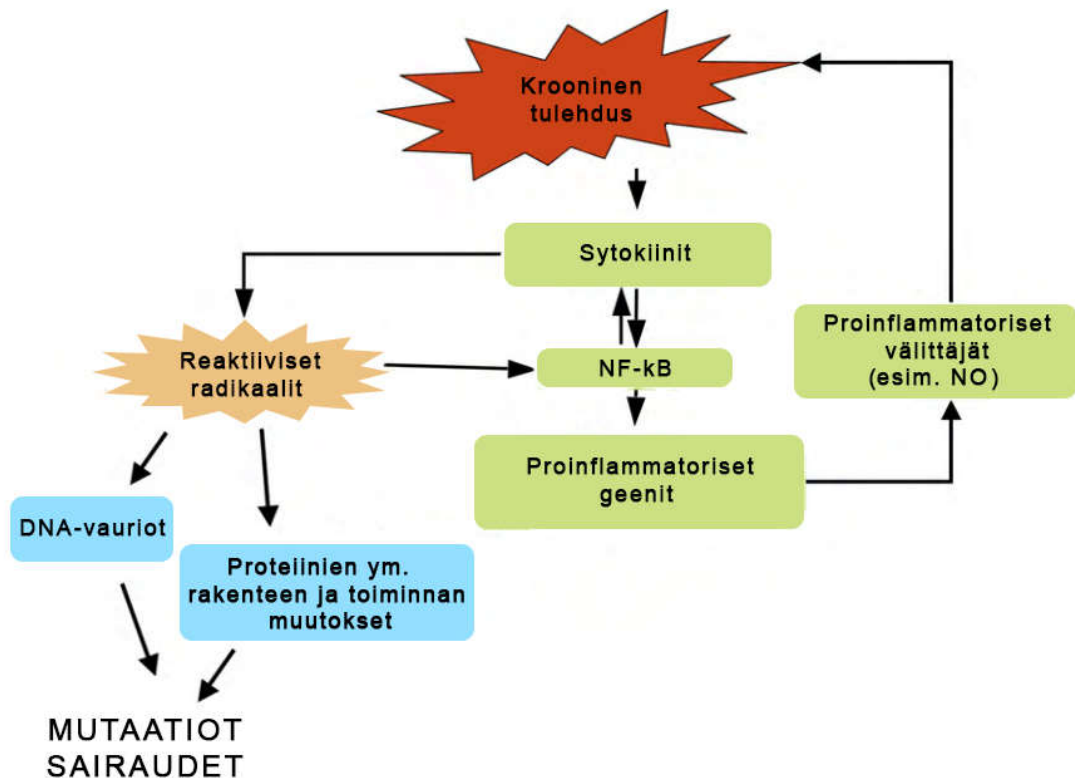
Norling 2015). Monosyytti-makrofaagijärjestelmän tulehdusvasteet ovat monimutkainen kokonaisuus, jonka häiriötilat voivat johtaa kroonistuneeseen tulehdukseen (Ravi ym. 2014).

#### 2.1.4 Tulehdusta säätelevät transkriptiotekijät IRF ja NF- $\kappa$ B

Interferonin säätelytekijät (engl. interferon regulating factor, IRF) ovat transkriptiotekijöitä, jotka ovat merkittävässä asemassa elimistön erilaisten immuunivasteiden säätelyssä. IRF:ien tärkein tehtävä on säädellä tyypin I interferonin (engl. type I IFN) geenejä joko itsenäisesti tai yhdessä muiden transkriptiotekijöiden kanssa. (Günthner & Anders 2013.) Geenien tuottamat interferonit ovat suuri ryhmä sytokiineja, jotka tunnetaan erityisesti niiden kyvystä aktivoida solutason puolustus viruspatogeeneja vastaan. IFN-systeemi on tärkeässä asemassa myös muissa mikrobi-infektioissa, koska interferonit säätelevät osaltaan luontaisen ja adaptiivisen immuunijärjestelmän toimintaa proinflammatorisin tai anti-inflammatorisin vaikutuksin. (Schultz ym. 2004.) Interferonin tuoton lisäksi IRF:t säätelevät osaltaan muun muassa immuunijärjestelmän solujen erilaistumista ja aktivaatiota sekä apoptoosia. IRF:t ovat myös tärkeässä asemassa makrofaagien muuntumisessa eri fenotyypeiksi. (Günthner & Anders 2013.)

Tumatekijä- $\kappa$ B (engl. nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) on proteiinikompleksi, joka kontrolloi geenien transkriptiota, sytokiinituottoa ja solujen selviytymistä (Oeckinghaus & Ghosh 2009). NF- $\kappa$ B:llä on tärkeä rooli immuunijärjestelmän toiminnassa, mutta se vaikuttaa myös luuston, ihon, rintarauhasen ja keskushermoston kehitykseen ja fysiologiaan (Quaedackers ym. 2007). Solun sytoplasmassa NF- $\kappa$ B on inaktiivisessa muodossa ja siihen on kiinnittynyt inhibiittoriproteiini, jonka erilaiset tiedonsiirtoproteiinit hajottavat esimerkiksi infektiosta aiheutuksesta (Oeckinghaus & Ghosh 2009, Heino & Vuento 2010). Aktivoituessaan NF- $\kappa$ B siirtyy tumaan ja sitoutuu määrättyihin kohtiin kohdegeenejään. Häiriöt NF- $\kappa$ B:n aktiivisuuden säätelyssä voivat olla yhteydessä moniin sairauksiin, etenkin tulehdus- ja autoimmunisairauksiin sekä syöpään (Kuva 1). (Quaedackers ym. 2007.)





Kuva 2. Kroonisen tulehduksen mahdolliset vaikutusreitit mutaatioiden ja sairauksien syntyyn (Muokattu: Ferguson 2010)

### 2.1.5 Estrogeenit ja estrogeenireseptorit immuunijärjestelmässä

Estrogeenit ovat naisen sukupuoliominaisuuksia ylläpitäviä ja sääteleviä steroidihormoneja, jotka ovat myös tärkeitä normaalin fysiologisen kehityksen säätelijöitä ja vaikuttavat suotuisasti muun muassa luuston, sydän- ja verenkiertoelimistön, keskushermoston sekä virtsa- ja sukupuolitehyyden kehitykseen ja toimintaan sekä naisilla että miehillä (Martín-Millán & Castañeda 2013). Luonnollisia estrogeeneja, estradiolia, estronia ja estriolia, muodostuu pääasiassa munarakkuloissa ja istukassa sekä pieniä määriä kiveksissä, lisämunuaiskuoressa ja rasvakudoksessa. Estradioli (17 $\beta$ -estradioli, E2) on hedelmällisessä iässä olevan naisen tärkein estrogeeni. Vaihdevuosien jälkeen E2:n pitoisuus pienenee ja estronin merkitys kasvaa. Raskausaikana istukka tuottaa estriolia. (Watson ym. 2008.)

Vaikka estrogeenit ovat merkittäviä normaalin fysiologisen kehityksen kannalta, on estrogeenialtistus myös liitetty menopausaalisen rintasyövän ja erilaisten kohtuvaurioiden, kuten kasvainten, esiintyvyyteen (Dutertre & Smith 2000, Nilsson &

Gustafsson 2011). Miehillä estrogeenipitoisuudet ovat naisiin verrattuna yleensä huomattavasti pienempiä ja tasaisempia, mutta poikkeavat estrogeenimäärät voivat lisätä esimerkiksi osteoporoosin, sydän- ja verisuonitautien sekä hermostosairauksien ja erilaisten kasvainten riskiä myös miehillä (Nilsson & Gustafsson 2011). Lisäksi estrogeenit vaikuttavat molempien sukupuolten immuunivasteisiin, joiden välillä on havaittu huomattaviakin eroja infektoihin liittyvissä immuunipuolustusreaktioissa ja autoimmunitetissa (Kovats 2015).

Estrogeenien fysiologiset vaikutukset välittyvät kolmen eri estrogeenireseptorityypin, ER $\alpha$ :n, ER $\beta$ :n, ja G-proteiinikytkentäisen reseptorin (engl. G protein-coupled estrogen receptor, GPER) kautta (Vrtačnik ym. 2014). Estrogeenireseptoreja on lähes kaikissa solutyypeissä, etenkin estrogeenille herkissä kudoksissa kuten kohdussa ja maitorauhasessa (Terveyskirjasto 2016b). Estrogeenireseptorit ER $\alpha$  ja ER $\beta$  ovat tumareseptoreita eli transkriptiotekijöitä, jotka muodostavat komplekseja tiettyihin kohtiin DNA:ta yhdessä muiden transkriptiotekijöiden kanssa ja vaikuttavat siten geenin ilmentymiseen ja transkription aloitukseen. ER-signaali voi olla transkriptiota edistävää (aktivaatio) tai estävää (inhibitio). (Kovats 2015.) GPER taas on solukalvolla sijaitseva estrogeenireseptorityyppi, joka eroaa merkittävästi tumareseptoreista; estrogeenien GPER-välitteiset vasteet aktivoivat nopeita solunsisäisiä viestintäreittejä, eivätkä suoraan vaikuta transkriptioon (Vrtačnik ym. 2014).

Estrogeenien ja niiden reseptorien kaikkia vaikutuksia immuunijärjestelmään ei tunneta vielä tarkasti ja monet immuunisoluihin kohdistuvat molekyyllitason säätelymekanismit ovat selvittämättä. Tiedetään kuitenkin, että monosyytti-makrofaagijärjestelmän soluissa on estrogeenireseptoreita, jotka säätelevät solujen kehitystä ja toimintaa sekä viestinvälitysketjuja estrogeenisten yhdisteiden sitoutuessa niihin. ER-signaali voi myös edistää tai vähentää immuunijärjestelmän solujen syntymistä hematopoieettisista kantasoluista. Lisäksi estrogeenireseptorien säätelyvaikutukset proinflammatoristen sytokiinien tuottoon voivat olla sekä lisääviä että vähentäviä, riippuen solutyyppistä ja estrogeenipitoisuudesta. (Härkönen & Väänänen 2006, Kovats 2015.)

Estrogeenien ja estrogeenireseptorien suorilla ja välillisillä vaikutuksilla immuunijärjestelmän toimintaan on tärkeä rooli kroonisten tulehdustautien ja rappeumasairauksien, kuten nivelrikon, osteoporoosin, sepelvaltimotaudin ja Alzheimerin taudin kehittymisessä (Martín-Millán & Castañeda 2013, Shivers ym. 2015). Estrogeenien uskotaan osaltaan suojaavan tällaisia sairauksia vastaan, sillä tutkimusten mukaan: 1) kuukautiskierron vaiheen mukaan vaihtelevat

estrogeenipitoisuudet ja esimerkiksi raskaus voivat vaikuttaa tulehduksellisten sairauksien syntyyn ja kulkuun; 2) tulehdukselliset sairaudet yleistyvät huomattavasti munasarjojen toiminnan vähenemisen ja/tai loppumisen yhteydessä; ja 3) hedelmällisessä iässä olevilla naisilla on kyseisiä sairauksia yleensä vähemmän kuin miehillä (Villa ym. 2015, Umland ym. 2016). Estrogeenien katsotaankin edistävän solujen jakautumista ja immuunivasteita (Martín-Millán & Castañeda 2013).

Shiversin ym. (2015) hypoteesin mukaan ulkopuolinen estrogeenilisä vähentää proinflammatoristen sytokiinien määriä ja lisää anti-inflammatoristen sytokiinien määriä, mikä edelleen vaimentaa tulehdukseen liittyviä vasteita. Tutkimuksessa tulehdusta hillitsevien sytokiinien määrät nousivat verrokkiin verrattuna huomattavasti ja hermostossa estrogeeni säätelee sytokiinituotannon perustasoa sekä sytokiinituotantoa tulehdustilassa (Shivers ym. 2015). Tulokset tukevat muita tutkimuksia, joiden mukaan matalat fysiologisen estradiolin pitoisuudet edistävät tyypin I interferonin ja proinflammatoristen sytokiinien tuottoa, kun taas korkeat estrogeenipitoisuudet lisäävät anti-inflammatorisia vasteita ja vähentävät tulehdusta (Kovats 2015).

ER-toiminta voi vaimentaa luontaisen immuunijärjestelmän vasteita dendriittisoluiissa ja makrofaageissa myös NF- $\kappa$ B:n transkriptiosäätelyyn vaikuttavien mekanismien kautta, joko suoraan tai välillisesti (Härkönen & Väänänen 2006, Kovats 2015). NF- $\kappa$ B:n immuunijärjestelmään ja tulehdusvasteisiin vaikuttavat toimintahäiriöt voivat toimia osatekijänä useissa sairauksissa, kuten diabeteksessä, sepelvaltimotaudissa, Alzheimerin taudissa ja useissa eri syöpätyypeissä. Estrogeenireseptorien on todettu estävän NF- $\kappa$ B-aktiivisuutta useilla eri mekanismeilla, jotka saattavat riippua spesifisistä ärsykkeistä tai solutyypistä. Mekanismit voidaan jakaa karkeasti sytoplasmassa (NF- $\kappa$ B-signaaliketjut) sekä tumassa (DNA:han sitoutuminen tai transkriptio) toimiviin mekanismeihin. (Kalaitzidis & Gilmore 2005). Tulehduksellisia sairauksia tutkittaessa NF- $\kappa$ B:n säätelyreitien inhibointi on todettu tehokkaaksi tulehduksen vähentäjäksi (Quaedackers ym. 2007).

Anti-inflammatoristen ominaisuuksiensa vuoksi E2 ja estrogeenireseptorit ovat kiinnostavia uusia tutkimuskohteita laaja-alaisten kroonisten tulehdustilojen kannalta (Villa ym. 2015). Pitkäaikaisessa käytössä hormonikorvaushoidoilla voi kuitenkin olla haittavaikutuksia, kuten suurentunut rintasyöpä- ja veritulppariski, minkä vuoksi myös hormonittomien hoitomuotojen tutkiminen on aiheellista (Umland ym. 2016, Xu ym. 2016).

### 2.1.6 Selektiiviset estrogeenireseptorimodulaattorit, SERM:t

Selektiiviset estrogeenireseptorimodulaattorit (engl. selective estrogen receptor modulator, SERM) eli SERM-yhdisteet ovat synteettisiä estrogeenireseptoreihin sitoutuvia yhdisteitä eli ligandeja, joilta puuttuu estrogeenien steroidirakenne (Dutertre & Smith 2000). Toisin kuin esimerkiksi estradioli, joka toimii reseptoriin situoutuessaan vain agonistina eli reseptorinaktivoijana ja antiestrogeenit, jotka ovat antagonisteja eli reseptorinsalpaajia, SERM-yhdisteillä voi olla sekä agonistisia että antagonistisia vaikutuksia (Dutertre & Smith 2000, Riggs & Hartmann 2003). Kudostyypistä riippuen SERM-yhdisteet voivat aktivoida tai inhiboida tiettyjen estrogeenireseptorien toimintaa tai estää luonnollisten ligandien toiminnan, vaikuttamatta muihin estrogeenireseptoreja sisältäviin kudoksiin (Dutertre & Smith 2000).

SERM-yhdisteet ovat kemiallisesti hyvin monimuotoinen joukko yhdisteitä (Riggs & Hartmann 2003), joiden ominaisuudet riippuvat yhdisteen rakenteesta, kohdereseptorista ja muista ER-SERM-kompleksin yhteydessä olevista molekyyleistä, solutyypistä sekä kohdegeenin promoottorista. Lisäksi SERM:t voivat vaikuttaa kohdereseptorin muotoon ja sen vuorovaikutuskykyyn muiden molekyylien kanssa. (Dutertre & Smith 2000.)

SERM-yhdisteitä sekä niiden toimintaa on tutkittu paljon ja niiden avulla voidaankin todennäköisesti tulevaisuudessa hoitaa tai jopa estää erilaisia ikään ja/tai sukupuoleen kytköksissä olevia sairauksia yhä enemmän (Nilsson & Gustafsson 2011). Koska SERM-yhdisteillä on kyky toimia valikoivina estrogeeni-agonisteina, niiden avulla voidaan hoitaa estrogeenin puutteesta johtuvia sairauksia, kuten osteoporoosia, ilman monia estrogeenin epätoivottuja vaikutuksia. Lisäksi SERM:ien estrogeeni-antagonististen ominaisuuksien ansiosta niitä voidaan hyödyntää hoidettaessa sellaisia rintasyöpiä, joissa estrogeeni-agonistinen vaikutus olisi haitallinen. (Riggs & Hartmann 2003.) Nykyisten SERM-valmisteiden käyttöön liittyy kuitenkin pitkäaikaiskäytössä myös riskejä, kuten kohdun limakalvon liikakasvua ja veritulppariskin suurenemista. Lisäksi SERM-yhdisteet saattavat lisätä vaihdevuosiin liittyviä oireita, kuten hikoilua ja kuumia aaltoja. (Inki 2015.)

Tamoksifeeni on yksi ensimmäisistä ja yhä käytössä olevista SERM-yhdisteistä. Tamoksifeeniä käytetään erityisesti ER $\alpha$ -positiivisen rintasyövän hoidossa, mutta sen on myös havaittu vaikuttavan suotuisasti luukudokseen menopaussin jälkeen, nostaen

muun muassa luun mineraalitiheyttä ja vähentäen luun hajoamista. (Michael ym. 2007.) Pieninä määrinä tamoksifeeniä voidaan käyttää lisäksi lapsettomuuden hoitoon, mutta pitkäaikainen käyttö kuitenkin nostaa kohtusyövän riskiä. Tamoksifeeni toimii siis ER $\alpha$ -antagonistina rintakudoksessa ja agonistina kohdussa sekä luukudoksessa. ER $\beta$ -reseptoriin sitoutuessaan tamoksifeeni toimii aina antagonistina. (Dutertre & Smith 2000, Xu ym. 2015.)

Raloksifeeni on SERM-yhdiste, joka sitoutuu selektiivisesti ER $\alpha$ -reseptoreihin ja toimii luukudoksessa biologisena aktivaattorina eli agonistina. Rintakudoksessa raloksifeenin vaikutus on antagonistinen ja se saattaa vähentää invasiivisen rintasyövän riskiä menopaussin jälkeen. Kohdun limakalvoihin raloksifeenillä ei juurikaan ole vaikutusta. Tutkimuksissa raloksifeenin on havaittu estävän luun hajoamista ja vähentävän luunmurtumien riskiä, joten sitä käytetään erityisesti postmenopausaalisten naisten osteoporoosin ehkäisyyn. (Michael ym. 2007.)

Ospemifeeni on tamoksifeeniä ja raloksifeeniä uudempi SERM-yhdiste, jolla on tutkimusten mukaan samankaltainen luukatoa ehkäisevä vaikutus postmenopausaalisilla naisilla kuin raloksifeenilläkin (Michael ym. 2007). Rintakudoksessa ospemifeenilla on antagonistinen vaikutus, kohdussa vähäiset osittaiset agonistiset/antagonistiset vaikutukset. Ospemifeeniä käytetään pääasiassa emättimen limakalvo-oireiden hoitoon, sillä ospemifeeni vaikuttaa emättimessä estrogeenin tavoin, lisäten epiteelin kypsymistä ja kohdunkaulan epiteelisolujen muuttumista limaa erittäviksi soluiksi. (Inki 2015.)

Fulvestrantti on antiestrogeeni eli estrogeenin vaikutusta estävä tai vähentävä yhdiste, ER-antagonisti, joka muun muassa Michaelin (2007) tutkimusryhmän tuloksissa kumosi täysin tamoksifeenin, raloksifeenin ja ospemifeenin vaikutukset luusoluviljelmissä. Fulvestranttia voidaankin käyttää esimerkiksi etäispesäkkeisen rintasyövän hoidossa (Lääkeinfo.fi 2015).

## 2.2 Menetelmäteoria

### 2.2.1 Soluviljely

Soluviljelyssä eläin- tai kasvisoluja kasvatetaan *in vitro*, eli elävän eliön ulkopuolella suotuisissa olosuhteissa. Soluviljelyn avulla voidaan yksinkertaistaa solu ympäristö,

mikä mahdollistaa kontrolloidummat kokeelliset testaukset ja vähentää muiden biologisten järjestelmien vuorovaikutusten aiheuttamia mahdollisia vääristymiä tuloksissa. Tästä johtuen soluviljelyn avulla mahdollistuvatkin monet sellaiset tutkimukset, jotka olisivat muutoin vaikeita tai mahdottomia toteuttaa ja tulkita korkeammissa organismeissa. Lisäksi soluviljely on usein nopeampaa, halvempaa ja vähentää koe-eläinten tarvetta *in vivo* -tutkimuksiin verrattuna. (Carter & Shieh 2015.)

Kasvaakseen solut vaativat määrätyn ja tarkoin säädellyn ympäristön sekä mahdollisesti alustan, jolle kiinnittyä. Soluviljelyn kannalta tärkein yksittäinen tekijä on solujen kasvatusliuos, jonka koostumus ja sen muutokset vaikuttavat merkittävästi solujen kasvuun ja selviytymiseen. Kasvatusliuokset tehdään solujen tarpeen mukaan ja niissä voi olla eroja esimerkiksi pH:n, ravintoaineiden, kasvutekijöiden sekä muiden biologisesti oleellisten yhdisteiden määrien suhteen. Kasvatusliuoksesta solut saavat ravintoaineita (aminohappoja ja vitamiineja) sekä energiaa (glukoosi) ja yleensä siihen lisätään myös seerumia, joka sisältää kasvutekijöitä ja edistää solujen selviytymistä. (Verma 2014, Carter & Shieh 2015.)

Soluviljelmien solut ovat herkkiä ja alttiita kontaminaatiolle ilman elimistön puolustusmekanismeja. Tämän vuoksi kasvatusliuoksiin voidaan lisätä esimerkiksi antibiootteja bakteerien, sienien ja muiden mikro-organismien aiheuttaman kontaminaation estämiseksi. Soluja viljeltäessä tulee myös aina noudattaa aseptisia työskentelymenetelmiä. Soluviljely tehdäänkin sille varatuissa tiloissa laminaarikaapissa, joka puhdistetaan ennen ja jälkeen käytön 70 % etanolilla. Lisäksi soluviljelmät ja reagenssit tulee aina suojata ja säilytettävä asianmukaisesti. Soluviljelmiä pidetään yleensä lämpökaapeissa, joiden lämpötila, kosteus ja kaasukoostumus ovat solujen kannalta otolliset. Soluviljelmien olosuhteita ylläpidetään vaihtamalla kasvatusliuokset tarpeen mukaan ja jakamalla solut uusille kasvatusalustoille, mikäli niiden solutiheys kasvaa liian suureksi. (Carter & Shieh 2015.)

Viljeltävät solut voidaan jakaa karkeasti kahteen ryhmään: primäärisolut ja immortalisoidut solut. Primäärisolut ovat suoraan peräisin eliön kudoksista ja niiden avulla voidaan tutkia esimerkiksi villityyppisten ja geneettisesti muunnettujen eläinten eroavaisuuksia. Primäärisoluilla on kuitenkin immortalisoituihin soluihin verrattuna huomattavasti lyhyempi elinikä. Immortalisoidut solulinjat ovat yleensä peräisin syöpäsoluista tai keinotekoisesti muunnetuista soluista, jotka voivat jakautua loppumattomasti. Tällaisia solulinjoja on paljon rutiinikäytössä laboratorioissa, koska ne

ovat ainakin teoriassa tasalaatuisia ja geneettisesti identtisiä populaatioita, jotka kasvavat helposti ja nopeasti sekä tuottavat toistettavia tuloksia. Immortalisoitujen solulinjojen ongelmana on se, etteivät ne välttämättä kuvasta täysin normaalien solujen ominaisuuksia ja toimintoja. (Carter & Shieh 2015.)

### 2.2.2 Reportterigeenien aktiivisuuden mittaaminen

Reportterigeenit ovat geenejä, jotka tuottavat jotakin solusta helposti mitattavaa signaalia. Reportterigeenimittausta käytetään laajalti uusien lääkeaineiden kehitystyössä ja testauksessa sekä muussa biolääketieteellisessä, molekyylibiologisessa ja biokemiallisessa tutkimustyössä (Allard & Kopish 2008). Reportterisolujen avulla voidaan tutkia esimerkiksi solujen sisäistä viestintää, solujen erilaistumista, promoottorien rakennetta ja reseptorien ligandien toimintaa. Reportterigeenimittaukset soveltuvat erityisen hyvin tumareseptorien toiminnan tutkimiseen, sillä geenin aktivoituminen on suora seuraus tumareseptorin toiminnasta. (Pakanen 2014.) Reportterisoluna voidaan käyttää esimerkiksi kaupallisia solulinjoja, joiden signaalireittien toimivuus on yleensä testattu ja solujen taataan kestävän viljelyä oikeissa olosuhteissa määrätyn ajan (InvivoGen 2016b).

Lusiferaasimittaukset ja eritettynä istukan alkaliseen fosfataasiin (engl. secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP) perustuvat mittausmenetelmät ovat yleisiä reportterigeenien aktiivisuuden määrittämismenetelmiä. Lusiferaasimenetelmä perustuu bioluminesenssin mittaamiseen. Bioluminesenssi syntyy kemiallisessa reaktiossa, jossa luminoiva eli valoa tuottava lusiferiini-proteiini hapettuu lusiferaasi-entsyymin katalysoimassa reaktiossa. Bioluminesenssiä esiintyy luonnossa esimerkiksi hyönteisissä ja sienissä. Reportteriteknologiana bioluminesenssia hyödynnetään paljon, sillä se on menetelmänä erittäin herkkä, nopea ja helposti mitattavissa. Lisäksi reportterigeeni ei häiritse isäntäsolun toimintoja. (Allard & Kopish 2008.)

SEAP:iin perustuvassa mittausmenetelmässä fosfataasin aktiivisuutta voidaan käyttää esimerkiksi geenin ilmentymisen analyyseissä, promoottoritutkimuksissa, virusten toiminnan tutkimisessa sekä *in vivo*-reportterigeenimäärityksissä. SEAP-reportterigeeni on muunnettu muoto ihmisen istukan alkalista fosfataasia koodavasta geenistä. Proteiinilta puuttuu kyky sitoutua kalvorakenteisiin, joten se erittyy helposti ulos solusta eikä solujen rakenteita tarvitse rikkoa määrittäjänsä varten. (Mitchell 2016.) Fosfataasimittaus on kolorimetrinen eli värin muutokseen perustuva menetelmä, jonka

avulla biologisen näytteen alkalisen fosfataasin aktiivisuutta voidaan mitata. Alkalisen fosfataasin läsnäollessa menetelmässä käytetty reagenssi muuttuu pinkistä siniseksi/violetiksi. Määritysmenetelmä on erittäin herkkä ja värireaktion voimakkuus korreloi alkalisen fosfataasin aktiivisuuden kanssa. (InvivoGen 2016a).

### 2.2.3 Proteiinimääritys

Thermo Scientificin Pierce BCA -proteiinimääritysmenetelmä perustuu bisinkoniinihappoon (engl. bicinchoninic acid, BCA) ja kokonaisproteiinimäärän kolorimetriseen havainnointiin ja määrittämiseen. Menetelmässä yhdistyy kupari-ioni  $\text{Cu}^{+2}$ :n pelkistyminen  $\text{Cu}^{+}$ :ksi proteiinin läsnäollessa (Biuret-reaktio) ja kupari-ionin kolorimetrinen tunnistus BCA:n avulla. Värireaktio syntyy, kun kaksi BCA-molekyyliä sitoutuu yhden kupari-ionin kanssa. Menetelmä on erittäin herkkä ja toimii 20-2000  $\mu\text{g/ml}$  proteiinipitoisuusvälillä. Standardina menetelmässä voidaan käyttää yleistä proteiinia, kuten BSA (engl. bovine serum albumin). Standardit laimennetaan tunnettujen pitoisuuksien sarjaksi ja tästä sarjasta saatuja tuloksia käytetään määrittämisen standardisuorana. (ThermoFisher Scientific 2015a.)

### 2.2.4 Nitriittipitoisuuden mittaaminen

Typpimonoksidi (NO) on tärkeä fysiologinen viestimolekyyli monissa biologisissa systeemeissä, kuten immunologisissa kudoksissa sekä hermostossa ja sydän- ja verisuoniston kudoksissa (Promega 2009). Jotkin immuunijärjestelmän solut, kuten makrofaagit tuottavat typpimonoksidia, joka mahdollistaa niiden sytotoksisen toiminnan erilaisia mikro-organismeja ja syöpäsoluja vastaan. Esimerkiksi bakteerien lipopolysakkaridit stimuloivat makrofaagien typpioksidituotantoa. (MacMicking ym. 1997.)

Yksi keino mitata solujen tuottaman typpimonoksidin määriä on nitriitin ( $\text{NO}_2^-$ ) pitoisuuksien määrittäminen. Nitriitti on toinen typpimonoksidin pysyvistä päähajoamistuotteista nitraatin lisäksi. (Promega 2009.) Nitriittipitoisuuden määrittäminen perustuu Griessin reaktioon, jossa nitriitti muodostaa diatsoyhdisteen happaman sulfaniilamidiliuoksen lisäyksessä. Tämän jälkeen lisätään N-(1-naftyyli)-etyleenidiamiinidihydrokloridiliuos (NED), jonka kanssa diatsoyhdiste reagoi. Lopputuloksena muodostuu purppuranvärinen atsoyhdiste, jossa värin



intensiteetti on suoraan verrannollinen nitriittikonsentraatioon. (Salminoja 2013.) Menetelmän avulla voidaan määrittää nitriittipitoisuus esimerkiksi plasmasta, seerumista, virtsasta ja solu- tai kudosisviljelmän mediumista (Promega 2009).

### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämä opinnäytetyö suoritettiin osana Turun yliopistolla tehtävää laajempaa tutkimushanketta, jonka tarkoituksena on tutkia estrogeenireseptorien ja erilaisten SERM-yhdisteiden vaikutuksia makrofaagisolujen tulehdusvasteen säätelyyn *in vitro* -malleissa. Opinnäytetyön tavoitteena oli tarkastella miten tutkittavia SERM-yhdisteitä voidaan hyödyntää tulehdusvasteiden säätelijöinä ja sopivatko tutkimuksessa käytetyt reportterisolut SERM-yhdisteiden vaikutusten tutkimiseen.

Tulehdusvasteita tutkittiin mittaamalla reportterisolujen NF- $\kappa$ B- ja IRF-aktiivisuudet sekä eritettyjen typpioksidien määrät SERM-, estradioli- ja/tai LPS-käsittelyiden jälkeen. Tutkimuksen SERM-yhdisteistä osaa käytetään tällä hetkellä lääkeaineina muun muassa rintasyövän ja osteoporoosin hoidossa, mutta yhdisteiden tarkkoja vaikutuksia tulehdusvasteisiin ei vielä tunneta. Lisäksi tutkimuksessa tarkasteltiin useiden vielä vain tutkimuskäytössä olevien SERM-yhdisteiden vaikutuksia makrofaagien tulehdusvasteisiin. Tuloksia verrattiin lääkeaineiden aiheuttamiin muutoksiin reportterisolujen toiminnassa.

Opinnäytetyön tutkimustehtäviä olivat:

1. Voidaanko SERM-yhdisteiden vaikutuksia tutkia reportterisolumalleilla?
2. Miten SERM-yhdisteet vaikuttivat J774-Dual-reportterisolujen NF- $\kappa$ B- ja IRF-aktiivisuuteen?

## 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

### 4.1 Tutkimuksen suoritus

Opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin 7.1.–14.4.2016 Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella Solubiologian ja anatomian osastolla. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat dosentti Jorma Määttä ja erikoistutkija Lauri Polari (Turun yliopisto) sekä lehtori Sanna Virtanen (Turun ammattikorkeakoulu).

Teoreettisena tausta-aineistona opinnäytetyössä käytettiin aiemmin julkaistuja samaa tai osittain samaa aihepiiriä käsitteleviä tieteellisiä artikkeleita ja kirjallisuutta, joihin on viitattu työn teoreettista taustaa käsittelevissä osuuksissa. Kokeellisen tutkimuksen aineiston muodostivat tutkimusryhmän käytössä olleet reportterisolut, estrogeeniset yhdisteet sekä makrofaagisolujen tulehdusvasteiden määrittämiseen tarvittut reagenssit. Tutkimuksessa käytettyjä menetelmiä olivat reportterisolujen viljely, solujen käsittelyt tutkituilla yhdisteillä sekä solujen NF- $\kappa$ B- ja IRF-aktiivisuuden määrittäminen käsittelyiden jälkeen. Tulehdusvasteiden voimakkuuden perusteella arvioitiin SERM-yhdisteiden toimivuutta mahdollisina tulehdusreaktioita hillitsevinä yhdisteinä.

#### 4.1.1 Soluviljely

Tässä opinnäytetyössä käytettiin InvivoGenin tuottamaa immortalisoitua J774-Dual-solulinjaa. Solulinja on johdettu hiiren J774.1 makrofaagin kaltaisista soluista ja niihin on pysyvästi liitetty kaksi yleistä reportterigeenimekanismia eli lusiferaasia ja eritettyä alkalista fosfataasia tuottavat rakenteet, jotka aktivoituvat mikrobiperäisten molekyylien tai sytokiinin vaikutuksesta (InvivoGen 2016b). J774-Dual-soluilla interferonin säätelytekijät (IRF) aktivoivat Lucia lusiferaasi -reportterigeenin, jonka aktiivisuuden perusteella IRF-säätelyä voitiin arvioida. NF- $\kappa$ B:n signaalireittien aktiivisuutta taas tutkittiin solulinjan SEAP-reportterigeenin ilmentymistä tarkastelemalla. (InvivoGen 2016a.)

Tutkimus aloitettiin käynnistämällä soluviljely, jossa nestetyypeen säilötyt J774-Dual P7 ( $3 \times 10^6$  solua) -solut sulatettiin ja siirrettiin yhteen T75-kasvatuspulloon. Pulloon lisättiin soluille tarkoitettua kasvatusliuosta eli mediumia, joka vaihdettiin seuraavana päivänä. J774-Dual on hiiren makrofaagisolusta johdettu immortalisoitu solulinja (Invivogen

2016a), jonka solut jakautuvat jatkuvasti. Tämän vuoksi ylläpidetyt solut tuli jakaa uusiin kasvatuspulloihin noin viiden päivän välein, jotta niiden tiheys ei olisi kasvanut liian suureksi vaikuttaen mahdollisesti solujen elinkykyyn ja erilaistumiseen. Solujen jaon yhteydessä myös medium vaihdettiin. Lisäksi solujen kunto tarkastettiin mikroskoopilla päivittäin.

Soluviljelyssä käytettiin vuorotellen kahta hieman erilaista DMEM-pohjaista (Dulbecco's Modified Eagle Medium -ravintoliuos) kasvatusliuosta eli selektiomediumeja J774-Dual – ja J774-Dual +. Selektiomediumeja käytetään soluviljelyssä ylläpitämään selektiopainetta reportterisoluissa, joiden geenit antavat vastustuskyvyn tiettyjä antibiootteja vastaan. Tällöin solut, joissa ei ollut toimivia reportteri- ja selektiogeneenejä, kuolivat. Menettelyn avulla pyrittiin takaamaan, että viljelyssä soluissa ilmentyivät kaikki halutut reportterigeenit. (ThermoFisher Scientific 2015b.) Käytettyihin selektiomediumeihin oli lisätty inaktivoitua (30 minuuttia 56°C:ssa) naudan sikiön seerumia (iFBS), glukoosiliuosta, Glutamax-ravintolisää sekä antibiootteja. Molempien kasvatusliuosten tarkemmat koostumukset on kuvattu liitteessä 2. Käsittelyitä varten soluja kasvatettiin myös 96-kuoppalevyillä, joilla kasvatusmediumina käytettiin J774-Dual – -mediumia. Lisäksi kahdessa 96-kuoppalevysarjassa testattiin myös DCC-mediumia (engl. dextran-coated charcoal-treated media), jossa käytetty FBS oli käsitelty dekstraanilla päällystetyllä hiilellä. Hiili-dekstraani-menetelmää käytetään vähentämään monien hormonien ja kasvutekijöiden, esimerkiksi estrogeenien, määrää FBS:ssä (Sigma-Aldrich 2016). DCC-mediumia ei käytetty solujen ylläpidossa.

Inkuboidut solut irrotettiin säännöllisin väliajoin jakoa tai 96-kuoppalevyille siirtoa varten kasvatuspullojen pohjista mekaanisesti lastalla raaputtamalla, sentrifugoitiin, suspensoitiin uuteen mediumiin ja laskettiin käyttämällä apuna mikroskooppia ja Bürkerin kammiota (liite 3). Käsittelyitä varten solususpensiota lisättiin kasvatuspullojen (noin  $1,0 \cdot 10^6$  solua/pullo) lisäksi myös 96-kuoppalevyille, rivien B–G kaivoihin 2–11 (noin 6000 solua/kaivo). Kaikkiin reunimmaisiiin kaivoihin lisättiin vain 250  $\mu$ l PBS-puskuriliuosta ilman soluja, sillä reunimmaisiet kaivot kuivuvat muita nopeammin, mikä olisi saattanut vaikuttaa tutkimuksen tuloksiin. Kuivumista pyrittiin estämään PBS:n avulla. Kuoppalevyjä tehtiin aina kaksi kerrallaan ja niitä sekä T75-pulloissa olleita soluja kasvatettiin inkubaatiokaapissa +37°C:ssa. Solulinjaa ylläpidettiin Invivogenin (2016a) suositusten mukaisesti vain passageen 20 asti eli niitä ei käytetty tutkimuksessa enää sen jälkeen, kun jako uusiin kasvatuspulloihin oli tehty 20 kertaa.

#### 4.1.2 Solujen käsittelyt

Käsittelyt tehtiin 96-kuoppalevyillä 4–6 päivää lämpökaapissa kasvaneille J774-Dual-soluille. Käsittelyt tehtiin kahdessa osassa eli ensin soluja sisältäviin kaivoihin lisättiin tutkittava estradiolipitoisuus, SERM-yhdisteet ja/tai deksametasoni, 100 µl/kaivo, ja seuraavana päivänä LPS. Tutkimuksessa käytettyjä kaupallisia SERM-yhdisteitä olivat tamoksifeeni, raloksifeeni, fulvestrantti ja ospemifeeni. Lisäksi käytettiin vielä vain tutkimuskäytössä olevia SERM-yhdisteitä, joita kutsuttiin nimillä SERM-1, SERM-2, SERM-5, SERM-7 ja SERM-8. DCC-mediumissa (estradioliton) kasvatetuilla soluilla testattiin myös pelkän estradiolin vaikutusta reportteriaktiivisuuteen pitoisuuksilla 0,01–10 nM. Tutkimuksessa deksametasonia käytettiin verrokkina makrofaagien tulehdusvasteita tarkasteltaessa. Deksametasoni (engl. dexamethasone) on synteettinen glukokortikoidi, jolla on 20–30 kertaa voimakkaampi immunosuppressiivinen vaikutus kuin kortisonilla ja sitä voidaankin käyttää esimerkiksi reumatautien, iho- ja suolistotulehdusten, pahojen allergioiden, astman sekä joidenkin syöpätyyppien hoidossa. (Haim ym. 2014.)

Kaikki käytetyt yhdisteet oli laimennettu J774-Dual – -mediumiin ja liuotettu 0,1 % dimetyylisulfoksidiin (DMSO), joka on muun muassa lääkkeiden ihon läpi imeytymistä edistävä liuotin (Terveyskirjasto 2016a). DMSO lisättiin erikseen myös vehikkeliin, jossa soluille lisättiin vain kasvatusmediumia vertailua varten. Kullekin erilaiselle tutkittavalle yhdisteelle varattiin 5 kaivoa, ja lisäksi jokaisella 96-kuoppalevyllä oli 5 solutonta kaivoa ("blankki") sekä 5 kaivoa vehikkeliä varten.

24 tuntia tutkittavien liuosten lisäyksen jälkeen levyille lisättiin vielä LPS kahtena eri pitoisuutena eli 10 ng/ml (merkitty LPS 1) ja 100 ng/ml (merkitty LPS 10), 11 µl/kaivo (Taulukko 1). LPS on gram-negatiivisten bakteerien ulkokalvon rakenneosaa, (Järveläinen & Miettinen 2001), joka aktivoi voimakkaasti erityisesti makrofaagien sekä endoteelisolujen tulehdusvasteita ja käynnistää inflammatoristen sytokiinien tuoton (Andreakos ym. 2016). Tämän vuoksi LPS-käsittelyitä käytettiin viljeltyjen makrofaagisolujen tulehdusvasteen ja sen muutosten tarkasteluun.

Taulukko 1. Esimerkki tyypillisestä pipetointikartasta.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS											
B	vehikkeli						blankki					
C	E2 10 nM						SERM-5 $\mu\text{M}$ + LPS 10					
D	E2 10 nM + LPS 1						SERM-8 1 $\mu\text{M}$					
E	E2 10 nM + LPS 10						SERM-8 1 $\mu\text{M}$ + LPS 1					
F	SERM-5 1 $\mu\text{M}$						SERM-8 1 $\mu\text{M}$ + LPS 10					
G	SERM-5 1 $\mu\text{M}$ + LPS 1						DEX 0,1 $\mu\text{M}$ + LPS 10					
H	PBS											

#### 4.1.3 Tulehdusvasteiden määrytykset

Vuorokausi LPS-käsittelyiden jälkeen 96-kuoppalevyiltä siirrettiin jokaisesta käsitellystä kaivosta 20  $\mu\text{l}$  mediumia toisille kuoppalevyille lusiferaasimääritystä varten ja 30  $\mu\text{l}$  SEAP:iin perustuvaa määritystä varten. SEAP:iin perustuvassa mittauksessa kuoppalevyille lisättiin vielä 170  $\mu\text{l}$  Quanti-Blue-liuosta (Invivogen) ja levyt jätettiin inkuboitumaan lämpökaappiin noin tunniksi tai kunnes värireaktio oli selkeä, jonka jälkeen tulokset mitattiin Victor<sup>2</sup>-kuoppalevylukijalla, aallonpituudella 650 nm. Lusiferaasimääritys tehtiin heti mediumin siirron jälkeen Victorilla laitteen itse annostellessa Quanti-Luc-liuos (Invivogen) kaivoihin. Mittausmenetelmien tarkemmat työohjeet on kuvattu liitteessä 4.

Alkuperäisten 96-kuoppalevyjen mediumit otettiin talteen typpioksidien pitoisuuksien määrytyksiä varten, jotka tehtiin Griessin menetelmällä Promegan reagensseillä (liite 5). Nitriittipitoisuuden mittausta käytettiin määrittämään makrofaagisoluista vapautuneiden typen oksidien pitoisuuksia. Analyysissä valmistettiin ensin laimennussarja reagenssipakkauksen mukana tulleelle nitriittistandardiliuokselle referenssisuoran määrittämistä varten. Näytteitä tarvittiin 50  $\mu\text{l}$ /kaivo. Kaikkien näytteiden päälle pipetoitiin ensin hapanta sulfaniilamidiliuosta ja 5–10 minuutin kuluttua NED-liuos. Tulokset luettiin Victorilla 540 nm:ssä 30 minuutin sisällä NED-liuoksen lisäyksestä, jolloin violetti värireaktio oli voimakkaimmillaan. Tuloksia verrattiin laskettuun referenssisuoraan.

Mediumeista tyhjennetyt kuoppalevyjen kaivot pestiin 100 µl PBS-puskuria/kaivo, jonka jälkeen levyt pakastettiin -20°C:ssa vähintään 30 minuuttia. Tämän jälkeen tehtiin proteiinimääritys Thermo Scientificin Pierce BCA -proteiinimäärityskitin avulla. Analyysin aluksi valmistettiin standardit työhjeen mukaan (liite 6) ja pipetoitiin kuoppalevyille solujen rakenteet hajottavaa ALP-lyysispuskuriä (liite 7), joka mahdollisti liuoksen proteiinipitoisuuden mittauksen. Tulokset luettiin Victorilla (aallonpituus 650 nm) ja proteiinikonsentraatiot laskettiin Multicalc-ohjelman avulla.

Kaikkien määritysten tulokset käsiteltiin Excelissä. Tulosten tilastollinen tarkastelu tehtiin kaksisuuntaisella kahden otoksen (eri varianssit) t-testillä aineistosta, jossa NF-κB:n ja IRF:n aktiivisuus sekä solujen typpioksidipitoisuudet oli suhteutettu solujen proteiinipitoisuuteen tulosten vertailtavuuden mahdollistamiseksi. Tulosten tilastollinen merkitsevyys määriteltiin p-arvoilla: tulos on tilastollisesti melkein merkitsevä, kun  $p < 0,05$  (\*); merkitsevä, kun  $p < 0,01$  (\*\*); ja erittäin merkitsevä, kun  $p < 0,001$  (\*\*\*) (Sarna 2007).

#### 4.2 Metodologiset lähtökohdat

Määrällinen eli kvantitatiivinen menetelmä on tutkimustapa, joka antaa yleiskuvan muuttujien mitattavien ominaisuuksien välisistä suhteista ja eroista. Kvalitatiivisen tutkimuksen tarkoituksena on selittää, kuvata, kartoittaa, vertailla tai ennustaa tutkittavia asioita, ominaisuuksia tai ilmiöitä. Kvalitatiivisessa tutkimuksessa tutkimustieto saadaan numeroina tai laadullinen aineisto ryhmitellään numeeriseen muotoon, jolloin tulokset voidaan esittää esimerkiksi tunnuslukuina. Olennaiset numerotiedot selitetään tutkimuksessa sanallisesti ja menetelmä vastaakin kysymyksiin kuinka moni, kuinka paljon ja/tai kuinka usein. (Vilka 2007, 14.)

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa on keskeistä esittää aiempia johtopäätöksiä ja teorioita sekä sijoittaa tutkittava ilmiö niiden kautta teoriasuuntaukseen. Ennen tutkimuksen alkua suunnitellaan koejärjestelyt ja aineiston keruumenetelmät. (Hirsjärvi ym. 2015.) Kvalitatiivisessa tutkimuksessa asetetaan yleensä myös tutkimusongelma eli hypoteesi, joka on perusteltu aiempien tutkimusten, teorioiden ja mallien avulla (Vilka 2007, 16). Lisäksi tutkimukseen liittyvät käsitteet määritellään ja lopuksi kootaan johtopäätökset, jotka havainnollistetaan tilastollisesti analysoimalla (Hirsjärvi ym. 2015).

Tämä opinnäytetyö oli luonteeltaan kvantitatiivinen tutkimus, sillä siinä mitattiin makrofaagisolujen tulehdusvastetta eli reportterigeenien aktiivisuutta määrällisesti. Teoreettisena lähtökohtana työssä käytettiin aikaisempia tutkimuksia ja kirjallisuutta. Teoreettisen pohjan avulla tutkimukselle asetettiin tutkimusongelmat ja määriteltiin tutkimukseen liittyvät käsitteet. Tutkimustulokset analysoitiin tilastollisesti.

#### 4.3 Eettiset näkökulmat

Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (2012) julkaiseman ohjeistuksen mukaisesti tieteellisessä tutkimuksessa tulisi aina noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä, jotta tutkimus olisi eettisesti hyväksyttävä, luotettava ja sen tulokset uskottavia. Hyvän tieteellisen käytännön keskeisiä lähtökohtiin kuuluvat muun muassa rehellisyyden, yleisen huolellisuuden ja tarkkuuden noudattaminen tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa, esittämisessä sekä arvioinnissa. Lisäksi tutkimukseen tulee soveltaa eettisesti kestäviä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä ja noudattaa tulosten julkaisun yhteydessä avointa ja vastuullista tiedeviestintää tietoa salaamatta tai vääristelemättä. Tutkijoiden tulee huomioida muiden tutkijoiden työ ja saavutukset ja viitata heidän julkaisuihinsa asianmukaisella tavalla. Myös tutkimuslupien tulee olla kunnossa ja mahdolliset tietosuojaa, henkilöiden yksityisyyttä sekä itsemääräämisoikeutta koskevat kysymykset pitää ottaa huomioon. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Tätä opinnäytetyötä tehdessä pyrittiin noudattamaan kaikkia hyvän tieteellisen käytännön periaatteita, kuten rehellisyyttä ja huolellisuutta tutkimusta tehdessä ja tuloksia kirjatessa. Tuloksia ei salattu tai vääristelty. Teoreettisena taustana hyödynnettyjen aikaisempien tutkimusten ja kirjallisuuden lähteet merkittiin asianmukaisesti ja plagiointia vältettiin. Tutkimuksen teosta sovittiin kaikkien osapuolten kanssa ja tutkimusta varten tehtiin toimeksiantosopimus Turun yliopiston ja Turun ammattikorkeakoulun välillä (Liite 1). Tutkimuksessa ei käytetty koe-eläimiä, eikä siihen osallistunut potilaita. Myöskään potilastietoja ei käytetty, joten tietosuojaan, yksityisyyteen tai itsemääräämisoikeuteen liittyviä eettisiä periaatteita ei tarvinnut tutkimuksen teossa ottaa huomioon.



## 5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

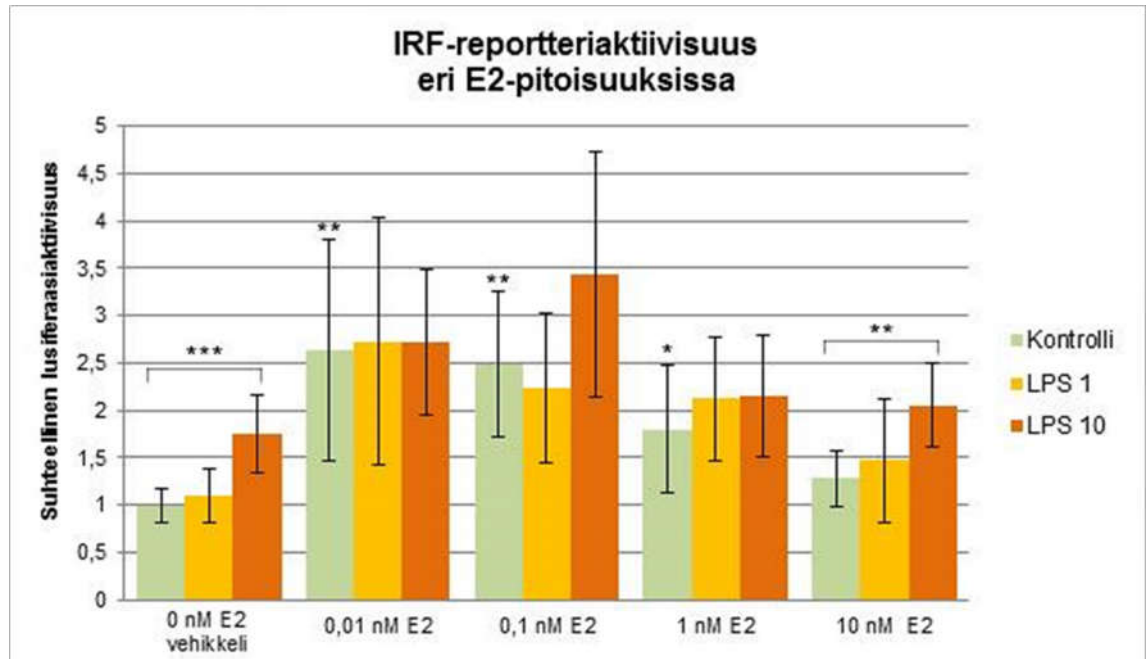
Tässä opinnäytetyössä tutkittiin estrogeenisten yhdisteiden vaikutusta J774-Dual-solujen tulehdusvasteisiin, mitaten IRF- ja NF- $\kappa$ B-reportterien aktiivisuutta ja solujen erittämiä typpioksidipitoisuuksia. Lisäksi määritettiin solujen proteiinipitoisuus, johon lusiferaasi- ja SEAP-aktiivisuudet sekä typpioksidipitoisuudet suhteutettiin.

Erillisiä mittaussarjoja 96-kuoppalevyillä tehtiin yhteensä kuusi. Neljässä sarjassa solut oli suspensoitu ja kasvatettu J774-Dual – -mediumissa ja kahden sarjan solut DCC-mediumissa. Kaikille käsittelyille tai niiden yhdistelmälle suoritettiin vähintään viisi toistoa kussakin mittaussarjassa.

### 5.1 Estradiolin vaikutus tulehdusvasteeseen

DCC-mediumissa kasvatettujen solujen avulla tutkittiin erityisesti soluviljelmälle lisätyn E2:n pitoisuuserojen vaikutusta solujen elinkykyyn ja tulehdusvasteeseen. E2:n fysiologinen pitoisuus ihmiskehossa vaihtelee noin 0,1–10 nM:n välillä (Celojevic ym. 2011), minkä vuoksi E2:n vaikutuksia tutkittaessa valittiin tarkasteltavaksi kolme eri pitoisuutta tältä vaihteluväliltä (0,1 nM, 1 nM ja 10 nM) ja yksi normaalia alhaisempi pitoisuus eli 0,01 nM. Lisäksi tutkittavilla levyillä oli estradiolittomat vehikkelikaivot verrokkina. Osaan kaivoista lisättiin LPS kahtena eri pitoisuutena Taulukon 1 pipetointikartan mallin mukaisesti. Kontrollikaivoja ei käsitelty LPS:llä. Koko mittaussarja tehtiin kahteen kertaan, joten tulosten tarkastelussa käytettiin näiden sarjojen keskiarvoja.

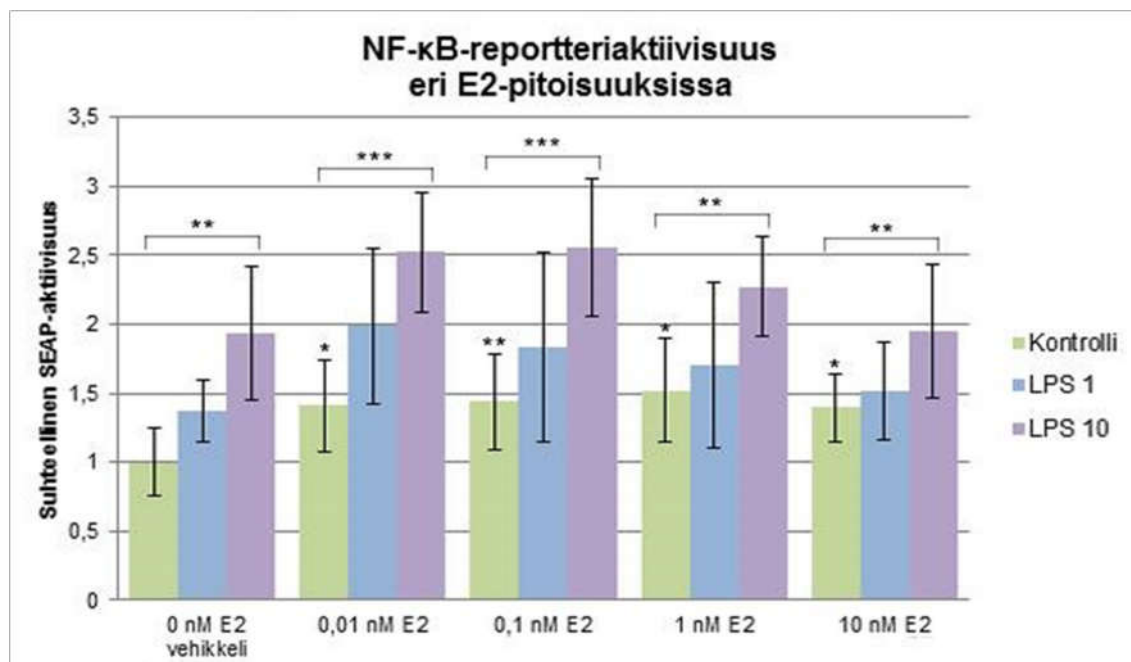
Lusiferaasimäärityksen tuloksista (Kuvio 1) on havaittavissa, että estrogeenien puute vaikutti vehikkelikaivoissa kasvaneiden solujen elinkykyyn, sillä E2-kaivoissa solut kasvoivat paremmin ja vasteet olivat suurempia. E2 kohotti reportteriaktiivisuutta tilastollisesti merkitsevästi pitoisuuksilla 0,01 nM ja 0,1 nM sekä melkein merkitsevästi pitoisuudella 1 nM. 10 nM:n pitoisuus ei vaikuttanut reportteriaktiivisuuteen tilastollisesti merkittävästi, mutta aktivoi kuitenkin myös IRF-toimintaa vehikkelin nollatasoon verrattuna.



Kuvio 1. Eri E2-pitoisuuksien vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa, verrattuna vehikkeliin

10 ng/ml LPS (merkitty LPS 1) ei aktivoi IRF-reportterigeeniä kontrolliin verrattuna millään E2-pitoisuudella. 100 ng/ml (merkitty LPS 10) taas aktivoi reportterin kaikilla E2-pitoisuuksilla, mutta altistus ei aiheuttanut merkittäviä tulehdusvasteiden nousuja kuin vehikkelissä ja korkeimmalla käytetyllä E2-pitoisuudessa.

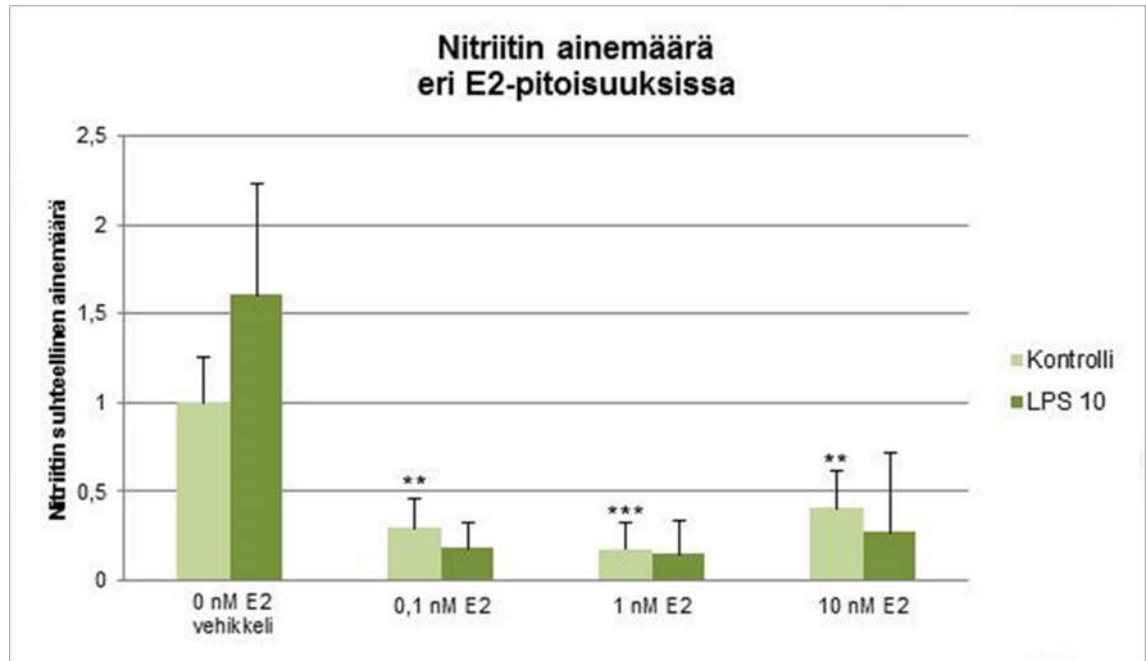
NF- $\kappa$ B-aktiivisuuden mittaustulokset on esitetty Kuviossa 2. Tuloksista on havaittavissa sama ilmiö kuin IRF-reportterilla, eli E2:lla oli myös NF- $\kappa$ B-aktiivisuutta lisäävä vaikutus kaikissa pitoisuuksissa. Tästä on pääteltävissä, että fysiologiset E2-pitoisuudet hieman aktivoivat ja ylläpitivät IRF- ja NF- $\kappa$ B-reportterien toimintaa, mutta E2:n konsentraation vaihtelu välillä 0,01–10 nM ei itsessään vaikuttanut aktiivisuuteen lisäävästi tai vähentävästi.



Kuvio 2. Eri E2-pitoisuuksien vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-aktiivisuuteen SEAP-mittauksessa, verrattuna vehikkeliin

Myös LPS aktivoi NF-κB-reportterin toimintaa: 10 ng/ml LPS:n vaikutus oli tilastollisesti merkittävä lukuun ottamatta 0,1 nM E2:ta, ja 100 ng/ml LPS:n aktivoiva vaikutus oli tilastollisesti erittäin merkittävä kaikilla E2-pitoisuuksilla. Tästä voidaan päätellä, että E2 ei pystynyt vaimentamaan LPS:n stimuloimaa tulehdusreaktiota. Kuviossa 2 kuitenkin näkyy reportteriaktiivisuustasojen lasku suuremmissa E2-pitoisuuksissa, mikä voi johtua estrogeenireseptoreiden aktivaation anti-inflammatorisista vaikutuksista. Tulokset tukevat osaltaan joitakin aikaisempia tutkimuksia, joiden mukaan korkeat estrogeenipitoisuudet ovat anti-inflammatorisia, kun taas matalilla pitoisuuksilla saattaa olla jopa proinflammatorinen vaikutus (Draijer ym. 2016).

Makrofaageista erittyneiden typpioksidien ainemääriä tarkasteltaessa (Kuvio 3) on havaittavissa, että vehikkelin solut tuottivat enemmän nitriittiä kuin estradiolilla käsitellyt solut; E2:lla oli tilastollisesti merkittävä typen oksidien erittymistä vähentävä vaikutus. 10 ng/ml LPS -altistus ei saanut aikaan kontrollista poikkeavia tuloksia, joten se jätettiin kokonaan pois typpioksidien ainemäärätarkasteluista. Myöskään 100 ng/ml LPS ei vaikuttanut typen oksidien erittymiseen tilastollisesti merkittävästi E2:n läsnäollessa. Tulokset voivat johtua esimerkiksi siitä, että E2 on saattanut estää makrofaagien muuntumista reaktiivisempaan fenotyyppiin, mikä vähentää LPS:n aiheuttamia vasteita, kuten nitriitin tuottoa (Vegeto ym. 2001).

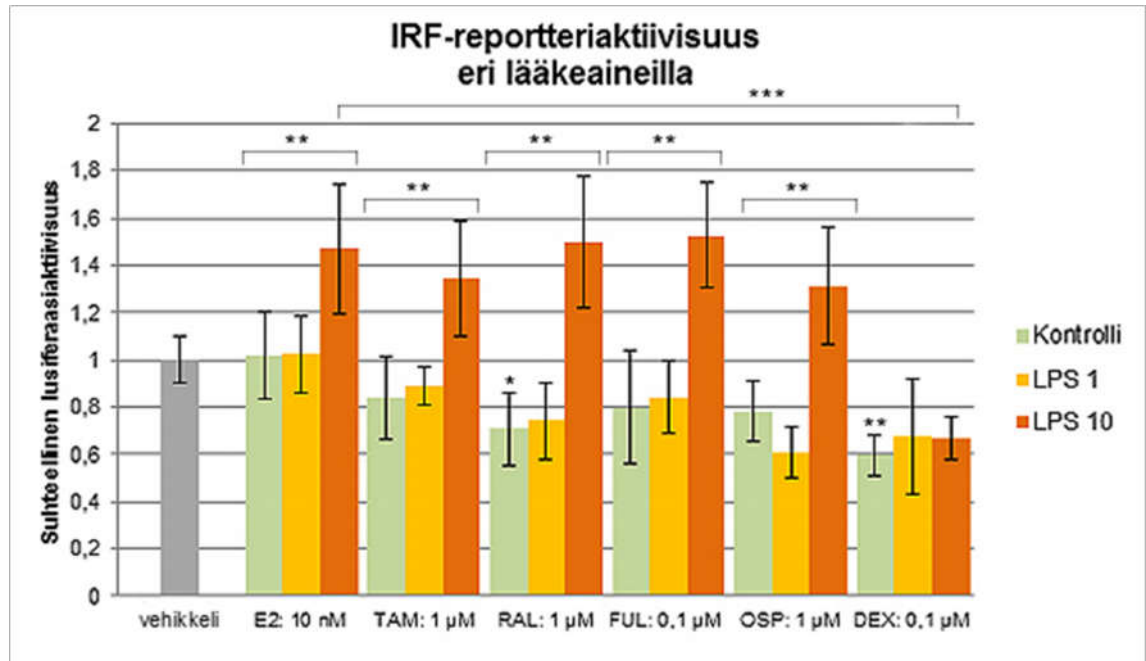


Kuvio 3. Eri E2-pitoisuuksien vaikutus J774-Dual-solujen erittämän nitriitin määrään, verrattuna vehikkeliin

## 5.2 SERM-yhdisteiden vaikutus IRF-aktiivisuuteen

Lääkkeinä käytetyistä SERM-yhdisteistä tutkimuksessa mukana olivat tamoksifeeni, raloksifeeni, fulvestrantti ja ospemifeeni (merkitty kuvioissa TAM, RAL, FUL ja OSP). Lisäksi tarkasteltiin viiden vain tutkimuskäytössä olevan SERM-yhdisteen (merkitty SERM-1, -2, -5, -7 ja -8) vaikutuksia makrofaagien tulehdusvasteisiin. SERM-yhdisteiden lisäksi tutkimuksessa oli myös vain mediumia sisältävä vehikkeli sekä verrokkeina E2 10 nM:n ja deksametasoni (DEX) 0,1 nM:n pitoisuuksilla. Kaikki SERM-yhdisteet laimennettiin kasvatusmediumiin, jossa E2-konsentraatio oli 10 nM, paitsi viimeinen sarja, joka on merkitty erikseen estradiolittomaksi.

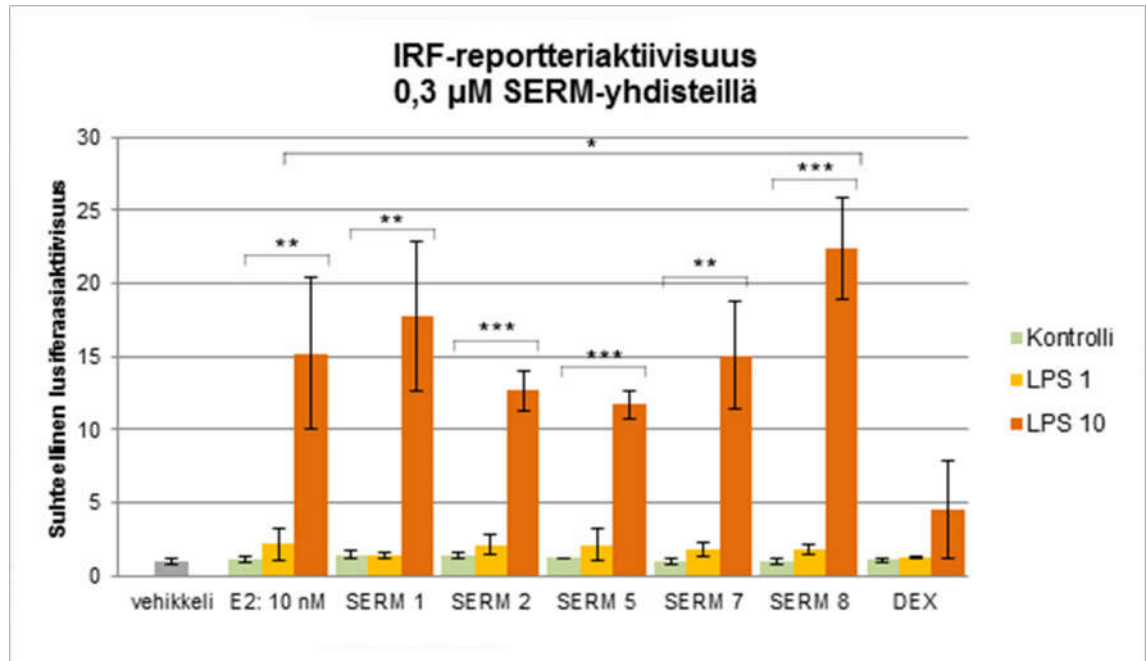
Kuviossa 3 on esitetty lusiferaasimittauksen tulokset, joista on havaittavissa, että kaikki lääkeyhdisteet vähensivät makrofaagien IRF-aktiivisuutta pelkkään E2:n ja myös vehikkeliin verrattuna. Vaikutus ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkittävä kuin deksametasonin ja melkein merkittävä raloksifeenin kohdalla. Lääkeaineiden, erityisesti deksametasonin ja raloksifeenin, voidaan siis katsoa toimineen anti-inflammatorisesti E2:n läsnäollessa.



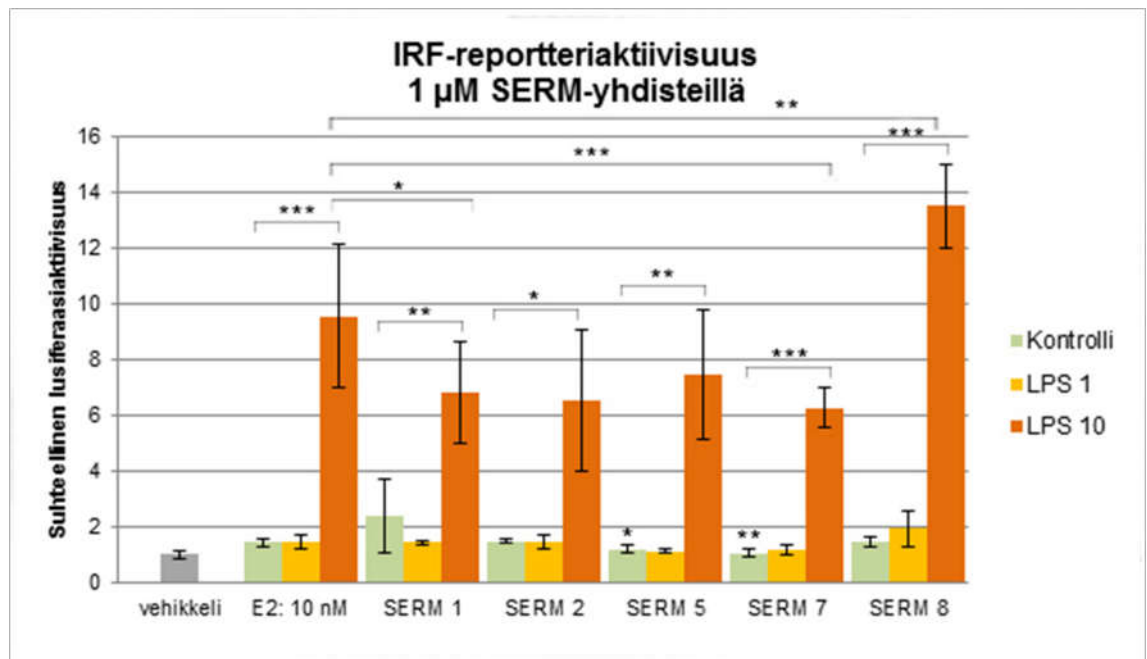
Kuvio 4. Lääkeaineiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa

10 ng/ml LPS:n lisäys ei aiheuttanut tilastollisesti merkittäviä muutoksia IRF-aktiivisuudessa lääkaineisiin verrattuna, mutta sen sijaan 100 ng/ml LPS aktivoi voimakkaan tulehdusvasteen, jota SERM-yhdisteet tai E2 eivät kyenneet vaimentamaan merkittävästi. Deksametasoni sen sijaan vähensi myös 100 ng/ml LPS:n indusoimaa IRF-aktiivisuutta (tilastollisesti erittäin merkittävä ero), mikä johtunee deksametasonin voimakkaasta immunosuppressiivisesta toiminnasta (Haim ym. 2014).

Kuvioissa 5a ja 5b on esitetty vain tutkimuskäytössä olevien SERM-yhdisteiden vaikutukset IRF-aktiivisuuteen. SERM-yhdisteitä tarkasteltiin kahtena eri pitoisuutena: 0,3 µM ja 1 µM. Tuloksista voidaan havaita, että 0,3 µM:n pitoisuudessa SERM-yhdisteet eivät vaikuttaneet pelkkään E2:n verrattuna tilastollisesti merkittävästi IRF-reportterin aktiivisuuteen. 1 µM:n pitoisuudessa SERM-5:n aiheuttama muutos reportteriaktiivisuudessa oli tilastollisesti melkein merkittävä ja SERM-7:n tilastollisesti merkittävä. Molemmat SERM-yhdisteet vähensivät IRF-aktiivisuutta E2:n verrattuna. Tästä voidaan päätellä, että yhdisteet saattavat vaikuttaa voimakkaammin suurempina pitoisuuksina.



Kuvio 5a. 0,3  $\mu$ M SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa

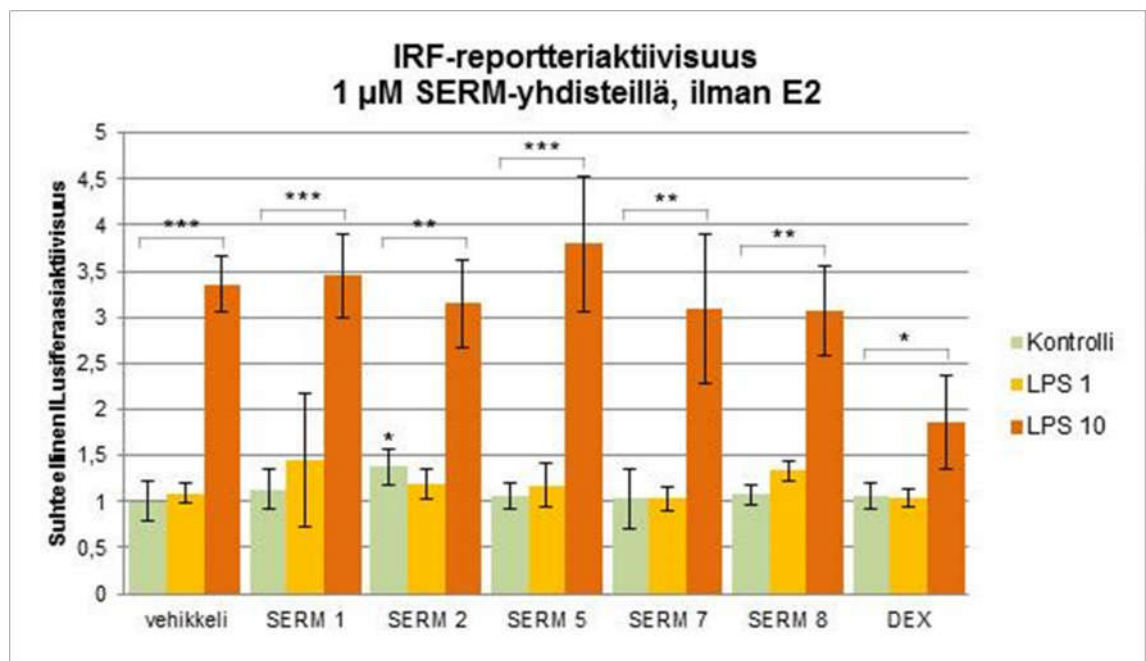


Kuvio 5b. 1  $\mu$ M SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa

SERM-yhdisteiden ja E2:n läsnäollessa 10 ng/ml LPS ei vaikuttanut tilastollisesti merkittävästi IRF-reportterin aktiivisuuteen. Sen sijaan 100 ng/ml LPS vaikutti kaikkien

SERM-yhdisteiden kohdalla niin voimakkaasti tulehdusreaktion aktivoitumiseen, etteivät SERM-yhdisteiden mahdolliset anti-inflammatoriset vaikutukset kyenneet vaimentamaan vasteita merkittävästi. Kuvioista 5a ja 5b on havaittavissa, että SERM-yhdisteet pääosin vähensivät IRF-reportterin LPS:n aiheuttamaa aktivoitumista hieman enemmän kuin pelkkä E2, lukuunottamatta SERM-8, joka aktivoi reportterigeeniä sekä 0,3  $\mu\text{M}$ :n että 1  $\mu\text{M}$ :n pitoisuudessa. 1  $\mu\text{M}$ :n pitoisuudessa SERM-1 ja SERM-7 vähensivät LPS:n indusoimaa IRF-aktiivisuutta tilastollisesti merkittävästi.

Viimeinen tutkimussarja tehtiin 1  $\mu\text{M}$  SERM-yhdisteillä, joihin ei ollut lisätty estradiolia. Lusiferaasimittauksen tuloksista (Kuvio 6) on havaittavissa, että SERM-yhdisteistä vain SERM-2:lla oli tilastollisesti melkein merkittävä vaikutus IRF-aktiivisuuteen vehikkeliin verrattuna. SERM-2:n vaikutus oli hieman reportterigeeniä aktivoiva.



Kuvio 6. 1  $\mu\text{M}$  SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen IRF-aktiivisuuteen lusiferaasimittauksessa, ilman E2:ta

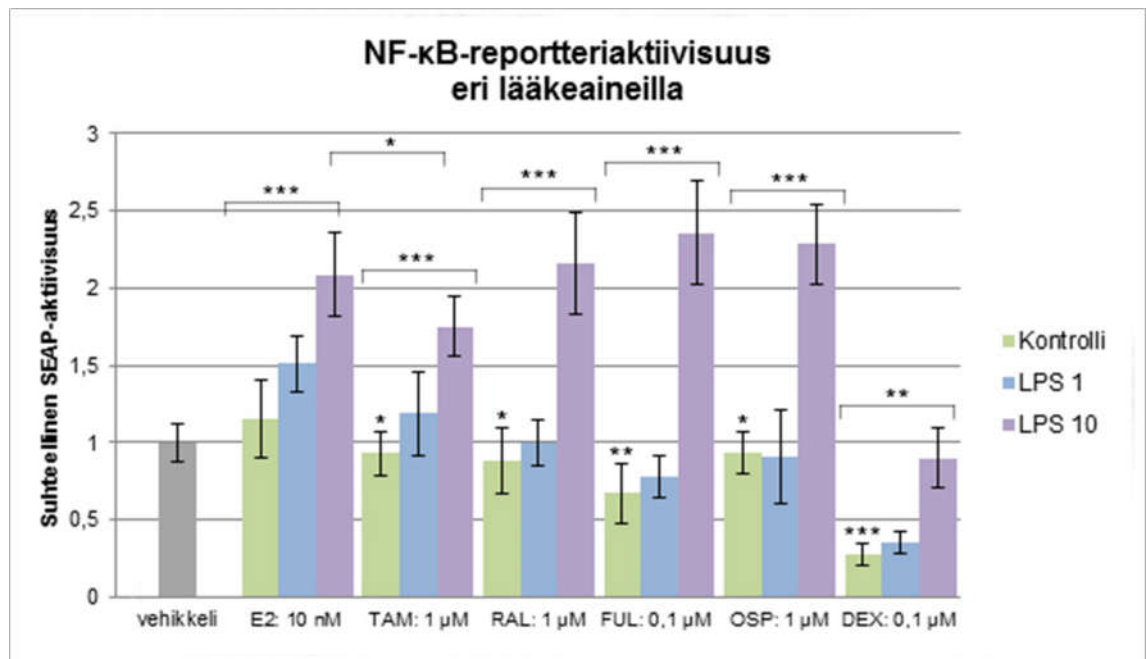
10 ng/ml LPS ei vaikuttanut tilastollisesti merkittävästi IRF-aktiivisuuteen myöskään estradiolittomassa tutkimussarjassa. 100 ng/ml LPS:n vaikutus oli tilastollisesti merkittävä tai erittäin merkittävä. Korkeassa LPS-pitoisuudessa tulokset poikkesivat jonkin verran edellisten sarjojen tuloksista, erityisesti SERM 5:n ja SERM 8:n osalta: muissa sarjoissa SERM 8:lla oli selkeästi IRF-aktiivisuutta lisäävä vaikutus ja SERM 5:llä aktiivisuutta vähentävä vaikutus. Erot olivat kuitenkin pieniä, sillä vehikkeliin

verrattuna SERM-yhdisteet eivät vaikuttaneet LPS:n aiheuttamaan tulehdusvasteeseen tilastollisesti merkittävästi. Vaihtelut voivat johtua siitä, että tietyt yhdisteet saattavat käyttäytyä eri tavoin estradiolittomissa olosuhteissa. Muiden SERM-yhdisteiden tulokset ovat pääpiirteittäin linjassa Kuvioden 5a ja 5b tulosten kanssa.

### 5.3 SERM-yhdisteiden vaikutus NF- $\kappa$ B-aktiivisuuteen

NF- $\kappa$ B-reportteriaktiivisuuden määitykset toteutettiin samoilla yhdisteillä edellisen kappaleen IRF-reportteriaktiivisuusmittausten kanssa.

Lääkeaineilla tehtyjen tutkimusten tulokset olivat IRF- ja NF- $\kappa$ B-reportteriaktiivisuuksien suhteen yhtenevät (Kuvio 7). Pelkkään E2:n verrattuna kaikki lääkeaineet vähensivät reportteriaktiivisuutta tilastollisesti melkein merkittävästi tai merkittävästi (fulvestrantti), deksametasoni erittäin merkittävästi. Yhdisteillä voidaan siis päätellä olevan anti-inflammatorisia vaikutuksia E2:n läsnäollessa.



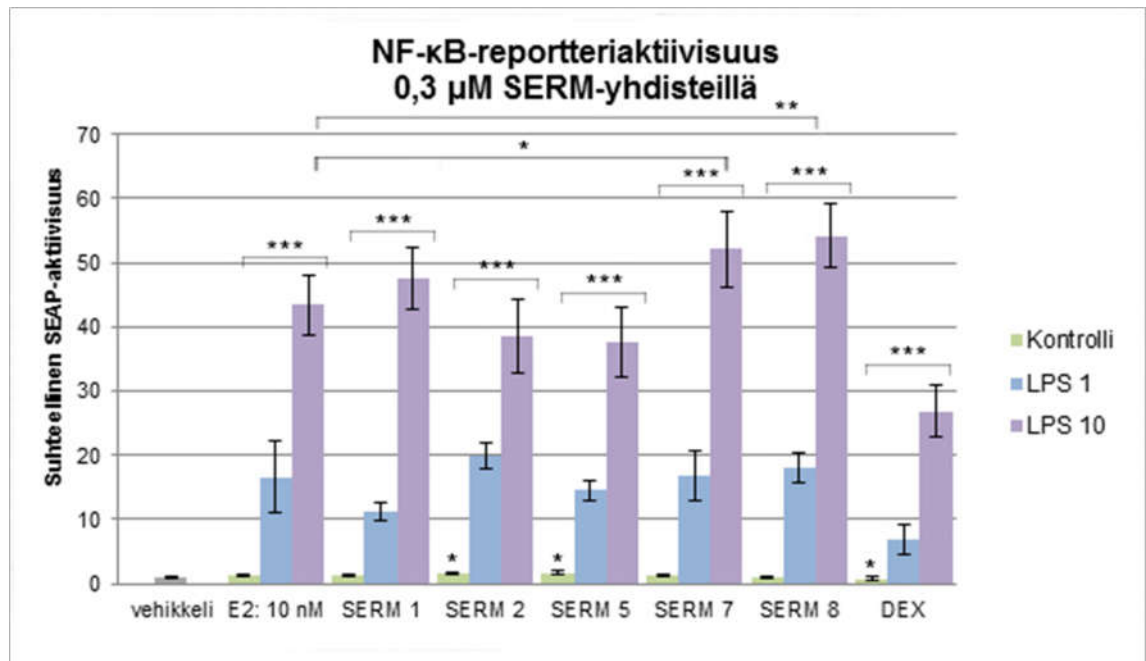
Kuvio 7. Lääkeaineiden vaikutus J774-Dual-solujen NF- $\kappa$ B-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa

100 ng/ml LPS:n vaikutus oli tilastollisesti erittäin merkittävä kaikilla SERM-yhdisteillä. Kuvio 7 on havaittavissa, että tamoksifeenillä oli 100 ng/ml LPS:n läsnäollessa



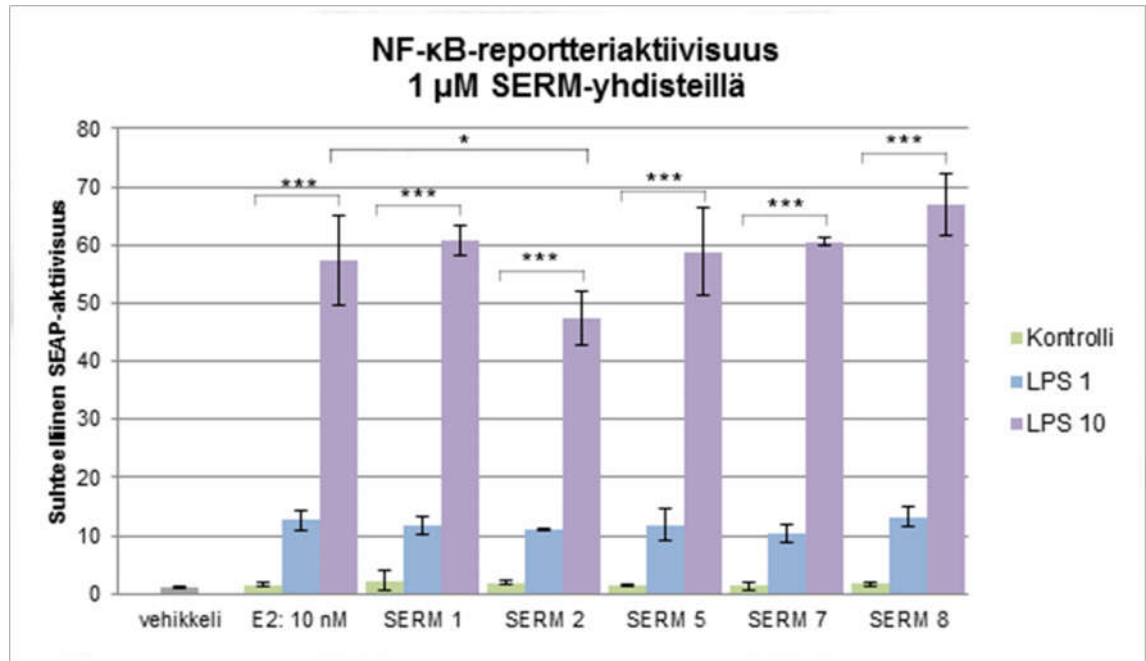
muuta SERM-yhdisteitä hieman voimakkaampi NF- $\kappa$ B-reportteriaktiivisuutta vähentävä vaikutus, joka oli tilastollisesti melkein merkittävä.

Kuvioissa 8a ja 8b on esitetty vain tutkimuskäytössä olevien SERM-yhdisteiden aiheuttama NF- $\kappa$ B-reportteriaktiivisuus kahdessa eri SERM-pitoisuudessa.



Kuvio 8a. 0,3  $\mu$ M SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen NF- $\kappa$ B-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa

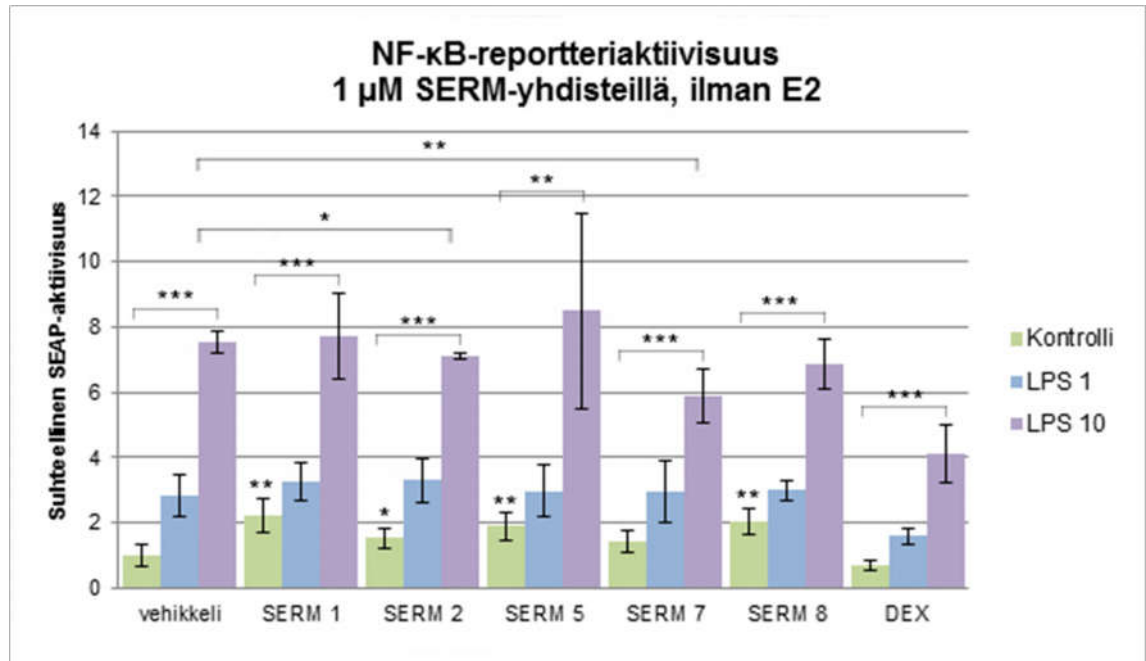
Tuloksista voidaan havaita, että E2:n verrattuna vain SERM-2 ja SERM-5 (ja deksametasoni) vaikuttivat NF- $\kappa$ B-reportterin aktiivisuuteen tilastollisesti melkein merkittävästi 0,3  $\mu$ M:n pitoisuudessa. Suuremmilla pitoisuuksilla vastaavaa tilastollista merkitsevyyttä ei ollut havaittavissa.



Kuvio 8b. 1 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa

LPS 10–100 ng/ml aktivoivat NF-κB-reportterigeeniä merkittävästi. Tästä päätellen NF-κB:n aktivaatioreitti saattaa olla IRF:n reittiä herkempi LPS:lle ja aktivoitua pienissäkin pitoisuuksissa. Pelkkään E2:n verrattuna SERM-yhdisteet vaikuttivat sekä 0,3 μM:n että 1 μM:n pitoisuuksina hyvin samankaltaisesti reportteriaktiivisuuteen 100 ng/ml LPS:n läsnäollessa: SERM-2 toimi selkeästi anti-inflammatorisesti ja vähensi aktiivisuutta, SERM-8 taas lisäsi NF-κB-reportteriaktiivisuutta, mutta ei tilastollisesti merkittävästi.

Estradiolittoman tutkimussarjan tulokset on esitetty Kuviossa 9. Kaikki SERM-yhdisteet, SERM-7 lukuunottamatta, lisäsivät NF-κB-reportterin aktiivisuutta tilastollisesti merkittävästi tai melkein merkittävästi. Ero oli huomattava verrattuna sarjaan, johon E2 oli lisätty (Kuvio 8b). E2:n läsnäolo saattaa siis tasoittaa SERM-yhdisteiden vaikutuksia reportteriaktiivisuuteen.

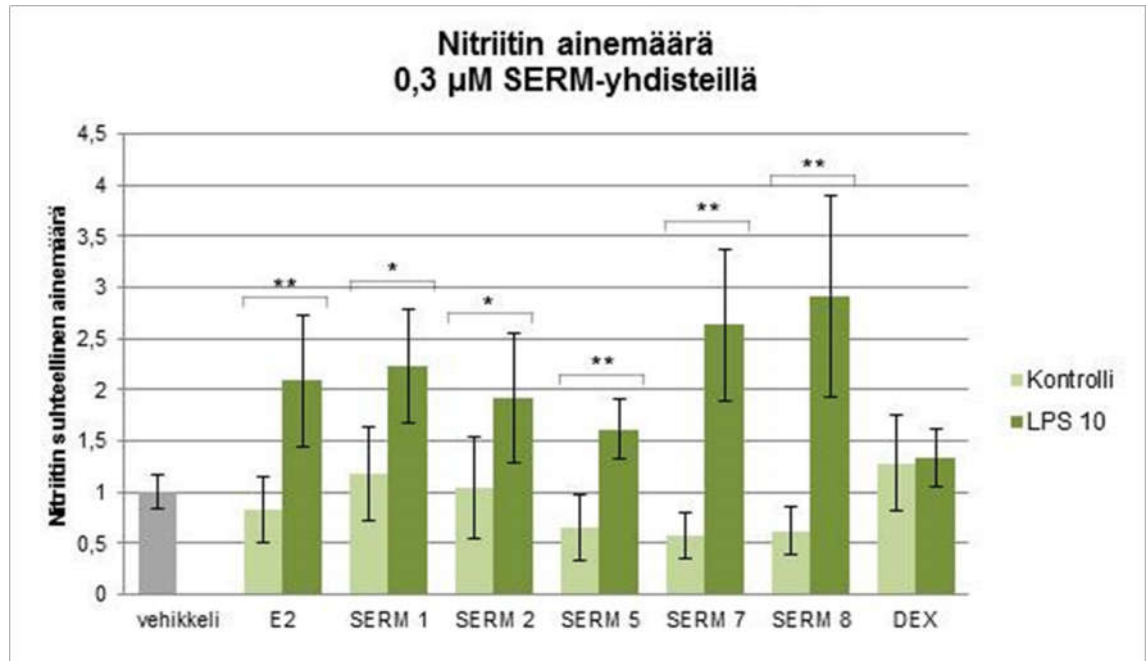


Kuvio 9. 1 μM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen NF-κB-reportteriaktiivisuuteen SEAP-mittauksessa, ilman E2:ta

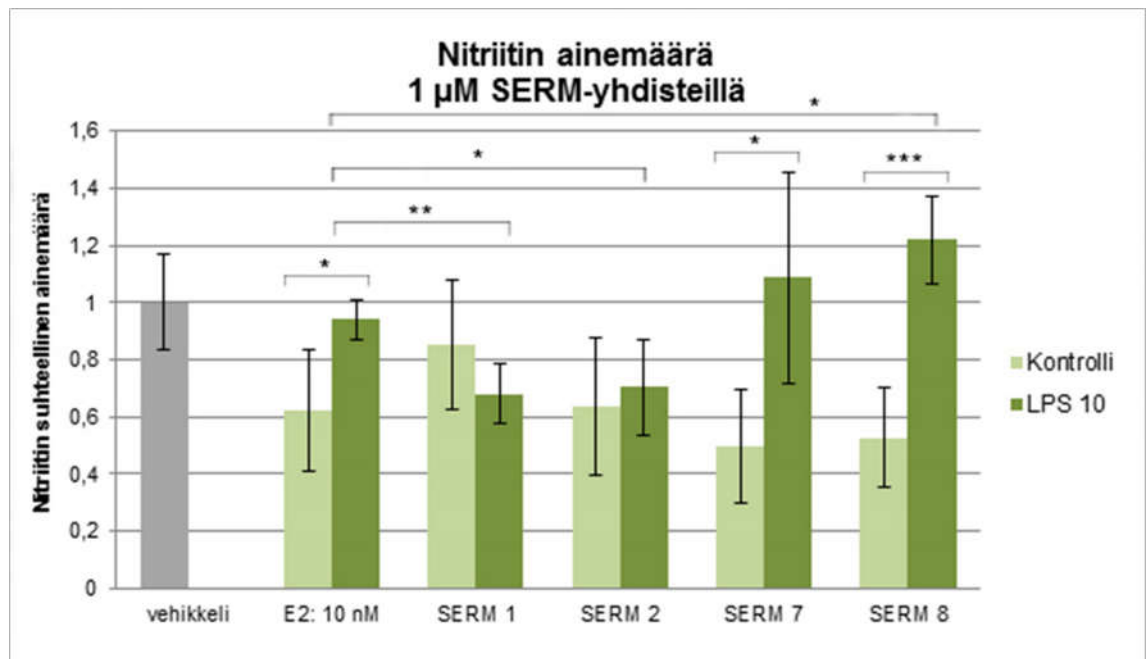
100 ng/ml LPS aktivoi jälleen reportteriaktiivisuutta tilastollisesti erittäin merkittävästi. Estradiolittomissa olosuhteissa SERM-2 ja SERM-7 vähensivät LPS:n indusoimaa NF-κB-aktiivisuutta tilastollisesti merkittävästi.

#### 5.4 SERM-yhdisteiden vaikutus typpioksidipitoisuuteen

Vain tutkimuskäytössä olevien SERM-yhdisteiden typpioksidimittausten tulokset (Kuviot 10a ja 10b) näyttivät noudattavan samaa linjaa muiden tulosten kanssa 100 ng/ml LPS:n läsnäollessa: SERM-7 ja SERM-8 aktivoivat makrofaagien toimintaa ja nitriitin erittymistä solusta, kun taas SERM-2 ja SERM-5 vähensivät aktiivisuutta estradioliin verrattuna. Tulokset eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkittäviä E2:n vaikutuksiin verrattuna.



Kuvio 10a. 0,3 µM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen erittämän nitriitin määrään



Kuvio 10b. 1 µM SERM-yhdisteiden vaikutus J774-Dual-solujen erittämän nitriitin määrään

0,3 µM:n SERM-pitoisuudessa 100 ng/ml LPS indusoi typen oksidien erittymistä tilastollisesti merkittävästi kaikilla SERM-yhdisteillä. 1 µM:n pitoisuudessa 100 ng/ml

LPS vaikutti tilastollisesti merkittävästi vain SERM-7 ja -8 kohdalla kontroleihin verrattuna. LPS:n indusoiman typen oksidien erittymiseen vaikuttivat eniten SERM-1, -2 ja -8 1  $\mu\text{M}$ :n pitoisuudessa: SERM-1 ja SERM-2 vähensivät typen oksidien ainemääriä ja SERM-8 aktivoi typpioksidien erittymistä. Tuloksissa oli kuitenkin paljon hajontaa, mikä voi tarkoittaa, että ne eivät välttämättä ole vertailukelpoisia ja typen oksidien ainemäärien mittaussuomenetelmä ei mahdollisesti sovellu luotettavaksi SERM-yhdisteiden toiminnan mittariksi tässä solulinjassa.

## 6 POHDINTA

SERM-yhdisteiden vaikutuksia on tutkittu paljon etenkin tietyissä estradiolin kohdekudoksissa, kuten luussa ja rintakudoksessa, mutta niiden vaikutukset makrofaagien toimintaan ovat vielä suurelta osin selvittämättä. Tämä opinnäytetyö tehtiin osana laajempaa Turun yliopistolla suoritettavaa tutkimusta tulehdusta hillitsevien SERM-tyyppisten molekyylien vaikutusmekanismeista. Opinnäytetyön kokeellinen osuus tehtiin hiiren makrofaagisolusta johdetun kaupallisen solulinjan (J774-Dual) avulla. Tutkimuksen tarkoituksena oli tarkastella viljeltyjen solujen tulehdusvasteita mittaamalla reportterigeenien NF- $\kappa$ B- ja IRF-aktiivisuus sekä eritettyjen typpioksidien määrä LPS-, E2- ja SERM-altistusten jälkeen. Tutkimuksen tavoitteena oli testata tutkittavien SERM-yhdisteiden sopivuutta tulehdusvasteiden säätelijöiksi.

Opinnäytetyön aiheeseen tutustuminen ja käytettyjen menetelmien harjoittelu aloitettiin jo ennen varsinaisen opinnäytetyön aloitusta solu- ja molekyylibiologian harjoittelujaksolla. Tämä oli tutkimuksen kannalta eduksi, sillä harjoittelujaksolta saatu kokemus toi osaltaan varmuutta esimerkiksi solujen viljelyyn ja analyysien suorittamiseen. Lisäksi harjoittelujaksolla ja opinnäytetyön aineistoa kerätessä seurattiin tarkasti ohjeita sekä täytettiin myös laboratoriotyöpäiväkirjaa, johon merkittiin kaikki tutkimuksen työvaiheet. Laboratoriotyöpäiväkirjan merkintöjen avulla kokeiden kulkua pystyi helposti seuraamaan ja tarvittaessa toistamaan samalla tavalla. Tutkimuksissa pyrittiinkin aina suorittamaan testisarjat keskenään samalla tavalla ja samanlaisissa olosuhteissa, jotta tulokset olisivat mahdollisimman vertailukelpoisia. Opinnäytetyön viitekehystä kirjoitettaessa käytettiin pääasiassa mahdollisimman uusia kansainvälisiä tutkimusartikkeleita, jotka oli haettu tunnettujen lehtitietokantojen kautta erilaisista tieteellisistä julkaisuista. Uusien ja luotettavien lähteiden käyttö teoriapohjan materiaalina lisäsi tutkimuksen luotettavuutta.

Työstä saatujen tulosten perusteella voidaan sanoa, että SERM-yhdisteiden avulla voidaan vaikuttaa makrofaagisolujen toimintaan sekä reportterigeenien aktiivisuuteen ja vaikutuksia voidaan tutkia käytettyjen reportterisolumallien avulla. Tutkittavilla SERM-yhdisteillä oli toisistaan poikkeavia vaikutuksia solujen NF- $\kappa$ B- ja IRF-aktiivisuuteen sekä typhen oksidien tuottoon. SERM-7 ja joissain tapauksissa SERM-2 olivat tulosten perusteella pääasiassa tulehdusvasteita vaimentavia ja SERM-8 niitä

aktivoiva. Muiden SERM-yhdisteiden vaikutukset olivat jonkin verran epäselvempiä, mutta niiden aiheuttamat vasteet olivat melko lähellä estradiolin (10 nM) aikaansaamia vasteita. E2 vaikutti läsnäolollaan jonkin verran SERM-yhdisteiden toimintaan ja osa yhdisteistä saattoi toimia eri tavoin estradiolittomissa olosuhteissa. Myös SERM-yhdisteen pitoisuudella oli merkitystä reportteriaktiivisuuteen. Eri E2-pitoisuuksien havaittiin lisäävän sekä IRF- että NF- $\kappa$ B-aktiivisuutta eli E2:n fysiologisilla pitoisuuksilla oli niin sanottu ylläpitovaikutus kaikissa soluissa. Pitoisuuden kasvattaminen ei juurikaan enää vaikuttanut reportterigeenien aktiivisuuteen.

Opinnäytetyön tutkimustulokset olivat pääosin linjassa tutkimusryhmän toisella reportterisolulinjalla tekemän aikaisemman tutkimuksen kanssa. Tuloksista on kuitenkin havaittavissa, että keskihajonnat ovat paikoin melko suuria, mikä voi johtua tutkimuksen suorittajan kokemattomuudesta ja tästä aiheutuvista mahdollisista virheistä tai epätarkkuuksista. Vaikka opinnäytetyöhön liittyviä menetelmiä oli harjoiteltu jonkin verran jo ennen tutkimuksen aloittamista, on pitkäaikaisen kokemuksen puute kuitenkin saattanut vaikuttaa osaltaan tulosten tarkkuuteen sekä toistuvuuteen ja sitä kautta luotettavuuteen. Lisäksi epätarkkuuksia on voinut aiheuttaa esimerkiksi solujen epätasainen jakautuminen ja kasvu 96-kuoppalevyn kaivoissa, ilmakuplat tuloksia mitatessa ja pipetistä johtuvat pipetointiepätarkkuudet.

Rajallisesta aikataulusta johtuen monien yhdisteiden vaikutukset voitiin mitata vain yhdessä 96-kuoppalevysarjassa. Useimmat toistot olisivat tukeneet tulosten luotettavuutta sekä mahdollisesti helpottaneet tulosten tulkintaa. Lisäksi olisi ollut hyvä tutkia enemmän LPS:n vaikutusta vehikkeliryhmän soluihin parempaa vertailtavuutta varten. Tulokset ovat kuitenkin mahdollisesti sellaisenaankin käytettävissä Turun yliopiston tutkimusryhmän tekemää työtä varten, mikä edistää osaltaan SERM-yhdisteillä tehtävää tutkimusta.

SERM-yhdisteiden tutkimus on tärkeää, sillä pitkäaikaisessa käytössä hormonikorvaushoidoilla voi olla haittavaikutuksia, kuten mahdollisesti suurentunut rintasyöpä- ja veritulppariski (Umland ym. 2016, Xu ym. 2016). SERM:iien avulla sen sijaan voidaan tulevaisuudessa pyrkiä yhä paremmin korvaamaan tällaiset hoitomuodot ja kehittämään kudosselektiivisiä lääkkeitä, joilla on estrogeenin hyödylliset ominaisuudet ilman sen haittoja (Riggs & Hartmann 2003). Tutkimusten alkuvaiheiden soluviljelymenetelmillä tehtyjä *in vitro* -kokeita voidaan käyttää apuna muodostettaessa hypoteeseja ja arvioita lääkkeiden toiminnasta elimistössä (Carter & Shieh 2015). On kuitenkin tärkeää testata hypoteeseja myös *in vivo*, sillä ei voida olettaa viljeltyjen

immortalisoitujen solujen käyttäytyvän täysin samoin kuin elimistön solut ja kudokset. Jatkossa Turun yliopistolla tehtävässä tutkimuksessa onkin tarkoitus tarkastella tulehdukseen liittyvien geenien ilmenemistä ja myöhemmin kiinnostavimmat yhdisteet pitää tutkia asianmukaisissa eläinmalleissa.



## LÄHTEET

Allard, S.T.M. & Kopish, K. 2008. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes* 21: 23–26. Promega Corporation.

Andreaskos, E., Sacre, S.M., Smith, C., Lundberg, A., Kiriakidis, S., Stonehouse, T., Monaco, C., Feldmann, M. & Foxwell, B.M. 2016. Distinct pathways of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood*, Vol. 103, No. 6: 2229–2237.

Bakour, S.H. & Williamson, J. 2015. Latest evidence on using hormonal replacement therapy in the menopause. *The Obstetrician & Gynaecologist* 17: 20–28.

Carter, M. & Shieh, J. 2015. Chapter 14 – Cell Culture Techniques. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*. Academic Press, 295–310.

Celojevic, D., Petersen, A., Karlsson, J.-O., Behndig, A. & Zetterberg, M. 2011. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on proliferation, cell viability and intracellular redox status in native human lens epithelial cells. *Molecular Vision* 17: 1987–1996.

Draijer, C., Hylkema, M.N., Boorsma, C.E., Klok, P.A., Robbe, P., Timens, W., Postma, D.S., Greene, C.M. & Melgert, B.N. 2016. Sexual maturation protects against development of lung inflammation through estrogen. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 310: 166–174.

Dutertre, M. & Smith C.L. 2000. Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) Action. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 295, No. 2: 431–437.

Egger G. 2012. In Search of a Germ Theory Equivalent for Chronic Disease. *CDC - Preventing Chronic Disease*, Vol. 9: 1–7 (110301).

Ferguson, L.R. 2010. Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutation Research* 690: 3–11.

Gilroy, D. & De Maeyer, R. 2015. New insights into the resolution of inflammation. *Seminars in Immunology* 27: 161–168.

Ginhoux, F. & Jung, S. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14: 392–404.

Günthner, R. & Anders, H.-J. 2013. Interferon-Regulatory Factors Determine Macrophage Phenotype Polarization. *Mediators of Inflammation*, Vol. 2013: 1–8.

Haim, Y.O., Unger, N.D., Souroujon, M.C., Mittelman, M. & Neumann, D. 2014. Resistance of LPS-activated bone marrow derived macrophages to apoptosis mediated by dexamethasone. *Nature Scientific Reports* 4: 1–10 (4323).

Headland, S.E. & Norling, L.V. 2015. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology* 27: 149–160.

Heino, J. & Vuento, M. 2010. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 2. uudistettu painos. Helsinki: WSOY.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2015. *Tutki ja kirjoita*. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Härkönen, P.L. & Väänänen, H.K. 2006. Monocyte-Macrophage System as a Target for Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1089: 218–227.

- Inki, P. 2015. Ospemifeeni. Sic! Lääketietoa Fimeasta 3. Viitattu 29.5.2016 [http://sic.fimea.fi/arkisto/2015/3\\_2015/vain-verkossa/uutta-laakkeista-ospemifeeni](http://sic.fimea.fi/arkisto/2015/3_2015/vain-verkossa/uutta-laakkeista-ospemifeeni).
- InvivoGen 2016a. J774-Dual Cells. Viitattu 13.5.2016 [http://www.invivogen.com/PDF/J774\\_Dual\\_TDS.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/J774_Dual_TDS.pdf)
- InvivoGen 2016b. Reporter Cell Lines. Viitattu 25.4.2016 <http://www.invivogen.com/reporter-cells>
- Järveläinen, H.A. & Miettinen, M. 2001. Bakterirakenteiden aiheuttama akuutti tulehdusvaste. Duodecim 117: 2015–2022. <http://www.terveysportti.fi/xmedia/duo/duo92541.pdf>
- Kalaitzidis, D. & Gilmore, T.D. 2005. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF- $\kappa$ B. Trends in Endocrinology and Metabolism, Vol.16, No.2: 46–52.
- Kidd, B.A. & Dudley, J.T. 2016. Chapter 1 – Systems Immunology. Teoksessa, Tan, S. (toim.) Translational Immunity, Mechanisms and Pharmacologic Approaches. Academic Press, 3–44.
- Kovats, S. 2015. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. Cellular Immunology 294: 63–69.
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A. & Merad, M. 2015. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. Nature Reviews Immunology 15: 731–744.
- León-Pedroza, J., González-Tapia, L.A, del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G. & González-Chávez, A. 2015. Low-grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: From the molecular evidence to the clinical practice. Cirugía y Cirujanos 83(6): 543–551.
- Lääkeinfo.fi 2015. Faslodex injektioneste, liuos 250 mg/5 ml. Viitattu 29.5.2016 [http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=10930&i=ASTRAZENECA\\_FASLODEX](http://www.laakeinfo.fi/Medicine.aspx?m=10930&i=ASTRAZENECA_FASLODEX)
- MacMicking, J., Xie, Q. & Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. Annual Review of Immunology 15: 323–350.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B. & Roitt, I. 2006. Immunology. 7. painos. Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Martín-Millán, M. & Castañeda, S. 2013. Estrogens, osteoarthritis and inflammation. Joint Bone Spine 80: 368–373. Elsevier Masson SAS on behalf of the Société Française de Rhumatologie.
- Michael, H., Härkönen, P.L., Kangas, L., Väänänen, H.K. & Hentunen, T.A. 2007. Differential effects of selective oestrogen receptor modulators (SERMs) tamoxifen, ospemifene and raloxifene on human osteoclasts *in vitro*. British Journal of Pharmacology 151: 384–395.
- Mitchell, B. 2016. Using Turner Biosystems instruments for the secreted alkaline phosphatase assay. Promega Technical Support Materials. Viitattu 25.4.2016 <https://fi.promega.com/products/pm/fluorometers-luminometers-multimode-readers/technical-support-materials/>
- Moticka, E.J. 2016. Chapter 1 – Innate Host Defense Mechanisms and Adaptive Immune Responses. A Historical Perspective on Evidence-Based Immunology. Elsevier, 1–8.
- Nilsson, S. & Gustafsson, J-Å. 2011. Estrogen Receptors: Therapies Targeted to Receptor Subtypes. Clinical Pharmacology & Therapeutics, Vol. 89 No. 1: 44–55.
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. 2009. The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, Vol. 1, Issue 4: 1–14 (a000034).

Pakanen, A-M. 2014. CAR- ja PXR-tumareseptorien kloonaminen eri lajeista ja niiden toiminnan tutkiminen. Opinnäytetyö. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Kuopio: Savonia ammattikorkeakoulu.

Promega 2009. Griess Reagent System Technical Bulletin. Viitattu 25.4.2016 <https://fi.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol/>

Quaedackers, M.E., van den Brink, C.E., van der Saag, P.T. & Tertoolen, L.G.J. 2007. Direct interaction between estrogen receptor  $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in the nucleus of living cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 273: 42–50.

Ravi, S., Mitchell, T., Kramer, P.A., Chacko, B. & Darley-Usmar, V.M. 2014. Mitochondria in monocytes and macrophages-implications for translational and basic research. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 53: 202–207.

Riggs, B.L. & Hartmann, L.C. 2003. Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *New England Journal of Medicine* 348: 618–629.

Salminoja, M. 2013. Nitraattilannoituksen vaikutus metsämaan mikrobimassaan FIA-analysointilla tutkittuna. Opinnäytetyö. Laboratorioalan koulutusohjelma. Helsinki: Metropolia ammattikorkeakoulu.

Sarna, S. 2007. Biostatistiikkaa lyhyesti. Kurssimateriaali. Helsinki: Helsingin yliopisto. <http://www.kttl.helsinki.fi/sarna/Biostatistiikkaa%20lyhyesti.pdf>

Schultz, U., Kaspers, B. & Staeheli, P. 2004. The interferon system of non-mammalian vertebrates. *Developmental and Comparative Immunology* 28: 499–508.

Shivers, K-Y., Amador, N., Abrams, L., Hunter, D., Jenab, S. & Quiñones-Jenab, V. 2015. Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity. *Cytokine*, Vol. 72, Issue 2: 121–129.

Sigma-Aldrich 2016. Charcoal, Dextran Coated – Product Information Sheet. Viitattu 12.5.2016 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6241?lang=fi&region=FI>

Silvennoinen, O. & Hurme, M. 2003. Uutta sytokiineista. *Duodecim* 2003; 119: 773–779. <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo93535.pdf>

Terveyskirjasto 2016a. DMSO. Viitattu 12.5.2016 [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Ilt00577](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt00577)

Terveyskirjasto 2016b. Estrogeenireseptori. Viitattu 11.5.2016 [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=Ilt00776](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Ilt00776)

ThermoFisher Scientific 2015a. Pierce™ BCA Protein Assay Kit > Manuals. Viitattu 25.4.2016 [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UU.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UU.pdf)


ThermoFisher Scientific 2015b. Stable Transfection. Viitattu 2.6.2016 <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/stable-transfection.html>

Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D.J. 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1843: 2563–2582.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Helsinki. Viitattu 24.4.2016 [http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)

- Umland, E.M., Karel, L. & Santoro, N. 2016. Bazedoxifene and conjugated equine estrogen: A combination product for the management of vasomotor symptoms and osteoporosis prevention associated with menopause. Accepted Article.
- van Furth, R. & Cohn, Z.A. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.*, 128: 415–435.
- Vegeto, E., Bonincontro, C., Pollio, G., Sala, A., Viappiani, S., Nardi, F., Brusadelli, A., Viviani, B., Ciana, P. & Maggi, A. 2001. Estrogen Prevents the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Microglia. *The Journal of Neuroscience* 21: 1809–1818.
- Vilkka, H. 2007. Tutki ja mittaa: Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.
- Villa, A., Rizzi, N., Vegeto, E., Ciana, P. & Maggi, A. 2015. Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Nature Scientific Reports* 5: 1–14 (15224).
- Verma, A. 2014. Chapter 12 – Animal Tissue Culture: Principles and Applications. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Academic Press, 211–231.
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S. & Marc, J. 2014. The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica* 24(3): 329–342.
- Watson, C.S., Jeng, Y-J. & Kochukov, M.Y. 2008. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22(9): 3328–3336.
- Xu, B., Lovre, D. & Mauvais-Jarvis, F. 2016. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. *Biochimie* 124: 92–97.
- Zhang, J-M. & An, J. 2007. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics* 45(2): 27–37.
- Zhang, Y., Choksi, S. & Zhenggang, L. 2015. Chapter 12 – Autophagy Is Required During Monocyte–Macrophage Differentiation. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Vol. 7: *Role of Autophagy in Therapeutic Applications*: 195–206. Academic Press.

# Toimeksiantosopimus



**TURUN AMMATTIKORKEAKOULU**  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

**OPINNÄYTETYÖN**  
**TOIMEKSIANTOSOPIMUS**

1

---

**OPISKELIJAN TIEDOT**

Nimi Anu Wiklund

Osoite \_\_\_\_\_

Puhelin koti \_\_\_\_\_ Puhelin työ \_\_\_\_\_

Sähköposti \_\_\_\_\_

Koulutusohjelma Bioanalyttikkokoulutus

**OPINNÄYTETYÖ**

Aihe/työnimi Myeloidien solujen tulendusrusteen  
estrogeenireseptorivälitteisen säätelyn  
määrittäminen tutkimus

Aikataulu 7.1.2016 - 31.3.2016

**TOIMEKSIANTAJA**

Organisaatio Turun yliopisto, lääket. tdk, biolääket. ts. / solubiologian  
pi. osasto

Työn ohjaaja / yhteys henkilö Jorma Mäntylä

Osoite Kivimiehenkatu 10, 20520 Turku

Puhelin 02 333 7356 Sähköposti \_\_\_\_\_

**OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT**

Ohjaava opettaja Sanna Virtanen

Puhelin \_\_\_\_\_ Sähköposti \_\_\_\_\_

**Turun ammattikorkeakoulu**  
Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku  
puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791  
sposti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi

### OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT\*

#### OHJAUS JA VASTUUT

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajorganisaation näkökulmasta.

#### OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

#### TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki- osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

#### TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisien toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen aiottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Tarkelehtiä tietoja Forensko Plannun yhdistykseltä

### OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTAYLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

19/2/2016

19/2/2016

*Ann Wikkilä*

Opiskelija

*J. J. J.*

Toimeksiantaja

### LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

\* Turun ammattikorkeakoulun toiminnan yhtiöittämistä vuoden 2014 alusta valmistellaan. Osakeyhtiön toiminnan alettua tämä sopimus siirtyy Turun AMK:n toiminnan vastaanottavalle yhtiölle.

## Liite 2 Solujen kasvatusliuokset (mediumit)

### J774-Dual kasvatusmedium – (100 ml):

1 ml	Glutamax 100x
1,75 ml	glukoosiliuos
1 ml	PenStrep 100x
10 ml	iFBS
86 ml	DMEM 11880 1x
0,2 ml	Normocin

### J774-Dual kasvatusmedium + (100 ml):

1 ml	Glutamax 100x
1,75 ml	glukoosiliuos
1 ml	PenStrep 100x
10 ml	iFBS
86 ml	DMEM 11880 1x
0,5 ml	Normocin
50 µl	Blasticidin
100 µl	Zeocin

Mediumien säilytys jääkaapissa +4°C

## Liite 3 Solulaskut

### Solujen valmistelu jakoa varten:

1. Poistetaan vanha kasvatusliuos ja lisätään noin 5 ml uutta liuosta
2. Irrotetaan solut T75-pullon pohjasta lastalla raaputtamalla
3. Mikäli T75-pulloja on useampia, yhdistetään niiden solut kasvatusliuokseen yhteen Falcon-putkeen ja sentrifugoidaan 5 min 1000 rp
4. Poistetaan medium solunappia rikkomatta
5. Lisätään 5 ml uutta mediumia ja suspensoidaan solunappi

### Solujen laskeminen Bürkerin kammiolla:

1. Pipetoidaan 10  $\mu$ l (mediumiin laimennettua) solususpensiota laskukammion peitinlasin alle
2. Lasketaan 4 A-ruutua solutiheyden määrittämistä varten
3. Lasketaan tulosten keskiarvo
4. Lasketaan näytteen solutiheys kaavoilla:

$$c \text{ (solua/ml)} = ka * \text{laimennoskerroin} * 10000$$

$$n \text{ (solua)} = \text{laskettu solutiheys (c)} * \text{solususpension tilavuus (V)}$$

### Solujen jakaminen:

Jokaiseen T75-pulloon lisätään noin  $1,0 * 10^6$  solua ja 12 ml kasvatusmediumia – tai +.

Esimerkki: Jos solujen tiheys on  $2,0 * 10^6$  solua/ml, lisätään T75-pulloon 0,5 ml solususpensiota ja 12 ml kasvatusmediumia.

### 96-kuoppalevyjen valmistus:

Lisätään noin 6000 solua/100 ml jokaiseen kaivoon. Blankki B7–B11, reunoilla 250  $\mu$ l PBS. Kuoppia on siten levyltä yhteensä käytössä 55, jolloin solususpensiota tarvitaan vähintään 5,5 ml. Laimennuksessa käytetään aina J774-Dual kasvatusmediumia – .

Esimerkki: Jos solujen tiheys on  $1,0 * 10^6$  solua/ml, on laimennossuhde  $\frac{1,0 * 10^6 / \text{ml}}{6\ 000 \text{ ml}} \approx 17$  eli 1 ml solususpensiota ja 16 ml mediumia tai esimerkiksi 0,5 ml solususpensiota ja 8 ml mediumia.



## Liite 4 Työohje lusiferaasi- ja SEAP-mittaukset

### Lusiferaasimittaus:

1. Valmistetaan Quanti-Luc-analyysireagenssi Invivogenin ohjeen mukaan [http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI\\_Luc.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI_Luc.pdf):
  - Kaada Quanti-Luc-pakkauksen sisältö 50 ml:n astiaan ja lisää 25 ml steriiliä vettä
  - Sekoita, kunnes jauhe on kokonaan liuennut
  - Käytä liuos heti tai säilytä 1 viikko +4°C:ssa tai 1 kuukausi -20°C:ssa
2. Lisätään valkoisille optisille 96-kuoppalevyille 20 µl käsiteltyjen solujen mediumia
3. Otetaan Quanti-Luc-liuosta erilliseen pulloon noin 10 ml, sillä Victor annostelee reagenssin itse
4. Luetaan tulokset Victorilla Lucia in vitro -ohjelmalla

### SEAP-mittaus:

1. Valmistetaan Quanti-Blue-analyysireagenssi Invivogenin ohjeen mukaan [http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI-Blue\\_TDS.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/QUANTI-Blue_TDS.pdf):
  - Kaada Quanti-Blue-pakkauksen sisältö 250 ml:n astiaan ja lisää 100 ml deionisoitua tai tislattua vettä
  - Sekoita, kunnes jauhe on kokonaan liuennut
  - Filtröi liuos 0,2 µm membraanin läpi 250 ml:n steriiliin astiaan
  - Lämmitä liuos +37°C:een ennen käyttöä
  - Säilytys 2 viikkoa +4°C:ssa tai 2 kuukautta -20°C:ssa, suojattava valolta
2. Lisätään 96-kuoppalevyille 30 µl käsiteltyjen solujen mediumia
3. Lisätään jokaiseen kaivoon 170 µl Quanti-Blue-reagenssia
4. Inkuboidaan levyjä noin tunti tai kunnes värireaktio on tarpeeksi voimakas
5. Luetaan tulokset Victorilla Vesa 650 -ohjelmalla

## Liite 5 Työohje NO<sub>2</sub>-määritys

### Promega Griess Reagent System:

50 ml	Sulfanilamide solution (2 x 25 ml)
50 ml	NED solution (2 x 25 ml)
1 ml	Nitrite standard (0,1 M Sodium nitrite)

### Työn kulku:

HUOM! Jokaisessa analyysissä tulee tehdä nitriitin standardin referenssisuora!

1. Valmistetaan 1 ml 100 µM:sta nitriittiliuosta laimentamalla reagenssipakkauksen mukana tullut 0,1 M nitriittistandardiliuos suhteessa 1:1000 tutkimuksessa käytettyyn kasvatusmediumiin tai bufferiin (käytetty J774-Dual – -mediumia)
2. 96-kuoppalevyn kaksi ensimmäistä pystyriviä käytetään nitriitin standardin referenssisuoraa varten:
  - Rivien B-H kaivoihin lisätään 50 µl mediumia
  - Rivin A kaivoihin lisätään 100 µl valmistettua 100 µM:sta nitriittiliuosta
  - Pipetoidaan rivin A kaivoista 50 µl rivin B kaivoihin ja edelleen rivin B kaivoista 50 µl rivin C kaivoihin jne. Riville H ei lisätä nitriittiliuosta. Laimennokset ovat tällöin 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 ja 0 µM
  - Jokaisen nitriittistandardin kaivon lopullinen tilavuus on siis 50 µl, nitriittikonsentraatiovälillä 0–100 µM
3. Annetaan sulfaniilamidiliuoksen ja NED-liuoksen lämmitä ja tasaantua huoneenlämpöiseksi 15–30 minuuttia
4. Lisätään 50 µl tutkittavaa näytettä kaivoihin (esim. duplikaattina)
5. Pipetoidaan sulfaniilamidiliuosta kaikkiin näytekaivoihin, myös standardeille
6. Inkuboidaan huoneenlämmössä valolta suojattuna 5–10 minuuttia
7. Pipetoidaan NED-liuosta kaikkiin näytekaivoihin
8. Inkuboidaan huoneenlämmössä valolta suojattuna 5–10 minuuttia, violetti väri alkaa muodostua heti
9. Mitataan absorbanssi 30 minuutin sisällä 520–550 nm:n filtterillä (käytetty 540 nm) Victorilla ja verrataan tuloksia referenssisuoraan

## Liite 6 Työohje proteiininmääritys

### Pierce BCA Protein Assay Kit:

500 ml	BCA Reagent A: sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0,1 M sodium hydroxide
25 ml	BCA Reagent B: 4% cupric sulfate
10 × 1ml	Albumin Standard Ampules 2 mg/ml: bovine serum albumin (BSA) at 2 mg/ml in 0.9 % saline and 0.05 % sodium azide

### Työn kulku:

1. Pipetoidaan 100 µl/kaivo ALP-lyysisbufferia pakastetuille 96-kuoppalevyille
2. Annetaan olla tasosekoittajalla noin 30–45 minuuttia
3. Valmistetaan standardit sarjalaimennoksina sopivaan liuokseen (käytetty ALP):
  - 1) 2 mg/ml = 20 µl stokkia (100 mg/ml BSA) + 980 µl ALP
  - 2) 1,5 mg/ml = 750 µl laimennosta 1 + 250 µl ALP
  - 3) 1 mg/ml = 667 µl laimennosta 2 + 333 µl ALP
  - 4) 750 µg/ml = 750 µl laimennosta 3 + 250 µl ALP
  - 5) 500 µg/ml = 667 µl laimennosta 4 + 333 µl ALP
  - 6) 250 µg/ml = 500 µl laimennosta 5 + 500 µl ALP
  - 7) 125 µg/ml = 500 µl laimennosta 6 + 500 µl ALP
  - 8) 25 µg/ml = 200 µl laimennosta 7 + 800 µl ALP
4. Pipetoidaan 25 µl jokaista standardia ja tutkittavaa näytettä duplikaatteina uusille 96-kuoppalevyille
5. Valmistetaan WR (working reagent) pakkauksen reagenteista A ja B suhteessa 50:1 (A:B)
6. Pipetoidaan 200 µl WR/kaivo
7. Inkuboidaan levyjä +37°C:ssa vähintään 30 minuuttia, kunnes värireaktio on tarpeeksi selkeä
8. Mitataan absorbanssit Multicalc-sovelluksen ja Victorin BCA2-ohjelman avulla

## Liite 7 ALP-lyyispuuskuri

### Valmistusohje (500 ml):

3,9405 g      50 mM Tris-HCl (MW 157,6)

4,506 g      0,9 % NaCl

500 µl      0,1 % Triton X-100

Mitataan pH ennen Tritonin lisäystä. Jos liuos on esimerkiksi liian hapan, lisätään lipeää (NaOH) kunnes lopullinen pH on 7,6. Lisätään Triton ja sekoitetaan huolellisesti sekoittajalla ennen käyttöä.