

Maria Tyni & Päivi Vainionpää

ENDOGEENISET OPIOIDIT STRESSIN MITTAAMISESSA

ENDOGEENISET OPIOIDIT STRESSIN MITTAAMISESSA

Maria Tyni & Päivi Vainionpää
Opinnäytetyö
Syksy 2017
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Tekijät: Maria Tyni, Päivi Vainionpää

Opinnäytetyön nimi: Endogeeniset opioidit stressin mittaamisessa

Työn ohjaajat: Simo Rasi, Paula Reponen

Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Syksy 2017

Sivumäärä: 37 + 4

Beta-endorfiini on elimistön tuottama mielihyvähormoni, jonka pitoisuus vaihtelee eri vuorokaudenaikoina. Stressi ja masennus ovat tiloja, joiden diagnosoimiseen ei ole olemassa yksiselitteistä mittaria. Tässä opinnäytetyössä oli tarkoituksena kehittää menetelmä beta-endorfiinipitoisuuksien määrittämiseksi kilpailevaa ELISA-menetelmää käyttäen ja selvittää, voiko beta-endorfiinia käyttää stressin ja/tai masennuksen merkkiaineena. Työn aihe saatiin toimeksiantajalta BioOption Oy:ltä.

Tutkittavana aineistona käytettiin olemassa olevia seerumi- ja sylkinäytteitä, jotka olivat peräisin sekä stressaantuneilta että ei-stressaantuneilta henkilöiltä. Beta-endorfiinipitoisuuksien mittaukset tehtiin ELISA-menetelmällä ja käytettiin kaksoisvasta-ainetekniikkaa. Saatuja mittaustuloksia verrattiin kirjallisuudesta löydettyihin tuloksiin sekä samoista näytteistä mitattuihin kortisolipitoisuuksiin.

Stressaantuneiden henkilöiden beta-endorfiini- ja kortisolipitoisuudet näyttivät noudattavan samansuuntaista vuorokausivaihtelua. Muiden mittauksien osalta ei pysty tekemään johtopäätöksiä. Kirjallisuudesta löydetty beta-endorfiinipitoisuuksien vuorokauden aikainen vaihtelu näyttää noudattavan stressaantuneilla henkilöillä yhtenäistä linjaa. Lisäksi käyttämämme mittausaineisto oli pieni ja kaikista mittauksista ei saatu tuloksia, joten siitä ei voi tehdä yleistettäviä johtopäätöksiä.

Beta-endorfiinin mittaumenetelmää voisi kehittää edelleen, jotta se olisi vähemmän herkkä erilaisille häiriötekijöille. Beta-endorfiinipitoisuudet ovat erittäin pieniä, kuten myös pipetoitavat näytemäärät, jolloin virheellisten mittaustulosten todennäköisyys kasvaa.

Asiasanat: endogeeniset opioidit, stressi, masennus, ELISA, beta-endorfiini

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Maria Tyni, Päivi Vainionpää
Title of thesis: Endogenous opioids in stress measurements
Supervisors: Simo Rasi, Paula Reponen
Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2017
Number of pages: 37 + 4

Beta-endorphin is an endogenous opioid, and its secretion follows a diurnal rhythm. There are no unambiguous methods for diagnosing stress and depression. The purpose of this study was to develop a method for measuring the beta-endorphin concentrations by using the competitive ELISA method, to find out if beta-endorphin can be used as a biomarker for stress and/or depression. The study was assigned by BioOption Oy.

The material in this study comprised of serum and saliva samples. The same samples were used in a previous study and they were collected from stressed and non-stressed persons. The beta-endorphin concentrations were measured with the competitive ELISA method, using the double antibody technique. The measured concentrations were compared to other studies and cortisol concentrations in measured from the same samples in previous studies.

The findings revealed that beta-endorphin and cortisol concentrations appear to have similar diurnal variation among stressed persons. Regarding the other measurements, too few results were gained to make further conclusions. In literature, beta-endorphin concentrations seem to follow a similar diurnal rhythm among stressed people. Furthermore, the amount of used serum and salive samples was small in this study, and results were not gained from all of the measurements: therefore generalized conclusions cannot be withdrawn.

The beta-endorphin concentration measurement method could be further developed so that it would be less sensitive to different distracting factors. Both beta-endorphin concentrations and pipetting sample amounts are extremely low, and thus the probability of incorrect measurement results is higher.

Keywords: endogenous opioids, stress, depression, ELISA, beta-endorphin

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	STRESSI, STRESSIHORMONIT JA ELIMISTÖN STRESSITASON MITTAAMINEN	8
2.1	Stressi	8
2.2	Masennus.....	9
2.3	Endogeeniset opioidit	11
2.3.1	Beta-lipotropiini	13
2.3.2	Beta-endorfiini.....	14
2.4	Stressitason mittaaminen	16
3	TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSMENETELMÄ.....	18
3.1	Tutkimuksen tarkoitus	18
3.2	Tutkimusmenetelmä: ELISA.....	18
4	TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN.....	20
4.1	Tutkitut näytteet.....	20
4.1.1	Kanien seeruminäytteet	20
4.1.2	Tutkimushenkilöiden seeruminäytteet.....	21
4.1.3	Tutkimushenkilöiden sylkinäytteet.....	21
4.2	Tutkimuksessa käytetyt reagenssit, materiaalit ja laitteistot	21
4.3	Näytteiden käsittely ja analysointi.....	22
4.4	Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi	23
5	TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY	24
5.1	Seerumin beta-endorfiinipitoisuus vs. seerumin kortisolipitoisuus.....	24
5.2	Syljen beta-endorfiinipitoisuudet.....	26
5.3	Tulosten vertailu olemassa oleviin tutkimuksiin	28
6	POHDINTA	29
	LÄHTEET.....	32
	LIITTEET.....	38

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön taustalla on Sanomalehti Kalevan toukokuun 23. päivän 2015 artikkeli ”Pelastaja vai suuri huijaus”. Artikkelissä käsiteltiin masennusta ja siihen liittyvää lääkehoitoa. Artikkelissa psykologi Aku Kopakkala kertoo, että masennuslääkkeitä käytetään liikaa ja niitä annetaan myös sellaisille, jotka eivät niistä oikeasti hyödy.

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli kehittää menetelmä beta-endorfiinipitoisuuksien määrittämiseksi kilpailevaa ELISA -menetelmää käyttäen. Lisäksi selvitimme, voiko beta-endorfiinia, joka kuuluu endogeenisiin opioideihin, käyttää stressin ja/tai masennuksen merkkiaineena. Tutkimuksessa oli tarkoitus mitata seerumi- ja sylkinäytteiden beta-endorfiinipitoisuuksia ELISA -menetelmällä ja verrata niitä aiempiin tehtyihin mittauksiin ja muihin stressimittareihin. Työn pohjana on Aho ym. opinnäytetyönä tehty tutkimus *Syljen alfa-amylaasientsyymin mittaus pitkäaikaisstressin diagnosoinnissa*. Käytimme mittauksissa heidän keräämiään seerumi- ja sylkinäytteitä.

Elimistössä esiintyvän beta-endorfiinin pitoisuus vaihtelee fysiologisten ja psykologisten tekijöiden vaikutuksesta. Stressitilanteessa aivolisäke-lisämunuaisakselin aktivoituminen saa hypotalamuksen erittämään mm. beta-endorfiinia. Beta-endorfiinin vaikutuksesta pelkovaste vähenee ja elimistö alkaa sopeutua stressiin.

Masennuksen ja stressin diagnosointi perustuvat molemmat oireiden tunnistamiseen sekä lääkärin tekemään haastatteluun. Molempiin tiloihin liittyy useita samanlaisia oireita, minkä vuoksi tiloja on vaikea erottaa toisistaan. Lääkehoidon kannalta olisi hyvä pystyä erottamaan oikeasti masentuneet henkilöt stressaantuneista.

Beta-endorfiinia vapautuu elimistöön myös luontaisesti, mutta stressin, sairauden tai muiden tekijöiden vaikutuksesta elimistön beta-endorfiinipitoisuus joko nousee tai laskee lepotilaan verrattuna. Beta-endorfiinin erittyminen elimistöön noudattaa vuorokausivaihtelua, pitoisuus on suurimmillaan aamulla ja pienimmillään myöhään illalla.

Pitkän tähtäimen suunnitelmana olisi kehittää sellainen testi, jolla on mahdollista erottaa masennuspotilaista sellaiset, jotka hyötyvät lääkähoidosta. Tällä saataisiin muun muassa huomattavaa yhteiskunnallista säästöä, sillä Suomessa masennuslääkkeitä syö yli 400 000 ihmistä. Masennuslääkkeet aiheuttavat myös huomattavia sivuvaikutuksia. Kopakkala syyttää artikkelissa myös lääkemyyjiä masennuslääkkeiden hyötyjen vääristämisestä, sillä ne itse tutkivat myymiään lääkkeitä. (Kopakkala, 2015.)

Työn idean taustalla on biotekniikka-alan yritys BioOption Oy ja sen omistaja Simo Rasi, joka toimi myös tämän opinnäytetyön ohjaajana. Yrityksen kautta saimme työhön myös tarvittavat materiaalit ja työohjeet tehtäviä määrittämiä varten. Mittaukset suoritettiin Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa.

2 STRESSI, STRESSIHORMONIT JA ELIMISTÖN STRESSITASON MITTAAMINEN

Stressi on ihmiselle normaali tila, jossa elimistö lisää voimavaroja selvitäkseen havaitusta uhkatekijästä. Stressin torjumisesta puhutaan paljon, mutta sitä on mahdotonta kenenkään täysin välttää. Stressaavan tilanteen ilmetessä aivoissa tapahtuu monimutkainen vuorovaikutus hormonien ja välittäjäaineiden välillä. Siinä kehossa tapahtuu useita fysiologisia ja biokemiallisia muutoksia, joiden avulla se on valmis taistelemaan ja pakenemaan. (Aldridge 2001, 93-95.) On joitakin fysiologia indeksejä, joita voidaan käyttää stressitilan mittaamisessa. Näitä ovat syke, parasympaattisen aktivaation taso levossa sekä syke- ja verenpaineaktiivisuus. (Puttonen 2006, viitattu 3.4.2017.)

2.1 Stressi

Stressillä tarkoitetaan tilaa, jossa ihmisen voimavarat sopeutua tilanteeseen ovat tiukoilla tai ylittyvät. Tällöin ihmiseen kohdistuu liikaa haasteita ja vaatimuksia. Jokaisella on erilainen kyky sietää ja vastustaa stressaavia tilanteita, joten reaktiot yksilöiden välillä vaihtelevat. Stressi voi kestää lyhyen aikaa tai olla pitkäaikaista, joka voi olla vaarallista. Stressin aiheuttajia on useita, kuten äkilliset muutokset elämässä, jatkuva kiire, työhön liittyvät ongelmat tai perheongelmat. (Mattiila, 2010, viitattu 16.3.2017.)

Monimutkainen stressireaktion kesto ärsykkeestä fysiologisiin ja psyykkisiin muutoksiin elimistössä kestää vain sekunnin murto-osan. Reaktion käynnistävä tekijä voi tulla stressille altistuneesta kehon osasta tai keskushermoston lähettämistä signaaleista. Aivojen hypotalamusosa saa varoitusmerkin aivojen kuorikerroksesta ja hypotalamuksen käskyjen avulla koko elimistö siirtyy valmiustilaan. Hypotalamuksen viesti kulkee lisämunuaisen ydinosaan, josta vapautuu adrenaliinia ja noradrenaliinia sekä lisämunuaisen kuoriosaa alkaa erittää kortisolia. Nämä hormonit siirtyvät verenkiertoon ja kulkeutuvat kaikkialle elimistöön. (Vartiovaara 2008, 29-30,68.)

Stressi jaetaan lyhytkestoiseen eli akuuttiin stressiin ja pitkäkestoiseen stressiin. Akuutissa stressitilanteessa keho reagoi samalla "taistele ja pakene" –järjestelmän aktivoitumisella kuin tuhansia vuosia sitten. Siinä verenkiertoon vapautuu glukoosia ja rasvahappoja, sydämen syke nousee sekä

kämmenet ja jalkapohjat hikoavat. Keho reagoi akuuttiin vaaraan, kuten pedon kohtaamiseen. Normaalisti näistä stressireaktioista palautuminen on nopeaa. (Puttonen 2006, viitattu 3.4.2017; Vartiovaara 2008, 29-30.) Pitkäkestoinen eli krooninen stressi on mekanismeiltaan monimutkaisempi ja siihen liittyy moninaisempia oireita. Pitkäkestoinen stressi on elimistölle vaarallisempaa ja se muun muassa aiheuttaa sairaspöissaoloja ja lisää sydän- ja verisuonisairauksien määrää. (Puttonen 2006, viitattu 3.4.2017.)

Stressitilan muuttuessa vakavaksi, seurauksena voivat olla masennus ja työuupumus (Mattiila 2010, viitattu 4.5.2017). Syynä siihen, että stressi muuttuu masennukseksi, on usein epäonnistuminen stressin säätelyssä. Stressin säätelyjärjestelmän korjautumista auttavat hoitomuodot auttavat myös lievittämään masennustilaa, koska sekä stressin että masennuksen taustalla on neurobiologien järjestelmä, jotka liittyvät glukokortikoidien aineenvaihduntaan, vaikutukseen ja signaalinvälitykseen. (Viinamäki, Lehto, Palvimo, Harvima, Valkonen-Korhonen, Koivumaa-Honkanen, Hintikka, Honkalampi & Niskanen 2012, viitattu 4.5.2017.)

2.2 Masennus

Masennuksella tarkoitetaan ohimenevää masentunutta mielialaa tai masennustilaa. Masennus voi olla myös erilaisten sairaustilojen tai psykologisten häiriöiden oire. Masennuksen ydinoireita ovat masentunut mieliala ja vaikeus tuntea mielihyvää. Muita oireita ovat mm. uupumus, unihäiriöt ja keskittymiskyvyttömyys. Masennus on tila, joka vaikuttaa henkilön kykyyn tehdä työtä, pitää yllä ihmissuhteita, selviytyä arjesta ja huolehtia itsestään. Masennustila voidaan diagnosoida vasta, kun eri olosuhteista riippumatta mieliala on alentunut yhtäjaksoisesti vähintään kaksi viikkoa. (Kampman, Heiskanen, Holi, Huttunen & Tuulari 2015, viitattu 3.4.2017.)

Masennukseen liittyy joukko tyypillisiä oireita, joiden perusteella masennus voidaan diagnosoida. Taulukossa 1 mainituista oireista vähintään neljän oireen tulee esiintyä yhtä aikaa kahden viikon ajan ja ainakin kaksi oireista 1-3. (Isometsä 2015, viitattu 3.4.2017.)

TAULUKKO 1. Masennustilan oireet. Diagnoosi edellyttää vähintään neljän oireen esiintymistä samanaikaisesti vähintään kahden viikon ajan. Oireista 1-3 tulee esiintyä vähintään kaksi. (Isometsä 2015, viitattu 3.4.2017.)

Masennustilan oireet

1. Masentunut mieliala
 2. Mielihyvän menetys
 3. Uupumus
 4. Itseluottamuksen tai itsearvostuksen menetys
 5. Kohtuuton itsekritiikki tai perusteeton syyllisyydentunne
 6. Toistuvat kuolemaan tai itsetuhoon liittyvät ajatukset tai itsetuhoinen käytös
 7. Päätämättömyyden tai keskittymiskyvyttömyyden tunne
 8. Psykomotorinen hidastuminen tai kiihtyneisyys
 9. Unihäiriöt
 10. Ruokahalun ja painon muutos
-

Masennuksen taustatekijöitä ovat perinnöllinen alttius, aivojen rakenteen poikkeavuudet, hermovälittäjäaineet sekä hermokasvutekijät. 1960 –luvulla masennuksen tutkimuksessa luotiin ns. monoamiinihypoteesi, jonka mukaan masennuksen taustalla olisi monoamiinien erityksen, erityisesti serotoniinin ja noradrenaliinin, mutta myös dopamiinin vajaatoiminta. (Isometsä & Karlsson 2015, viitattu 3.4.2017.)

Masennuksen taustalla on hypotalamuksen, aivolisäkkeen ja lisämunuaisen välisen yhteyden eli ns. HPA –akselin yliaktiivisuus. Kuormittava tai sopeutumista vaativa elämäntapahtuma eli ns. psykososiaalinen stressi aktivoi HPA –akselia. Elimistö reagoi kahden mekanismin kautta stressiin: autonominen hermosto vastaa nopeasta, akuutista reaktiosta erittämällä adrenaliinia ja noradrenaliinia, kun taas hypotalamus-aivolisäke-lisämunuaiskuori –akseli puolestaan säätelee pitkän aikavälin vaikutuksia erittämällä mm. kortisolia. Tavallisesti stressireaktio auttaa elimistöä sopeutumaan tilanteeseen ja palauttaa elimistön tasapainotilan. Mikäli stressi on henkilön voimavaroihin ja sopeutumiskykyyn nähden liian voimakasta tai liian pitkäaikaista saattaa henkilölle kehittyä depressio eli masennus. (Karlsson & Isometsä 2015, viitattu 3.4.2017.)

2.3 Endogeeniset opioidit

Endogeeniset opioidit ovat elimistössä esiintyviä peptidejä, jotka vaikuttava keskushermoston opioidireseptoreihin. (Duodecim 2016, viitattu 16.3.2017). Endogeeniset opioidit osallistuvat useisiin fysiologisiin ja elimistön sopeutumiseen liittyviin prosesseihin, kuten kipuun, stressiin, palkitsemiseen, tunteisiin, motivaatioon, ravintotottumuksiin ja lämpötilan säätelyyn. Näitä peptideitä löytyy usealta eri alueelta aivoista ja ne voivat toimia joko neurotransmittereinä tai neuromodulaattoreina. (Esel, Sofuoglu, Aslan, Kula, Yabanoglu & Turan 2001, viitattu 1.5.2017.)

Aivolisäkkeen valmistamat mielihyvää tuottavat peptidit, endorfiinit, ovat neurotransmittereitä. Kaikki tunnetut endorfiinit ovat pilkkoutumistuotteita, joiden esimuotoja ovat pro-opiomelanokortiini, proenkefaliini ja prodynorfiini (Solunetti 2006, viitattu 16.3.2017.) Endorfiineilla on morfiinin kaltaisia farmakologisia ominaisuuksia. Endorfiinit jaetaan kolmeen pääluokkaa, joita ovat enkefaliitit, dynorfiinit ja beta-endorfiinit. Lisäksi on muita peptidejä, jotka vaikuttavat opioidien tavoin. (Scheinin, Korpi & Pesonen 2014, Neuroaktiiviset peptidit.)

Stressi ja kipu ovat yleisimmät tekijät, jotka vapauttavat endorfiineja. Endorfiinit vaikuttavat lääkkeiden kuten morfiinin ja kodeiinin tavoin, mutta eivät aiheuta riippuvuutta. Kivun ja stressin tunteen vähentämisen lisäksi endorfiini aiheuttaa muun muassa hyvinvointitunteita ja edesauttaa immuunivastetta. Vapautuneen endorfiinin määrä vaihtelee yksilöittäin välillä. Myös perinnöllisyydellä on vaikutusta mm. beta-endorfiinin vapautumiseen ja määrään. Mahdolliset geneettiset variaatiot μ -opioidireseptoreissa voivat vähentää tai kokonaan estää beta-endorfiinin vapautumisen. (Stoppler, M. & Shiel, W. 2014, viitattu 16.3.2017; Bali, A., Randhawa, P.K. & Jaggi, A.S. 2014, viitattu 4.5.2017.)

Stressi voi lisätä myös useiden hormonien pitoisuutta seerumissa kuten glukokortikoidien, katekoliamiinien, kasvuhormonien ja prolaktiinin (taulukko 2). Näiden hormonien pitoisuus veressä voi nousta 2-5 kertaiseksi stressitilanteessa. (Ranabir, S. & Reetu, K. 2011, viitattu 30.4.2017.)

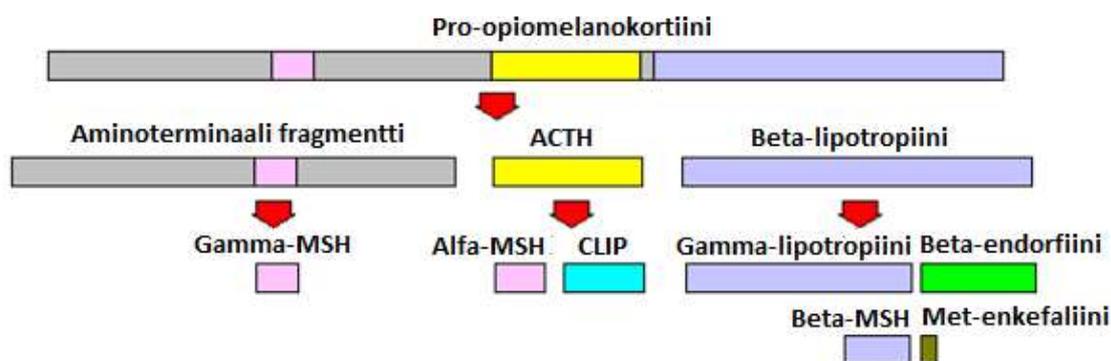
Stressitilanteessa aivolisäke-lisämunuaisakselin aktivoituminen saa hypotalamuksen erittämään kortikotropiinin vapauttajahormonia (CRH –hormonia), joka puolestaan lisää pro-opiomelanokortinigeenin (POMC –geeni) ekspressiota aivolisäkkeen etulohkossa muuttaen POMC:n adrenokortikotropiiniksi (ACTH) ja beta-endorfiiniksi. Beta-endorfiini sitoutuu manteliumakkeessa μ -opioidireseptoreihin, minkä vaikutuksesta pelkovaste vähenee ja elimistö alkaa sopeutua stressiin. Beta-

endorfiini vaikuttaa CRH vapautumiseen negatiivisen palautejärjestelmän kautta (Bali ym. 2014, viitattu 4.5.2017.)

Useat tutkimukset osoittavat, että ACTH:n ja beta-endorfiinin lisäksi aivolisäkkeen etulohkosta vapautuisi samanaikaisesti myös beta-lipotropiinia. Mutta se missä suhteessa beta-endorfiinia ja beta-lipotropiinia vapautuisi stressitilanteessa, on vielä epäselvää. Koe-eläimillä tehdyissä tutkimuksissa akuutissa stressissä verenkiertoon vapautuisi enemmän beta-endorfiinia kuin beta-lipotropiinia. Krooninen stressi taas puolestaan näyttäisi suosivan beta-lipotropiinin vapautumista. Tutkimuksissa myös todettiin, että beta-lipotropiini näyttäisi häviävän plasmasta hitaammin kuin beta-endorfiini stressaavan tilanteen jälkeen. (Young, Day, Schafer, Watson & Akil 1993, viitattu 1.5.2017; Young, Lewis & Akil 1986, viitattu 4.5.2017.) Kuviossa 1 on esitetty pro-opiomelanokortiinin metaboloituminen ACTH:ksi, beta-lipotropiiniksi ja beta-endorfiiniksi.

TAULUKKO 2. Stressiin liittyvät hormoniryhmät ja niiden erittämiä hormoneita.

Hormoniryhmä	Hormonit, esim.
glukokortikoidit	kortisoli
katekoliamiinit	adrenaliini, noradrenaliini ja dopamiini
kasvuhormonit	somatotropiini
endorfiinit	α -endorfiini, β -endorfiini (voimakkain), γ -endorfiini ja σ -endorfiini β -lipotropiini ACTH

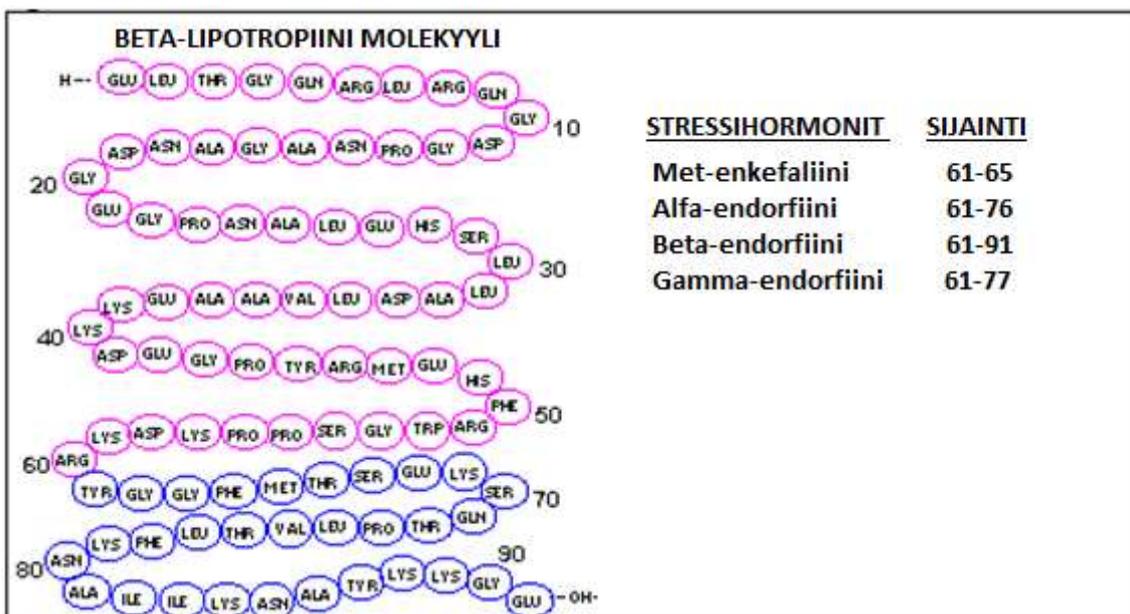


KUVIO 1. Pro-opiomelanokortiinin hajoaminen ACTH:ksi, beta-lipotropiiniksi ja beta-endorfiiniksi. (Mukaiillen Answers in Genesis 2017, viitattu 15.5.2017.)

2.3.1 Beta-lipotropiini

Beta-lipotropiini on 91 aminohapon pituinen ketjumolekyyli, joka metaboloituu elimistössä usealla eri tavalla muodostaen vaikutustavaltaan erilaisia peptidejä. Beta-lipotropiini kiihdyttää mm. rasva-aineenvaihduntaa. Aminohapot 41-58 muodostavat ns. beta-melanotropiinipeptidin, joka vaikuttaa ihon pigmentteihin. (Mäkelä, A. 2010, viitattu 30.4.2017.)

Beta-lipotropiinimolekyylin aminohapot 61-65 muodostavat met-enkefaliinipeptidin (Timmons & Hamilton 1990, viitattu 30.4.2017). Met-enkefaliini kuuluu enkefaliineihin, joilla on tärkeä rooli erilaisissa fysiologisissa toiminnoissa kuten kivun aistimisessa, elimistön reaktioissa stressiä vastaan sekä GI –kanavan toiminnassa (Murrin 2007, viitattu 1.5.2017). Aminohapot 61-76 muodostavat alfa-endorfiinipeptidin, aminohapot 61-79 muodostavat beta-endorfiinipeptidin ja aminohapot 61-77 muodostavat gamma-endorfiinipeptidin. Alfa-, beta- ja gamma-endorfiini ovat ns. stressihormoneita (kuvio 2). (Timmons & Hamilton 1990, viitattu 30.4.2017.)



KUVIO 2. Beta-lipotropiinimolekyyli sekä sen sisältämät stressiin reagoivat peptidit. (Mukaiillen Timmons & Hamilton 1990, viitattu 30.4.2017)

Beta-lipotropiinin pitoisuus veressä vaihtelee vuorokauden ajankohdan mukaan. Suurimmillaan pitoisuus on aamulla ja pienimmillään illalla. (Petraglia, Faccinetti, Parrini, Micieli, De Luga & Genazani 1983, viitattu 30.4.2017.)

TAULUKKO 3. Mitattuja seerumin beta-lipotropiinipitoisuuksia.

Tutkimus	aamu	ilta
Petraglia ym. 1983 (fmol/l)	6.3 ± 0.7	3.3 ± 0.4
Gibson ym. 1993 (pmol/l)	2.5 – 6.7	1.9 – 4.5

2.3.2 Beta-endorfiini

Beta-endorfiini on suuri molekyyli, jonka kemiallinen kaava on $C_{158}H_{251}N_{39}O_{46}S$ ja molekyylipaino 3465.003 g/mol (PubChem 2015, viitattu 1.5.2017). Beta-endorfiini on elimistön oma morfiiniopioidi, jonka pitoisuutta voidaan mitata verestä. Sen pitoisuus nousee merkittävästä esimerkiksi fyysisen harjoittelun yhteydessä. Beta-endorfiini on neuropeptidihormoni, joka muuntaa keskushermostojärjestelmän neuroneitten herkkyyttä ja muuttaa kivun välitystä, hengitystä, motorista aktiivisuutta, mielialaa ja aivolisäkkeen hormonineritystä. (Cravana, Medica, Ragonese & Fazio 2017, viitattu 4.5.2017.)

Seerumin beta-endorfiinipitoisuus noudattaa 24 tunnin sykliä (Jie, Yun-fei, Fang, Qian-hong, Hui & Rui 2017, viitattu 27.4.2017). Suurimmat beta-endorfiinipitoisuudet tavataan aamulla ja pienimmät illalla (Petraglia ym. 1983, viitattu 30.4.2017.) Sukupuolella näyttäisi olevan myös vaikutusta veren beta-endorfiinipitoisuuteen. Naisilla, joilla on säännöllinen kuukautiskierto, on mitattu beta-endorfiinipitoisuuksia 30.7 ± 5.8 pg/ml. Samassa tutkimuksessa miehillä mitattiin 12.2 ± 2.0 pg/ml beta-endorfiinipitoisuuksia. Vastasyntyneillä ei vastaavaa eroa tavattu, minkä vuoksi arvioidaan, että sukupuolinen kypsyminen ja sukupuolihormonien erityis vaikuttavat myös beta-endorfiinipitoisuuteen. (Furuhahsi, Takahahsi, Kono, Shinkawa & Suzuki 1984, viitattu 4.5.2017.)

Unirytmillä näyttäisi myös olevan vaikutusta seerumin beta-endorfiinipitoisuuteen. Henkilöt, joilla on normaali päivärhythmi (aktiivisia päivällä) endorfiinipitoisuus on korkeimmillaan klo 04.00 – 10.00 ja matalimmillaan klo 22.00 – 03.30. (McMurray, Hill & Field 1990, viitattu 15.5.2017.)

Eläimillä tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että plasman beta-endorfiinipitoisuus nousee 2-10 minuutin kuluttua kipua tuottavan ärsykkeen annon jälkeen ja se pysyy korkeana noin puolen tunnin

ajan (Guillemin, Vargo, Rossier, Minick, Ling, Rivier, Vale & Bloom 1977, viitattu 3.5.2017; Rasmussen & Farr 2008, viitattu 3.5.2017). Puoli tuntia ärsykkeen annon jälkeen beta-endorfiinipitoisuus saattaa olla yli 75 % perustason yläpuolella. (Guillemin ym. 1977, viitattu 3.5.2017.)

Vastaavasti koe-eläimillä, joille annettiin ei kipua tuottavia ärsykejä, beta-endorfiinipitoisuus nousi minuutin kuluttua ärsykkeen annosta, mutta palasi perustasolle jo 5 minuutin kuluttua ärsykkeen annon jälkeen. (Rasmussen & Farr 2008, viitattu 3.5.2017.)

Beta-endorfiinin roolista masennuksessa on olemassa useita kliinisiä tutkimuksia (N = 18, 1985-2000), mutta tulokset ovat osittain ristiriidassa keskenään. Näyttäisi kuitenkin, että masentuneilla henkilöillä beta-endorfiinitasot olisivat alemmat ei masentuneisiin verrattuna. Tehdyissä tutkimuksissa ei ole huomioitu henkilöiden sukupuolta, jolla saattaa olla merkitystä beta-endorfiinipitoisuuksiin. Muun muassa masentuneilla naisilla elimistön muu hormonitoiminta (mm. menopaussi) voi vaikuttaa myös endorfiinipitoisuuteen. (Hegadoren, O'Donnell, Lanius, Coupland & Lacaze-Masmontheil 2009, viitattu 3.5.2017.)

Ohion yliopistossa toteutettiin tutkimus, jossa mitattiin opiskelijoiden kokemaa stressiä. 55 opiskelijan seerumin ACTH, kortisoli ja beta-endorfiinipitoisuudet määritettiin tunnin välein sekä syksyllä että keväällä kuukausi ennen tenttijaksoa, tenttijakson aikana sekä kaksi viikkoa tenttijakson jälkeen. Tutkimuksen mukaan tenteistä aiheutuva stressi ei juurikaan vaikuttanut opiskelijoiden seerumin beta-endorfiinipitoisuuksiin. Seerumin beta-endorfiinipitoisuus oli keskimäärin 10 pmol/l muutoksen ollessa noin 1 pmol/l. (Malarkey, Pearl, Demers, Kiecolt-Glaser & Glaser 1994, viitattu 3.5.2017.)

Seerumin beta-endorfiinipitoisuuden muuttumisesta pitkittyvässä stressaavassa tilanteessa on ristiriitaisia tuloksia. Esimerkiksi alkoholisteilla kuukauden yhtäjaksoinen alkoholinkäyttö näyttäisi laskevan seerumin aamun beta-endorfiinipitoisuutta (36.7 pg/ml -> 32.5 pg/ml), mutta illan seerumin keskimääräinen beta-endorfiinipitoisuus näyttäisi nousevan (14.5 -> 18.9 pg/ml) (Esel ym. 2001, viitattu 12.5.2017).

Erään tutkimuksen mukaan (Hoffman, Watson, Wilson & Montgomery 1989, viitattu 15.5.2017) plasman beta-endorfiinia voidaan pitää traumaperäisen stressihäiriön (PTSD) merkkiaineena. Plasman beta-endorfiinipitoisuuden todettiin olevan traumaperäisestä stressihäiriöstä kärsivällä

potilaalla merkittävästi alhaisempi kuin kontrolliryhmäläisellä sekä aamulla (PTSD 4.2 pmol/l; kontrolli 6.1 pmol/l) että illalla (PTSD 3.5 pmol/l; kontrolli 5.3 pmol/l).

2.4 Stressitason mittaaminen

Henkilön kokemaa stressiä voidaan mitata psykologisilla testeillä, tietyillä fysiologisilla mittauksilla sekä veren, virtsan ja syljen entsyymiaktiivisuuden määrittämisellä. Psykologien kehittämien testien kysymykset kattavat laajan alueen psykologisia oireita, jotka aiheuttavat kroonista stressiä. Stressin fysiologisina mittareina voidaan pitää verenpainetta ja sykettä. Syljen kortisolista on tullut suosituin biomarkkeri, jota käytetään stressitutkimuksissa. (Fernand-Seguin Research Centre of Louis-H Lafontaine Hospital Quebec 2007, viitattu 3.4.2017.)

Glukokortikoidit vapautuvat lisämunuaisista ja niistä tärkein on kortisoli. Kortisolia erittyy selvästi eri määriä eri vuorokaudenaikoina. (Huslab 2016, viitattu 6.4.2017.) Syljen kortisolia on käytetty laajamittaisesti stressin biomerkkiaineena tutkimuksissa, erityisesti niissä, joissa tutkitaan psykologista stressiä toistuvissa mittauksissa. Syljen kortisolin mittaamiseen käytetään useita eri tekniikoita, kuten radioimmunologista menetelmää ja kromatografi-massaspektometriä. Syljen kortisolitasojen tulkinta riippuu tarkoista standardeista näytteenkeräysvälineissä, näytteenotto-protokollasta ja määrittästeknologiasta. (Inder, Dimenski & Russell 2012, viitattu 27.4.2017.)

Syljen kortisolipitoisuuksien mittaamiseen reaaliaikaisesti on jo kehitetty menetelmä. Mittaus perustuu älypuhelimella luettavaan kolorimetriseseen signaaliin. Näytetikun päässä oleva vanu kastellaan suussa syljellä, jonka jälkeen vanussa ollut sylki uutetaan puskuriliuokseen. Syljen sisältävää puskuriliuosta tiputetaan 2-3 pisaraa mukana olevalle kortisoliliuskalle. Prosessointiaika liuskalla on 10 minuuttia, jonka jälkeen liuska laitetaan puhelimeen liitettävään erilliseen lukijaan. Lukija valokuvaa näytteen ja määrittää syljen kortisolipitoisuuden kolorimetrisesti. Syljen kortisolipitoisuus saadaan puhelimen näytölle nanogrammoina millilitraa kohden. (Seoyeon, Soocheol, Jung-Sik, Jung-Hyun, Chulmin & Hyo-II 2014, viitattu 6.4.2017.)

Useat yritykset ovat tuoneet markkinoille sykevälivaihtelua mittaavia sykemittareita. Niitä markkinoidaan helppona keinona selvittää oman kehon stressaantuneisuutta sekä kuormittumisen ja palautumisen suhdetta. Sykevälivaihteluun vaikuttaa autonomisen hermoston toiminta ja erilaisilla

kuormittavilla tekijöillä, myös stressillä, on vaikutusta sykevälivaihteluun. Asiantuntijat kuitenkin sanovat, että sykevälivaihtelumittauksien tulkinta on haastavaa, eikä niistä voi suoraan tehdä johtopäätöksiä. Sykevälivaihteluun vaikuttavat myös haitalliset elintavat, kuten huono ruokavalio, tupakointi ja alkoholi, jotka jo itsessään ovat vaikuttamassa haitallisen stressin syntyyn. Lisäksi yksilöllistä vaihtelua on paljon perimästä johtuen. (Seppänen 2012, viitattu 3.5.2017.)

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSMENETELMÄ

Opinnäytetyömme alkuperäisenä tavoitteena oli kehittää menetelmä beta-lipotropiinin määrittämiseksi. Määrittämisessä oli tarkoitus käyttää kahta kanissa tuotettua eri vasta-ainetta, jotka on tuotettu beta-lipotropiinimolekyylin eri päihin. Menetelmänä kilpaileva ELISA. Toinen kanissa tuotetuista vasta-aineista oli tarkoitus kiinnittää kuoppalevyn pohjalle, jonka päälle laitettaisiin tutkittava näyte ja tämän päälle toinen kanissa tuotettu vasta-aine, joka on leimattu.

3.1 Tutkimuksen tarkoitus

Koska beta-lipotropiinin vasta-ainetuotanto epäonnistui johtuen immunisoidun kanin odottamattomasta kuolemasta, keskityimme jatkossa tutkimaan olemassa olevien (Aho ym. 2011) näytteiden beta-endorfiinipitoisuudet. Beta-endorfiinit ovat beta-lipotropiinin seuraava metaboliavaihe minkä vuoksi oli loogista siirtyä tutkimaan niitä. Beta-endorfiinipitoisuuksien määrittämiseksi oli tarkoitus kehittää määritysmenetelmä kilpailevaa ELISA –menetelmää käyttäen. Tavoitteena oli selvittää, voidaanko seerumin beta-endorfiinipitoisuutta pitää stressin merkkiaineena.

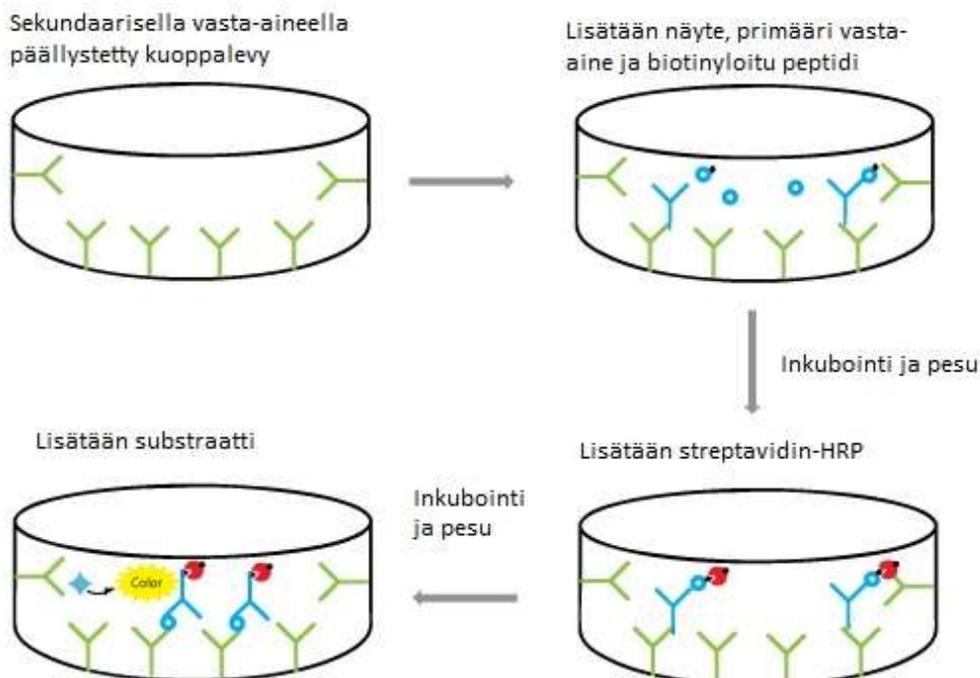
3.2 Tutkimusmenetelmä: ELISA

Beta-endorfiinipitoisuuksien mittaamiseen valikoitu ELISA –menetelmä, koska sillä on mahdollista määrittää äärimmäisen pieniä pitoisuuksia. Hormonipitoisuuksien mittaukset ovat haasteellisia, koska verenkierrossa hormoneita kiertää usein erittäin pieninä konsentraatioina (tyypillisesti piko- ja nanomooleina) ja veressä kiertävät muut aineet saattavat häiritä määritystä. (Boster 2017, viitattu 4.5.2017). ELISA –menetelmä on herkkä ja sensitiivinen ja soveltuu sekä seerumi- että sylkinäytteiden analysointiin minkä vuoksi se valikoitu käytetyksi tutkimusmenetelmäksi.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) on kuoppalevyyen perustuva tekniikka, jolla voidaan määrittää erilaisia aineita, kuten peptidejä, proteiineja, vasta-aineita ja hormoneja. ELISA -menetelmässä antigeeni tai vasta-aine on kiinnitetty kuoppalevyn pinnalle, johon lisättävä entsyymillä leimattu vasta-aine tai antigeeni kiinnittyy muodostaen kompleksin. Kompleksiin liittyvä substraatti

tuottaa mitattavan värireaktion. Määritys perustuu erittäin spesifiseen antigeeni-vasta-aine kiinnittymiseen. (Thermo Fisher Scientific 2017, viitattu 6.4.2017.)

ELISA -menetelmästä on erilaisia versioita ja tässä työssä käytettiin kaksoisvasta-aineeseen perustuvaa tekniikkaa (kuvio 3). Siinä kuoppalevy on päällystetty sekundaarivasta-aineella. Kuoppiin lisätään primääriä vasta-ainetta, joka tarttuu kuoppalevyssä olevaan vasta-aineeseen. Kuoppalevyille lisätään biotinyloitu peptidiä ja tutkittavaa näytettä, jotka kilpailevat kiinnittymisestä primääriin vasta-aineeseen. Inkuboinnin ja pesun jälkeen lisätään Streptavidin-HRP, joka tarttuu kiinni biotinyloituun peptidiin. Suoritetaan taas inkubointi ja pesu, lisätään substraatti TMB, joka katalysoi reaktion muuttaen sen siniseksi. Entsyymi-substraatti –reaktio pysäytetään suolahapolla (HCl) ja lopputuloksena on keltainen väri. Värin määrä on suoraan verrannollinen biotinyloidun peptidin määrään ja kääntäen verrannollinen mitattavan aineen pitoisuuteen. Näytteiden konsentraatiot saadaan selville vertailemalla tuloksia standardisuoraan. (MD Biosciences 2017, viitattu 6.4.2017.)



KUVIO 3. ELISA -menetelmän kuvaus. (Mukailten: MD Biosciences 2017, viitattu 4.5.2017.)

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

Työhön liittyvät laboratoriotyöt teimme koululla keväällä 2016. Tutkimusten analysoinnin ja työn raportoinnin saimme valmiiksi keväällä 2017. Määrittelyssä käytetyt standardit, vasta-aineet, substraatit ja kuoppalevyt saatiin työn toimeksiantajalta BioOption Oy:ltä. Muut tarvikkeet saatiin Oulun ammattikorkeakoululta. Absorbanssien mittaamiseen käytimme koulun Perkin Elmerin Victor™ X4 –spektrofotometriä. Tutkitut näytteet saatiin työn toimeksiantajalta.

Laboratoriotyöt teimme itse toimeksiantajamme ohjaamana. Työn ohjauksesta vastasi toimeksiantajamme Simo Rasi sekä koulun puolelta lehtori Paula Reponen ja yliopettaja Mika Paldanius. Työn opponoinnista vastasivat Sini Peltomäki ja Janne Appelgren.

4.1 Tutkitut näytteet

Beta-endorfiini –tutkimuksissa käytettiin aiemmin saatujen tutkimushenkilöiden seerumi- ja sylkinäytteitä. Seerumi- ja sylkinäytteet olivat samoja näytteitä kuin Aho ym. (2011) käyttivät *Syljen alfa-amylaasientsyymin mittaus pitkäaikaisstressin diagnosoinnissa* opinnäytetyössä.

Tutkimuksessa oli ollut mukana kymmenen henkilöä. Tulosten analysoinnin yhteydessä tutkimusjoukko oli jaettu kahteen ryhmään, stressaantuneihin (henkilöt B, D, G ja H) ja ei-stressaantuneihin (henkilöt A, C, E, F, I ja J) henkilökohtaisen haastattelun ja psykologin arvioinnin perusteella. Käytimme samaa ryhmittelyä beta-endorfiinitulosten analysoinnissa. Alkuperäiset näytteet oli jaettu kahteen osaan ja pakastettu. Molemmissa tutkimuksissa sekä meidän että Aho ym. käytettiin pakasesta sulatettuja näytteitä. Sylkinäytteet sentrifugoitiin ennen tutkimusta. Näytteet käytettiin laimentamattomina. Sylki- ja seeruminäytteistä mitataan aktiivista vapaana olevaa beta-endorfiinia.

4.1.1 Kanien seeruminäytteet

Kanien immunisoinnin tarkoituksena oli tuottaa kahta eri polyklonaalista vasta-ainetta. Immunisoinnissa käytettiin kahta kania, jotka tutkimuksia ja määrittelyä varten nimettiin ”punainen” ja ”musta” kani. Punaisen kanin immunisointiin käytettiin tyroglobuliinin konjugoitua peptidiä A ja mustan kanin peptidiä B. Aloitusannos oli 1,2 mg immunogeeniä (peptidi A tai peptidi B) sekoitettuna NaCl:iin ja

adjuvanttiin (FICA –liuos). Ensimmäinen tehoste annettiin kuukauden kuluttua ensimmäisestä immunisoinnista. Tällöin annos oli 0,6 mg immunogeeniä NaCl:iin ja adjuvanttiin sekoitettuna. Toinen tehoste (myös 0,6 mg immunogeeniä) annettiin kahden kuukauden kuluttua ensimmäisestä immunisoinnista. Immunisoinnissa liuotettu immunogeeni vedettiin ruiskuun ja takaisin useampia kertoja niin, että muodostui emulsiovahto, joka pistettiin kanin selän nahan alle useisiin kohtiin (vähintään 10). Verinäyte (noin 1 ml) otettiin kanin korvan isosta verisuonesta toisen tehosteen jälkeen noin kuukauden kuluttua.

4.1.2 Tutkimushenkilöiden seeruminäytteet

Aho ym. (2011) tutkimuksessa käytetyt verinäytteet oli otettu vakioidusti seerumigeeli –näyteputkiin. Näytteitä oli hydytetty vähintään puoli tuntia ennen sentrifugointia (15 min, 3000 rpm). Sentrifugoinnin jälkeen seerumit oli erotettu puhtaaseen putkeen ja pakastettu analysointipäivään asti. Verinäytteet oli otettu kahtena perättäisenä päivänä neljänä eri kellonaikana klo 12, 16, 20 ja 8, siten että ensimmäinen näyte oli otettu klo 12 ja viimeinen seuraavana aamuna klo 8.

4.1.3 Tutkimushenkilöiden sylkinäytteet

Sylinäytteet oli otettu Salivette –näytteenottoputkiin. Tutkimushenkilöt oli opastettu sylkinäytteen ottoon. Sylinäytteet oli sentrifugoitu kierrosnopeudella 2290 rpm kahden minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet oli pakastettu analysointiin asti.

Sylinäytteet oli otettu myös neljänä eri kellonaikana klo 12, 16, 20 ja 8, siten että ensimmäinen näyte otettiin klo 12 ja viimeinen seuraavana aamuna klo 8. Aamun näyte oli otettu puoli tuntia heräämisen jälkeen ennen aamupalaa ja hampaiden pesua. Klo 12 näytteet jätettiin tutkimatta, koska eivät mahtuneet samaan sarjaan.

4.2 Tutkimuksessa käytetyt reagenssit, materiaalit ja laitteistot

Seeruminäytteiden ja standardiliuosten valmistukseen käytettiin PBS + 1 % BSA –liuosta. PBS (=Phosphate Buffered Saline) on puskuroitu suolaliuos, jota käytetään yleisesti biologisissa tutki-

muksissa. PBS sisältää mm. natriumkloridia, kaliumkloridia, natriumvetyfosfaattia ja kaliumvetyfosfaattia. PBS –liuoksen pH on säädetty 7.4. PBS:ään lisätty BSA (= Bovine Serum Albumin) on naudun seerumista erotettua albumiinia. PBS –liuosta käytettiin yksinään kuoppalevyjen pesuun. Työssä käytettiin Thermo Fisher Scientificin Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP:tä (Lot 172592, Prod 21130). Streptavidin-HRP:tä käytetään biotiinilla leimattujen vasta-aineiden määrittämiseen ELISA:lla. Streptavidin sitoutuu kovalentisti HRP:hen (HRP = horseradish peroxidase). Streptavidin sitoutuu biotiiniin, johon konjugoituneen HRP:n aktiivisuus voidaan määrittää sopivalla substraattilla. (Thermo Fischer Scientific 2017, viitattu 6.4.2017) Käyttöliuoksena käytettiin 1:2500 laimennosta.

Työssä käytettiin substraattina Thermo Fisher Scientificin Pierce TMB Substrate Solutionia, jonka avulla HRP:n aktiivisuus voidaan mitata aallonpituudella 450 nm. Mittauksessa käytettiin Perkin Elmerin Victor™ X4 –spektrofotometriä.

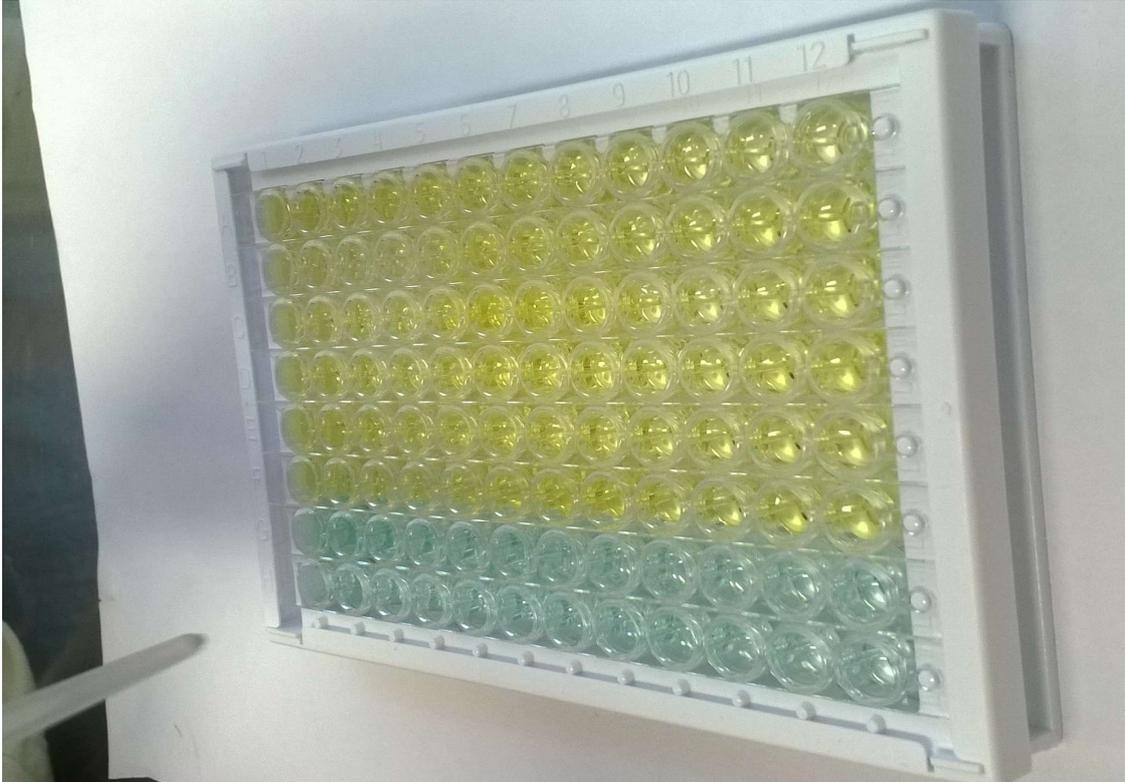
Tutkimuksessa käytettiin DELFIA®/AutoDELFIA™ Anti-rabbit IgG Microtitration Strips kuoppalevyjä (8x12 kuoppaa), jossa kuopat on päällystetty vuohessa tuotetuilla kanin IgG vasta-aineilla. Käytetyt kuoppalevyt olivat vanhoja (Exp. date: 2008-01, Lot 382175). Kuoppalevyjen pesuun käytettiin LabSystems Wellwash 4 –automaattipesuria.

4.3 Näytteiden käsittely ja analysointi

Beta-endorfiinimääryksiä varten sylkinäytteet ja verinäytteet pipetoitiin laimentamattomina. Sylkinäytteet sulatettiin ja sentrifugoitiin. Verinäytteet sulatettiin ja sekoitettiin vortexilla ennen pipetointia. Ensimmäisessä vaiheessa kuoppalevyjen pohjalle pipetoitiin standardit (5,12; 12,8; 32; 80; 200 ja 500), 50 µl/kaivo ja aina kaksi rinnakkaista näytettä. Lisäksi kuoppiin pipetoitiin neljä 0-näytettä (4x50 µl). Standardien ja näytteiden jälkeen kuoppalevyihin pipetoitiin biotinyloitua beta-endorfiinia (BE₄₋₂₁-biotiini) 100 µl/kaivo. Seuraavassa vaiheessa pipetoitiin 100 µl anti-betaendorfiini vastaainetta (a-BE vasta-aine BK22-180283). Tämän jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin viileässä yön yli.

Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin kolmesti (3x250 µl) PBS –puskurilla, jonka jälkeen kaivoihin lisättiin 200 µl Streptavidin-HRP –liuosta. Avidiini-HRP -liuoksen jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin ravistellen 45 minuuttia, jonka jälkeen kaivoja pestiin kahdesti (2x250 µl) PBS –liuoksella. Pesun jälkeen kaivoihin lisättiin TMB –substraattia 200 µl/kaivo. TMB on herkkä valolle, minkä vuoksi kuoppalevy peitettiin foliolla. Kuoppalevyä inkuboitiin ravistellen 20 min. Inkuboinnin jälkeen reaktio

pysäytettiin laimealla suolahapolla (50 µl/kaivo). Suolahapon lisäyksen jälkeen HRP:n väri muuttui sinisestä keltaiseksi (kuvio 4). Konsentraatiot mitattiin Victor X4 spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm. Mitatun näytteen konsentraatio oli suoraan verrannollinen näytteen antamaan absorbanssiin.



KUVIO 4. Kuoppalevy ennen ja jälkeen suolahapon lisäyksen. Lisäyksen vaikutuksesta HRP:n väri on muuttunut sinisestä keltaiseksi.

4.4 Tutkimusaineiston käsittely ja analysointi

Tutkimuksesta saimme ELISA -menetelmän avulla kvantitatiivisia mittaustuloksia. Ennen tulosten analysointia tulokset muutettiin oikeaan yksikköön ja kirjattiin taulukkomuotoon Excel-ohjelmalla. Taulukoista tehtiin diagrammeja, joiden avulla pääsimme vertailemaan mittaustuloksista saatuja pitoisuuksia. Johtopäätöksiä tuloksista tehtiin diagrammeja ja taulukoita tarkastelemalla. Beta-endorfiinipitoisuuksien mittaamiselle ei ole ainakaan Suomessa vielä olemassa standardisoitua määrittämenetelmää eikä viitearvoja. Vertasimme saamiamme pitoisuuksia muista tutkimuksista saatuihin tuloksiin, joissa oli tutkittu henkilöitä stressitilaa vastaavissa olosuhteissa.

5 TUTKIMUSTULOKSET JA TULOSTEN KÄSITTELY

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää beta-endorfiinipitoisuuden roolia henkilöiltä, joilta on jo aiemmin mitattu stressin merkkiaineena pidettyjä kortisolipitoisuuksia. Mitatut beta-endorfiinipitoisuudet ja aiemmin tutkitut kortisolipitoisuudet tehtiin samantyyllisiksi diagrammeiksi, jotta tulosten vertailu olisi mahdollisimman selkeää.

5.1 Seerumin beta-endorfiinipitoisuus vs. seerumin kortisolipitoisuus

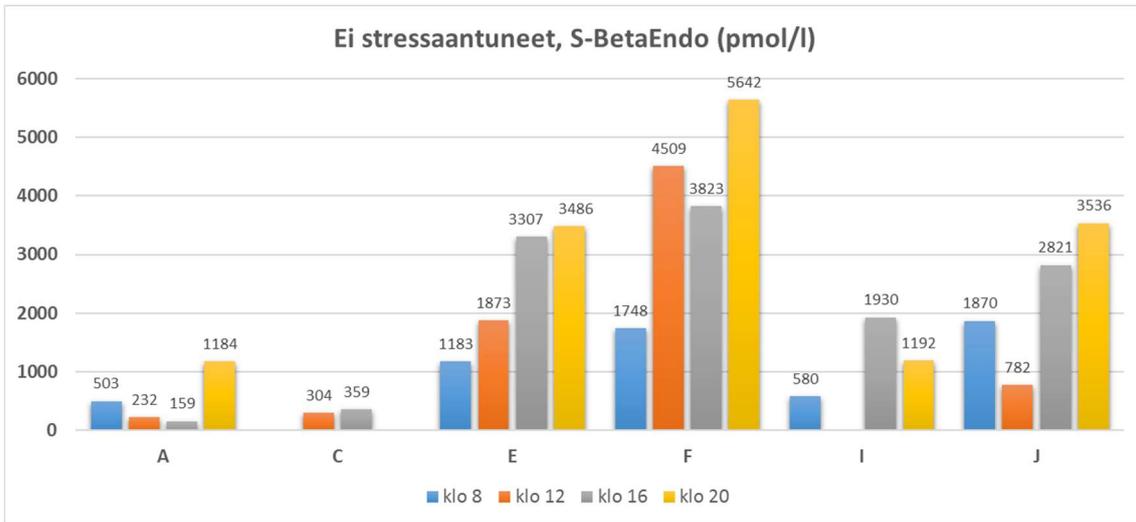
Ei-stressaantuneilla henkilöillä seerumin beta-endorfiinipitoisuus vaihteli 159 – 5642 pmol/l. Pitoisuuksien vaihtelu on suurta sekä yksittäisen henkilön kohdalla, että henkilöiden välillä. Yleinen suuntaus näyttäisi olevan, että pitoisuus kasvaa iltaa kohden (kuvio 5).

Stressaantuneilla henkilöillä seerumin beta-endorfiinipitoisuus vaihteli 637 – 4158 pmol/l. Tuloksista ei ole nähtävissä yhteneväistä linjaa pitoisuuksien vaihteluissa eri vuorokauden aikoina. Kuvio 7 nähdään, että yksittäisten henkilöiden vuorokauden aikainen beta-endorfiinipitoisuuden muutos ei ole yhtä suurta kuin ei-stressaantuneiden. Stressaantuneilla beta-endorfiinipitoisuudet näyttäisivät olevan keskimäärin korkeammat kuin ei-stressaantuneilla.

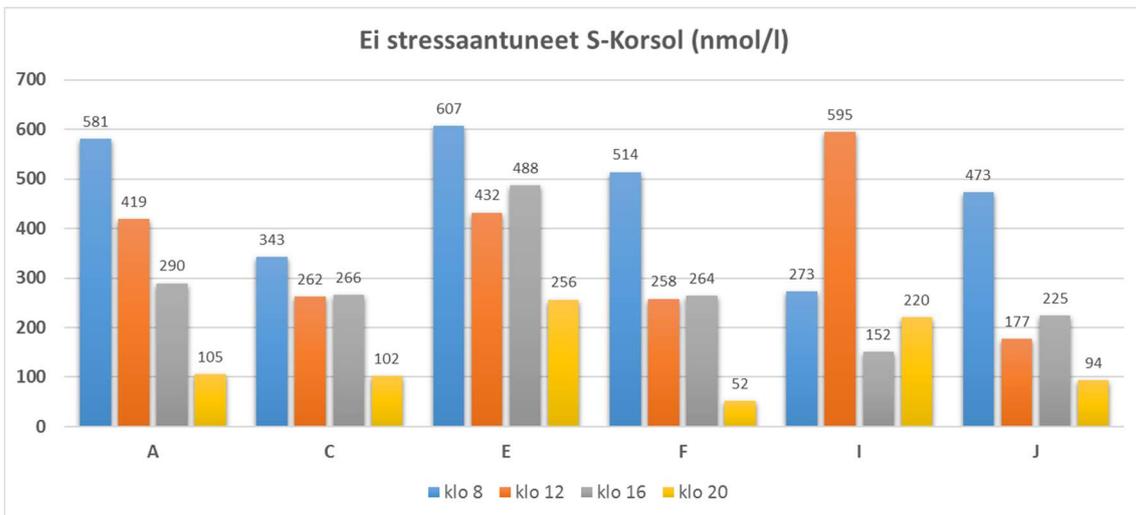
Aho ym. tutkimuksessa sekä ei-stressaantuneiden että stressaantuneiden henkilöiden seerumin kortisolipitoisuudet noudattavat normaalia vuorokausivaihtelua (kuviot 6 ja 8). Aamulla seerumin kortisolipitoisuus on korkea. Pitoisuus laskee iltaa kohden ja on alhaisimmillaan keskiyön aikaan. (Vaasan keskussairaala 2015, viitattu 24.4.2017.) Stressaantuneilla seerumin beta-endorfiinipitoisuus noudatti samansuuntaista vuorokausivaihtelua kortisolin kanssa, jolloin pitoisuudet laskivat iltaa kohden. Ei-stressaantuneiden henkilöiden seerumin beta-endorfiinipitoisuudet näyttävät noudattavan päivänvastaista suuntausta eli kasvavan iltaa kohden.

Stressaantuneen henkilön sekä beta-endorfiini- että kortisolipitoisuuden vaihtelu vuorokauden aikana on pienempää kuin ei-stressaantuneilla. Seerumin beta-endorfiinin suurimmat ja pienimmät pitoisuudet löytyvät ei-stressaantuneilta.

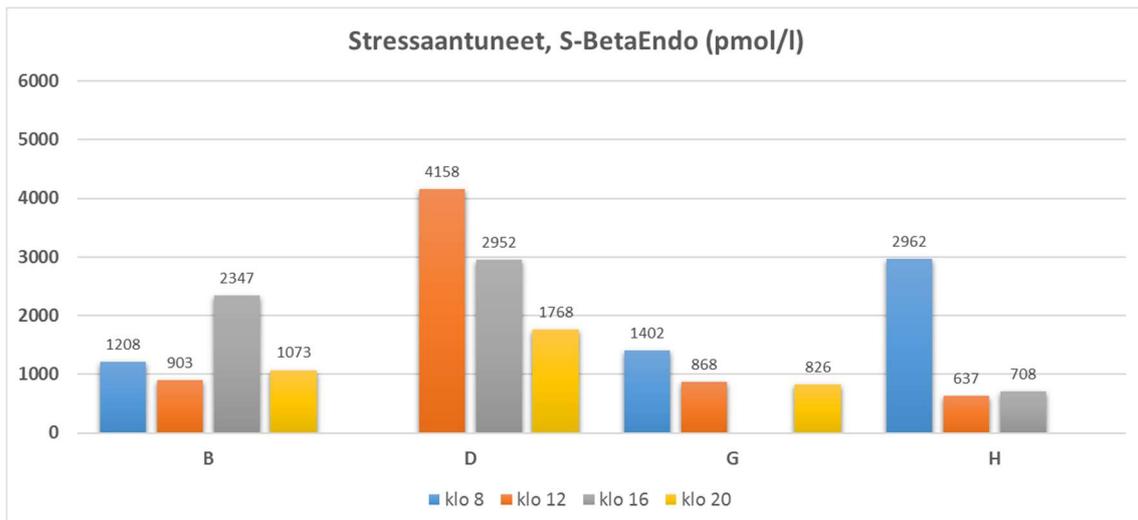
Tulosten vertailussa tulee huomioida, että beta-endorfiinipitoisuudet ovat tuhat kertaa pienempiä kuin kortisolipitoisuudet.



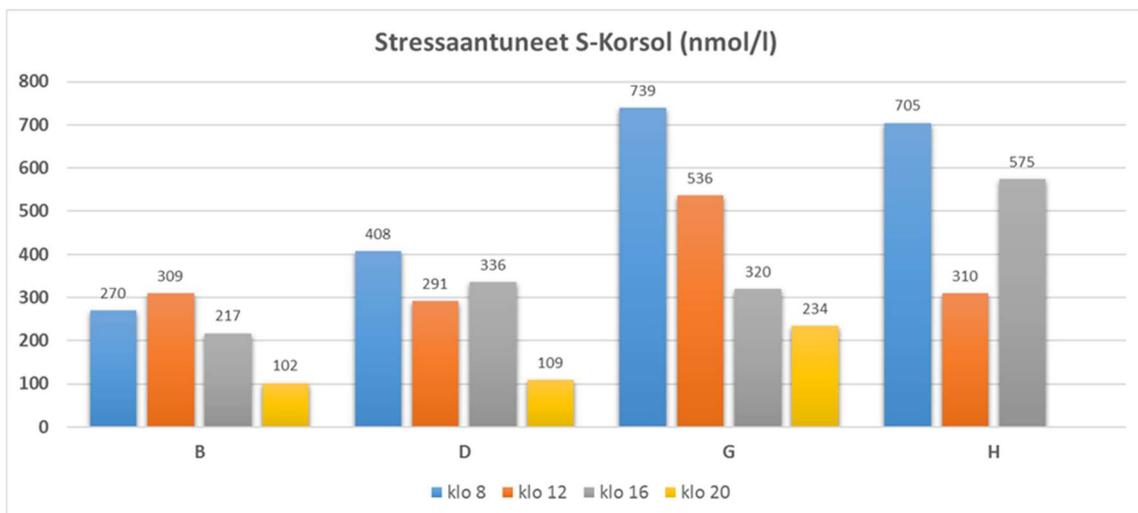
KUVIO 5. Ei-stressaantuneiden henkilöiden seerumin beta-endorfiinipitoisuudet eri näytteenottoaikoina.



KUVIO 6. Ei-stressaantuneiden henkilöiden seerumin kortisolipitoisuudet eri näytteenottoaikoina.



KUVIO 7. Stressaantuneiden henkilöiden seerumin beta-endorfiinipitoisuudet eri näytteenottoaikoina.



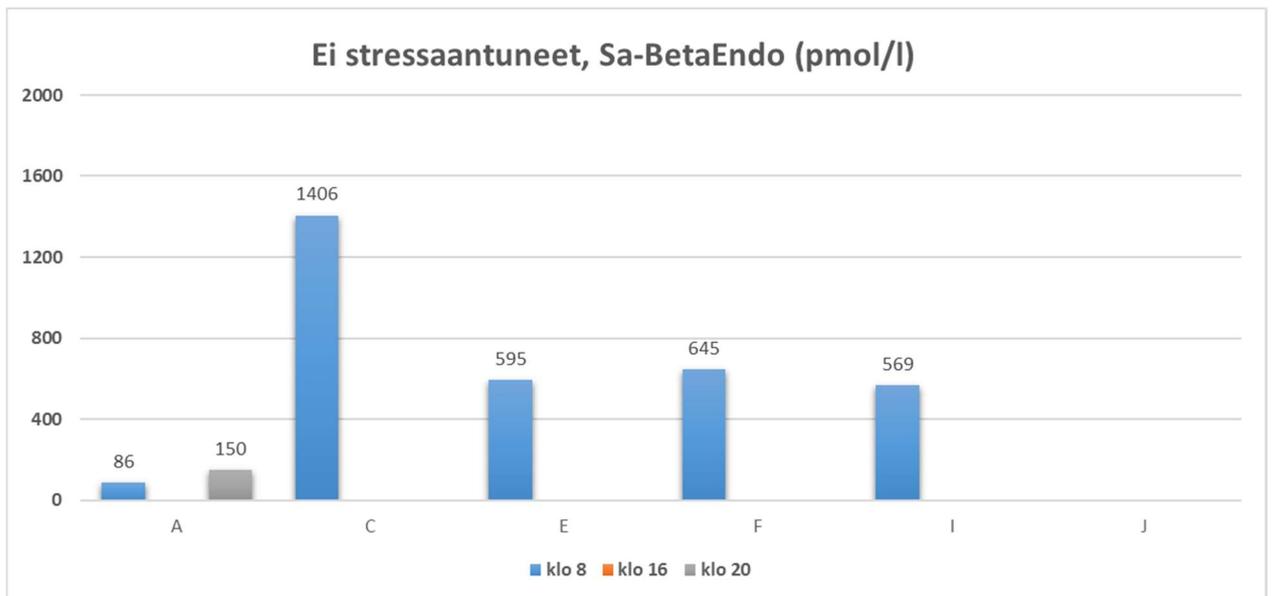
KUVIO 8. Stressaantuneiden henkilöiden seerumin kortisolipitoisuudet eri näytteenottoaikoina.

5.2 Syljen beta-endorfiinipitoisuudet

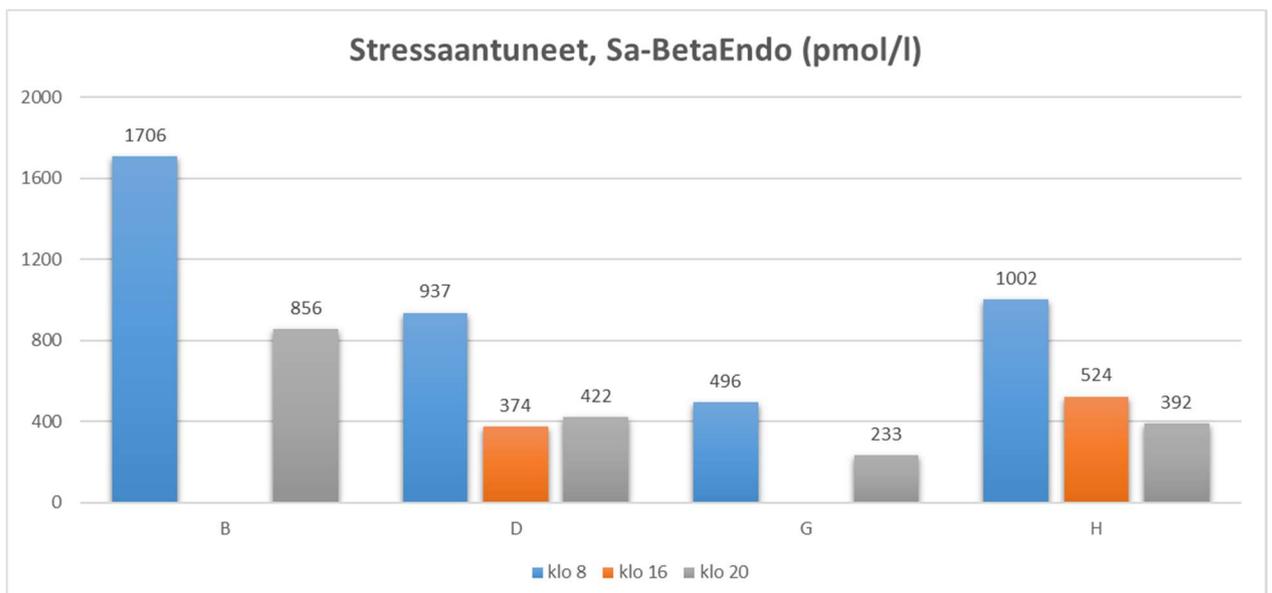
Ei-stressaantuneilta henkilöiltä saatiin liian vähän tuloksia (kuvio 9), jotta niistä voitaisiin tehdä johtopäätöksiä, miten syljen beta-endorfiinipitoisuudet vaihtelevat eri vuorokauden aikoina. Aamun ensimmäinen beta-endorfiinipitoisuus näyttäisi kuitenkin vaihtelevan eri henkilöiden kesken huomattavasti (vaihtelu 86 – 1406 pmol/l).

Syljen beta-endorfiinipitoisuudesta stressaantuneilla henkilöillä on kuviossa 10 havaittavissa trendi, jossa pitoisuudet laskevat iltaa kohden. Aamun ensimmäisen näytteen beta-endorfiinipitoisuus on

selkeästi suurempi kaikilla henkilöillä illan pitoisuuteen verrattuna. Tulosten perusteella stressaantuneiden henkilöiden aamun beta-endorfiinipitoisuudet näyttäisivät olevan korkeammat kuin ei-stressaantuneiden. Stressaantuneilla seerumi- ja sylkinäytteiden vuorokausivaihtelu näyttäisi olevan samassa linjassa eli laskee aamusta iltaa kohden.



KUVIO 9. Ei-stressaantuneiden henkilöiden syljen beta-endorfiinipitoisuudet eri näytteenottoaikoina.



KUVIO 10. Stressaantuneiden henkilöiden syljen beta-endorfiinipitoisuudet eri näytteenottoaikoina.

5.3 Tulosten vertailu olemassa oleviin tutkimuksiin

Tutkimuksessamme ei-stressaantuneiden henkilöiden seerumin beta-endorfiinipitoisuus aamulla klo 8 oli keskimäärin 1177 pmol/l (N=5) ja illalla klo 20 keskimäärin 3008 pmol/l (N=5). Stressaantuneiden henkilöiden keskimääräinen seerumin beta-endorfiinipitoisuus oli aamulla 1857 pmol/l (N=3) ja illalla 1222 pmol/l (N=3). Aiempiin tutkimuksiin verrattuna (taulukko 4) tutkimustuloksemme stressaantuneiden henkilöiden osalta näyttää noudattavan samanlaista linjausta eli beta-endorfiinipitoisuus on aamulla korkeampi laskien iltaa kohden. Ei-stressaantuneiden henkilöiden kohdalla saamamme tutkimustulokset poikkeavat muissa tutkimuksissa saaduista tuloksista. Muissa tutkimuksissa illan beta-endorfiinipitoisuus on ollut samaa luokkaa kuin aamulla tai se on laskenut. Meidän tutkimuksessa ei-stressaantuneilla beta-endorfiinipitoisuus nousi iltaa kohden.

TAULUKKO 4. Eri tutkimuksissa määritettyjä seerumin beta-endorfiinipitoisuuksia.

Tutkimus	aamu	ilta	yksikkö
Ei-stressaantuneet			
Esel ym. 2001	56.0 ± 18.3	23.3 ± 8.2	pg/ml
Gibson ym. 1993	< 1.4 – 1.7	< 1.4 – 1.7	pmol/l
Hoffman ym. 1989	4.2	3.5	pmol/l
Malarkey ym. 1994	10.4 ± 0.6	10.1 ± 0.9	pmol/l
McMurray ym. 1990	11.9 ± 8.4	6.4 ± 3.6	pmol/l
Petraglia ym. 1983	6.5 ± 0.5	3.7 ± 0.6	fmol/l
Stressaantuneet			
Esel ym. 2001	36.7 ± 20.7	14.5 ± 7.1	pg/ml
Malarkey ym. 1994	11.0 ± 0.9	9.8 ± 0.6	pmol/l
McMurray ym. 1990	25.7 ± 14.7	14.7 ± 8.3	pmol/l

6 POHDINTA

Tässä opinnäytetyössä tarkoituksena oli selvittää, voiko beta-endorfiinia käyttää merkkiaineena stressin ja/tai masennuksen mittaamisessa. Stressin mittaamiseen on olemassa joitakin mittausmenetelmiä ja masennuksen diagnosoinnissa käytetään kyselyjä. Mittasimme seerumi- ja sylkinäytteistä beta-endorfiinipitoisuuksia entsyymi-immunologisella menetelmällä käyttäen kaksoisvasta-ainetekniikkaa.

Saatuja mittaustuloksia verrattiin kirjallisuudesta löydettyihin pitoisuuksiin ja todettiin sekä pitoisuuksien määrällä, että vuorokausivaihtelun käyttäytymisellä olevan ristiriitaisia tuloksia. Näin ollen tuloksista ei voinut vetää suoraa johtopäätöksiä muiden mittaamiin tuloksiin vertailtaessa. Beta-endorfiinin pitoisuuksien vuorokausivaihtelua verrattiin myös Aho ym. mittaamiin kortisolipitoisuuksiin ja todettiin, että stressaantuneilla henkilöillä se oli samansuuntaista seerumista mitattuna.

Mittaukset tehtiin ELISA -menetelmällä, koska haluttiin mitata hyvin pieniä pitoisuuksia. Työn aikana tehdyt pipetointimäärät olivat myös hyvin pieniä, joten niissä on mahdollisesti voinut tulla joitakin virheitä. Toisaalta spektrofotometrillä rinnakkaisista näytteistä tehdyt mittaustulokset poikkesivat vain vähän toisistaan, mutta muutamissa näytteissä poikkeama oli yli hyväksytyjen virherajojen. Käytetyt kuoppalevyt olivat jo vanhentuneita, joten emme tiedä, onko tällä ollut vaikutusta. Vähemmän herkissä tutkimuksissa, kuin tämä, sillä ei ole ollut vaikutusta.

Kaikista näytteistä ei saatu mittaustuloksia, joten tämä vaikeutti johtopäätösten tekemistä. Aho ym. tutkimuksessa mukana olleiden henkilöiden määrä oli melko pieni (ei-stressaantuneita 6 ja stressaantuneita 4), joten puuttuvista mittaustuloksista johtuen aineisto pieneni osittain entisestään. Tutkitut seerumi- ja sylkinäytteet olivat pakasteesta sulatettuja. Pohdimme, onko tällä vaikutusta tuloksiin, mutta kirjallisuudesta ei löytynyt lähteitä beta-endorfiinipitoisuuksien säilymiseen pakastuksen ja sulatuksen aikana.

Petraglian ym. 1983 tekemässä tutkimuksessa beta-endorfiini ja beta-lipotropiinipitoisuudet olivat samaa luokkaa sekä aamulla (β -EP 6.5 ± 0.5 fmol/l; β -LPH 6.3 ± 0.7 fmol/l) että illalla (β -EP 3.7 ± 0.6 fmol/l; β -LPH 3.3 ± 0.4 fmol/l) eli näyttäisi siltä, että beta-endorfiinia ja beta-lipotropiinia erittyy suhteessa 1:1. Olisiko siis mahdollista, että tutkimissamme seeruminäytteissä olisi suunnilleen saman verran beta-lipotropiinia kuin beta-endorfiinia?

Toisaalta toisessa tutkimuksessa (Young, Schafer, Watson & Akil 1993, viitattu 1.5.2017), jossa koe-eläimiä altistettiin stressiärsykkeillä, havaittiin, että välittömästi stressiärsykkeen antamisen jälkeen mitattujen beta-endorfiini ja beta-lipotropiinipitoisuuksien suhde oli 2.5:1 (akuutti stressi). Vastaavasti, kun koe-eläimille annettiin toistuvasti stressiärsykejä 14 päivän ajan (krooninen stressi) mitattujen beta-endorfiini- ja beta-lipotropiinipitoisuuksien suhde oli 1.1:1. Koe-eläimillä, joille ei annettu stressiärsykejä lainkaan (kontrolliryhmä), beta-endorfiinin ja beta-lipotropiinin suhde oli 1.8:1.

Tutkimuksen mukaan krooninen tupakointi inhiboi pro-opiomelanokorttiinigeenin ekspressiota ja siten myös beta-endorfiinin ja muiden opiomelanokorttiininen biosynteesiä. (Rasmussen 1998, viitattu 28.4.2017.) Käytimme tutkimuksessamme Aho ym. ottamia seerumi- ja sylkinäytteitä. Heidän tutkimusraportissaan mainitaan tupakoinnin vaikuttavan mm. seerumin kortisolipitoisuuteen, joten oletamme heidän ohjeistaneen koehenkilöitä välttämään tupakointia ennen näytteenottoa, jolloin voimme olettaa, että mittaamamme beta-endorfiinipitoisuudet ovat oikeita.

Mittausmenetelmän kehittäminen stressin ja masennuksen tunnistamiseen on ajankohtainen aihe, koska molemmat ovat lisääntyneet yhteiskunnassamme. Masennuksen hoitoon käytetään paljon lääkkeitä ja lääkehoitoa halutaan vähentää varsinkin sellaisilta, joille siitä ei ole osoitettu olevan kiistatonta hyötyä. Stressin tunnistaminen on myös tärkeää, sillä vakava ja pitkäkestoinen stressi voi johtaa masennukseen. Stressin ja masennuksen diagnosoiminen perustuu psykologisiin arvioihin, joten näytteeseen perustuva mittaustulos olisi kustannuksiltaan taloudellisempaa.

Jatkossa voisi kehittää edelleen menetelmää, jolla saisi luotettavasti mitattua beta-lipotropiinipitoisuuksia. Tätä varten tulisi tuottaa onnistuneesti beta-lipotropiinin vasta-aineet. Myös beta-endorfiinin mittausmenetelmään voisi edelleen kehittää, jotta siitä tulisi vähemmän herkkä näytteen muille komponenteille, erityisesti lipeemisyys saattaa häiritä mittausta. Lisäksi näytteen hemolyysi ja ikteerisyys voivat vaikuttaa.

Koimme tämän työn tekemisen haastavana, mutta mielenkiintoisena. Työn tekeminen oli hyvin opettavaista, sillä olimme ensimmäistä kertaa tekemässä vastaavanlaista analysointia ja tutkimusta. Koimme haastavaksi aiheen kokonaisuudessaan, sillä jouduimme perehtymään entsyymi-immunologiaan ja endokrinologiaan paljon. Se, että aikaa kului laboratoriotöistä raportin laadintaan

yli vuosi, on auttanut meitä sisäistämään asioita ja ymmärtämään kokonaisuutta paremmin. Varsinkin raportin laadinnassa, jouduimme todella miettimään mitä olemme tehneet. Kokonaisuudessa olemme työhön tyytyväisiä, koska olemme oppineet tämän avulla paljon uutta ja uskomme siitä olevan hyötyä myös tulevaisuudessa.

LÄHTEET

Aho, S., Haipus, P. & Väre, I. 2011. Syljen alfa-amylaasientsyymin mittaus pitkäaikaisstressin diagnosoinnissa. Opinnäytetyö. Oulun ammattikorkeakoulu.

Aldridge, S., 2001. Masennus ja stressi : tunteiden biologiaa. Helsinki: Art House 2001.

Answers in Genesis 2017. The Highly Efficient Genome. Viitattu 15.5.2017, <https://answersingenesis.org/genetics/human-genome/the-highly-efficient-genome/>

Bali, A., Randhawa, P.K. & Jaggi, A.S. 2014. Stress and opioids: Role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. Viitattu 4.5.2017, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763415000299>.

Boster 2017. ELISA Fundamental Principle, How ELISA Works – Immunoassays. Viitattu 4.5.2017. <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>.

Cravana, C., Medica, P., Ragonese, G. & Fazio, E. 2017. Influence of training and competitive sessions on peripheral β -endorphin levels in training show jumping horses. Veterinary World. Viitattu 4.5.2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5301181/?report=reader>.

Duodecim 2016. Opioidi. Viitattu 16.3.2017, http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=Itt02419.

Esel, E., Sofuoglu, S., Aslan, S.S., Kula, M., Yabanoglu, I. & Turan, M.T. 2001. Plasma levels of beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol during early and late alcohol withdrawal. Alcohol and Alcoholism. Oxford Academic. Viitattu 1.5.2017, <https://academic.oup.com/alcalc/article/36/6/572/132466/PLASMA-LEVELS-OF-BETA-ENDORPHIN>.

Fernand-Seguin Research Centre of Louis-H Lafontaine Hospital Quebec 2007. How to measure stress in humans? Viitattu 3.4.2017, http://www.stresshumain.ca/documents/pdf/Mesures%20physiologiques/CESH_howMeasureStress-MB.pdf.

Furuhahsi, N., Takahashi, T., Kono, H., Shinkawa, O. & Suzuki, M. Sex Difference in the Human Peripheral Plasma Beta-Endorphin and Beta-Lipotropin Levels. Viitattu 4.5.2017, <https://www.karger.com/Article/Abstract/299138>.

Gibson, S., Crosby, S.R. & White, A. 1993. Discrimination between beta-endorphin and beta-lipotrophin in human plasma using two-site immunoradiometric assays. Viitattu 15.5.2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8287571>

Guillemin, R., Vargo, T., Rossier, J., Minick, S., Ling, N., Rivier, C., Vale, W & Bloom, F. 1977. Beta-endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. Viitattu 3.5.2017.

Hegadoren, K.M., O'Donnell, T., Lanius, R., Coupland, N.J. & Lacaze-Masmonteil, N. 2009. The role of β -endorphin in the pathophysiology of major depression. Viitattu 3.5.2017, http://ac.els-cdn.com/S0143417909000699/1-s2.0-S0143417909000699-main.pdf?_tid=4fa4f69c-2fd8-11e7-aa5e-00000aab0f02&acdnat=1493799355_8377bb277c7c6168a3394354deb53dd7.

Hoffman, L., Watson, P.B., Wilson, G. & Montgomery, J. 1989. Low Plasma β -Endorphin in Post-Traumatic Stress Disorder. Viitattu 15.5.2017, <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.3109/00048678909062145>

Huslab 2016. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Kortisoli, seerumista. Viitattu 6.4.2017, <https://huslab.fi/ohjekirja/2129.html>.

Inder, W, Dimenski, G. & Russell, A. 2012. Measurement of salivary cortisol in 2012 – laboratory techniques and clinical indications. Clinical Endocrinology. Viitattu 27.4.2017, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2265.2012.04508.x/abstract;jsessionid=8C3CE4434B2347B51877751A381EEA7A.f02t04>.

Isometsä, E. 2015. Masennustilan oireet ja diagnoosi. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 3.4.2017, <http://www.terveysportti.fi/dtk/pit/koti>.

Isometsä, E. & Karlsson, H. 2015. Masennus ja neurokemian – hermovälittäjäaineiden merkitys. Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 3.4.2017, <http://www.terveysportti.fi/dtk/pit/koti>.

Jie, Q., Yun-fei, J., Fang, L., Qian-hong, T., Hui, R. and Rui, C. 2017. Effect of combined music and touch intervention on pain response and β -endorphin and cortisol concentrations in late pre-term infants. Viitattu 27.4.2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5270209/>.

Kampman, O., Heiskanen, T., Holi, M., Huttunen, M. & Tuulari, J. 2015. Mitä masennuksella tarkoitetaan? Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 3.4.2017. <http://www.terveysportti.fi/dtk/pit/koti>.

Karlsson, H. & Isometsä, E. 2015. Stressi ja hypotalamus-aivolisäke-lisämunuaisakseli (HPA –akseli). Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 3.4.2017, <http://www.terveysportti.fi/dtk/pit/koti>.

Kopakkala, A. 2015. Pelastaja vai suuri huijaus. Sanomalehti Kaleva 23.5.2015. Viitattu 15.5.2017.

Malarkey, W.B., Pearl, D.K., Demers, L.M., Kielcolt-Glaser, J.K. & Glaser, R. 1994. Influence of academic stress and season on 24-hour mean concentrations of ACTH, cortisol and β -endorphin. Viitattu 3.5.2017, http://ac.els-cdn.com/030645309400077N/1-s2.0-030645309400077N-main.pdf?_tid=97d706cc-2fdc-11e7-8e7e-00000aacb361&acdnat=1493801194_e0bd6523c9e1cfd20db10d71332ff505.

Mattila, A. 2010. Stressi. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 16.3.2017, http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00976.

McMurray, R.G., Hill, D. & Field, K.M. 1990. Diurnal variations of beta-endorphin at rest and after moderate intensity exercise. Viitattu 15.5.2017, <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07420529009056965?journalCode=icbi20>

MD Biosciences 2017. Endorphin (β -Endorphin) ELISA. Viitattu 6.4.2017, <http://www.mdbioproducts.com/products/elisas/%CE%B2-endorphin-elisa>.

Murrin, L.C. 2007. Metenkephalin. The Comprehensive Pharmacology Reference. Science Direct. Viitattu 1.5.2017, <http://www.sciencedirect.com/topics/page/Met-enkephalin>.

Mäkelä, A. 2010. Akupunktion vaikutusmekanismit. EMRED Oy. Viitattu 30.4.2017, http://www.emred.fi/htmls_fi/acupuncture_fi.html.

Petraglia, F., Faccinetti, F., Parrini D., Micieli, G., De Luga, S. & Genazzani, A.R. 1983. Simultaneous Circadian Variations of Plasma ACTH, Beta-Lipotropin, Beta-Endorphin and Cortisol. Viitattu 30.4.2017, <http://www.karger.com/Article/Abstract/179690>.

PubChem 2015. Beta-Endorphin (human). Open Chemistry Database. Compound Summary for CID 101600084. Viitattu 1.5.2017, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/101600084#section=Top>.

Puttonen, S. 2006. Stressin fysiologiset vaikutukset. Suomen työterveyslääkäriyhdistys r.y. Viitattu 3.4.2017, http://www.ebm-guidelines.com/dtk/ltk/avaa?p_artikkeli=tll00352&p_haku=ty%F6terveysl%E4%E4k%E4ri.

Ranabir, S. & Reetu, K. 2011. Stress and hormones. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism. Viitattu 30.4.2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3079864/>.

Rasmussen, D. D. 1998. Effects of chronic nicotine treatment and withdrawal on hypothalamic proopiomelanocortin gene expression and neuroendocrine regulation. Psychoneuroendocrinology. Viitattu 28.5.2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9695129>.

Rasmussen, N.A. & Farr, L.A. 2008. Beta-endorphin response to an acute pain stimulus. Journal of Neuroscience Methods. Viitattu 3.5.2017, http://ac.els-cdn.com/S0165027008006298/1-s2.0-S0165027008006298-main.pdf?_tid=d687115a-2fd2-11e7-bd7c-00000aacb360&acdnat=1493797004_24f15d599003672de33240788eaba1c3.

Scheinin, M., Korpi, E. & Pesonen, U. 2014. Neuroaktiiviset peptidit. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Kustannus Oy Duodecim.

Seoyeon, C., Soochol, K., Jung-Sik, Y., Jung-Hyun, L., Chulmin, J. & Hyo-II, J. 2014. Real-time measurement of human salivary cortisol for the assessment of psychological stress using a smartphone. Viitattu 6.4.2017, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221418041400021X>.

Seppänen, A. 2012. Sykevälien mittaaminen on helppoa, tulkinta vaikeaa. Lääkärilehti. Viitattu 3.5.2017, <http://www.laakarilehti.fi/ajassa/ajankohtaista/sykevalien-mittaus-8232-on-helppoa-tulkinta-vaikeaa/>.

Solunetti 2006. Fysiologisesti vaikuttavat peptidit. Viitattu 16.3.2017, http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fysiologiset_peptidit/2/.

Stoppler, M. & Shiel, W. 2014. Endorphins: Natural Pain and Stress Fighters. MedicineNet.com. Viitattu 16.3.2017, <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=55001>.

Thermo Fisher Scientific 2017. Overview of ELISA. Viitattu 6.4.2017, <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#>.

Thermo Fischer Scientific 2017. HRP-Conjugated Streptavidin. Viitattu 6.4.2017, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N100>.

Timmons, C.R. & Hamilton, L.W. 1990. Drugs, Brains and Behavior. Chapter 5. Pain and other stressors. Viitattu 30.4.2017, <http://www-rci.rutgers.edu/~lwh/drugs/chap05.htm>.

Vaasan keskussairaala 2015. Laboratorio-ohjekirja. P-Kortisoli. Viitattu 24.4.2017, <http://www.vshp.fi/medserv/klkemi/fi/ohjekirja/2128.htm>.

Vartiovaara, I. 2008. Stressaa! : Hyvä paha paine. Helsinki: Duodecim 2008.

Viinämäki, H., Lehto S.M., Palvimo, J.J., Harvima, I., Valkonen-Korhonen, M., Koivumaa-Honkanen, H., Hintikka, J., Honkalampi, K., & Niskanen, L. 2012. Glukokortikoidien yhteys masennuksen syntyyn ja oirekuvaan. Aikakauskirja Duodecim. Viitattu 4.5.2017, <http://www.duodecim-lehti.fi/lehti/2012/10/duo10282>.

Young, E.A., Day, R., Schafer, M., Watson, S.J & Akil, H. 1993. Altered Ratios of Beta-Endorphin:Beta-Lipotropin Released from Anterior Lobe Corticotropes with Increased Secretory Drive. II. Repeated Stress. *Journal of Neuroendocrinology*. Viitattu 1.5.2017, <https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/72769/j.1365-2826.1993.tb00371.x.pdf?sequence=1>.

Young, E.A., Lewis, J. & Akil, H. 1986. The preferential release of bet-endorphin from anterior pituitary lobe by Corticotropin Releasing Factor (CRF). Viitattu 4.5.2017, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0196978186900343>.

Kanien immunisoinnin tarkoituksena oli tuottaa polyklonaalisia vasta-aineita. Immunisoinnissa käytettiin kahta kania, jotka tutkimuksia ja määrittämiä varten nimettiin "punainen" ja "musta".

Punainen kani

Immunisointiin käytettiin tyroglobuliinin konjugoitua peptidiä A. Peptidikonjugaatista tehtiin primääri eli aloitusannos, jossa oli 1,2 mg/160 µl immunogeeniä sekä kolme boosteria, joissa kussakin oli 0,6 mg immunogeeniä.

Primääri eli aloitusannos (rokote): 1,2 mg immunogeeniä sisältävään putkeen lisätiin 1 ml 0,9 % keittosuolaliuosta (NaCl –liuosta) ja 1 ml FICA –liuosta (FICA = Adjuvant Incomplete Freund). Liuotettu immunogeeni vedettiin ruiskuun ja takaisin useampia kertoja niin, että muodostui emulsiovahto, joka pistettiin kanin selän nahan alle useisiin kohtiin (vähintään 10).

Booster 1: Ensimmäinen boosteri (samaa peptidiä A) annettiin kuukauden kuluttua aloituksesta. Boosterannos, 0,6 mg immunogeeniä sisältävään putkeen 1 ml 0,9 % keittosuolaliuosta (NaCl –liuosta) ja 1 ml FICA –liuosta (FICA = Adjuvant Incomplete Freund). Liuotettu immunogeeni vedettiin ruiskuun ja takaisin useampia kertoja niin, että muodostui emulsiovahto, joka pistettiin kanin selän nahan alle useisiin kohtiin (vähintään 10).

Booster 2: Kahden kuukauden kuluttua aloituksesta samoin kuin booster 1. Tämän jälkeen kanista otettiin ensimmäinen verinäyte, kanin korvan isosta verisuonesta (noin 1 ml).

Musta kani

Immunisointiin käytettiin tyroglobuliinin konjugoitua peptidiä B. Peptidikonjugaatista tehtiin primääri eli aloitusannos, jossa oli 1,2 mg/160µl immunogeeniä sekä kolme boosteria, joissa kussakin oli 0,6 mg immunogeeniä.

Primääri eli aloitusannos (rokote): 1,2 mg immunogeeniä sisältävään putkeen lisätiin 1 ml 0,9 % keittosuolaliuosta (NaCl –liuosta) ja 1 ml FICA –liuosta (FICA = Adjuvant Incomplete Freund). Liuotettu immunogeeni vedettiin ruiskuun ja takaisin useampia kertoja niin, että muodostui emulsiovahto, joka pistettiin kanin selän nahan alle useisiin kohtiin (vähintään 10).

Booster 1: Ensimmäinen boosteri (samaa peptidiä B) annettiin kuukauden kuluttua aloituksesta. Boosterannos, 0,6 mg immunogeeniä sisältävään putkeen 1 ml 0,9 % keittosuolaliuosta (NaCl –liuosta) ja 1 ml FICA –liuosta (FICA = Adjuvant Incomplete Freund). Liuotettu immunogeeni vedettiin ruiskuun ja takaisin useampia kertoja niin, että muodostui emulsiovahto, joka pistettiin kanin selän nahan alle useisiin kohtiin (vähintään 10).

Booster 2: Kahden kuukauden kuluttua aloituksesta samoin kuin booster 1. Tämän jälkeen kanista otettiin ensimmäinen verinäyte, kanin korvan isosta verisuonesta (noin 1 ml).

11.5. – 12.5.2016, 23.5. – 24.5.2016 ja 1.6. – 2.6.2016 Maria Tyni/Päivi Vainionpää

Ohjaus Simo Rasi

Kuoppalevy

DELFLIA/AUTODELFLIA

Anti-rabbit IgG Microtitration Strips 8x12 wells

Lot. 382175, Exp. date: 2008-01

Näytteet

Sylkinäytteet ja verinäytteet pipetoitiin laimentamattomina. Sylkinäytteet sulatettiin ja sentrifugoitiin. Verinäytteet sulatettiin ja sekoitettiin vormixilla ennen pipetointia. Kuoppiin pipetoitiin kaksi rinnakkaista näytettä 2x50 µl.

Standardit

Standardiputki, joka sisälsi 5 pmol beta-endorfiinia liuotettiin 500 µl:aan 1xPBS + 1% BSA –liuosta => standardi 500 fmol. Standardista tehtiin laimennussarja seuraavasti:

200 fmol: 500 fmol liuosta pipetoitiin 200 µl + 300 µl 1xPBS + 1% BSA –liuosta

80 fmol: 200 fmol liuosta pipetoitiin 200 µl + 300 µl 1xPBS + 1% BSA –liuosta

32 fmol: 80 fmol liuosta pipetoitiin 200 µl + 300 µl 1xPBS + 1% BSA –liuosta

12,8 fmol: 32 fmol liuosta pipetoitiin 200 µl + 300 µl 1xPBS + 1% BSA –liuosta

5,12 fmol: 12,8 fmol liuosta pipetoitiin 200 µl + 300 µl 1xPBS + 1% BSA –liuosta

0 –näyte: pipetoitiin 500 µl pelkkää 1xPBS + 1% BSA –liuosta

Kuoppiin pipetoitiin neljä 0-näytettä (4x50 µl) ja muista standardeista (5,12; 12,8; 32; 80; 200 ja 500) kaksi rinnakkaista näytettä (2x50 µl).

BE₄₋₂₁-biotiini

Valmiissa putkessa ollut 5 pmol biotiini liuotettiin 12,5 ml:aan 1xPBS + 1% BSA –liuosta. BE – biotiinia kuoppalevyihin pipetoitiin 100 µl/kaivo.

a-BE vasta-aine BK22-180283

Putkessa oli alkuperäistä kanissa tuotettua vasta-aineseerumia 0,6 µl, joka liuotettiin 12 ml:aan 1xPBS + 1% BSA –liuosta. Kuoppiin pipetoitiin a-BE vasta-ainetta 100 µl/kaivo.

Kuoppalevyä ravisteltiin ja inkuboitiin kylmässä yön yli.

Streptavidin-HRP (Pierce#I21132, Lot#NE 172592)

Kaivot pestiin PBS –puskurilla, 3x250 µl (LabSystems Wellwash 4:llä). Streptavidinista tehtiin tehtiin 1/3000 laimennos 1xPBS + 1% BSA –liuokseen. Streptavidin-HRP:tä lisättiin 200 µl/kuoppa ja annettiin inkuboitua ravistellen 45 minuuttia.

Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin PBS –puskurilla, 3x250 µl

Substraatti

TMB –substraattia lisättiin 200 µl/kuoppa. TMB –substraatti on arka valolle, joten kuoppalevy peitettiin foliolla. Inkuboitiin ravistellen 30 min.

Reaktion pysäytys 2N rikkihapolla tai 0,5M suolahapolla (pipetoitiin 50 µl/kaivo) ja absorbanssit mitattiin Victorilla aallonpituudella 450 nm.

KÄYTETYT PUSKURIT

10x PBS (1 litra)

- NaCl 80.0 g
- KCl 2.0 g
- Na₂HPO₄*2H₂O 14.4 g
- KH₂PO₄ 2.4 g
- lisää 800 ml H₂O
- tarkista pH 7.4 (HPO₃/NaOH)
- lisää H₂O litraksi

PBS (1 litra)

- 100 ml 10x PBS
- 900 ml H₂O

PBS + 1 % BSA (250 ml)

- PBS 250 ml
- pinnalle ripotellaan 2.5 g “protease-free” BSA (albumin free bovine serum)
- liuotetaan kevyellä sekoituksella

Ei-stressaantuneet henkilöt

Seerumin beta-endorfiinipitoisuus pmol/l tutkimushenkilöittäin eri näytteenottoaikoina

	klo 8	klo 12	klo 16	klo 20
A	503	232	159	1184
C	-	304	359	-
E	1183	1873	3307	3486
F	1748	4509	3823	5642
I	580	-	1930	1192
J	1870	782	2821	-

Stressaantuneet henkilöt

Seerumin beta-endorfiinipitoisuus pmol/l tutkimushenkilöittäin eri näytteenottoaikoina

	klo 8	klo 12	klo 16	klo 20
B	1208	903	2347	1073
D	-	4158	2952	1768
G	1402	868	-	826
H	2962	637	708	3536

Kortisolipitoisuudet

”Ei –stressaantuneiden” henkilöiden seerumin kortisolipitoisuudet (nmol/l) eri kellonaikoina.

(nmol/l)	klo 8	klo 12	klo 16	klo 20
A	581,4	419,4	289,5	105,4
C	342,5	261,9	266,4	102,2
E	606,8	432,1	487,6	256,3
F	514,1	258,2	264,1	52,2
I	273	594,8	151,6	220,4
J	472,6	177,2	224,7	93,8

”Stressaantuneiden” henkilöiden seerumin kortisolipitoisuudet (nmol/l) eri kellonaikoina.

(nmol/l)	klo 8	klo 12	klo 16	klo 20
B	269,8	309,4	217,2	102
D	407,8	291,3	335,5	108,7
G	739,3	536	320,4	234,3
H	704,5	309,6	574,5	

”Ei –stressaantuneiden” henkilöiden syljen kortisolipitoisuudet (nmol/l) eri kellonaikoina.

(nmol/l)	klo 8	klo 12	klo 16	klo 20
A	27,1	7,6	3,7	0,7
C	30,3	5,0	5,3	0,8
E	9,3	7,9	13,8	2,5
F	10,6	2,0	2,4	0,0
I	28,6	21,7	2,1	5,2
J	25,9	2,6	3,4	1,6

”Stressaantuneiden” henkilöiden syljen kortisolipitoisuudet (nmol/l) eri kellonaikoina.

(nmol/l)	klo 8	klo 12	klo 16	klo 20
B	11,5	4,3	2,0	0,5
D	20,7	3,0	5,3	out
G	12,4	6,6	3,1	2,0
H	18,2	7,4	12,3	

Lähde: Aho, S., Haipus, P. ja Väre, I. 2011. *Syljen alfa-amylaasientsyymin mittaus pitkäaikaisstressin diagnosoinnissa opinnäytetyö.*