



ADIPOKIINIT JA YKL-40 MUNUAISSYÖVÄSSÄ

Alexandra Ojala

Opinnäytetyö
Toukokuu 2015
Laboratorioala

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioala

ALEXANDRA OJALA:
Adipokiinit ja YKL-40 munuaissyövässä

Opinnäytetyö 44 sivua, joista liitteitä 0 sivua
Toukokuu 2015

Munuaissyöpä yleistyy jatkuvasti, ja sen osuus maailman kaikista syöivistä on noin 3 %. Munuaissyöpään kuolleisuus ei ole juurikaan vähentynyt, vaikka sen diagnostiikka on parantunut. Syövän ennusteeseen vaikuttavat mm. kasvaimen levinneisyys ja erilaistumisaste. Munuaissyövän yleisin hoitomuoto on leikkaus, jossa osa munuaisesta tai koko munuainen poistetaan. Paikallisen taudin ennuste on selvästi parempi kuin levinneen taudin.

Adipokiinit ja YKL-40 ovat mm. rasvakudoksen tuottamia sytokiinien kaltaisia välittäjäaineita, jotka säätelevät energia-aineenvaihduntaa sekä neuroendokriinistä järjestelmää. Lisäksi ne toimivat säätelijöinä immuunijärjestelmässä sekä tulehdusreaktiossa. Adipokiineilla on havaittu olevan sekä tulehdusta edistäviä että estäviä vaikutuksia.

Opinnäytetyössä tutkittiin adipokiinien ja YKL-40:n yhteyttä munuaissyövän levinneisyyteen. Työssä määritettiin potilasaineistosta adiponektiinin, adipsiinin, leptiinin ja YKL-40:n pitoisuudet seerumissa useassa eri aikapisteessä. Pitoisuuksien määrittämiseen käytettiin ELISA -menetelmää. Työssä vertailtiin tutkittujen adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien eroja paikallisessa ja levinneessä taudissa, pitoisuuksien muuttumista ajan myötä sekä adipokiinien korrelaatiota keskenään sekä elinaikaan leikkauksen jälkeen.

Tutkimuksessa havaittiin vahva negatiivinen korrelaatio YKL-40:n pitoisuuden ja leikkauksen jälkeisen elinajan kanssa. Mitä korkeammat YKL-40:n pitoisuudet olivat ennen leikkausta, sitä lyhyempi odotettavissa oleva elinaika oli. Tutkimuksessa havaittiin YKL-40:n pitoisuuksien ennen leikkausta olevan korkeampia levinneessä taudissa paikalliseen verrattuna. Tutkimuksessa saadut tulokset viittaavat siihen, että YKL-40 saattaisi toimia munuaissyövän leviämistä ja syövästä selviämistä ennustava tekijänä. YKL-40:n tarkempaa roolia ja vaikutusmekanismeja syövän synnyssä ei vielä tiedetä.

Asiasanat: munuaissyöpä, adipokiini, adipsiini, adiponektiini, leptiini, YKL-40, ELISA

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Laboratory sciences

ALEXANDRA OJALA:
Adipokines and YKL-40 in renal cell carcinoma

Bachelor's thesis 44 pages, appendices 0 pages
May 2015

Incidence of renal cell carcinoma (RCC) is increasing. Although diagnostics has improved the mortality rate to RCC has not decreased. Most important risk factors for RCC are smoking and obesity. Also some hereditary factors predispose to renal cell cancer. Prognosis for RCC depends mainly on the stage and differentiation of the tumor. Most common treatment for RCC is surgery where part or whole of the kidney is removed. Prognosis is substantially better for patients with local carcinoma than for patients with metastatic carcinoma.

Adipokines and YKL-40 are cytokine-like mediators that are produced by adipose tissue. In the body they are involved in regulating energy metabolism, immune system and inflammation. Adipokines have both pro- and anti-inflammatory properties.

The aim of this bachelor's thesis was to study adipokines and YKL-40 in renal cell carcinoma. Levels of adiponectin, adipsin, leptin and YKL-40 were measured in clinical patient samples by using ELISA method. Adipokine and YKL-40 concentrations in local and metastatic cancer were compared, differences between different time points were measured and correlations to survival were studied.

In the present study, levels of YKL-40 were found to negatively correlate with survival i.e. the higher was the pre-surgical level of YKL-40 the shorter was the remaining lifetime after surgery. YKL-40 levels were higher in metastatic than in local cancer. The results of this study support the role for YKL-40 as a prognostic factor and a biomarker of metastatic renal cell carcinoma.

Key words: renal cell carcinoma, adipokine, adipsin, adiponectin, leptin, YKL-40, ELISA

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	5
2	TEOREETTINEN TAUSTA	7
2.1	Munuaissyöpä	7
2.1.1	Munuaissyövän riskitekijät	8
2.1.2	Munuaissyövän diagnostiikka ja hoito.....	9
2.1.3	Munuaissyövän levinneisyyden luokittelu.....	11
2.2	Adipokiinit ja YKL-40.....	13
2.2.1	Adiponektiini	14
2.2.2	Adipsiini.....	15
2.2.3	Leptiini	16
2.2.4	YKL-40	17
2.2.5	Adipokiinit, YKL-40 ja munuaissyöpä.....	18
2.3	ELISA-menetelmä	19
2.3.1	Suora ja epäsuora menetelmä.....	21
2.3.2	Sandwich-ELISA	23
2.3.3	Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät	25
3	TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS.....	26
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	27
4.1	Tutkittava aineisto.....	27
4.2	Tutkimuksessa käytetty ELISA-menetelmä	28
4.2.1	Tasokontrollit	30
4.3	Tilastollinen analyysi.....	31
5	TULOKSET	32
5.1	Potilaiden adipokiini- ja YKL-40 tasot ennen leikkausta.....	32
5.2	Adipokiinien tasojen muutokset potilailla ennen leikkausta ja sen jälkeen.....	33
5.2.1	Adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien muutos ajan edetessä koko aineistossa.....	33
5.2.2	Adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien muutos potilailla, joilla on joko paikallinen tai levinnyt syöpä.....	34
5.3.	Korrelaatio adipokiinien ja YKL-40:n välillä.....	36
5.4.	Adipokiinien ja YKL- 40:n tasojen korrelaatio elinaikaan.....	37
6	MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELU.....	38
6.1	Menetelmien tarkastelua	38
6.2	Tulosten tarkastelu.....	40
	LÄHTEET.....	42

1 JOHDANTO

Munuaissyövän yleisyys kasvaa jatkuvasti. Se on maailman yhdeksänneksi yleisin syöpä. Suomessa uusia munuaissyöpiä diagnosoitiin vuonna 2010 noin tuhat kappaletta. Miehillä syöpä todetaan useammin kuin naisilla ja lisäksi syövän riski kohoaa iän myötä. Tavallisimmin munuaissyöpä todetaan 60–65 vuotiailla. Munuaissyövän riskitekijöitä ovat tupakointi sekä ylipaino. Myös eräät perinnölliset sairaudet ovat yhteydessä syövän syntyyn. Primääristi levinnyt tauti todetaan 20–30 %:lla potilaista ja 40 % kuolee tähän tautiin viiden vuoden kuluessa. Radikaalisti leikatuille potilaillekin kehittyy etäpesäkkeitä noin 20–40 %:lle, etäpesäke saattaa munuaissyövässä tulla esiin huomattavan pitkän oireettoman seuranta-ajan jälkeen. (Joensuu, ym. 2013; Jonash, ym. 2014., Sunela ja Kellokumpu-Lehtinen 2014)

Munuaissyövän ennusteeseen vaikuttaa sen levinneisyys ja erilaistumisaste. Munuaissyövän levinneisyyttä kuvataan kansainvälisellä TNM-luokituksella. Leikkaus on syövän ensisijainen hoitomuoto: kasvainalueen poisto (resektio) tai koko munuaisen poisto. Levinneessä munuaissyövässä primäärikasvaimen kirurgisessa poistosta on jonkin verran lisähyötyä, jos potilaan yleistila on hyvä. Tämän lisäksi myös yksittäisiä etäpesäkkeitä voidaan kirurgisesti poistaa. Jäljelle jäävän syöpäkudoksen hoidoksi tarvitaan lääkehoito: antiangiogeneettinen lääke tai mTOR:n estäjä. Leikkauksen jälkeen potilaita seurataan viisi vuotta, joten uusiutumiset ja etäpesäkkeet huomataan usein ajoissa. (Joensuu, ym. 2013.; Jonash, ym. 2014, Sunela ja Kellokumpu-Lehtinen 2014)

Adipokiinit ja YKL-40 ovat rasvakudoksen tuottamia sytokiiniin kaltaisia välittäjäaineita. Adipokiinit toimivat hormonien tavoin ja säätelevät energia-aineenvaihduntaa sekä neuroendokriinistä järjestelmää. Lisäksi ne toimivat säätelijöinä useissa immuunijärjestelmän toiminnoissa sekä tulehdusreaktiossa. Adipokiineilla on havaittu olevan sekä tulehdusta estäviä että edistäviä vaikutuksia. (Awad & Bradford 2010. 24–25; Johansen, ym. 2006. 194–202)

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin adipokiinien sekä YKL-40:n yhteyttä munuaissyövän levinneisyyteen. Tutkimuksen kohteena olivat adipokiineista adiponektiini, adipsiini ja leptiini, sekä YKL-40. Näiden pitoisuuksia kliinisestä potilasaineistosta määritettiin käyttäen ELISA-menetelmää.

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopistossa Immunofarmakologian tutkimusryhmässä toukokuussa 2014 - toukokuussa 2015. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat FT Mari Hämmäläinen ja professori Eeva Moilanen (Tampereen Yliopisto) sekä Outi Heiniö (Tampereen Ammattikorkeakoulu).

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Munuaissyöpä

Munuaissyövän osuus kaikista syöivistä maailmassa on 2-3 %. Suomessa vuonna 2010 uusia munuaissyöpätapauksia todettiin miehillä 530 ja naisilla 416. Munuaissyövän yleisyys kasvaa jatkuvasti. Syöpään sairastumisen riski kohoaa selvästi iän myötä. Yleensä se diagnosoidaan 60–65 vuoden iässä. Miehillä syöpä on yleisempi kuin naisilla. Kuolleisuus munuaissyöpään ei ole juurikaan vähentynyt, vaikka kuvantamismenetelmät ja niiden saatavuus on parantunut viime vuosina (Joensuu, ym. 2013.).

Munuaiskudoksen kasvaimet ovat alkuperältään epiteliaalisia, mesenkymaalisia tai sekatumoreita. Yleisin munuaissyövän muoto on kirkassoluinen munuaiskarsinooma eli hypernefrooma (70 %), toiseksi yleisin on papillaarinen karsinooma (10 %) ja kolmanneksi yleisin kromofobinen karsinooma. (Joensuu, ym. 2013)

Munuaissyövän ennusteeseen vaikuttavat sen levinneisyys ja erilaistumisaste. Potilaista, joiden syöpä on toteamishetkellä paikallinen eli munuaisiin rajoittunut, on viiden vuoden kuluttua elossa 80–97 %. Vastaava luku on 10 % potilailla, joilla on jo toteamishetkellä ollut metastasoitunut syöpä. Paras ennuste on potilailla, jotka ovat oireettomia ja joiden syöpä löytyy sattumalta kuvantamistutkimuksessa. Kirkassoluinen munuaiskarsinooma on ennustetekijöiltään huonoin verrattuna papillaariseen tai kromofobiseen karsinoomaan. Kirkassoluinen karsinooma on usein papillaarista ja kromofobista karsinoomaa suurempi ja huonommin erilaistunut, ja lisäksi siinä etäpesäkkeiden syntymisen vaara on suurempi. (Joensuu, ym. 2013.)

2.1.1 Munuaissyövän riskitekijät

Munuaissyövän parhaiten tunnettu riskitekijä on tupakointi. Jopa noin 30 % munuaissyövästä uskotaan johtuvan tupakoinnista. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että syöpään sairastumisen riski kasvaa huomattavasti tupakointimäärän myötä (Kallio 2004. 13–14). Tupakoinnin lopettaminen vähentää munuaissyövän riskiä melko nopeasti. Jo 10 vuoden kuluttua riski on pienentynyt huomattavasti. (Joensuu, ym. 2013.).

Toinen selkeä riskitekijä on ylipaino. Ylipainon merkityksen syövän syntyyn on todettu olevan suurempi naisilla kuin miehillä (Kallio 2004. 13–14). Vaikka ylipaino on useissa tutkimuksissa yhdistetty kohonneeseen munuaissyöpäriskiin, ei tarkkaa patofysiologista mekanismeja tunneta (McGuire & Fitzpatrick 2011. 356). Ruokavalion, kuten alkoholin tai kahvin käytön, yhteyttä munuaissyöpään ei ole todettu. Joidenkin tutkimusten mukaan vihannesten ja hedelmien käyttö pienentäisi syöpään sairastumisriskiä. (Joensuu, ym. 2013.)

Myös eräät perinnölliset sairaudet, kuten Von Hippel-Lindaun oireyhtymä (VHL), ovat yhteydessä syövän syntyyn. Oireyhtymää sairastavilla esiintyy kirkassuoluista munuaissyöpää. Tässä oireyhtymässä kasvaimet ovat usein multifokaalisia eli esiintyvät useassa kohdassa samaan aikaan, ja ilmaantuvat jo nuorilla. Ei-perinnölliseen syöpään sairastuneilla kasvaimet ovat tyypillisesti unifokaalisia, eli esiintyvät yhdessä paikassa. Lisäksi ne yleensä ilmaantuvat vasta vanhemmalla iällä. Monilla munuaissyöpään sairastuneista potilaista ei kuitenkaan ole todettu yhtään tunnettua riskitekijää. (Joensuu, ym. 2013.)

2.1.2 Munuaissyövän diagnostiikka ja hoito

Munuaissyövän oireet ovat usein monimuotoisia ja saattavat viitata muihin sairauksiin. Tavallisimpia oireita ovat verivirtsaisuus, kyljen alueen kivut, kuumeilu ja laihtuminen. Usein munuaissyöpä löydetään sattumalta muiden tutkimusten yhteydessä, esimerkiksi tutkittaessa kohonnutta verenpainetta tai hemoglobiinia. Syövän löytyessä noin 30 %:lla potilaista on jo etäpesäkkeitä. Sattumalta löydettyjen syöpien ennuste on kuitenkin keskimääräistä parempi verrattuna oireita aiheuttaviin syöpiin. (Joensuu, ym. 2013)

Munuaissyövän toteamiseen käytetään kuvantamistekniikoita, joista yleisimmin käytössä on kaikukuvaus sekä tietokonetomografia. Tietokonetomografialla saadaan tarkempaa tietoa kasvaimesta, sen levinneisyydestä ja etäpesäkkeistä, mutta usein kaikukuvaus riittää kasvaimen toteamiseen. Hyvänlaatuiset kasvaimet erotetaan pahanlaatuisista biopsian eli kudoksenäytteen perusteella, mutta usein munuaissyöpä on kuvantamistutkimuksissa tyypillisen näköinen, selkeästi erottuva, yksittäinen kasvain, eikä biopsiaa välttämättä tarvita. (Joensuu, ym. 2013.)

Leikkaushoito on munuaissyövän yleisin ja ensisijainen hoitomuoto. Tavallisin leikkaus on radikaali nefrektomia eli koko munuaisen poisto. Lisäksi tarvittaessa voidaan myös poistaa imusolmukkeita tai lisämunuaisten, jos kasvain on levinnyt laajalle alueelle. Radikaalin nefrektomian edellytyksenä on, että potilaan toinen munuaisten toimii riittävästi. Myös munuaiskudosta säästävä osittainen nefrektomia on mahdollinen. Osittainen munuaisen poisto voidaan tehdä vain pienille T1-luokan kasvaimille (ks. taulukko 1 ja kuva 1). Osittainen munuaisen poisto tehdään lisäksi potilaille, joilla on vain yksi munuaisten tai kasvain kummassakin munuaisessa, sekä periytyvissä syövässä, joissa on suuri uusiutumistaipumus. (Joensuu, ym. 2013.)

Sädehoitoa ei yleensä käytetä paikallisen munuaissyövän hoidossa. Joissakin tapauksissa potilaan oireita, kuten vaikeaa kipua, voidaan lieventää sädehoidolla (Joensuu, ym. 2013.). Paikallisen munuaissyövän hoidossa ei yleensä tarvita leikkauksen jälkeistä liittänlääkehoitoa, jolloin pelkkä tilanteen seuranta riittää. Jos syöpä on metastasoitunut, sen hoitoa leikkauksen jälkeen jatketaan lääkkeillä. (Javanainen 2011. 10–15)

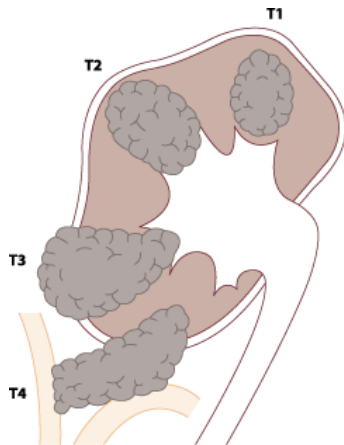
Perinteisellä solunsalpaajahoidolla ei munuaissyövän hoidossa saavuteta hyviä hoitovasteita. Sen sijaan melko uusilla täsmälääkkeillä, joiden vaikutus perustuu muun muassa angiogeneesin eli verisuonten muodostumisen estämiseen, on saatu lupaavia tuloksia (Wilenius 2010.) Vuoteen 2006 asti levinneen syövän hoitona käytettiin pääasiassa sytokiinihoitoa (interferoni alfa tai interleukiini-2). Suomessa on käytetty sytokiinihoitoista eniten interferonia alfaa, sillä interleukiini-2:lla on todettu melko vakavia haittavaikutuksia (Joensuu, ym. 2013).

Interferoni alfan käyttö on vähentynyt vuoden 2005 jälkeen, jolloin hyväksyttiin uusia täsmälääkkeitä levinneen syövän hoitoon. Näillä täsmälääkkeillä on kaksi päävaikutusmekanismia, joko angiogeneesin estäminen tai mTOR-signaalintimolekyylin toiminnan estäminen, tai molemmat samanaikaisesti (Joensuu, ym. 2013). mTOR (mammalian target of rapamycin) -kinaasi on osa solunsisäistä signaalinvälitystä, joka vaikuttaa solujen erilaistumiseen ja kasvuun (Wilenius 2010.). Eurooppalaisen hoitosuosituksen mukaan levinneen munuaissyövän, etenkin kirkassoluisen munuaiskarsinooman, hoitona voidaan käyttää esimerkiksi sunitinibiä tai bevasitsumabin ja interferoni alfan yhdistelmää. Potilaille, joiden ennuste on huono, suositellaan temsirolimuusia (Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea 2013.). Näistä sunitinibi ja bevasitsumabi vaikuttavat angiogeneesiin ja temsirolimuusi mTOR-signaalintireittiin (Wilenius 2010.).

Munuaissyövän sairastaneita seurataan viisi vuotta leikkauksen jälkeen, joten mahdolliset uusiutumat ja etäpesäkkeet huomataan yleensä ajoissa. On kuitenkin mahdollista, että etäpesäkkeitä löytyy vielä 20 vuoden jälkeen, mutta tämä on kuitenkin harvinaisempaa. Seurantatutkimuksina käytetään keuhkokuvausta, kaikututkimusta sekä tietokonetomografiaa. Seuranta tapahtuu aluksi noin puolen vuoden välein ja myöhemmin vuoden välein. Korkean uusiutumisriskin potilailla suositellaan harvennettua seurantaa (2v välein) aina 10 vuoteen asti. (Javanainen 2011. 15; Joensuu, ym. 2013.)

2.1.3 Munuaissyövän levinneisyyden luokittelu

Munuaissyövän ennuste arvioidaan levinneisyyden sekä kudoksenäytteen avulla. Levinneisyyttä ilmaistaan maailmanlaajuisella TNM-luokituksella. Luokituksessa T (tumor) kuvaa kasvaimen laajuutta munuaisessa, N (node) leviämistä lähimpiin imusolmukkeisiin ja M (metastasis) etäpesäkkeiden muodostumista. T-luokitus on nelitasoinen, N-luokitus kolmitasoinen ja M-luokitus kaksitasoinen. Kasvaimen laajuutta munuaisessa T-asteikon mukaan on selvennetty kuvassa 1. Taulukossa 1 on esitetty TNM-luokituksen tasot ja selitykset. (Javanainen 2011 8-10; Jonasch, ym.)



KUVA 1. Munuaiskasvaimen levinneisyyden luokittelu. T-luokkien kuvallinen selitys. (Joensuu. 2013.)

TAULUKKO 1. Munuaissyövän TNM-luokitus (2009)

T (tumor)		N (node)	
T1	Munuaisen sisäinen kasvain ≤ 7cm	N0	Imusolmukkeissa ei etäpesäkkeitä
T2	Kasvain ulottuu munuiskapseliin >7cm	N1	Etäpesäke yhdessä alueellisessa imusolmukkeessa
T3	Kasvain tunkeutuu munuaista ympäröivään rasvaan tai laskimoihin	N2	Etäpesäke useammassa alueellisessa imusolmukkeessa
T4	Kasvain tunkeutuu Gerotan faskian läpi munuaista ympäröiviin kudoksiin	M (metastasis)	
		M0	Ei etäpesäkkeitä kauempana
		M1	Etäpesäkkeitä kauempana

Levinneisyyden lisäksi kasvain luokitellaan sen erilaistumisasteen mukaan. WHO:n histologisessa luokituksessa erilaistumisastetta (gradus) kuvaavat kudosopilliset luokat 1-4, jotka todetaan sen mukaan miltä kudospäyte näyttää mikroskoopilla tarkasteltaessa. Jos kudospäytteessä on paljon jakautuvia soluja ja sen rakenne viittaa helposti leviävään tyyppiin, on kasvaimen erilaistumisaste, gradus, 4. Jos taas jakautuvia soluja on vähän ja rakenne viittaa hitaasti leviää tyyppiin, on kyseessä graduksen 1 kasvain. Muut kasvaimet ovat edellä mainittujen välistä. (Javanainen 2011. 8-10). Laajemmassa käytössä on nykyään Fuhrmanin tumaluokitus. Tässä luokittelu (1-4) tehdään tumen rakenteeseen liittyvin perustein, Fuhrman gradus 4 kasvain on ennusteeltaan huonoin (Fuhrman, ym. 1982).

2.2 Adipokiinit ja YKL-40

Rasvakudos jaetaan kahteen pääluokkaan, valkoiseen ja ruskeaan rasvakudokseen. Ruskean rasvakudoksen tehtävänä on toimia lämmöneristeenä, kun taas valkoinen rasvakudos toimii elimistön energiavarastona. Sen lisäksi valkoinen rasvakudos erittää runsaasti erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä eli se toimii endokriinisenä elimenä. (Välimäki, ym. 2009; Sane & Dunkel 2009. 27)

Rasvakudoksen solut, adiposyytit, tuottavat välittäjäaineita, kuten sytokiineja ja sytokiinien kaltaisia adipokiineja. Adipokiinit säätelevät muun muassa energia-aineenvaihduntaa sekä neuroendokriinistä järjestelmää. Ne toimivat säätelijöinä useissa immuunijärjestelmän toiminnoissa sekä tulehdusreaktiossa. Adipokiineilla on havaittu olevan sekä anti- että proinflammatorisia ominaisuuksia. Lisäksi adipokiinit toimivat välittäjäaineina rasvakudoksen ja immuunijärjestelmän välillä. (Awad & Bradford (toim.) 2010. 24–25). Adipokiinien on havaittu olevan osallisina myös keuhkosairauksiin kuten keuhkohtaumatautiin, astmaan. (Leivo-Korpela 2014.) ja nivelrikkoon. (Scoltece, ym. 2013.) liittyvässä tulehduksessa.

Adipokiineja ovat esimerkiksi adiponektiini, adipsiini ja leptiini. YKL-40 on adipokiinien kaltainen biomarkkeri. Adipokiineja tuotetaan pääasiassa adiposyyteissä, mutta myös jonkin verran makrofageissa. YKL-40 tuotetaan pääosin makrofageissa. Myös monien muiden solujen kuten esimerkiksi joidenkin syöpäsolujen on havaittu tuottavan adipokiineja ja YKL-40:ä. (Johansen, ym. 2006. 194–202; Välimäki, ym. 2009. 27).

2.2.1 Adiponektiini

Adiponektiini on yksi parhaiten tunnetuista adipokiineista. Se on monomeerinä 30 kDa:n kokoinen, mutta proteiinisynteesin jälkeen sitä muokataan pääasiassa kolmeen erilaiseen muotoon: trimeeriksi, heksameeriksi tai vielä suuremmiksi proteiineiksi (12-18meeri). Näitä kaikkia kolme muotoa esiintyy verenkierrossa. Adiponektiini tuotetaan adiposyyteissä. Sitä tuotetaan jatkuvasti ja sen pitoisuus voi olla jopa 0,05 % kaikista plasman proteiineista. (Litwack 2012.)

Adiponektiinin on todettu lisäävän glukoositoleranssia ja insuliiniherkkyyttä. Adiponektiinitasot ovat huomattavasti matalampia liikalihavilla henkilöillä. Sen pitoisuuden on huomattu olevan kääntäen verrannollinen sekä painoindeksiin (BMI), veren leptiinipitoisuuteen että insuliiniresistenssiin. Tyypin 2 diabeteksen yhteydessä adiponektiinitasot veressä laskevat. Naisilla adiponektiinin erityis on runsaampaa kuin miehillä (Smith & Minson 2012.). Anoreksiaa sairastavilla potilailla on usein korkeat adiponektiinitasot (Fantuzzi 2007.).

Elimistön tulehdusreaktioissa adiponektiini toimii pääasiallisesti anti-inflammatorisena eli tulehdusta rauhoittavana tekijänä (Ouchi, ym. 2011.) Sen on todettu lisäävän anti-inflammatoristen tekijöiden, kuten interleukiini-1RA:n ja interleukiini-10:n, tuotantoa makrofageissa ja monosyyteissä. (Wolf, ym. 2004.) Adiponektiinillä on huomattu olevan kuitenkin myös proinflammatorisia eli tulehdusta edistäviä vaikutuksia. Sen on osoitettu lisäävän interleukiini-8:n tuotantoa ihmisen makrofageissa lipopolysakkaridin läsnä ollessa sekä lisäävän makrofagien fagosytoosia eli solusyöntiä. (Saijo, ym. 2005.) Adiponektiini on todettu assosioituvan nivelrikon patogeneesiin (Koskinen, ym. 2011).

2.2.2 Adipsiini

Adipsiini tunnetaan myös nimellä komplementtitekijä D. Se löydettiin vuonna 1986. Hiirillä adipsiinia tuotetaan vain adiposyyteissä, kun taas ihmisillä adiposyyttien lisäksi sitä tuotetaan myös monosyyteissä ja makrofageissa. Adipsiini on yksi merkittävimmistä adiposyyttien tuottamista proteiineista. Eläinkokeissa on huomattu adipsiinitasojen olevan matalampia ylipainoisilla kuin normaalipainoisilla hiirillä, mutta ylipainoisilla henkilöillä adipsiinin pitoisuus on samalla tasolla tai jopa korkeammalla kuin normaalipainoisilla henkilöillä. (Lo 2014, Fantuzzi 2007.)

Komplementti, jonka aktivaation vaihtoehtoisen reitin entsyyminä adipsiini (komplementtitekijä D) toimii, aktivoi useiden tulehdusta säätelevien välittäjäaineiden tuottoa. Komplementin reaktioketjuun kuuluu kaiken kaikkiaan noin 20 proteiinia. Komplementin vaihtoehtoinen reitti aktivoituu mikrobien vaikutuksesta komplementtitekijöiden B ja C3 muodostaman kompleksin kautta. Adipsiini on seriiniproteaasi, joka spesifisesti katalysoi komplementtitekijä B:ssä tietyn peptidisidoksen katkeamisen. Reaktioketjun vaiheet johtavat sekä neutrofiilien, että makrofagien fagosytoosin voimistumiseen sekä muun muassa mikrobien solukalvon tuhoamista välittävän MAC-makromolekyylin (membrane-attack complex) tuottamisen aloittamiseen. (White, ym. 1992.)

2.2.3 Leptiini

Leptiini on adipokiineista kaikista tunnetuin. Se on ylipainogeenin (*ob*-geeni, obese gene) koodaama, 16 kDa:n kokoinen peptidihormoni. Se tuotetaan pääosin valkoisen rasvakudoksen adiposyyteissä (Dube, ym. (toim.) 2010. 287- 290). Leptiini löydettiin vuonna 1994. Leptiinin löytäminen tapahtui sattumalta lihavuustutkimuksen yhteydessä. Tutkimuksessa käytetystä hiirimallista huomattiin, että mutaatio molemmissa *ob*-geenin alleeleissa aiheuttaa häiriintynyttä leptiinin tuotantoa (Awad, Bradford (toim.) 2010.).

Leptiinin puutoksen todettiin aiheuttavan liikalihavuutta, insuliiniresistenssiä sekä hyperfagiaa eli epänormaalia syömisen lisääntymistä. Leptiini on keskushermostoon vaikuttava signaalintimolekyyli, joka säätelee nälän tunnetta. Säättely tapahtuu hypotalamuksen kautta. Leptiinipitoisuuden on todettu korreloivan vahvasti painoindeksin (BMI) kanssa. Leptiinipitoisuus on normaalisti korkeampi ylipainoisilla kuin normaali-painoisilla henkilöillä. (Fantuzzi 2007., Välimäki ym. 2009. 882–883). Leptiinin pitoisuus veressä on suhteessa rasvakudoksen määrään, mutta ylipainoisilla keskushermoston leptiiniresistenssin vuoksi se ei vähennä ruokahalua normaaliin tapaan. (Välimäki ym. 2009. 882–883)

Leptiini toimii myös immuunipuolustuksessa. Leptiinin tehtäviin kuuluu muun muassa T-lymfosyyttien suojaaminen apoptoosilta ja vaikuttaminen niiden sytokiinituotantoon. Lisäksi leptiini osallistuu T-solujen jakautumisen ja aktivaation säätelyyn. Se vaikuttaa myös monosyyttien aktivaatioon, fagosytoosiin ja sytokiinituotantoon. (Fantuzzi 2007.) Leptiini toimii välittäjäaineena tulehduksessa. Sen tuottoa tulehduksen akuutin vaiheen aikana aktivoi nopeasti bakteerien soluseinän lipopolysakkaridi (LPS), interleukiini-1 sekä TNF- α (tuumorinekroositekijä α). (Loffreda, ym. 1998.).

2.2.4 YKL-40

YKL-40 tunnetaan myös nimellä chitinase-3-like-1. Se on kitinaasien kaltainen proteiini ilman kitinaasiaktiivisuutta. Se on hepariinia, kitiniä ja kollageenia sitova glykoproteiini, joka on kooltaan noin 40 kDa. (Roslind & Johansen 2009. 1-4). YKL-40 -geeniä ekspressoidaan muun muassa makrofageissa ja neutrofiileissä sekä rusto- ja nivelsoluissa. Lisäksi joidenkin syöpäsolujen on todettu tuottavan sitä (Prakash, ym. 2013). YKL-40:n roolia biomolekyylinä ei tarkalleen tunneta. (Kazakova, ym. 2010.)

YKL-40 on yhdistetty kudosisvaurioihin sekä tulehdukseen ja sitä kautta myös tauteihin, jotka aiheuttavat kudoksen rappeutumista. Tällaisia tauteja ovat esimerkiksi astma (Chupp, ym. 2007.) ja nivelreuma (Väänänen, ym. 2014.). Lisäksi YKL-40:n mahdollisuutta toimia biomarkkerina on tutkittu laajasti. On huomattu, että korkeat YKL-40 pitoisuudet ovat yhteydessä levinneeseen syöpään ja huonoon selviämisenusteeseen. Kohonneita YKL-40 tasoja on havaittu keuhkosyövän, melanooman ja rauhassyöpien yhteydessä. (Johansen, ym. 2006.)

2.2.5 Adipokiinit, YKL-40 ja munuaissyöpä

Munuaissyövän ja ylipainon välillä on todettu yhteys. Ylipainon on huomattu liittyvän etenkin kirkassoluisen munuaiskarsinooman kehittymiseen. Useissa tutkimuksissa on ylipainon lisäksi kirkassoluisen munuaiskarsinooman kehittymiseen liitetty myös von Hippel-Lindaun oireyhtymä (VHL). Tutkimuksissa on huomattu, että yhdessä rasvakuoksen tuottamat adipokiinit, hypoksia, ylipainoon liittyvä korkea verenpaine ja VHL-geenin mutaatiot vaikuttavat angiogeneesiin, mikä puolestaan edistää syöpäkuoksen kasvua. (McGuire & Fitzpatrick 2011. 356)

Adiponektiinitasot ovat normaalia matalampia ylipainoisilla henkilöillä. Adiponektiinin tiedetään heikentävän syöpäsolujen toimintaa Bcl-2 ja STAT3 välitteisesti. Bcl-2 säätelee muun muassa apoptoosia ja STAT3 vaikuttaa muun muassa solun erilaistumiseen ja apoptoosiin. Adiponektiini toimii myös angiogeneesin inhibiittorina. Leptiinitasot ovat normaalia korkeampia ylipainoisilla henkilöillä. Leptiinin on näytetty olevan angiogeneesiä edistävä tekijä ja lisäksi se säätelee immuunijärjestelmää. Tutkimusten mukaan samanaikainen korkea leptiinipitoisuus ja matala adiponektiinipitoisuus lisäsivät munuaissyövän riskiä. (McGuire & Fitzpatrick 2011. 356–360, Liao, ym. 2013.)

YKL-40:n pitoisuuksien on havaittu olevan sitä korkeampia, mitä pidemmälle syöpä on edennyt. Lisäksi korkea YKL-40 pitoisuus on yhdistetty huonoon ennusteeseen. YKL-40:n roolia syövän synnyssä ei kuitenkaan tarkalleen tiedetä. Sen uskotaan toimivan angiogeneesiä edistävä tekijänä, suojelevan syöpäsoluja apoptoosilta, vaikuttavan syöpäsolujen erilaistumiseen ja kasvuun sekä stimuloivan kasvainta ympäröiviä fibroblasteja. (Johansen, ym. 2006.)

2.3 ELISA-menetelmä

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) on immunologinen menetelmä, joka perustuu vasta-aineiden ja niiden antigeenien eli tutkittavien analyyttien spesifiseen sitoutumiseen. Vasta-aineet ovat proteiineja, jotka sitoutuvat spesifisesti konformaation-
sa mukaisesti kohdemolekyyleihinsä eli antigeeneihin (Crowther 2009. 9-12). Spesifi-
nen sitoutuminen mahdollistaa tutkittavan analyytin havaitsemisen myös hyvin pieninä
pitoisuuksina. Vasta-aineen ja kohdemolekyylin välinen sidos on kestävä, joten se ei
hajoa määrittelyn eri vaiheiden aikana. (Davies 2005. 3-4)

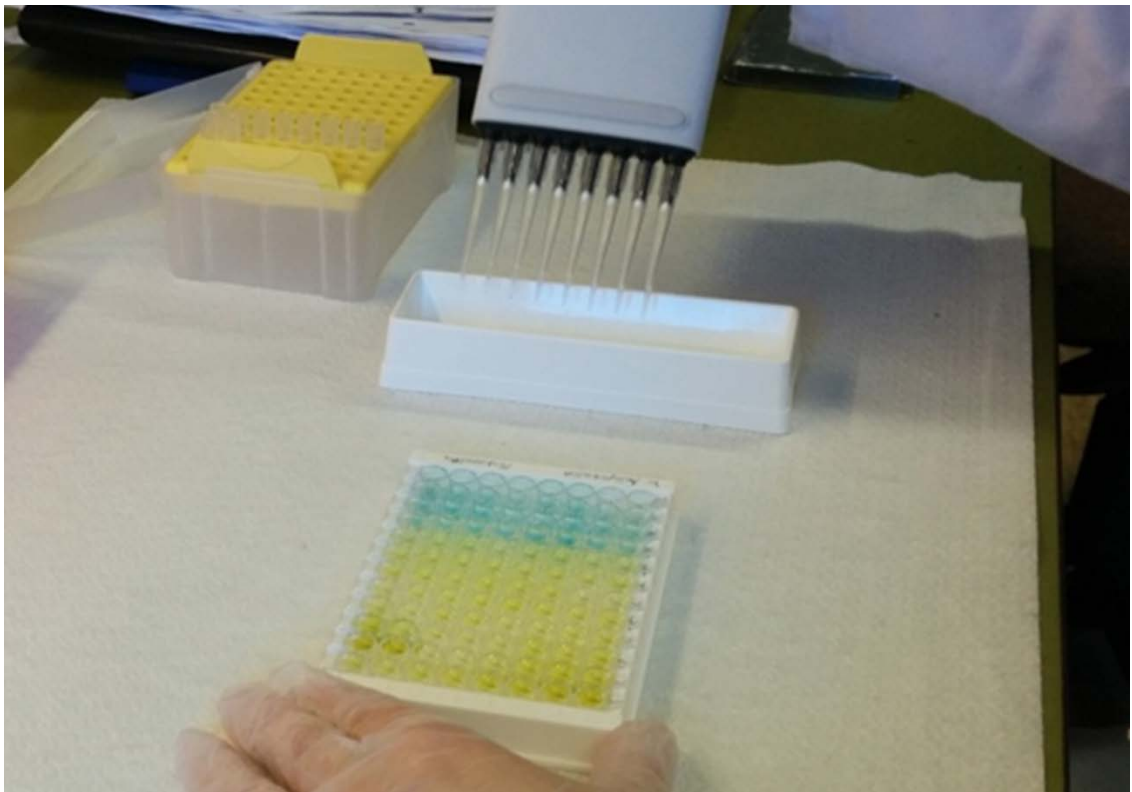
ELISA-menetelmän pääperiaatteena on, että reaktion yksi komponentti sitoutuu kiinte-
ään alustaan, tavallisesti muoviselle kuoppalevyille. Kuoppiin lisätään määrittelyssä
käytettäviä reagensseja, joita inkuboidaan tietyissä olosuhteissa reaktion edistämiseksi.
Pesuvaiheilla erotellaan sitoutumattomat molekyylit sitoutuneista. Määrittelyn tulos
mitataan näytteiden värinmuodostumisesta spektrofotometrisesti. (Davies 2005. 3-4,
Crowther 2009. 9-12)

Määritettävään antigeeniin sitoutuva vasta-aine detektoidaan leimauksen avulla. Aikai-
semmin detektoinnissa käytettiin radioaktiivista leimausta (radioimmunoassay RIA),
mutta nykyään käytössä on pääosin entsyymileimaus (ELISA). Detektio perustuu vasta-
aineeseen sidotun entsyymin reaktioon substraatin kanssa. (Davies 2005. 798, Crowther
2009. 12–42)

Entsyymi voidaan sitoa vasta-aineeseen esimerkiksi streptavidini-biotiini -sidoksella.
Tällöin biotiinimolekyyli liitetään (sekundaari)vasta-aineeseen ja entsyymi puolestaan
konjugoidaan streptavidini-proteiiniin, joka sitoutuu spesifisesti biotiinimolekyyliin.
Yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase,
HRP) sekä alkalinen fosfataasi. HRP:n kanssa käytetty substraatti on yleensä tetrame-
tylibentsidiini (tetramethylbenzidine, TMB) (Jordan 2005. 419–420). Substraattiliuok-
seen on yleensä lisätty vetyperoksidia, jolloin se entsyymin kanssa reagoidessaan tuot-
taa värillistä reaktiotuotetta, joka voidaan detektoida spektrofotometrisesti. Entsyymien
(HRP) ja substraatin (TMB) reaktion tuotteena muodostuu sininen yhdiste. Entsyymire-

aktiot pysäytetään lisäämällä reaktioon happoa tai emästä, jolloin pH:n muutos pysäyttää reaktion. (Crowther 2009. 9-12)

ELISA-menetelmästä on useita erilaisia muunnoksia, mutta yleensä ne jaotellaan kolmeen päätyyppiin: suoraan ja epäsuoraan menetelmään sekä sandwich-ELISA:aan. Näistä sandwich-ELISA voidaan jakaa vielä suoraan ja epäsuoraan menetelmään. Kaikkia kolmea menetelmätapaa voidaan soveltaa myös kilpailevana (kompetitiivisena) tai inhiboivana menetelmänä. (Jordan 2005. 419)



KUVA 2. ELISA-menetelmässä entsyymireaktio pysäytetään esimerkiksi hapolla, jonka jälkeen syntyneen värillisen kompleksin absorbanssi mitataan spektrofotometrillä.

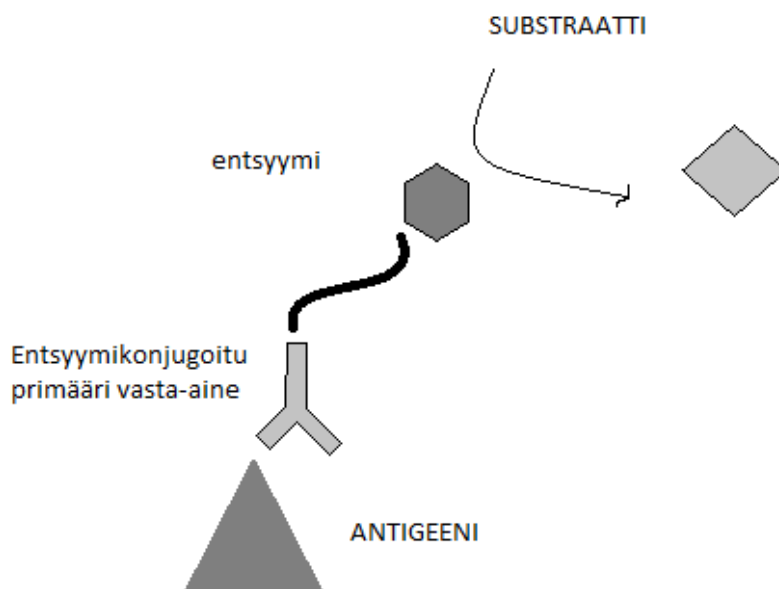
2.3.1 Suora ja epäsuora menetelmä

Suoraa menetelmää voidaan pitää yksinkertaisimpana ELISA-menetelmänä. Se perustuu määritettävän näytteen antigeenin epäspesifiseen sitoutumiseen kuoppalevyn pohjalle ja siihen sitoutuvan spesifisen leimatun vasta-aineen detektioon. (Crowther 2009. 12–27)

Määritettävä näyte, joka mahdollisesti sisältää määritettävää antigeeniä laimennetaan sopivalla puskurilla, usein neutraalin pH:n fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (phosphate buffered saline, PBS) tai korkean pH:n karbonaatti- tai bikarbonaattipuskurilla. Laimennospuskuri ei saa sisältää antigeenin sitoutumiseen vaikuttavia komponentteja kuten muita proteiineja tai antigeenin kaltaisia yhdisteitä. Laimennettu näyte pipetoidaan kuoppalevylle, johon proteiinit inkuboinnin aikana kiinnittyvät passiivisesti. Inkubaation jälkeen sitoutumaton osa näytteestä pestään pois. (Crowther 2009. 12–27)

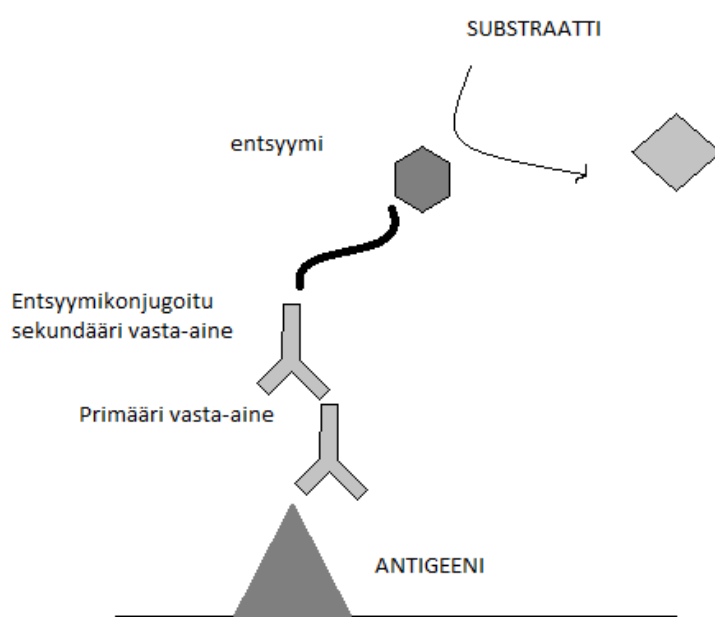
Pesun jälkeen levyille lisätään määritettävälle antigeenille spesifinen entsyymileimattu vasta-aine. Vasta-aine laimennetaan puskuriliuoksella, johon on lisätty epäspesifistä sitoutumista estävää proteiinia. Tällaisena blokkausproteiinina käytetään esimerkiksi naudan seerumin albumiinia (bovine serum albumin, BSA). Blokkausproteiini estää vasta-aineen passiivista sitoutumista kuoppalevyyn, mutta ei vaikuta antigeenin ja vasta-aineen spesifisen sitoutumiseen (Jordan 2005. 419). Inkubaation aikana entsyymileimattu vasta-aine sitoutuu spesifisesti kuoppalevyn pohjalle sitoutuneeseen antigeeniin. Inkubaation jälkeen levy pestään sitoutumattoman vasta-aineen poistamiseksi (Crowther 2009. 12–27).

Seuraavaksi kuoppalevylle lisätään detektion mahdollistava komponentti, entsyymille sopiva substraatti. Reaktion annetaan edetä tietty aika, jonka jälkeen reaktio pysäytetään lisäämällä kuoppiin happoa tai muuta sopivaa pysäytysreagenssia. Pysäytyksen jälkeen reaktiossa syntyneen värillisen yhdisteen absorbanssi mitataan spektrofotometrisesti sopivalla aallonpituudella. (Crowther 2009. 12–27) Kuvassa 3 on kuvattu suora ELISA-menetelmä.



KUVA 3. Suora ELISA

Epäsuora ELISA -menetelmä eroaa suorasta menetelmästä vain vähän. Siinä kuoppalevyllä sitoutuneeseen antigeeniin sitoutuu ensin leimaamaton primäärivasta-aine. Leimaamaton vasta-aine on laimennettu puskuriliuokseen, joka sisältää epäspesifistä sitoutumista estävää komponenttia, blokkauksproteiinia (Jordan 2005. 419). Inkubaation jälkeen pestään pois sitoutumaton vasta-aine ja lisätään entsyymileimattu sekudäärivasta-aine, joka sitoutuu primääriin vasta-aineeseen. Sekudäärivasta-aine on laimennettu kuten primääri-vasta-aine. Tämän jälkeen määrittystä jatketaan kuten suorassa menetelmässä (Crowther 2009. 12–27). Kuvassa 4 on kuvattu epäsuoran ELISA-menetelmän periaate.



KUVA 4. Epäsuora ELISA

2.3.2 Sandwich-ELISA

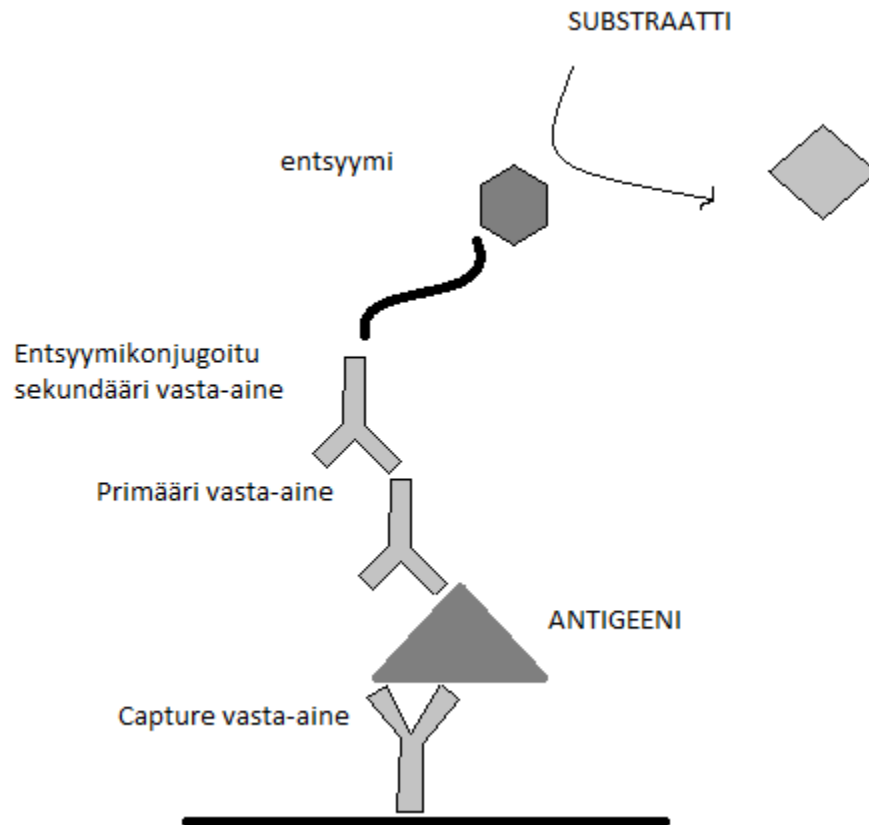
Sandwich-ELISA -menetelmä perustuu kahden eri vasta-aineen spesifiseen sitoutumiseen määritettävään analyyytiin, antigeeniin. Edellytyksenä sandwich-menetelmän käytölle on, että antigeenilla on vähintään kaksi epitooppia eli vasta-ainetta sitovaa kohtaa. Toisella epitoopilla se tarttuu kuoppalevylle sitoutuneeseen vasta-aineeseen ja toisella lisättyyn sekudäärivasta-aineeseen. (Crowther 2009. 12–27)

Tässä menetelmässä kuoppalevyn pohjalle pipetoidaan ensin sitova (capture) vasta-aine. Se sitoutuu levyn kuoppiin epäspesifisesti. Inkubaation jälkeen levy pestään, jolloin saadaan poistettua sitoutumaton vasta-aine (Crowther 2009. 12–27). Tämän jälkeen levylle pipetoidaan puskuria, joka sisältää blokkauksproteiinia. Blokkauksproteiini estää antigeenin epäspesifisen sitoutumisen kuopan vasta-aineettomalle alueelle tai sitovaan vasta-aineeseen. Inkubaation jälkeen levy pestään jälleen. (Jordan 2005. 421)

Näytteet laimennetaan määritettävän analyytin tarpeen mukaan. Laimentamiseen käytetään myös blokkauksessa käytettyä puskuria. Näin saadaan minimoitua näytteessä olevien mahdollisten häiritsevien komponenttien vaikutus. Inkubaation aikana määritettävä antigeeni sitoutuu sitovaan vasta-aineeseen. Pesun jälkeen levylle lisätään primäärivasta-aine, joka sitoutuu sitovaan vasta-aineeseen sitoutuneeseen antigeeniin. Jos käytössä on entsyymileimattu vasta-aine, voidaan tulos mitata tämän jälkeen ja kyseessä on suora sandwich-ELISA. (Crowther 2009. 12–27, Jordan 2005. 421)

Mikäli primäärivasta-aine ei ole leimattu, eli kyseessä on epäsuora sandwich-ELISA, lisätään siihen seuraavan pesun jälkeen detektion mahdollistava entsyymikonjugoitu vasta-aine. Erilaisia vaihtoehtoja detektoitavan molekyylin liittämiseen ja detektoitaviin molekyyliin on monia. Entsyymi voidaan sitoa vasta-aineeseen esimerkiksi streptavidini-biotiini -sidoksella. Samaa entsyymikonjugoitua vasta-ainetta voidaan käyttää useille eri primäärivasta-aineille. Primäärivasta-aineen ja kuoppiin sidotun capture vasta-aineen täytyy olla peräisin eri eläinlajeista, jotta entsyymikonjugoitu vasta-aine reagoi vain primäärivasta-aineen kanssa, mutta ei capture-vasta-aineen kanssa. (Crowther 2009. 12–27)

Inkuboinnin jälkeen toistetaan pesu ja lisätään substraatti. Entsyymien reaktiossa substraatin kanssa syntyy värillinen reaktiotuote, jonka absorbanssi voidaan mitata spektrofotometrisesti (Crowther 2009. 12–27). Kuvassa 5 on kuvattu epäsuoran sandwich-ELISA -menetelmän periaate.



KUVA 5. Epäsuora sandwich-ELISA

2.3.3 Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät

Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät perustuvat määritettävän analyytin ja käytettävän vasta-aineen kilpailemiseen samasta sitoutumispaikasta tai sitoutumisen häirinnästä eli mitattavan yhdisteen (antigeeni tai vasta-aine) kykyyn syrjäyttää tai häiritä tunnetun vasta-aineen tai antigeenin sitoutumista. Menetelmien perustana voi olla joko suora, epäsuora tai sandwich-menetelmä. (Crowther 2009. 12–27)

Kilpailevissa ja inhiboivissa menetelmissä analyytti on leimaamaton ja kilpaileva vasta-aine tai antigeeni on leimattu. Komponenttia, joka häiritsee sitoutumista, lisätään tunnettu määrä, jotta voidaan määrittää tuntemattoman analyytin pitoisuus. Kun näytteen antigeeni tai vasta-aine pystyy sitoutumaan lisättyyn entsyymileimattuun komponenttiin, ei antigeeni-vasta-aine- kompleksi sitoudu kuoppalevyille vaan poistuu pesuvaiheessa. Tällöin näytteen antigeenin tai vasta-aineen sitoutuessa syntyy heikompi värireaktio kuin kontrolliin, johon ei ole lisätty näytettä. (Crowther 2009. 12–27)

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Tässä työssä tavoitteena oli selvittää munuaissyövän levinneisyyttä ennustavia tekijöitä. Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää ELISA -menetelmällä kliinisestä potilasaineistosta adipokiinien adipsiini, adiponektiini, leptiini ja lisäksi YKL-40:n pitoisuudet. Tarkoituksena oli tilastollisen analyysin avulla selvittää plasman adipokiinien yhteyttä munuaissyövän etenemiseen.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Tutkittava aineisto

Tutkittavan aineiston näytteet on kerätty potilailta, joilta oli munuaissyövästä johtuen poistettu joko osa munuaisesta tai koko munuainen. Näytteet on kerätty Tampereen yliopistollisessa sairaalassa klinisten tutkijoiden toimesta. Potilaita aineistoon kuului 91, joilta kultakin oli näytteitä useasta eri aikapisteestä. Näin ollen tutkittavia näytteitä oli lähes 400 kappaletta.

Potilasaineistoon kuului sekä miehiä että naisia. Naisia potilaista oli 31,9 %. Potilaiden keski-ikä leikkaushetkellä oli $63,9 \pm 1,1$ vuotta. Suurimmalla osalla aineiston potilaista oli kirkassoluinen munuaiskarsinoma (87,9 %), joka on yleisin munuaissyövän muoto. Myös muut syöpämuodot, papillaarinen karsinoma (6,6 %) ja kromofobinen karsinoma (3,3 %), olivat aineistossa edustettuina.

Potilaat on jaoteltu kahteen ryhmään paikallisiin (TNM-luokitus T1 – T3N0M0) ja levinneisiin syöpiin (T4 tai M1). Aineistossa paikallinen syöpä oli 66 potilaalla eli 72,5 %:lla potilaista. Potilaita, joilla syöpä oli levinnyt, oli 25 (27,5 %).

Näytteitä potilailta on kerätty kahdeksassa aikapisteessä. Ensimmäisenä aikapisteenä oli nollanäyte, joka on otettu ennen leikkausta. Leikkauksen jälkeen näytteitä otettiin aikapisteissä 3, 9 ja 15 kuukautta sekä 2, 3, 4 ja 5 vuotta. Käytössä ei kuitenkaan ollut jokaiselta potilaalta näytettä kaikista aikapisteistä. Kerätyt näytteet ovat seeruminäytteitä, joita on säilytetty -80 °C:ssa.

4.2 Tutkimuksessa käytetty ELISA-menetelmä

Tutkimuksessa käytettiin R&D:n valmistamia adipokiinien määrittämiseen tarkoitettuja ELISA-kittejä (R&D systems Europe Ltd, Abingdon, UK, DuoSet ELISA). Käytetyt kitit perustuivat sandwich ELISA -menetelmään. Tutkimuksessa käytettiin valmistajan ohjeesta sovellettuja inkubaatioaikoja, joiden toimivuus oli todettu.

Työ aloitettiin edellisenä päivänä käsittelemällä määrityksessä käytettävä 96-kuoppalevy (EIA-levy Costar, Corning, Tewksbury, MA, USA) capture-aineella. Vasta-aine laimennettiin PBS:lla (pH 7.2–7.4, 0,2 µm suodatus). Levyä inkuboitiin +4 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä levy otettiin hetkeksi lämpenemään, jonka jälkeen se pestiin ELISA-pesurilla. Pesu tehtiin automaattisella ELISA -pesurilla (Tecan Hydro-Flex™ microplate washer, Männedorf, Sveitsi). Pesuriin oli ohjelmoitu soveltuva pesuohjelma, joka pesee levyä kolme kertaa. Yhteen pesuun käytettiin 250 µl pesupuskuria (PBS:sää, johon on lisätty 0,05 % Tween 20) yhtä kuoppalevyn kuoppaa kohti. Pesun jälkeen levy kuivattiin hakkaamalla sitä puhtaita käsipapereita vasten.

Tämän jälkeen levyille pipetoitiin blokkaukspuskuri (PBS, jossa 1 % BSA, 0,2 µm suodatus). Blokkauksen tarkoituksena on estää proteiinien epäspesifinen sitoutuminen kuoppiin ja sitovaan (capture) vasta-aineeseen. Levyä inkuboitiin huoneenlämmössä 24 °C:ssa yksi tunti. Inkubaatio tapahtui lämpökaapissa. Lämpökaappia käytetään, sillä se takaa tasalaatuiset olosuhteet kaikille suoritetuille ELISA-testeille. Blokkauksen jälkeen levy pestiin ja kuivattiin kuten edellä.

Levyn blokkauksen aikana valmistettiin näytelaimennokset kunkin analyysin tarpeen mukaan. Ennen laimentamista näytteet sekoitettiin ja sentrifugointiin kymmenen minuutin ajan nopeudella 10000 rpm +4 °C:ssa. Näytelaimennoksen tulee osua mahdollisimman hyvin standardisuoran suoralle osalle. Laimennokset riippuvat määritettävästä analyytistä. Käytetyt laimennokset on nähtävillä taulukossa 2. Käytetyt laimennokset olivat suuria ja niiden tekemiseen käytettiin välilaimennoksia. 1:10 000-laimennoksen saavuttamiseksi tehtiin kaksi 1:100-laimennosta. 1:200-laimennosta varten tehtiin ensin 1:50-laimennos, josta laimennettiin edelleen 1:4. Kaikkiin laimennoksiin käytettiin laimennusliuosta (PBS, jossa 1 % BSA, 0,2 µm suodatus).

Laimennoksen jälkeen näytteet pipetoitiin ensin siirtolevylle. Levyn alkuun pipetoidaan standardisuora. Mukaan levylle tulee myös nollanäyte (laimennusliuosta) sekä tasokontrolli. Tasokontrolli tulee levyn alkuun, keskelle ja loppuun. Tasokontrolli on valmistettu lisäämällä plasmaan määritettävää yhdistettä. Sen avulla seurataan, pysyvätkö määrittämisen tasot samana levyn sisällä ja koko näytesarjassa. Näytteiden pipetointi siirtolevyn kautta vähentää pipetointiaikaa varsinaiselle kuoppalevylle. Näytteitä inkuboitiin kaksi tuntia lämpökaapissa, jonka lämpötilaksi on säädetty +24 °C. Inkubaation jälkeen levy pestiin ja kuivattiin.

Seuraavaksi levylle lisättiin primäärivasta-aine, joka laimennettiin aikaisemmin käytetyllä laimennosliuoksella. Tässä vaiheessa levyä inkuboitiin lämpökaapissa (+24 °C) puolitoista tuntia, jonka jälkeen levy pestiin ja kuivattiin. Sitten levylle lisättiin entsyymikonjugoitu vasta-aine, joka oli laimennettu laimennusliuoksella. Se sitoutuu primäärivasta-aineeseen, joka on sitoutunut näytteeseen. Levyä inkuboitiin 15 minuuttia lämpökaapissa (+24 °C), jonka jälkeen levy pestiin ja kuivattiin.

Seuraavassa vaiheessa levylle lisättiin substraatti, TMB, jonka reaktiossa HRP-entsyymin kanssa muodostuu TMB-radikaali, joka on väriltään sininen. Substraatin lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin jälleen 15 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen reaktio lopetettiin lisäämällä kuoppiin 1 M rikkihappoa. Hapon lisäys lopettaa reaktion, jossa värillistä tuotetta syntyy ja muuttaa reaktiossa muodostuneen sinisen värin keltaiseksi. Tämän keltaisen värin absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä (Victor³ Multilabel Counter, Perkin Elmer, Suomi). Levy mitattiin kaksi kertaa, ensin aallonpituudella 450 nm ja sen jälkeen aallonpituudella 540 nm. Spektrofotometristä saadut tulokset siirtyivät automaattisesti MultiCalcTM (Perkin Elmer, Suomi) -ohjelmaan, joka laski näytteiden pitoisuudet standardisuoran avulla (smoothed spline -laskentamenetelmä). Näytteiden pitoisuudet saatiin yksikkönä pg/ml. Saadut tulokset taulukoitiin ja niiden todelliset pitoisuudet laskettiin laimennuskertoimien avulla.

TAULUKKO 2. Käytettyjen ELISA-kittien määrittämisalueet ja näytelaimennukset.

ELISA-kitti	Määrittämisalue (pg/ml)	Näytelaimennos
R&D human Adipsin	15,6–2000	1:10 000
R&D human Adiponec- tin	15,6–2000	1:10 000
R&D human leptin	15,6–2000	1:50
R&D human YKL-40 (chitinase-3-like-1)	15,6–2000	1:200

4.2.1 Tasokontrollit

Jokaiselle määrittäksessä mukana olleelle levyille lisättiin levyn alkuun, keskelle ja loppuun tasokontrollinäyte, jonka avulla voidaan seurata, pysyvätkö määrittäksen tasot samana levyn sisällä ja eri levyjen välillä koko näytesarjassa. Tasokontrolli on yleensä valmistettu lisäämällä plasmaan tutkittavan analyysin standardia tai näytteestä, jossa tiedetään olevan tutkittavaa analyysiä. Tasokontrollia tulee valmistaa riittävästi, jotta sitä voidaan käyttää kaikissa saman sarjan määrittäksissä. Tällöin analyysin tason vaihtelua voidaan tarkastella läpi koko sarjan.

Adipsiinin ja adiponektiinin määrittäksissä käytetty tasokontrolli oli 1:10 000 laimennettua plasmaa. Leptiinin määrittäksissä tasokontrollina käytettiin 1:50 laimennettua plasmaa. YKL-40:n tasokontrolli valmistettiin lisäämällä plasmaan standardia. Sen laimennossuhde oli sama kuin näytteillä, 1:200. Taulukossa 3 on määrittäksissä käytettyjen tasokontrollien keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokerroin (coefficient of variation, cv %).

TAULUKKO 3. Tasokontrollien keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin (cv %)

	Keskiarvo	Keskihajonta	cv %
Adipsiini (µg/l)	29,0	2,1	7,3
Adiponektiini (µg/l)	59,8	4,5	7,5
Leptiini (ng/l)	786,0	16,0	2,0
YKL-40 (ng/l)	194,1	7,1	3,7

4.3 Tilastollinen analyysi

Tulosten tilastollinen analyysi suoritettiin SPSS-tilasto -ohjelmalla. Tulosten jakautuminen analysoitiin Kolmogorov-Smirnov -testillä. Tulokset ilmoitettiin käyttäen keskilukuna normaalisti jakautuneille tuloksille keskiarvoa ja hajontalukuna keskiarvon keskihajontaa (standard error of mean, SEM). Ei-normaalisti jakautuneille tuloksille keskilukuna käytettiin mediaania ja hajontalukuna interkvartaaliväliä (interquartale range, IQR). Adipsiinin ja adiponektiinin tulokset olivat normaalisti jakautuneita, leptiinin ja YKL-40:n tulokset olivat ei-normaalisti jakautuneet. Koska leptiini ja YKL-40 eivät olleet normaali-jakautuneita, suoritettiin niille ensin logaritminen muunnos, minkä jälkeen niiden jakauma todettiin normaaliksi, jolloin myös niiden tilastolliseen tarkasteluun voitiin käyttää parametrisiä analyysejä.

Parittaisella t-testillä tai toistettujen mittausten ANOVA-varianssivertailulla laskettiin adipokiinitasojen erojen tilastollinen merkitsevyys, kun vertailtiin saman potilaan tuloksia eri aikapisteissä. Tavallista t-testiä käytettiin vertailtaessa tuloksia levinnyttä ja paikallista tautia sairastavien välillä. Tuloksia pidettiin tilastollisesti merkittävänä, jos p-arvo oli alle 0,1.

Lisäksi tutkittiin korrelaatioita adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien ja elinajan välillä sekä adipokiinien ja YKL-40 korrelaatioita keskenään. Korrelaatioanalyysiin käytettiin Spearmanin analyysejä. Tulosta pidettiin merkittävä, jos r oli $>0,3$ tai $<-0,3$ ja $p < 0,05$.

5 TULOKSET

5.1 Potilaiden adipokiini- ja YKL-40 tasot ennen leikkausta

Potilaiden adipokiini- ja YKL-40 pitoisuuksia ennen leikkausta tarkasteltiin syövän levinneisyyden mukaan. Tulokset on esitetty taulukossa 4. Taulukosta voidaan havaita, että YKL-40:n pitoisuudet olivat korkeammat potilailla, joilla oli levinnyt syöpä kuin potilailla, joilla syöpä oli paikallinen ($p=0,06$). Adipsiinin, adiponektiinin ja leptiinin osalta pitoisuudet näyttivät olevan jonkin verran matalammat potilailla, joilla todettiin levinnyt syöpä kuin niillä, joilla oli paikallinen syöpä, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä.

TAULUKKO 4. Adipokiini- ja YKL-40 pitoisuudet ennen leikkausta potilailla, joilla on paikallinen tai levinnyt syöpä.

	Adipsiini ($\mu\text{g/ml}$)	Adiponektiini ($\mu\text{g/ml}$)	Leptiini (ng/ml)	YKL-40 (ng/ml)
Paikallinen	$1,4 \pm 0,5$	$3,4 \pm 1,4$	10,4 (16,2)	84,9 (132,7)
Levinnyt	$1,2 \pm 0,4$	$3,1 \pm 1,7$	5,9 (13,1)	115,7 (160,5)
p-arvo	0,2	0,4	0,2	0,06

Adipsiinin ja adiponektiinin osalta on tulokset esitetty keskiarvona ja hajontalukuna SEM. Leptiinin ja YKL-40:n tulokset on esitetty mediaaneina ja hajontalukuna IQR.

Taulukkoa tarkasteltaessa on syytä huomata, että adipsiinin ja adiponektiinin pitoisuudet on esitetty mikrogrammoina millilitrassa ($\mu\text{g/ml}$), kun taas leptiinin ja YKL-40 pitoisuudet ovat nanogrammaa millilitrassa (ng/ml). Taulukossa on esitetty p-arvo, joka kuvaa onko adipokiinien ja YKL-40 pitoisuuksissa tilastollisesti merkittävää eroa paikallisen ja levinneen syövän potilailla ennen leikkausta. Koska leptiinin ja YKL-40:n tulokset eivät ole normaalijakautuneita, suoritettiin niille ensin logaritminen muutos, jonka jälkeen niiden jakauma todettiin normaaliksi, ja niille voitiin käyttää samaa analyysiä kuin normaalijakautuneille adipsiinille ja adiponektiinille.

5.2 Adipokiinien tasojen muutokset potilailla ennen leikkausta ja sen jälkeen

Kunkin adipokiinin ja YKL-40:n pitoisuuksien muutoksia tarkasteltiin ensin koko aineistossa ja myöhemmin siten, että potilaat jaettiin kahteen ryhmään sen mukaan oliko heillä paikallinen vai levinnyt syöpä. Adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien muutoksia tarkasteltiin kolmessa aikapisteessä; 0 kk, 2-3 kk ja 9 kk. Tarkastelua ei jatkettu myöhempiin aikapisteisiin (15 kk – 5 v), sillä potilaiden, joilta näyte on, määrä väheni huomattavasti erityisesti levinneen syövän ryhmässä.

5.2.1 Adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien muutos ajan edetessä koko aineistossa

Adipokiinien ja YKL-40 pitoisuudet kolmessa aikapisteessä (0-9 kk) sekä toistettujen mittausten ANOVA-varianssianalyysillä lasketut p-arvot on esitetty taulukossa 5. P-arvot on laskettu siten, että kummankin aikapisteen tuloksia on verrattu ensimmäisen aikapisteen tulokseen. Tarkasteltaessa tuloksia ennen ja jälkeen leikkauksen (0–2-3 kk) huomattiin, että adipsiinin ja leptiinin pitoisuuksissa oli tilastollisesti merkitsevä ero. Jatkettaessa tarkastelua pidemmälle leikkauksen jälkeen (0-9 kk) huomattiin, että adipsiinin ja leptiinin lisäksi myös adiponektiinin pitoisuus muuttui tilastollisesti merkitsevästi. Adipsiinin, adiponektiinin sekä leptiinin pitoisuudet kasvoivat ajan kuluessa leikkauksen jälkeen.

TAULUKKO 5. Adipokiinien ja YKL-40 pitoisuudet eri aikapisteissä sekä pitoisuuksien erojen merkitsevyys.

	0 kk	2-3 kk	p-arvo (0–2-3kk)	9kk	p-arvo (0-9 kk)
Adipsiini (µg/ml)	1,4 ±0,1	1,9 ±0,1	p<0,001	2,0 ±0,1	p<0,001
Adiponektiini (µg/ml)	3,2 ±0,2	3,4 ±0,2	ns	3,6 ±0,2	p=0,048
Leptiini (ng/ml)	11,6 (15,9)	13,06 (24,8)	p=0,037	16,1 (29,8)	p<0,001
YKL-40 (ng/ml)	86,9 (135,9)	92,6 (89,7)	ns	77,0 (107,0)	ns

Adipsiinin ja adiponektiinin osalta on tulokset esitetty keskiarvona ja hajontalukuna SEM. Leptiinin ja YKL-40:n tulokset on esitetty mediaaneina ja hajontalukuna IQR. ns=not significant, p>0,1 (ei tilastollisesti merkitsevää eroa)

5.2.2 Adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien muutos potilailla, joilla on joko paikallinen tai levinnyt syöpä

Potilaiden, joilla syöpä oli paikallinen, ja potilaiden, joilla syöpä oli levinnyt, tuloksia tarkasteltiin erikseen. Taulukkoon 6 on kerätty adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuudet kolmessa aikapisteessä potilailta, joilla syöpä oli paikallinen, sekä toistettujen mittaus-ten ANOVA-varianssianalyysillä lasketut p-arvot. P-arvot on laskettu siten, että kum-
mankin aikapisteen tuloksia on verrattu ensimmäisen aikapisteen tulokseen.

Tarkasteltaessa pitoisuuksien eroja ennen ja jälkeen leikkauksen (0–2–3 kk) havaittiin tilastollisesti merkittävä ero adipsiinin ja leptiinin pitoisuuksissa. Adiponektiinin ja YKL-40:n pitoisuuksissa ei tilastollisesti merkitsevää muutosta havaittu. Sama oli näh-
tävissä tarkasteltaessa pitoisuuksien muutoksia aikapisteiden 0 kk ja 9 kk välillä (Tau-
lukko 6).

TAULUKKO 6. Adipokiinien ja YKL-40 pitoisuudet eri aikapisteissä potilailla, joilla oli paikallinen syöpä sekä tulosten tilastollinen merkitsevyys.

	0 kk	2-3 kk	p-arvo (0–2–3kk)	9kk	p-arvo (0–9kk)
Adipsiini (µg/ml)	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1	p<0,001	2,0 ± 0,1	p<0,001
Adiponektiini (µg/ml)	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,2	ns	3,7 ± 0,2	ns
Leptiini (ng/ml)	10,8 (15,8)	11,6 (22,9)	p=0,057	16,1 (29,9)	p<0,001
YKL-40 (ng/ml)	86,9 (136,7)	92,6 (106,3)	ns	78,9 (107,0)	ns

Adipsiinin ja adiponektiinin osalta on tulokset esitetty keskiarvona ja hajontalukuna SEM. Leptiinin ja YKL-40:n tulokset on esitetty mediaaneina ja hajontalukuna IQR. ns=not significant, p>0,1 (ei tilastolli-
sesti merkitsevää eroa)

Potilaiden, joilla syöpä oli levinnyt, kohdalla tarkastelua tehtiin vain kahdessa aikapis-
teessä, ennen ja jälkeen leikkauksen. Potilaiden lukumäärä myöhemmissä aikapisteissä
jää niin pieneksi, että laajempaa tarkastelua ei ollut mahdollista tehdä. Taulukosta 7 ha-
vaittiin adipsiinin ja adiponektiinin pitoisuuksissa tilastollisesti merkitsevä muutos nii-
den pitoisuuksien kohotessa leikkauksen jälkeen. Leptiinin ja YKL-40:n pitoisuuksissa
ei havaittu merkitsevää eroa ennen ja jälkeen leikkauksen potilailla, joilla syöpä oli le-
vinnyt.

TAULUKKO 7. Adipokiinien ja YKL-40 pitoisuudet eri aikapisteissä potilailla, joilla oli levinnyt syöpä sekä tulosten tilastollinen merkitsevyys.

	0 kk	2-3 kk	p-arvo (0-2-3kk)
Adipsiini (µg/ml)	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2	p=0,008
Adiponektiini (µg/ml)	3,1 ± 0,8	3,9 ± 0,9	p=0,03
Leptiini (ng/ml)	10,0 (14,8)	8,7 (18,9)	ns
YKL-40 (ng/ml)	91,4 (147,2)	63,0 (183,0)	ns

Adipsiinin ja adiponektiinin osalta on tulokset esitetty keskiarvona ja hajontalukuna SEM. Leptiinin ja YKL-40:n tulokset on esitetty mediaaneina ja hajontalukuna IQR. ns=not significant, $p>0,1$ (ei tilastollisesti merkitsevää eroa)

5.3. Korrelaatio adipokiinien ja YKL-40:n välillä

Korrelaatioita havaittiin vain niiden potilaiden adipokiinien ja YKL-40 pitoisuuksissa, joilla syöpä oli paikallinen. Korrelaatiota havaittiin ensimmäisessä aikapisteessä (0 kk) eli ennen leikkausta niin adiposiinin ja adiponektiinin ($r = 0,376$ ja $p = 0,003$) kuin adiposiinin ja YKL-40:n välillä ($r = 0,448$ ja $p < 0,001$). Potilailla, joilla syöpä oli levinnyt, ei havaittu korrelaatioita adipokiinien ja YKL-40 välillä. Korrelaatioanalyysiin käytettiin Spearmanin analyysiä. Tulosta pidettiin merkittävä, jos korrelaatiokerroin r oli $> 0,3$ tai $< -0,3$ ja $p < 0,05$. Taulukossa 8 on esitetty Spearmanin analyysissä saadut tulokset.

TAULUKKO 8. Korrelaatiot adipokiinien ja YKL-40:n välillä, potilailla, joilla syöpä oli paikallinen.

	Adipsiini	Adiponektiini	Leptiini	YKL-40
Adipsiini	Korrelaatiokerroin (r)	1	0,2	0,448
	p-arvo	p=0,003	ns	p<0,001
Adiponektiini	Korrelaatiokerroin (r)	0,376	0,204	0,235
	p-arvo	p=0,003	ns	ns
Leptiini	Korrelaatiokerroin (r)	0,248	1	-0,02
	p-arvo	ns	ns	ns
YKL-40	Korrelaatiokerroin (r)	0,448	-0,02	1
	p-arvo	p<0,001	ns	ns

ns=not significant, $p > 0,05$ (ei tilastollisesti merkitsevää eroa)

5.4. Adipokiinien ja YKL-40:n tasojen korrelaatio elinaikaan

Adipokiinien ja YKL-40:n ennen leikkausta otettujen näytteiden pitoisuuksien korrelaatio elinaikaan laskettiin potilailta, joilla oli levinnyt syöpä. Taulukossa 9 on esitetty Spearmanin korrelaatioanalyysin tulokset. Tulosta pidettiin merkittävänä, jos korrelaatiokerroin r oli $>0,3$ tai $<-0,3$ ja $p < 0,05$.

YKL-40:n kohdalla havaittiin vahva negatiivinen korrelaatio ($r=-0.568$ ja $p=0.007$). Havaittiin, että mitä korkeampi YKL-40 pitoisuus potilaalla oli ennen leikkausta, sitä lyhempi oli jäljellä oleva elinaika. Leptiinin puolestaan havaittiin korreloivan positiivisesti elinajan kanssa. Kun leptiinipitoisuus oli korkea, oli potilaalla pidempi jäljellä oleva elinaika ($r=0.628$ ja $p=0.002$). Adipsiinin ja adiponektiinin osalta korrelaatiota ei havaittu.

TAULUKKO 9. Adipokiinien ja YKL-40 pitoisuuksien korrelaatio elinaikaan leikkauksen jälkeen potilailla, joilla oli levinnyt syöpä.

		Adipsiini	Adiponektiini	Leptiini	YKL-40
Elinaika	korrelaatiokerroin (r)	0,182	0,196	0,628	-0,568
leikkauksen jälkeen	p-arvo	ns	ns	p=0,002	p=0,007

ns=not significant, $p>0,05$ (ei tilastollisesti merkitsevää eroa)

6 MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELU

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää munuaissyövän levinneisyyttä ennustavia tekijöitä. Työssä mitattiin adipokiinien adipsiini, adiponektiini ja leptiini, sekä YKL-40:n pitoisuuksia kliinisestä potilasaineistosta. Pitoisuusmääritykset tehtiin ELISA-menetelmää käyttäen. Työn tarkoituksena oli selvittää plasman adipokiinien ja YKL-40:n yhteyttä munuaissyövän etenemiseen. Työssä vertailtiin tutkittujen adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien eroja ennen leikkausta, pitoisuuksien muuttumista ajan edetessä sekä adipokiinien ja YKL-40:n korrelaatiota keskenään sekä elinikään.

6.1 Menetelmien tarkastelua

Näytteiden havaittuun pitoisuuteen vaikuttavia virhelähteitä ovat mm. näytteenotto, -käsittely sekä säilytys ja määrittämisvaiheen virheet. Tässä työssä suoritettiin vain analyytin määrittäminen ELISA-menetelmällä, joten näytteenottoon tai -käsittelyyn ei ollut mahdollista vaikuttaa. Analysoidut näytteet olivat perifeerisestä verestä eroteltuja seeruminäytteitä.

Näytettä otettaessa ja käsiteltäessä on syytä tietää tutkimuksen taustat, jotta näyte voidaan ottaa oikealla tavalla. Käsittelyn aikana näytteen säilytys oikeassa lämpötilassa on tärkeää. Verinäytteitä tulee inkuboida vakioitu aika jäällä ennen sentrifugointia ja sentrifugointi tulee suorittaa +4 °C:ssa. Näin pysäytetään näytteen entsyymitoiminta ja myös sytokiinituotanto näytteenoton jälkeen. (Tapola 2003.)

Määrittämisvaiheessa erilaiset häiriötekijät voivat estää vasta-aineiden spesifistä sitoutumista ja entsyymireaktiota. Tällaisia häiriötekijöitä ovat mm. näytteen hemolyysi, ikteerisyys ja lipemia. Hemolyysi tarkoittaa että näytteeseen on hajonnut punasoluja, joista on vapautunut hemoglobiinia. Tällöin näytteet ovat väriltään punertavia. Ikteerisyys tarkoittaa näytteen korkeaa bilirubiinipitoisuutta, jolloin näytteen väri on voimakkaan keltainen. Suuri lipidipitoisuus verenkierrossa näytteenottohetkellä voi aiheuttaa näytteeseen sameutta. Tällöin on kyse lipemiasta. (Makkonen & Tuokko 1997.) Näytteitä laimennettaessa myös häiriötekijöiden määrä vähenee, joten myös virheen mahdollisuus pienenee.

Näytteiden määrittäsvaiheessa on useita mahdollisia virhelähteitä. ELISA-määrittäykseen vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi lämpötila sekä pipetointivälineistön ja pesulaitteiston kunto. Lämpötila vaikuttaa komponenttien sitoutumiseen toisiinsa sekä kuoppalevyn pohjaan. Myös entsyymireaktion kannalta on tärkeää pitää lämpötila oikeana. Immunofarmakologian tutkimusryhmässä ELISA-määrittysten inkubaatioihin käytetään lämpökaappia, jonka lämpötila on säädetty +24 °C:seen. Lämpökaapin käyttö takaa tasaiset lämpötilaolot kaikille määrittäyksille. Lämpökaapin sisällä on tasainen kosteus ja lisäksi levyt ovat valolta suojassa.

Immunofarmakologian tutkimusryhmässä on käytössä automaattinen kuoppalevypesuri. Parhaan pesutuloksen saavuttamiseksi sen kunnosta ja puhtaudesta on huolehdittava. Kontaminaatioiden estämiseksi pesurille suoritettiin päivittäin puhdistustoimenpiteet ennen käyttöä ja käytön jälkeen. Lisäksi päivän aikana suoritettiin huuhtelu vähintään kaksi kertaa. Pesuvaiheet ovat ELISA-menetelmässä hyvin tärkeitä, sillä niillä poistetaan kuoppalevyltä sitoutumattomia komponentteja.

Määrittäyksen aikana voi tapahtua lukuisia virheitä, jotka johtuvat pääasiassa määrittäjästä. Tärkeää on säilyttää reagenssit oikein niiden toimivuuden takaamiseksi. Reagensseja on säilytetty valmistajan ohjeiden mukaan joko -80 °C:ssa tai +4 °C:ssa reagenssista riippuen. Pipetointivirheet vaikuttavat lopullisiin tuloksiin. Näytteiden laimennoksessa pipetointimäärät saattavat olla hyvin pieniä tai laimennokset saattavat olla monikertaisia. Kuoppalevylle pipetoidut määrät ovat tarkkoja, mutta määrittäjästä tai pipetistä johtuen tarkkuus saattaa vaihdella. Pipetointiin pyrittiin aina käyttämään samoja pipetteja. Lisäksi pipettien kalibroinnista ja huoltamisesta huolehdittiin asianmukaisesti.

Näytteet ja standardit tulee pipetoida kuoppalevylle huolellisesti, mutta nopeasti, jotta vaikutusaika levyn alku- ja loppupäässä pysyy mahdollisimman samanlaisena. Näin samalla levyllä määritetyt näytteet ovat keskenään vertailukelpoisia. Jokaiselle levyille lisättiin levyn alkuun, keskelle ja loppuun tasokontrolli, jonka avulla voidaan tarkkailla määritettävän analyytin tasojen säilymistä sekä levyjen sisällä, että koko näytesarjassa. Tasokontrolleista laskettiin kullekin analyyttille variaatiokerroin, joka kertoo kuinka paljon vaihtelua määrittäyksissä oli. Adipsiinille variaatiokerroin oli 7,3 %, adiponektiinille 7,5 %, leptiinille 2,0 % ja YKL-40:lle 3,7 %. Variaatiokerrointa <5 % pidetään erittäin hyvänä ja <10 % hyvänä.

Määrittämisessä käytetty kuoppalevy on syytä tarkastaa ennen käyttöönottoa mahdollisten epäpuhtauksien tai kuoppien naarmujen vuoksi. Myös määrittämisajan aikana pitää huolehtia levyn pohjan puhtaudesta, sillä se vaikuttaa mittauksessa valon absorptioon ja näin ollen mittauksen tuloksiin. Määrittämisessä kaikkien reagenssien inkubaatioaikojen pitää olla tarkkoja, jotta määritettyjen levyjen välille ei synny eroja.

6.2 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksessa havaittiin YKL-40:n ennen leikkausta mitattujen pitoisuuksien ja potilaiden eliniän välillä vahva negatiivinen korrelaatio. Tämä tarkoittaa, että mitä korkeampi YKL-40 pitoisuus oli, sitä lyhyempi oli jäljellä oleva elin aika. Leptiinin pitoisuuksien kohdalla puolestaan havaittiin positiivinen korrelaatio elin aikaan. Pitoisuuksien korrelaatiota tutkittiin ensimmäisen aikapisteen eli ennen leikkausta otetuista näytteistä ja vain niiden potilaiden osalta, joilla syöpä oli levinnyt.

Tutkimuksessa havaittiin myös, että ennen leikkausta YKL-40:n pitoisuudet olivat korkeammat potilailla, joilla syöpä oli levinnyt kuin potilailla, joilla syöpä oli paikallinen. Adipsiinin, adiponektiinin ja leptiinin tuloksissa ei tilastollisesti merkittävää eroa havaittu. Kirjallisuudessa esitetyt terveen ihmisen seerumista mitatut YKL-40 tasot ovat keskimäärin 43 ng/ml (Johanssen, ym. 2006.) ja 67 ng/ml (Väänänen, ym. 2014), ja tässä työssä mitatut pitoisuudet ovat kummankin ryhmän potilailla selkeästi korkeammat.

Korrelaatio adipokiinien ja YKL-40:n välillä havaittiin vain niiden potilaiden tuloksissa, joilla syöpä oli paikallinen. Adipsiinin havaittiin korreloivan sekä adiponektiinin että YKL-40:n kanssa.

Adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien muutoksia tarkasteltiin myös leikkauksen jälkeen. Potilailla, joilla syöpä oli paikallinen, tarkastelua jatkettiin kolmanteen aikapisteeseen (0–9 kk) saakka. Potilailla, joilla syöpä oli levinnyt, tarkastelua tehtiin kahden aikapisteen välillä (0–2–3 kk). Näytteiden lukumäärä väheni huomattavasti kolmannen (9 kk) aikapisteen jälkeen, etenkin niiden potilaiden osalta, joilla syöpä oli levinnyt. Vä-

hissä olivat etenkin sellaiset potilaat, joilta näytteitä olisi ollut kaikista tai mahdollisimman monesta peräkkäisestä aikapisteestä. Tästä syystä tilastollista analyysiä ei voitu jatkaa pidemmälle, vaikka kummassakin ryhmässä oli näytteitä myös myöhemmiltä aikapisteiltä.

Adipokiinien ja YKL-40:n pitoisuuksien muutoksien tarkastelussa havaittiin, että adiposiinin, adiponektiinin ja leptiinin pitoisuudet muuttuivat tilastollisesti merkitsevästi leikkauksen jälkeen tarkasteltaessa kaikkia potilaita. Kun pitoisuuksien muutoksia tarkasteltiin erikseen kahdessa potilasryhmässä, havaittiin että adiponektiinin pitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkittävää muutosta paikallisen syövän potilasryhmässä eikä leptiinin pitoisuuksien muutoksessa levinneen syövän potilasryhmässä.

Potilasaineistosta ei ollut saatavilla painoindeksi-arvoja, joten vertailua siihen eikä vakiointia sen suhteen ollut mahdollista tehdä. Tutkituista analyyteistä etenkin leptiinin tiedetään korreloivan vahvasti painoindeksin kanssa.

Opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että YKL-40:n korkealla pitoisuudella näyttää olevan yhteys vakavasti levinneeseen munuaissyöpään. Työssä havaittiin, että mitä korkeampi oli leikkausta edeltävä YKL-40 -pitoisuus, sitä lyhyempi oli potilaan elin-aika. Tutkimuksessa saadut tulokset viittaavat siihen, että YKL-40 saattaisi toimia munuaissyövän leviämistä ja syövästä selviämistä ennustava tekijänä.

Kohonneita YKL-40:n tasoja on havaittu esimerkiksi keuhkosityövän ja melanooman yhteydessä (Johansen, ym. 2006.), mikä voisi tarkoittaa sitä, että syöpäkudos tuottaisi YKL-40:tä. Tässä työssä kuitenkin havaittiin, että YKL-40:n pitoisuus ei muuttunut tilastollisesti merkittävästi leikkauksen jälkeen, vaikka syöpäkudoksen määrä selvästi väheni tai se poistettiin lähes kokonaan. YKL-40:n pitoisuus ei laskenut, kuten olisi voinut olettaa, jos YKL-40:n tuotannosta päävastuussa olisi syöpäkudos. YKL-40 pitoisuuden nousu voi liittyä syövän käynnistämään immuunivasteeseen, jossa makrofagit tuottavat paljon YKL-40:tä (Johansen, ym. 2006).

Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta YKL-40:n olevan munuaissyövän mahdollinen biomarkkeri ennustaen syövän leviämistä ja odotettavissa olevaa elin-aikaa. Kuitenkaan YKL-40:n tarkempaa roolia ja mahdollisia vaikutusmekanismeja syövän syntyyn ja etenemiseen ei vielä tiedetä.

LÄHTEET

Awad, A., Bradford, P. (toim.). 2010. Adipose tissue and inflammation. Taylor and Francis Group. Yhdysvallat.

Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, et al. 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med*. 357:2016–2027

Crowther, JR. 2009. Methods in molecular biology, The ELISA guidebook. 2. painos. Humana Press Inc. New Jersey.

Davies, C. 2005. Introduction to Immunoassay. Teoksessa Wild, D (toim.) The Immunoassay Handbook. 3. painos. Oxford. Elsevier Ltd.

Dube, L., Bechare, A., Dagher, A., Drewnowski, A., LeBel, J., James, P. & Yada, R. (toim.) 2010. Obesity preventions; The Role of Brain and Society on Individual Behavior. Elsevier Inc. London. UK.

Fantuzzi, G. 2007. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. Humana Press Inc. New York.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. Oct 1982;6(7):655-63.)

Javanainen, M. 2011. Munuaissyöpäpotilaan opas. PDF. Tallennettu 23.10.2014

Joensuu, H., Roberts, P., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkö S., Kouri, M. & Teppo, L. (toim.) 2013. Syöpätaudit. 5. painos. Kustannus Oy Duodecim. Helsinki.

Johansen, J., Jensen, B., Roslind, A. Nielsen, D. & Price, P. 2006. Serum YKL-40, A new prognostic biomarker in cancer patients? . *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. Vol 15. p.194-202.

Jonasch, E., Gao, J., Rathmell, K. 2014. Renal cell carcinoma. *BMJ*; 349; g4797.

Jordan, W. 2005. Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Teoksessa Walker, J, Rapley, R (toim.) Medical Biomethods Handbook. Humana Press Inc. New Jersey.

Kallio. 2004. Prognostic factors in renal cell carcinoma. Väitöskirja. Tampereen yliopistopaino Oy – Juvenes Print. Tampere 2004.

Kazakow, M., Deneva, T., Uzunova, V., Srafiian, V. 2010. YKL-40 in sera of breast tumor patients. *Journal of IMAB*. Vol 16. b.3.

Koskinen, A., Juslin, S., Nieminen, R., Moilanen, T., Vuolteenaho, K., Moilanen, E. 2011. Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13:R184

Leivo-Korpela, S. 2014. *Adipokines in Inflammatory Lung Diseases*. Tampereen yliopisto. Tampere.

Liao, L., Schwartz, K., Pollack, M., Graubard, B., Li, Z., Ruterbusch, J., Rothman, N., Davis, F., Wacholder, S., Colt, J., Chow, W-H., Purdue, M. 2013. Serum leptin and adiponectin levels and risk of renal cell carcinoma. *Obesity*. Vol 21. Nro. 7.

Litwack, G. (toim.). 2012. *Adiponectin. Vitamins and hormones*. Vol.90. Elsevier Inc. London. UK.

Lo, J.C. 2014. Adipsin is an adipokine that improves beta cell function in diabetes. *Cell*. Vol. 158 (1). p. 41-53.

Loffreda, S., Yang, S., Lin, H., Karp, C., Brengman, M., Wang, D., Klein AS., Bulkley, G, Bao, C., Noble, P., Lane, M. & Diehl, AM. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB Journal*. Vol. 12 (1). p. 57-65.

Lääkealan turvallisuus- ja kehittämiskeskus Fimea. 2013. Edenneen munuaissyövän ensilinjan läkehoidot. Fimea kehittää, arvioi ja informoi. 4/2013. Fimea.

Makkonen, S. & Tuokko, S. 1997. *Näytteenotto*. Helsinki: Opetushallitus.

McGuire, B. & Fitzpatrick, J. 2011. BMI and the risk of renal cell carcinoma. The Mater Misericordiae University Hospital, Dublin, Ireland.

Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J. ja Walsh K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, Volume 11, s. 85-97. Englanti.

Prakash, M. Bodas, M., Prakash, D., Nawani, N., Khetmalas, M., Mandal, A. & Eriksson, C. 2013. Diverse pathological implications of YKL-40: Answers may lie in 'outside-in' signaling. *Cellular signaling*. Vol.25 (7). p.1567-1573

Roslind, A., Johansen, J. 2009. YKL-40: A Novel marker shared by chronic inflammation and oncogenic transformation. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 511. p.159-184.

Saijo, S., Nagata, K., Nakano, Y., Tobe, T. & Kobayashi, Y. 2005. Inhibition by adiponectin of IL-8 production by human macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol 334 (4). p. 1180-1183.

Scotece, M., Conde, J., Vuolteenaho, K., Koskinen, A., Lopez, V., Gomez-Reino, J., Lago, F., Moilanen, E., Gualillo, O. 2013. Adipokines as drug targets in joint and bone disease. *Drug Discovery Today*. Vol. 19 (3).

Smith M.M. & Minson C.T. 2012. Obesity and Adipokines: Effects on Sympathetic Overactivity. *J.Physiol*.

Sunela, K. ja Kellokumpu-Lehtinen,P-L. 2014. Munuaissyövän hoito ja ennuste. *Suomen lääkärilehti*.40/2014. Vsk 29. p.2529-2534

Välimäki, M. Sane, T., Dunkel, L. (toim.) 2009. *Endokrinologia*. 2.painos. Kustannus Oy Duocedim. Jyväskylä.

Väänänen, T., Koskinen, A., Paukkeri, E-L., Hämäläinen, M., Moilanen, T., Moilanen, E. & Vuolteenaho, K. 2014. YKL-40 as a novel factor associated with inflammation and catabolic mechanisms in osteoarthritic joints. *Mediators of Inflammation*. 2014.

White, R.T., Damm, D., Hancock, N., Rosen, B.S., Lowell, B.B., Usher, P., Flier, J.S. & Spiegelman, B.M. 1992 Human adiponin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267 (13). p. 9210-9213.

Wilenius. M. 2010. Levinneen munuaissyövän faasi I-II hoitotutkimus syöpälääkehoidon osana. Lääketieteen laitos, Tampereen yliopisto. Tampere.

Wolf, A., Wolf, D., Rumbold, H., Enrich, B. & Tilg, H. 2004. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1 RA in human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 323 (2). p. 630-635.