

MUNASARJASYÖVÄN ADENOVIRUSVÄLITTEISEN GEENI- JA
KEMOTERAPIAN TURVALLISUUS- JA BIODISTRIBUUTIOTUTKIMUS

Laura Tuppurainen

Pro gradu –tutkielma

Biotieteiden koulutusohjelma/Biotekniikan pääaine

Itä-Suomen yliopiston Biotieteiden laitos

Heinäkuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Biotieteiden koulutusohjelma, Biotekniikan pääaine

TUPPURAINEN, LAURA MARIA: Munasarjasyövän adenovirusvälitteisen geeni- ja kemoterapian turvallisuus- ja biodistribuuotitutkimus

Pro gradu -tutkielma 85 sivua

Ohjaajat: LT Hanna Sallinen ja Dosentti Sami Heikkinen ja FT Tiina Arsiola

Heinäkuu 2012

Avainsanat: Adenovirus, Angiogeneesi, Biodistribuuotio, Geeniterapia, Liukoinen VEGF-reseptori, Munasarjasyöpä

TIIVISTELMÄ

Munasarjasyöpään liittyy suurin kuolleisuus kaikista gynekologisista syöivistä, sillä syöpä diagnosoidaan yleensä levinneessä vaiheessa. Syövän aggressiivisen luonteen ja nykyisten hoitojen tehostommuuden vuoksi uusien hoitomuotojen kehittäminen on tärkeää. Tässä prekliinisessä *in vivo* -tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää munasarjasyövän adenovirusvälitteisen veri- ja imusuonten kasvua estävän geeniterapian sekä hoitoon yhdistetyn kemoterapian mahdollisia sivuvaikutuksia. Työssä selvitettiin hoitogeenien biodistribuuotio eli biologinen jakautuminen terveissä koe-eläimissä sekä geenihoidoannos, jolla saavutetaan riittävän tehokas hoitovaste syöpäkudoksen määrän vähentämiseksi ja välttämään merkittävilta hoidon aiheuttamilta sivuvaikutuksilta.

Tutkimusaineisto koostui 90 terveestä Wistar-kannan naarasrotasta. Geeninsiirtoihin käytettiin adenovirusvektoreita, jotka koodasivat sVEGFR2 ja sVEGFR3 hoitoproteiinien tuottoa. Geeniterapiaa annettiin eläimille joko korkea (2×10^{11} vp) tai matala hoitoannos (2×10^{10} vp) ja kemoterapiassa käytettiin paklitakseli ja karboplatiini sytostatteja. Eläimistä 15 sai kokeen aloituspäivänä AdsVEGFR2:a ja AdsVEGFR3:a joko korkean tai matalan hoitoannoksen. Geeniterapian ja kemoterapian yhteisvaikutuksia tutkittiin yhteensä 20 eläimellä, jotka saivat kokeen alussa AdsVEGFR2:a ja AdsVEGFR3:a korkean tai matalan hoitoannoksen sekä tästä viikon ja kahden viikon kuluttua kemoterapiaa. Pelkän kemoterapian vaikutusta tutkittiin 15 eläimellä. Kontrolliryhmissä 15 eläintä sai AdLacZ:aa ja 10 eläintä sai AdLacZ:aa sekä kemoterapiaa viikon välein. Kokeen kesto oli neljä viikkoa.

Tutkimustulokset osoittivat AdsVEGFR2:n ja AdsVEGFR3:n käyttöön perustuvan geeniterapian ja hoitoon yhdistetyn kemoterapian olevan turvallinen terveille koe-eläimille käytettäessä geenihoidoannosta 2×10^{10} vp. Adenovirusvälitteisesti tuotettujen hoitoproteiinien biodistribuuotio keskittyi odotetusti maksakudokseen, jossa niiden tuotto tapahtuu, eikä hoidoista aiheutunut merkittäviä sivuvaikutuksia. Liukoisten VEGF-reseptoreiden tuotto oli tehokkainta viikon kuluttua geenihoidosta ja kemoterapia pidensi geenihoidon vaikutusaikaa elimistössä. Tutkimuksessa saadut tulokset on hyvä huomioida arvioitaessa adenovirusvälitteisen geeniterapian turvallisuutta munasarjasyövän hoidossa ja siirryttäessä klinisiin hoitokokeisiin.

ESIPUHE

Tämä pro gradu -tutkielma suoritettiin Itä-Suomen yliopiston Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunnan Biotieteiden koulutusohjelmassa. Tutkimuksen kokeellinen osuus suoritettiin A.I. Virtanen-instituutissa professori Seppo Ylä-Herttulan molekulaarisen lääketieteen tutkimusryhmässä, jossa on erinomaiset mahdollisuudet tutkimustyön tekoon.

Haluan erityisesti kiittää ohjaajaani, LT Hanna Sallista mahdollisuudesta päästä mukaan tutkimustyön pariin sekä tuesta tätä työtä tehdessäni. Kiitän myös ohjaajiani FT Tiina Arsiolaa ja dosentti Sami Heikkistä biotieteiden laitokselta työn kirjoitusosuuden loppuun viemisessä. Suuri kiitos tutkimusryhmämme johtajalle Seppo Ylä-Herttualle, joka on mahdollistanut työn teon huippututkimuksen parissa. Kiitokset Emmi Kokille ja Svetlana Laidiselle, jotka auttoivat minua eläintöissä sekä Kati Pulkkiselle, Jonna Kuposelle, Tommi Heikuralle ja Pyy Toivaselle, jotka olivat apuna ja henkisenä tukena laboratoriotöiden suorittamisessa.

Kuopiossa, kesällä 2012

Laura Tuppurainen

LYHENNELUETTELO

AAV	adenoassosiatiivinen virus (adeno-associated virus)
Ad	adenovirus
AFOS	alkaalinen fosfataasi
ALAT	alaniini aminotransferaasi
Ang	angiopoietiini
AUC	käyränalainen pinta-ala (area under the curve)
BRCA	rintasyövälle altistava kasvunrajoitegeeni (breast cancer-associated gene)
CAR	coxsackie-adenovirusreseptori
cDNA	komplementaarinen DNA (complementary DNA)
CMV	sytomegalovirus (cytomegalovirus)
DNA	deoksiribonukleiinihappo
ELISA	entsyymiin linkitetty immunologinen menetelmä
FGF	fibroblastikasvutekijä (fibroblast growth factor)
Flk-1	sikiön maksan kinaasi (fetal liver kinase-1/ hiiren VEGFR2)
Flt-1	sikiön ihon kaltainen tyrosiinikinaasi (fms-like tyrosine kinase-1/ VEGFR1)
Flt-4	sikiön ihon kaltainen tyrosiinikinaasi (fms-like tyrosine kinase-4/ VEGFR3)
HCT	hematokriitti
HGB	hemoglobiini
HIF	hypoksiasta indusoituva transkriptiotekijä (hypoxia inducible factor)
KDR	kinaasiin liittyvä reseptori (kinase insert domain receptor/ ihmisen VEGFR2)

Krea	kreatiniini
<i>LacZ</i>	β -galaktosidaasientsyymiä tuottava markkerigeeni
LDH	laktaattidehydrogenaasi
MCH	punasolujen hemoglobiinin massa (mean cell hemoglobin)
MCHC	punasolujen keskimääräinen hemoglobiinin konsentraatio (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	punasolujen keskitilavuus (mean cell volume)
PDGF	verihiutalekasvutekijä (platelet-derived growth factor)
PlGF	istukkakasvutekijä (placental growth factor)
PLT	verihiutaleet (platelets)
qRT-PCR	kvantitatiivinen käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio (quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction)
RBC	punasolut (red blood cells)
SEM	keskiarvon keskivirhe (standard error of the mean)
sVEGFR	liukoinen verisuonen endoteelikasvutekijäreseptori (soluble vascular endothelial growth factor receptor)
WBC	valkosolut (white blood cells)
VEGF	verisuonen endoteelikasvutekijä (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	verisuonen endoteelikasvutekijäreseptori (vascular endothelial growth factor receptor)
vp	viruspartikkeli

SISÄLLYSLUETTELO

Tiivistelmä	
Esipuhe	
Lyhenneluettelo	
1. Johdanto.....	8
2. Kirjallisuuskatsaus	10
2.1. Munasarjasyöpä.....	10
2.2. Geeniterapia ja geeninsiirrot	11
2.3. Vektorit	12
2.3.1. Virusvektorit	13
2.3.2. Adenovirus.....	14
2.4. Munasarjasyövän geeniterapia	18
2.5. Geenihoidojen turvallisuus ja etiikka	18
2.6. Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi	20
2.7. Verisuonen endoteelikasvutekijät (VEGF), Neuropiliinit (NRP) ja istukkakasvutekijä (PIGF)	23
2.8. Verisuonen endoteelikasvutekijäreseptorit; VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 ...	27
2.8.1. VEGF-reseptoreiden soluunsigmentointi.....	29
2.9. Antiangio- ja antilymfangiogeneesi syövän hoidossa.....	30
3. Tutkimuksen tarkoitus ja tavoitteet.....	31
4. Materiaalit ja menetelmät	32
4.1. Eläimet	32
4.2. Virusvektorit	33
4.3. Geeniterapia	33
4.4. Kemoterapia	33
4.5. Hoitoryhmät.....	34
4.6. Kokeen aikataulu	35
4.7. Näytteet	37
4.7.1. Verinäytteet.....	37

4.7.2. Kudosnäytteet	37
4.8. Näytteiden analysointi.....	38
4.8.1. qRT-PCR	38
4.8.2. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA	40
4.8.3. Histologia	42
4.8.4. Kliininen kemia ja hematologia	43
4.9. Tilastolliset menetelmät	44
5. Tulokset.....	44
5.1. Eläinten hyvinvointi ja painonkehitys.....	44
5.2. AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 hoitogeenien ilmentyminen kudospäytteissä .	46
5.3. sVEGFR2 ja sVEGFR3 hoitoproteiinien pitoisuus verenkierrossa	49
5.4. Histologia	51
5.5. Kliininen kemia ja hematologia.....	54
6. Pohdinta	61
6.1. Eläinmallin soveltuvuus	62
6.2. Hoitojen turvallisuus ja biodistributio	63
6.2.1. Hoitogeenien ilmentyminen kudospäytteissä	63
6.2.2. Hoitoproteiinien pitoisuus verenkierrossa.....	66
6.2.3. Histologia	68
6.2.4. Kliininen kemia ja hematologia	69
6.3. Biologisten lääkkeiden tulevaisuus.....	70
6.4. Geenihoidon kliiniset sovellukset tulevaisuudessa	72
7. Lähdeluettelo	73

1. JOHDANTO

Terapeuttisesta geeninsiirrosta voidaan puhua, kun nukleiinihappoja viedään geeninkuljettimen avulla somaattisiin soluihin ja saadaan aikaan toivottu hoitovaikutus (Ylä-Herttua ja Alitalo 2003). Geeniterapia perustuu geeninkuljettimen perimän muokkaamiseen korvaamalla jokin geenialue halutun hoitoproteiinin tuottoa koodaavalla siirtogeenillä. Vektori kulkeutuu kohdesoluun, jonka jakautumismekanismien avulla vektori replikoituu ja sen perimässä olevaa siirtogeenin koodaamaa hoitoproteiinia tuotetaan. Kliinisiä geeniterapiatutkimuksia on tehty useiden eri sairauksien hoidossa, näistä tutkimuksista 65 % on kliinisiä syöpätutkimuksia (<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

Munasarjasyöpätapauksista noin 90 % on tyypiltään epiteliaalista munasarjasyöpää (Jemal ym. 2010) ja sen esiintyvyys on runsainta post-menopausaalisilla 60–70-vuotiailla naisilla. Munasarjasyövän luonteen vuoksi varhainen diagnosointi on harvinaista ja sairaus todetaan useimmiten levinneessä vaiheessa, mikä heikentää huomattavasti taudista paranemisen ennustetta. Laajoista leikkaus- ja kemoterapiahoidoista huolimatta levinneeseen munasarjasyöpään liittyy erittäin suuri uusiutumisen riski ja uusiutuneen taudin paranemisennuste on huono. Kemoterapian on osoitettu tehoavan hyvin munasarjasyöpään, mutta ongelmana on ollut resistenssin kehittyminen sytostaatteja vastaan. Viime vuosina syövän hoidon ja potilaiden ennusteen parantamiseksi ei ole tapahtunut merkittävää edistystä, näin ollen geeniterapian mahdollisuudet syöpähoitojen kehittämisessä ovat potentiaaliset.

Angiogeneesi eli verisuonten uudismuodostuminen on syöpäkasvaimen pääasiallinen keino hankkia sen kasvulle välttämättömiä ravinteita sekä happea (Folkman ja Shing 1992). Angiogeneesi ja verisuonen endoteelikasvutekijät (vascular endothelial growth factor, VEGF) ovat merkittäviä munasarjojen normaalin toiminnan, kuten follikkeleiden kasvun ja keltarauhasen kehittymisen kannalta, mutta niillä on rooli myös syövän kehittämisessä (Artini ym. 2008). Angiogeneesiä kontrolloidaan lukuisilla eri kasvu- ja säätelytekijöillä, kuten pro- ja antiangiogeenisillä molekyyleillä. Kasvaimessa näiden säätelytekijöiden ilmentyminen

on häiriintynyt, mikä johtaa sen epänormaaliin kasvuun. VEGF:n yli-ilmentymisen on osoitettu liittyvän munasarjasyövän kehittymiseen ja huonoon paranemisennusteeseen (Sowter ym. 1997). Prekliiniset munasarjasyövän geeniterapiatutkimukset perustuvat muun muassa liukoisten endoteelikasvutekijäreseptoreiden (sVEGFR) avulla tapahtuvaan veri- ja imusuonten kasvun estoon eli antiangio- ja antilymfangiogeneesiin.

Itä-Suomen yliopistossa, Kuopion A.I. Virtanen -instituutissa molekulaarisen lääketieteen tutkimusryhmässä on kehitetty ihmisen epiteliaalisen munasarjasyövän koe-eläinmalli, jossa on tutkittu adenovirusvälitteistä antiangiogeenistä ja antilymfangiogeenistä geeniterapiaa (Sallinen ym. 2006). Näissä geeniterapiaan perustuvissa tutkimuksissa liukoisten VEGF-reseptoreiden avulla estetään veri- ja imusuonten endoteelisolujen pinnalla sijaitsevien VEGF-reseptoreiden kautta tapahtuva syöpäkudoksen angiogeneesiä ja lymfangiogeneesiä aktivoiva signaalinvälitys. Munasarjasyöpäkudoksen verisuonitusta ja kasvaimen määrää on onnistuttu vähentämään immuunipuutteisessa nude-hiiressä AdsVEGFR1:n, AdsVEGFR2:n ja AdsVEGFR3:n avulla (Sallinen ym. 2009). Tutkimuksessa AdsVEGFR2:n todettiin vähentävän askitesnesteen muodostumista ja kolmen liukoisen VEGF-reseptorin yhdistelmähoidon todettiin olevan tehokkaampi syöpäkasvaimen määrän vähentämiseksi kuin käytettäessä näitä yksinään. Tutkimukset ovat osoittaneet liukoisten VEGF-reseptoreiden käytön pidentävän myös munasarjasyöpää sairastavien koe-eläinten elinikää yhdessä paklitakselisytostaatin kanssa (Sopo ym. 2012).

Aiemmat tutkimustulokset munasarjasyövän geeniterapian kehittämiseksi ovat olleet lupaavia. Tässä tutkimuksessa suoritettu munasarjasyövän geeniterapian toksikologia- ja biodistributiitutkimus liukoisten VEGF-reseptoreiden käyttöön ja tähän yhdistettyyn kemoterapiaan perustuen on tiettävästi ensimmäinen laaja tutkimus, jossa selvitetään geeniterapian sekä geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon vaikutuksia terveisiin koe-eläimiin. Tutkimuksen avulla saadaan tietoa virusvälitteisesti tuotettujen hoitoproteiinien leviämisestä elimistöön, niiden ilmentymisajasta eri kudoksissa ja verenkierrrossa sekä mahdollisista hoitojen sivuvaikutuksista. Tutkimuksessa pyritään saamaan tietoa geenihoidon suuruudesta, jolla saavutetaan riittävä hoitovaste mutta vältetään hoidon aiheuttamilta merkittäviltä sivuvaikutuksilta.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1. Munasarjasyöpä

Munasarjasyöpä on kehittyneissä maissa yleisin gynekologinen syöpä. Maailmanlaajuisesti se on naisten kuudenneksi yleisin syöpä. Munasarjasyövän ilmaantuvuus on suurinta yli 65 vuotiailla naisilla, nuorilla syöpää todetaan harvoin. Munasarjasyövän ilmaantuvuus kasvaa 40 ikävuoden jälkeen (NORDCAN, Association of the Nordic Cancer Registries 2012). Vuonna 2010 Suomessa todettiin 463 uutta munasarjasyöpätapausta ja kuolemia todettiin 356. Taudin ilmaantuvuus oli 8.7 100 000 asukasta kohti (Suomen syöpärekisteri 2012). USA:ssa munasarjasyöpään ennustetaan vuoden 2012 aikana sairastuvan 22 280 naista ja ennustettu kuolleisuus on 15 500 naista (Siegel ym. 2012). Viimeisten 15 vuoden aikana munasarjasyövän hoidossa ei ole tapahtunut merkittävää kehitystä.

Munasarjasyövältä suojaavia tekijöitä ovat muun muassa yhdistelmäehkäisy pillereiden käyttö, raskaus ja imetys. Munasarjasyöpä voidaan diagnosoida gynekologisella tutkimuksella sekä ultraäänikuvantamisella. Tutkimukset ovat osoittaneet perimällä olevan myös vaikutusta munasarjasyövän ilmaantuvuuteen, mutta perinnöllisten tautitapausten määrä on vähäinen liittyen vain noin 5-15 %:iin tautitapauksista (Boyd ym. 2000; Auranen ym. 1996). Munasarjasyöväälle altistavista geenimuutoksista tunnetaan muun muassa BRCA1-mutaatio, joka altistaa voimakkaasti myös rintasyöväälle, tämän mutaation kantajilla on 24-39 % sairastumisriski munasarjasyöväälle (Eerola ym. 2002). Myös BRCA2-mutaation on todettu altistavan perinnölliselle munasarjasyöväälle sairastumisriskin ollessa 11 % tämän geenivirheen kantajalla (Antoniou ym. 2003). Munasarjasyövän perinnöllisiä mutaatioita kantaville henkilöille ja heidän sukulaisilleen on tärkeää suorittaa vuosittainen gynekologinen tutkimus mahdollisen syövän varhaisvaiheen havaitsemiseksi.

Munasarjasyöpä todetaan levinneessä vaiheessa jopa 70 %:lla tautitapauksista, sillä syövän varhaisvaiheessa potilas voi olla täysin oireeton. Syövän oireisiin ja diagnosointiin liittyy kasvaimen lisäksi runsas askitesnesteiden kertyminen vatsaonteloon, mikä aiheuttaa turvotusta sekä maha- ja alaselkikipua. Taudin edetessä näiden oireiden lisäksi esiintyy

muun muassa suoliston toiminnan häiriöitä, tihentynyttä virtsaamistarvetta, väsymystä ja laihtumista.

Munasarjasyövän levinneisyydellä on merkittävä vaikutus taudin paranemisennusteeseen. Ennuste potilaan elossa olemiselle viiden vuoden kuluttua sairauden diagnosoinnista on taudin levinneisyysasteilla I ja II 71-90 %. Levinneessä syövässä (asteet III ja IV) viiden vuoden elossaoloennuste on 19-47 % (Heintz ym. 2006). Epiteliaalisen munasarjasyövän hoidossa suoritetaan avoleikkaus, jolla pyritään kasvaimen täydelliseen poistoon tai sen vähentämiseen mahdollisimman tehokkaasti eli sytoreduktioon (debulking) (Suomalainen Lääkäriseura Duodecim 2012). Leikkauksessa potilaalta poistetaan kohtu, munasarjat, vatsapaita, umpisuoli sekä lantion ja aortan alueen imusolmukkeet. Leikkaushoito voi riittää hoidoksi varhaisvaiheen syövässä, mutta useimmiten hoitoa seuraa solunsalpaajahoidot eli kemoterapia. Solunsalpaajahoidoissa yleisessä käytössä ovat karboplatiinin ja paklitakselin yhdistelmähoito (McGuire ym. 1996). Vaihtoehtoisesti paklitakselin ohella sytostaattihoidoihin voidaan käyttää doketakselia. Hoidoissa potilaalle annetaan paklitakselia 175 mg/m² tai doketakselia 75 mg/m² ja karboplatiinia glomerulusfiltraation mukaan käyttäen AUC-arvoa 5-6 mg/ml/min. Jos munasarjasyöpä uusiutuu alle puolen vuoden kuluttua hoitojen aloittamisesta, on kyseessä karboplatiinille resistentti vaihe. Tällöin potilasta hoidetaan toisen linjan sytostaateilla, kuten liposomaalisella doksorubisiinilla, topotekaanilla tai gemsitabiinilla. Sytostaattihoidoihin liittyy usein hankalia sivuvaikutuksia kuten luuydinsuppressio, neurotoksisuus sekä pahoinvointi.

2.2. Geeniterapia ja geeninsiirrot

Geeniterapiassa nukleiinihappoja siirretään yksilön somaattisiin soluihin, menetelmällä pyritään tuottamaan endogeenisiä hoitoproteiineja ilman merkittäviä sivuvaikutuksia (Ylä-Herttua ja Martin 2000). Geeninsiirroilla geneettistä materiaalia viedään soluihin geeninkuljettimien eli vektoreiden avulla, jolloin niin sanottu siirtogeeni ilmentyy kohdekudoksessa. Elimistölle vieraat nukleiinihapot tuhoutuvat nopeasti nukleaasien vaikutuksesta, joten ilman kantajamolekyyliä tai geeninsiirtoon tarkoitettua vektoria

vapaasti kuljetettavan siirtogeenin kulkeutuminen kohdesoluun on vähäistä. Geeninsiirroissa käytettävä siirtogeeni on taudin kannalta oleellinen geeni, jolla oletetaan olevan terapeuttinen vaikutus taudin parantamiseksi (Ylä-Herttuala ja Martin 2000). Geeniterapialla saavutettavia etuja verrattuna perinteisiin hoitomenetelmiin on hoidon selektiivinen kohdentuminen kohdekudokseen, minkä avulla voidaan parantaa hoidon tehokkuutta ja tarkkuutta. Systemiseen verenkiertoon annosteltuna geeniterapian aiheuttamat sivuvaikutukset ovat kuitenkin todennäköisempiä verrattaessa muihin annostelutapoihin (esimerkiksi vatsaontelonsisäinen annostelutapa, i.p.) (Ylä-Herttuala ja Alitalo 2003).

Ensimmäinen geeninsiirtoon perustuva tutkimus tehtiin ihmiselle vuonna 1989 retrovirusvektorilla (Rosenberg ym. 1990). Ensimmäinen Suomessa suoritettu geeninsiirto tehtiin Kuopiossa vuonna 1995 pahanlaatuista glioomaa sairastavalle potilaalle (Ylä-Herttuala ym. 1996; Puumalainen ym. 1998). Geeniterapiaa on hyödynnetty muun muassa glioman, neurologisten sairauksien sekä sydän- ja verisuonisairauksien hoidossa. Geenihoitoa voidaan hyödyntää yhden geenivirheen aiheuttamien perinnöllisten sairauksien hoitoon. Terapiamuodon mahdollisuuksia tutkitaan ja hyödynnetään myös monitekijäisten hankinnaisten sairauksien kuten erilaisten syöpien, sydän- ja verisuonitautien, HIV-infektioiden ja Parkinsonin taudin hoidossa (Ylä-Herttuala 2009). Geenihoidon mahdollisuuksia tutkitaan myös perinnöllisten sairauksien kuten hemofilian, kystisen fibroosin ja vaikeiden immuunipuutesairauksien (severe combined immunodeficiency, SCID/ADA) hoidossa (Verma ja Somia 1997).

2.3. Vektorit

Geeninsiirroissa käytetään sekä pitkä- että lyhytaikaisen geenin ilmentymisen aiheuttavia geeninkuljettimia eli vektoreita. Virusvektorit voidaan tuottaa pakkaussoluissa joko suoralla plasmiditransfektioilla tai niin, että viruksen rakenneosat tuotetaan pakkaussolun omasta genomista ja tähän rakenteeseen tuodaan osa geeninkuljettimesta (esimerkiksi siirtogeeni) plasmidirakenteessa (Ylä-Herttuala 2009). Yleisesti vektoreiden toiminta perustuu halutun siirtogeenin sisältävän geeninkuljettimen kulkeutumiseen kohdesoluun, jossa siirtogeeni joko integroituu isäntäsolun genomiin tai jää ekstrakromosomaaliseksi.

Insertiomutageneesin välttämiseksi geeninsiirtoihin yleensä valitaan genomiin integroitumattomia vektoreita, joilla saavutetaan lyhytaikainen hoitoproteiinin tuotto (Hacein-Bey-Abina ym. 2003). Insertiomutageneesin riskinä on siirtogeenin mahdollisuus aktivoida jokin onkogeeni tai syöpäkasvaimen kasvua rajoittava geeni (Ylä-Herttua ym. 1996).

Hyvän vektorin ominaisuus on mahdollisuus tuottaa vektoria suurina tiittereinä, jolloin infektoivien eli toiminnallisten virusten määrä on suuri (Hakkarainen ym. 2005). Tehokkaat vektorit kohdentuvat spesifisesti tiettyntyyppisiin kohdesoluihin ja niiden rakennetta voidaan muokata geenitekniikan menetelmillä. Optimaalisella vektorilla saavutetaan kunkin sairauden hoitoon parhaiten soveltuva siirtogeenin ilmentymisaika, eikä vektorin käyttö geeninkuljettimena johda immuunivasteen aktivoitumiseen (Verma ja Somia 1997). Täysin optimaalisesti toimivaa virusvektoria ei ole kuitenkaan onnistuttu tuottamaan tähän päivään mennessä.

Virusvektorit ovat yleisimmin käytettyjä geeninkuljettimia niiden geeninsiirtotehokkuuden ansiosta. Ei-viraalisia geeninkuljettimia ovat muun muassa plasmidit, joiden ilmentymisaika kestää 1-2 viikkoa. Plasmidien käytön heikkoutena on niiden heikko geeninsiirron tehokkuus. Näiden menetelmien etuna verrattuna virusvälitteiseen geeninsiirtoon on mahdollisuus tuottaa geeninkuljettimia helposti suuria määriä. Menetelmien haittana on huono hoitojen tehokkuus, mistä johtuen virusvektoreiden käyttö on huomattavasti suositumpaa geeniterapiassa (Ylä-Herttua ja Alitalo 2003).

2.3.1. Virusvektorit

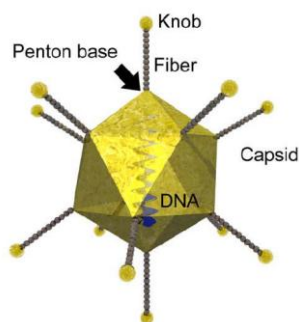
Virukset voidaan luokitella DNA- ja RNA-viruksiin, vaipallisiin ja vaipattomiin sekä integroituihin ja ei-integroituihin viruksiin (Hakkarainen ym. 2005). Geeniterapiassa yleisimmin käytetty geeninkuljetin on adenovirusvektori, jonka avulla saadaan transdukoitua sekä jakautuvat että ei-jakautuvat solut (Matthews ym. 2009). Lyhytaikaisen geenin ilmentymisen aiheuttavien geeninkuljettimien avulla saavutetaan nopea, noin 1-2

viikkoa kestävä hoitoproteiinin ilmentyminen (Connelly 2001). Lyhytaikaisen siirtogeenin ilmentymisen aiheuttavia virusvektoreita ovat muun muassa adenovirusvektori, Herpes simplex -virusvektori, Semliki Forest -viruksesta johdetut vektorit ja bakulovirusvektorit (Ylä-Herttua 2009). Lyhytaikaisista, ei-integroituvista virusvektoreista adenovirus on huomattavasti tehokkain ja eniten tutkittu.

Pitkäaikaisen geenin ilmentymisen aiheuttavat virusvektorit ovat joko isäntäsolun genomiin integroituvia, kuten retro- ja lentivirus tai ekstrakromosomaalisia, kuten adenoassosioitunut virus (adeno associated virus, AAV) (Ylä-Herttua ja Martin 2000). Geeniterapialla hoidettavan sairauden tyypistä riippuen geeninkuljettimeksi voidaan valita joko pitkä- tai lyhytaikaisen siirtogeenin ilmentymisen aiheuttava virusvektori.

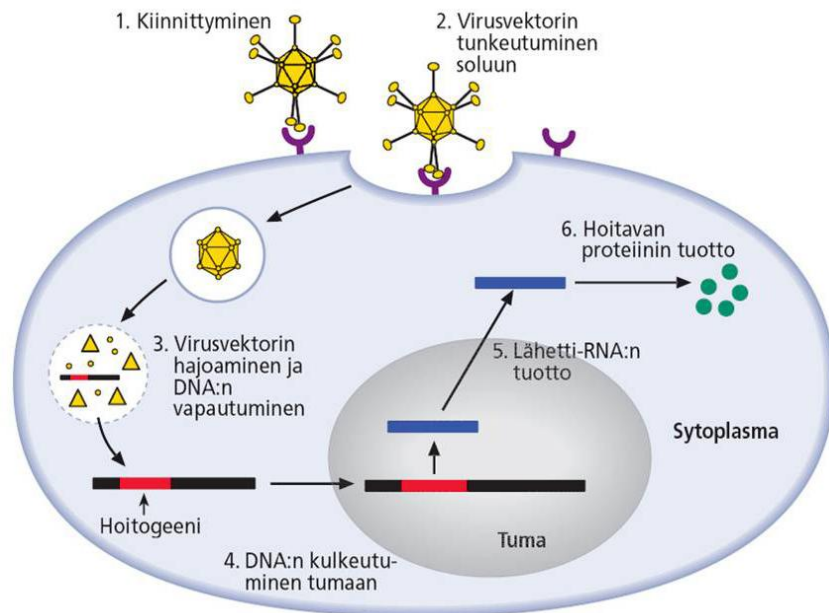
2.3.2. Adenovirus

Adenovirus kuuluu ikosahedraalisiin DNA-viruksiin ja sen kapsidi koostuu 240 heksonista ja 12 pentoni -emäksestä (Kuva 1) (Räty ym. 2008). Pentonit muodostavat kohdesolun pinnan coxsackie-adenovirusreseptorin (CAR) tunnistavan osan (fiber ja knob). Virus on kooltaan 70-100 nm ja kapsidin sisällä on noin 50 kep kokoinen kaksijuosteinen lineaarinen DNA. Adenoviruksella on yli 50 tunnettua serotyyppiä. Geeniterapiassa sekä kliinisissä tutkimuksissa hyödynnetään viruksen serotyyppiä 2 ja 5 (Parks ym. 1999; Connelly 2001). Villityypin adenovirus aiheuttaa ihmiselle muun muassa hengitystieinfektioita, maha-suolisto-, virtsarakon- sekä silmätulehdusta.



Kuva 1. Adenoviruksen rakenne koostuu heksoni ja pentoniemäksiä sisältävästä kapselista sekä fiber ja knob osista. Viruksen sisällä on lineaarinen kaksijuosteinan DNA (Räty ym. 2008).

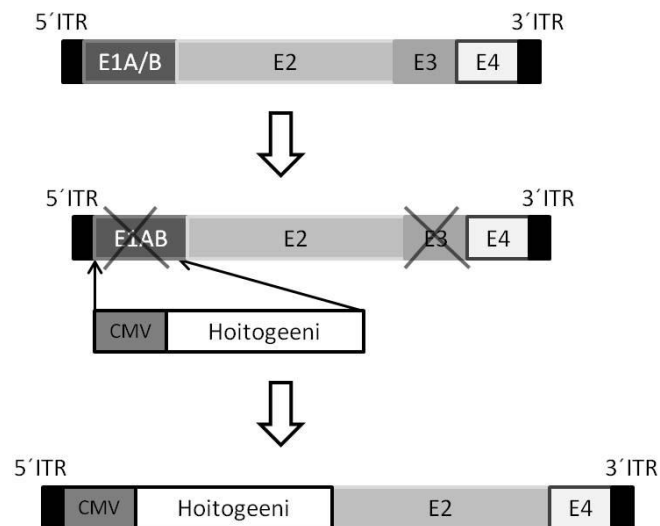
Adenovirusia voidaan tuottaa suuria tiittereitä, jolloin tehokkaasti toimivien ja suuren geeninsiirron tehokkuuden omaavien viruspartikkeleiden määrä on suuri. Adenovirusten käytön haittana ovat mahdolliset immunologiset ja tulehdusreaktiot (Thaci ym. 2011; Newman ym. 1995). Adenovirukset tunnistavat ligandina toimivan fiber-proteiinin carboxy-terminaaliosalla kohdesolun pinnalla olevan CAR-reseptorin sekä $\alpha_v\beta_3$ ja $\alpha_v\beta_5$ -integriinit (Hakkarainen ym. 2005). Sitouduttuaan solun pinnalle viruksen genomi kulkeutuu solun sisään reseptorivälitteisellä endosytoosilla (Kuva 2) (Bergelson ym. 1997). Solussa virus kulkeutuu sytosoliin pH-gradientin ohjaamana ja kulkeutuu tumahuokosen läpi kohdesolun tumaan. Kohdesolussa adenoviruksen genomi ei integroidu isännän genomiin, vaan pysyy ekstrakromosomaalisena.



Kuva 2. Adenovirusvälitteinen geeninsiirto. 1. Adenovirusvektori tunnistaa kohdesolun pinnan CAR-reseptorin fiber ja knob-proteiininsa avulla ja sitoutuu siihen. 2. Vektori siirtyy soluun reseptorivälitteisellä endosytoosilla ja 3. hajoaa solulimassa, jolloin viruksen DNA vapautuu. 4. Hoitogeenin sisältävä DNA kulkeutuu kohdesolun tumaan, jossa se pysyy ekstrakromosomaalisena. 5. Siirtogeenistä tuotetaan mRNA:ta, joka kulkeutuu takaisin sytoplasmaan ja muodostaa täällä hoitoproteiinia. Adenoviruksen hoitoproteiinin tuotto tapahtuu pääasiassa maksasoluissa. (Hakkarainen ym. 2005).

Adenovirusvektorilla tuotetun siirtogeenin ilmentyminen kohdekudoksessa on tilapäinen ja kestää 1-2 viikkoa (Yang ym. 1994). Adenoviruksen villityypin genomi koostuu viidestä varhaisesta (early, E) transkriptiota säätelevästä alueesta; E1A, E1B, E2, E3 ja E4 (Kuva 3) sekä viidestä myöhäisestä (late, L) transkriptioalueesta L1-5 (Connelly 2001). Geeninsiirroissa

käytettävät adenovirukset tuotetaan spesifisissä pakkaussoluissa. Valmistettavat virukset ovat jakautumiskyvyttömiä, sillä niiden rakenteesta poistetaan viruksen jakautumista ja lisääntymistä säätelevät geenialueet E1A tai E1B sekä E3 (Kuva 3) (Ylä-Herttuala ja Martin 2000). E1-geenialue korvataan halutulla hoitogeenillä ja sen ilmentymiseen tarvittavilla sekvensseillä. Yleisesti adenovirusvektoreissa käytetty promoottori on sytomegalovirus (cytomegalovirus, CMV) (Tong ym. 1998).



Kuva 3. Adenovirusvektorin tuottaminen pakkaussoluissa. Geenin rakennetta muokataan poistamalla geenin jakautumista säätelevät alueet E1A/B ja E3. E1:n alueelle liitetään CMV-promoottori ja hoitogeenin tuottoa säätelevä siirtogeenialue. Pakkaussoluja (esim. 293T HEK, human embryonic kidney) transfektoimalla saadaan tuotettua hoitoproteiinin tuottoa koodaavia virusvektoreita. ITR, inverted terminal repeat.

Adenovirusvälitteistä geeniterapiaa hyödynnetään ja tutkitaan useiden eri sairauksien, kuten sydänlihaskemian, sydämen vajaatoiminnan ja kardiomyopatian hoidossa (Ylä-Herttuala ja Martin 2000; Ylä-Herttuala ja Alitalo 2003). Ongelma adenovirusvektoreiden käytössä on elimistön virusvasta-aineiden tuotto ja immuunivasteen kehittyminen. Aktivoitunut immuunipuolustus voi rajoittaa adenovirusvälitteisen geeniterapian uudelleenannostelua ja toisen hoitokerran tehokkuutta (Bessis ym. 2004). Tutkimustuloksien on kuitenkin osoitettu uusitun adenovirusvälitteisen geeniterapian olevan turvallinen, eikä toistettu hoitokerta ole aiheuttanut immuunireaktioita syöpäpotilailla (Santoso ym. 1995; Tolcher ym. 2006).

Käytettäessä systeemiseen verenkiertoon kohdistettua adenovirusvälitteisen geeniterapian annostelutapaa, hoitoproteiinin tuotto tapahtuu pääasiassa maksan hepatosyyteissä, joista

tuotettu hoitoproteiini siirtyy edelleen verenkiertoon. Adenovirukset poistetaan verenkierrosta nopeasti verihiutaleiden avulla, joihin virus sitoutuu aiheuttaen verihiutaleiden aktivoitumisen ja degranulaation, jolloin muun muassa sytokiinejä vapautuu. Lopulta pääasiassa maksan Kupfferin solut tuhoavat viruspartikkelit (Stone ym. 2007a). Tao ym. (2001) osoittivat siirtogeenin tuoton tehokkuuden olevan heikkoa käytettäessä matalaa adenovirusannosta ($1-3 \times 10^{10}$ vp), sillä Kupfferin solut tuhoavat injisoidut viruspartikkelit. Korkeammalla adenovirusannoksella (1×10^{11} vp) siirtogeenin ilmentyminen hepatosyyteissä oli tehokkaampaa, joten tutkimuksen tulosten perusteella voitiin päätellä Kupfferin solujen saturoituvan suurella virusannoksella. Tällöin maksan hepatosyytteihin tehokkaasti pääsevien toiminnallisten adenovirusten määrä on suurempi ja saavutetaan tehokkaampi siirtogeenin tuotto.

Adenoviruksen käytön tehokkuus geeniterapiassa ja viruksen kohdistuminen maksaan perustuu pääasiassa CAR-reseptoreiden määrään kohdekudoksessa, lisäksi koagulaatiotekijöillä IX, X sekä komplementti-proteiinilla C4PB on merkitys viruksen kohdistumisessa maksaan (Shayakhmetov ym. 2005). Syöpäsoluissa CAR-reseptoreiden vähäinen määrä voi heikentää adenovirusvälitteisen geeninsiirron tehokkuutta. Geenihoidon tehokkuuden parantamiseksi on tutkittu CAR-reseptoreiden ilmentymistä ja mahdollisuuksia niiden ilmentymisen tehostamiseksi syöpäkudoksessa (Hemminki ym. 2003). Haasteena adenovirusvälitteisessä geeniterapiassa on siirtogeenin kohdentuminen, sillä syöpäsolujen lisäksi viruksen sitovia reseptoreita on myös terveiden solujen pinnalla (Hakkarainen ym. 2005). Adenovirusvälitteisen geeniterapian on havaittu aiheuttavan kudostoksisuutta hiirissä annosteltaessa viruksia verisuonensisäisesti. Tutkimuksen tulokset osoittivat kuitenkin viruksen serotyypillä olevan merkittävä vaikutus hoidon aiheuttamiin sivuvaikutuksiin ja turvallisimmaksi geeninsiirtovektoriksi todettiin geeninsiirroissa yleisimmin käytössä oleva serotyypin 5 adenovirus (Stone ym. 2007b).

2.4. Munasarjasyövän geeniterapia

Munasarjasyövän prekliinisissä geeniterapiatutkimuksissa geeninsiirrot on kohdennettu kasvaimen alueelle yleisimmin intraperitoneaalista annostelutapaa käyttäen (Hasumi ym. 2002; Mahasreshti ym. 2001; Mahasreshti ym. 2003). Syöpäkudos ja sen etäpesäkkeet tavoitetaan mahdollisesti tehokkaammin annostelemalla geenihoito systeemiseen verenkiertoon, tämän elimistöön tehokkaasti leviävän annostelutavan haittana saattaa olla sen aiheuttamat sivuvaikutukset eri kohdekudoksissa (Hiltunen ym. 2000). Munasarjasyövän prekliinisissä geeniterapiatutkimuksissa hyödynnetään adenovirusia, retrovirusia, lentivirusia ja adenoassosiatiivisia viruksia (Mahendra ym. 2005; Indraccolo ym. 2002).

Käytettäessä virusvektorina AAV- tai adenovirusta, munasarjasyöpäkudoksen määrää ja askitesnesteiden muodostumista on onnistuttu vähentämään koe-eläimissä liukoisen VEGFR1:n avulla (Mahasreshti ym. 2003; Takei ym. 2007). Wu ym. (2006) ovat osoittaneet myös liukoisen VEGFR2:n vähentävän munasarjasyöpäkasvaimen määrää annettaessa geenihoitoa hiirelle verisuonensisäisesti. Tammela ym. (2008) osoittivat VEGFR3:n toiminnan estämisen ehkäisevän angiogeneesiä ja uusien kapillaariverisuonten muodostumista angiogeneesin koe-eläinmallissa. Tutkimuksissa adenovirusvälitteisen liukoisten reseptoreiden sVEGFR1, sVEGFR2 ja sVEGFR3 toimintaan perustuvan geeniterapian todettiin pienentävän munasarjasyöpäkasvainten kokoa käytettäessä hiirtä munasarjasyövän koe-eläinmallina (Sallinen ym. 2009). Sopo ym. (2012) osoittivat liukoisten VEGF-reseptoreiden AdsVEGFR1, AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 yhdistelmägeenihoidon ja tähän yhdistetyn paklitakseli-sytostaatin pidentävän munasarjasyöpää sairastavien hiirten elinaikaa.

2.5. Geenihoidojen turvallisuus ja etiikka

Geeniterapiaan perustuvat uudet hoitomenetelmät koskevat vakavia sairauksia, jotka ovat vailla tehokasta hoitomenetelmää. Geenihoidot ituradan ja sukusoluihin ovat kiellettyjä, sillä genomiin integroituvien siirtogeenien vaikutuksia geenien ilmentymiseen ei vielä tunneta riittävästi (Ylä-Herttua 2009). Geeniterapia on yleisesti hyvin siedetty hoitomuoto.

Potilastutkimuksissa havaittuja sivuoireita ovat olleet kuume, suolisto-oireet, pahoinvointi sekä kipuoireet. Geenihoitoihin perustuvissa tutkimuksissa on tapahtunut yksi kuolemantapaus, kun ornitiini-transkרבamyalaasientsyymiin puutteesta kärsivälle potilaalle annettiin huomattavan suuri annos adenovirusvälitteistä geenihoitoa (Lehrman 1999; Raper ym. 2003). Adenovirusten käyttö geeniterapiassa on kuitenkin suhteellisen turvallista, sillä virus ei integroidu isännän genomiin ja sillä saavutetaan tilapäinen siirtogeenin ilmentyminen kohdekudoksessa. Syövän hoidon geeniterapiatutkimuksissa ei ole esiintynyt geeniterapiasta aiheutuneita kuolemantapauksia käytettäessä adenovirusta geeninkuljettimena.

Virusvektoreiden käytön turvallisuus geeninkuljettimina perustuu niiden perimän muokkaamiseen. Viruksista poistetaan geenialueet, jotka säätelevät niiden kykyä aiheuttaa sairauksia ja mahdollistavat virusten lisääntymisen (Hakkarainen ym. 2005). Geenihoitoon perustuvat tutkimukset ja geenihoitoon kehittäminen ovat perusteltuja silloin, kun vakavaan sairauteen ei ole olemassa tehokasta hoitoa (Vapalahti ym. 1997). Munasarjasyöpä todetaan potilailla usein levinneessä vaiheessa, jolloin syöpäkudos on levinnyt laajalti vatsaonteloon sekä elimiin. Uusiuduttuaan aggressiivinen munasarjasyöpä on tappava, joten geenihoitojen aiheuttamat sivuvaikutukset on yleisesti hyväksyttävämpiä hoidettaessa aggressiivista syöpää kuin hoidettaessa hyvänlaatuista kasvainta. Hoitojen sivuvaikutusten vähentäminen on oleellista kehitettäessä uusia geenihoitomenetelmiä (Gonin ja Gaillard 2004).

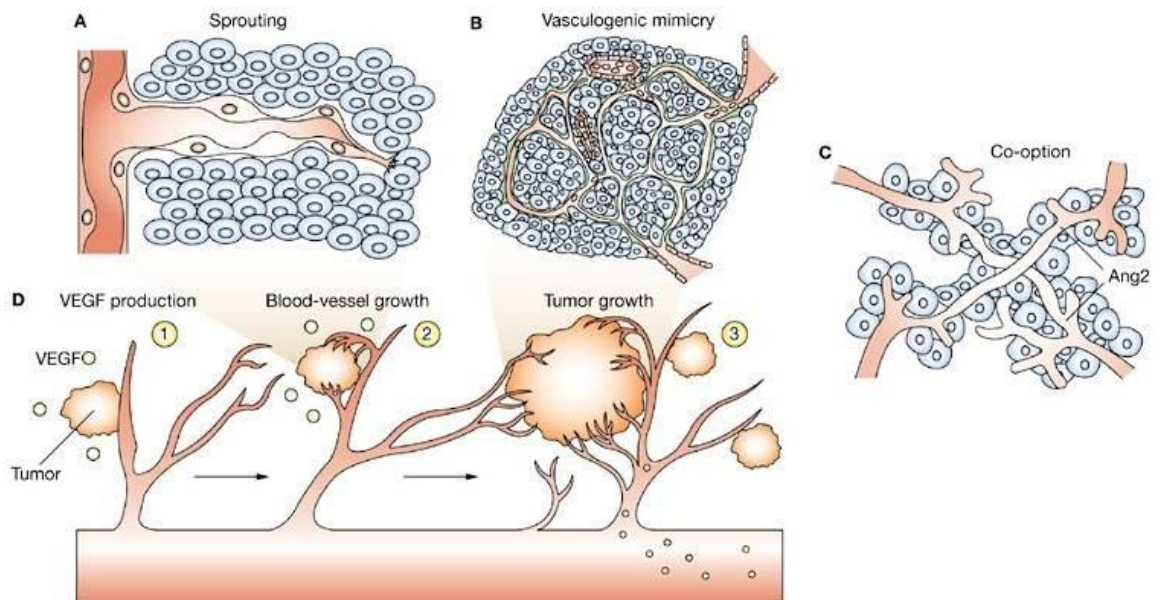
Geenimuunneltujen organismien käyttöä Suomessa valvotaan geenitekniikkalailla, joka edistää geenitekniikan turvallisuutta ja sen kehittymistä eettisesti oikealla tavalla (Geenitekniikkalaki 1995). Geenitekniikkaa ja prekliinisiä geeniterapiatutkimuksia valvotaan koe-eläinlautakuntien myöntämien eläinkoelautakunnan hyväksymien eläinkoelupien avulla (ELLA-eläinkoelautakunta). Kliinisten vaiheiden geeniterapiatutkimuksia, geenilääkkeiden valmistusta, testausta ja kokeellisten biologisten lääkkeiden käyttöä säätelee puolestaan lääkelaki (Läkelaki 1987).

2.6. Angiogeneesi ja lymfangiogeneesi

Uusien verisuonten muodostumista olemassa olevaan kapillaariverisuonistoon kutsutaan angiogeneesiksi (Folkman 1971) (Kuva 4). Angiogeneesiin perustuvia normaaleja fysiologisia tapahtumia ovat muun muassa sikiön kehittyminen, haavan paraneminen, luuston kehittyminen, hiusten kasvu, kuukautiskierto, follikkeleiden kasvu ja keltarauhasen kehitys (Risau 1997; Carmeliet 2003). Angiogeneesi liittyy myös useisiin patologisiin tautitiloihin ja niiden kehittymiseen, kuten sokeritautiin liittyvän verkkokalvosairauden eli retinopatian kehittymiseen (Risau 1997). Merkittävin angiogeneesiä aktivoiva tekijä on kudoksen hapenpuute eli hypoksia. Hapenpuutteen on osoitettu lisäävän angiogeneesiä stimuloivan pro-angiogeenisen kasvutekijän, hypoksiasta aktivoituvan kasvutekijän (hypoxia inducible factor, HIF) määrää. HIF aktivoi edelleen muita angiogeenisiä kasvutekijöitä kuten VEGF:a, jolloin verisuonten uudismuodostus alkaa (Shweiki ym. 1992; Pugh ja Ratcliffe 2003; Fong 2008).

Angiogeneesiä säätelee solukalvoilla sijaitsevat tyrosiinikinaasireseptorit eli verisuonen endoteelikasvutekijäreseptorit (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) (Grunewald ym. 2010). VEGF:en ja näiden reseptoreiden lisäksi angiogeneesiä säätelevät lukuisat muut pro- ja antiangiogeeniset säätely- ja kasvutekijät, kuten istukkakasvutekijä (placental growth factor, PlGF), verihiutalekasvutekijä (platelet derived growth factor) ja fibroblastikasvutekijät-1 ja -2 (fibroblast growth factor) (Burger 2011). Myös solukalvon Tie1- ja Tie2-reseptoreihin sitoutuvat angiopoietiinit (Ang-1 ja Ang-2), transforming growth factor α ja β , tumor necrosis factor α (TNF- α) sekä angiogeniini ovat angiogeneesiä sääteleviä tekijöitä (Folkman ja Shing 1992; Suri ym. 1996; Risau 1997; Montero ym. 1998). Uudisverisuonten muodostumista inhiboivat muun muassa angiostatiini, endostatiini, trombospondiini ja platelet factor-4 sekä liukoiset endoteelikasvutekijäreseptorit sVEGFR1, sVEGFR2 ja sVEGFR3. Kuo ym. (2001) osoittivat adenovirusvälitteisen sVEGFR2:n ja sVEGFR1:n estävän verisuonten kasvua tehokkaammin kuin angio-, endostatiinit tai neuropiliinit.

Angiogeneesin ensimmäiseen vaiheeseen liittyy verisuonen laajeneminen eli vasodilataatio, minkä seurauksena suonen seinämän läpäisevyys eli permeabiliteetti lisääntyy (Conway ym. 2001). Läpäisevyyden lisääntyminen johtaa usein syövälle tyypillisen askitesnesteeseen muodostumiseen. Verisuonen seinämässä olevalle Tie-2-reseptorille ligandina toimiva Ang-2 puolestaan vähentää suonen seinämän läpäisevyyttä (Thurston ym. 2000) ja Ang-1 stabiloi muodostuvan verisuonen rakennetta (Thomas ja Augustin 2009). Uuden verisuonen syntyyn liittyy myös uusien suonten puhkeaminen (endothelial sprouting) (Kuva 4A), suonten välisten anastomoosien syntyminen (Kuva 4C) sekä non-sprouting angiogeneesi (intussusception), jolloin olemassa oleva verisuoni jakautuu osiin transkapillaaristen väliseinien avulla (Risau 1997; Spannuth ym. 2008). ”Endothelial sprouting” on yleisin uudisverisuonten muodostumistapa kasvaimessa, jolloin suonen endoteelisolut aktivoituvat ja vaeltaa suonen seinämän ekstrasellulaariseen matriksiin. Solut erikoistuvat niin sanotuiksi tip- ja näitä seuraaviksi stalk-soluiksi, jotka muodostavat uuden verisuonen seinän aihiota (Karamysheva 2008). Verisuonen muodostumista ohjaa lukuisat eri kasvu- ja säätelytekijät, näistä merkittävin on angiogeneesiä aktivoiva VEGF-A-gradientti (Gerhardt ym. 2003).



Kuva 4. Syöpäkasvaimen uudisverisuonituksen kehittyminen kapillaariverisuonistosta. A) ”Endothelial sprouting”; Verisuonen endoteelisolut vaeltaa ekstrasellulaariseen matriksiin muodostaen suonen ”ulokkeen”. B) Aggressiivisiin kasvaimiin syntyy mikroverisuonia. C) Uudet verisuonet liittyvät kasvutekijöiden ohjaamana jo olemassa oleviin kapillaariverisuoniin muodostaen verisuonten yhdyskanavia eli anastomooseja. D) Kasvain tuottaa mm. VEGF- kasvutekijöitä, jotka säätelävät uusien verisuonten muodostumista (Spannuth ym. 2008).

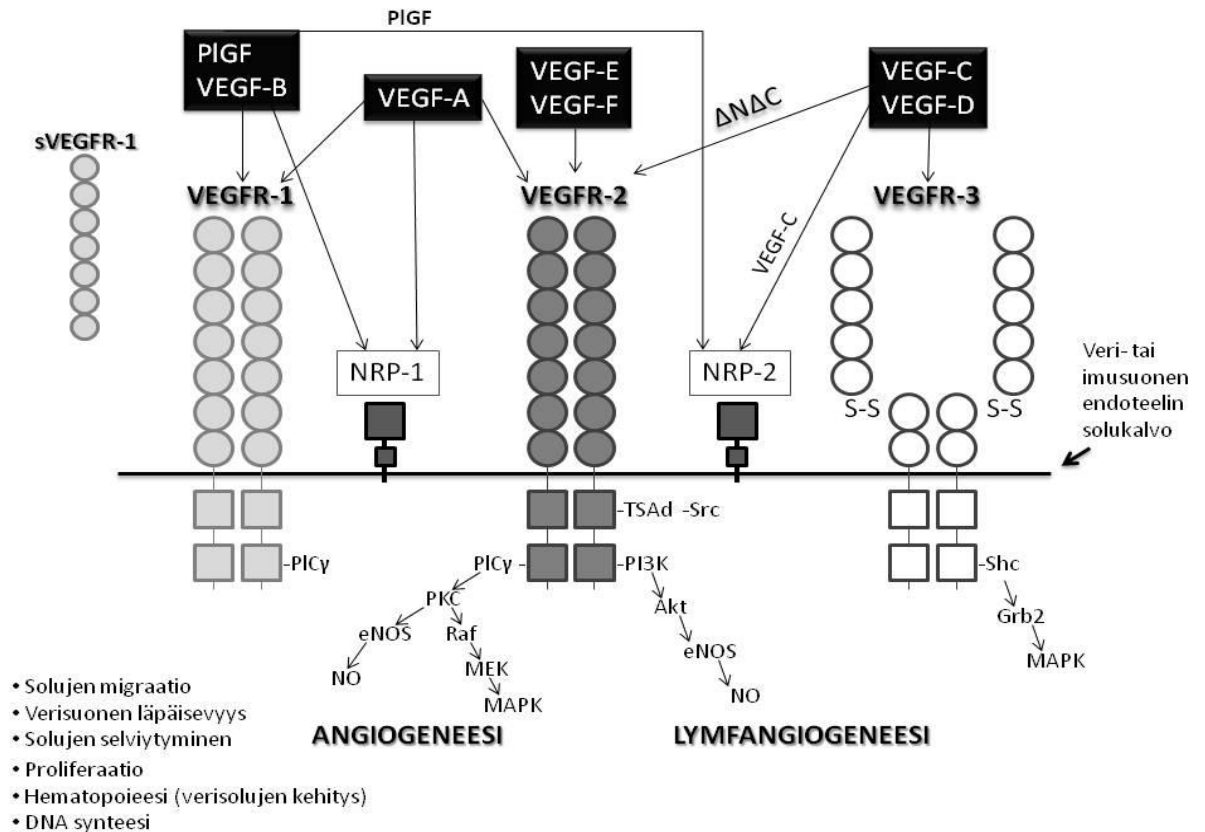
Syöpään liittyy angiogeneesin aktivoituminen ja runsas uusien verisuonten muodostuminen pro- ja antiangiogeenisten kasvutekijöiden toiminnan häiriintyessä (Hanahan ja Weinberg 2000). Angiogeneesillä on merkittävä rooli 100-200 µm:n kokoisten kasvainten muodostumiselle sekä niiden metastasoinnille. Diffuusioon perustuen kasvain saa lähelle syntyvästä verisuoniverkostosta solujen toiminnalle ja kasvulle välttämättömät ravinteet sekä happea (Folkman ym. 1989). Angiogeneesi aktivoituu, kun verisuonen seinämä vaurioituu paikallisesti. Tällöin suonen seinämän endoteelisoluista vapautuu kasvutekijöitä ja sytokiineja, jotka aktivoivat verisuonen endoteelisoluja muuttumaan tip-soluiksi. Myös luuytimen kantasolut aktivoituvat muodostamaan verisuonen ahiota (Eskens 2004). Normaaliin verisuoniston rakenteeseen verrattuna syöpäkasvaimen verisuonet ovat hyvin hauraita ja vuotavia, lisäksi niiden endoteelin rakenne on poikkeava ja suonet ovat järjestäytyneet epäsäännöllisesti (Baluk ym. 2005). Lisääntynyt kasvaimen verisuonitus ja proangiogeenisten kasvutekijöiden määrä viittaa yleisesti useiden eri syöpien edenneeseen vaiheeseen sekä huonoon paranemisenusteeseen (Pasqualini ym. 2002). VEGF:en ja niiden apureseptoreiden eli neuropiliinien (NRP-1 ja NRP-2) yli-ilmentyminen syöpäkasvaimessa on havaittu myös munasarjasyöpätutkimuksissa (Shen ym. 2000; Osada ym. 2006).

Imu- eli lymfasuonten avulla säädellään kudosten ja imusolujen kulkeutumista sekä ravinnon rasvojen imeytymistä (Tammela ja Alitalo 2010). Lymfangiogeneesillä on tärkeä merkitys syöpäkasvaimen kehittymiselle sekä kasvaimen metastasoinnille. Useissa syövässä imusolmukkeessa esiintyvää etäpesäkettä pidetään taudin ennustetta heikentävänä indikaattorina (Sleeman ja Thiele 2009). Imusuonten seinissä on löysät solu-solu liitokset eikä niissä ole perisyttettä, minkä ansiosta imusuonisto soveltuu paremmin syöpäkasvaimen metastasointiin kuin verisuonisto (Saharinen ym. 2004). sVEGFR3 oli ensimmäinen löydetty imusuoniston toimintaa säätelevä kasvutekijäreseptori (Alitalo ym. 2005). sVEGFR3:een sitoutuvat lymfangiogeneesiä aktivoivat endoteelikasvutekijät VEGF-C ja VEGF-D (Kärpänen ja Alitalo 2008). Kasvutekijöiden ilmentymisen on todettu lisääntyvän useissa kasvaimissa ja tulehdussoluissa, lisäksi niiden määrän on todettu korreloivan imusolmukkeissa esiintyvien etäpesäkkeiden määrän kanssa. Syöpäkasvaimessa esiintyvän imusuoniston tiheyden on osoitettu liittyvän syövän ennusteeseen ja levinneisyyteen (Li ym. 2009). Imusuonten kasvua aktivoivien sVEGFR2:n ja sVEGFR3:n sekä näihin sitoutuvien VEGF-

C:n ja VEGF-D:n määrän on todettu lisääntyvän myös munasarjasyövässä ja liittyvän syöpää sairastavien huonoon paranemisennusteeseen (Klasa-Mazurkiewicz ym. 2011).

2.7. Verisuonen endoteelikasvutekijät (VEGF), Neuropiliinit (NRP) ja istukkakasvutekijä (PlGF)

Angiogeneesin tärkeimpiin aktivoijiin kuuluu VEGF-perheen kasvutekijät ja kasvutekijäreseptorit (Kuva 5). Näiden kasvutekijöiden kautta soluun välittyy muun muassa solun mitogeneesiä, migraatiota, erilaistumista, verisuonen läpäisevyyttä ja endoteelisolujen toimintaa sääteleviä signaaleja. VEGF:t ovat välttämättömiä alkionkehityksen aikaisessa verisuonten kehityksen säätelyssä eli vaskulogeneesissä sekä uusien verisuonten muodostumisessa eli angiogeneesissä (Olsson ym. 2006). VEGF-perheeseen kuuluu angiogeneesiä ja lymfangiogeneesiä aktivoivia, glykoproteiineista koostuvia dimeerisiä kasvutekijöitä, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, parapoxviruksen VEGF-E (Takahashi ja Shibuya 2005), käärmeen myrkyn VEGF-F sekä PlGF-1 ja -2.



Kuva 5. Verisuonen endoteelikasvutekijöiden (VEGF) ja niiden reseptoreiden (VEGFR) soluunsigmentimekanismit yksinkertaistettuna kaaviona. Akt, seriini-treoniini kinaasi (proteiinikinaasi B); BAD, Bcl-2-associated death promoter; Caspase9, apoptoosiin liittyvä kysteiinipeptidaasi; eNOS, endoteelin typpioksidisyntaasi; Grb2, kasvutekijäreseptorin sitova proteiini 2; MAPK, mitogeeniaktivoitu proteiinkinaasi; MEK, MAPK kinaasi; NO, typpioksidi; NRP, neuropiliini; PIP2, fosfatidyli-inositoli (4,5)-bisfosfaatti; PIP3, fosfatidyli-inositoli (3,4,5)-trifosfaatti; PI3K, fosfatidyli-inositoli-3-OH-kinaasi; PKC, proteiinkinaasi C; PICy, fosfolipaasi Cy; PIGF, istukkakasvutekijä; Ras, proteiiniperhe; Raf, proto-onkogeneeni seriini/treoniini-proteiinikinaasi; Shc, proteiiniperhe; Src, Src-tyrosiinikinaasi; VEGF, verisuonen endoteelin kasvutekijä; VEGFR, verisuonen endoteelikasvutekijäreseptori.

VEGF-A:sta käytetään usein lyhennettä VEGF, kasvutekijästä on käytetty myös nimitystä vascular permeability growth factor, sillä kasvutekijän todettiin alun perin ilmentyvän runsaasti kasvaimissa ja lisäävän niissä verisuonten läpäisevyyttä (Senger ym. 1983). VEGF-A on 45 kDa:n kokoinen glykoproteiini, jonka geeni koostuu kahdeksasta eksonista ja seitsemästä intronista. Vaihtoehtoisella silmukoinnilla kasvutekijän mRNA:ta muokkaamalla saadaan seuraavat ihmisen tunnetut isoformit: VEGF-A 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 ja 206 (Houck ym. 1991). Nämä isoformit ovat rakenteeltaan hiirellä yhden aminohapon verran lyhyempiä kuin ihmisen VEGF-A. Tutkituin isoformi on VEGF-A₁₆₅, joka sitoutuu solun pinnan hepariiniin muodostaen VEGFR2:een sitoutuvan kysteiinisidoksisen homodimeerirakenteen

(Ferrara ja Henzel 1989). VEGF-A:n kaikki isoformit sitoutuvat VEGFR1:een sekä VEGFR2:een, mutta niiden sitoutuminen on huomattavasti tehokkaampaa VEGFR1:een (Kuva 5). VEGF-A:n signalointi tapahtuu pääasiassa VEGFR1:n ja VEGFR2:n kautta, mutta se sitoutuu myös NRP-1:een ja NRP-2:een.

VEGF-A on välttämätön kasvutekijä muun muassa normaalin kehityksen, ovulaation, kuukautiskierron, verenpaineen ylläpidon ja raskauden ajan säätelyssä. Kasvutekijän avulla säädellään verisuonten vasodilataatiota ja niiden läpäisevyyttä sekä verisuonen endoteelisolujen proliferaatiota ja migraatiota (Ferrara ym. 2003). VEGF-A:n määrän on todettu lisääntyvän huomattavasti hypoksiassa HIF:n aktivoimana, kun tämä kasvutekijä sitoutuu VEGF-A:n promoottorialueelle (Pugh ja Ratcliffe 2003). VEGF-A:n ilmentymistä säätelee hypoksian lisäksi erilaiset kasvutekijät, transformaatiot, p53 mutaatiot, estrogeeni, kilpirauhasta stimuloiva hormoni ja typpioksidi (nitric oxide, NO) (Takahashi ja Shibuya 2005). Munasarjoissa VEGF-A:n tuottoa stimuloivat gonadotropiini-hormonit eli follikkelia stimuloiva hormoni, luteinisoiva hormoni sekä estrogeeni (Gutman ym. 2008).

VEGF-B-kasvutekijä sitoutuu ainoastaan VEGFR1:een ja NRP-1 apureseptoriin (Kuva 5). Ihmisessä esiintyvät VEGF-B:n isoformit ovat VEGF-B₁₆₇ ja VEGF-B₁₈₆, joista isoformi 167 on yleisempi ja ilmentyy lähes kaikissa kudoksissa (Olofsson ym. 1996). VEGF-B toimii ligandina VEGFR1:lle sekä NRP-1:lle, sekä voi muodostaa heterodimeerirakenteen VEGF-A₁₆₅:n kanssa (Olofsson ym. 1996; Nash ym. 2006). VEGF-B ei sitoudu VEGFR2:een tai VEGFR3:een. Sydänlihaksessa VEGF-B:n on todettu lisäävän angiogeneesiä VEGFR1:n ja NRP-1:n välityksellä (Lähteenvuo ym. 2009).

VEGF-C:lla ja VEGF-D:lla on merkittävä rooli syntymän jälkeisessä lymfangiogeneesissä (Kärkkäinen ym. 2004a). Kasvutekijät aktivoivat proliferaatiota, migraatiota ja endoteelisolujen selviytymistä (Tammela ym. 2005). Nämä kasvutekijät signaloivat pääasiassa VEGFR3:n kautta, mutta kasvutekijöiden muokatut rakenteet signaloivat myös VEGFR2:n kautta (Kuva 5) (Joukov ym. 1996). Signalointi VEGFR3:n kautta tapahtuu VEGF-C:n ja VEGF-D:n pitkien, epäkypsiä muotojen avulla. VEGF-C ja VEGF-D ovat aktiivisessa muodossa vasta kun niiden rakennetta on muokattu proteolyttisesti kasvutekijöiden N- ja

C-terminaaliosista noin 40 kDa kokoiseen rakenteeseen. Muokattujen, kypsien kasvutekijöiden (merkitään $\Delta N\Delta C$) soluunsigntointi tapahtuu VEGFR2:n kautta, johon niillä on suurempi sitoutumisaffiniteetti kuin VEGFR3:een. Lyhyissä aktiivisissa muodoissa kasvutekijät voivat signaloida myös VEGFR3:n kautta (Karamysheva 2008).

VEGF-C on kooltaan noin 40 kep, sen on todettu olevan pääasiallinen lymfangiogeneesiä säätelevä endoteelikasvutekijä etenkin alkion kehityksessä (Kärkkäinen ym. 2004b). VEGF-C:n signaali välittyy VEGFR3:n kautta, se sitoutuu myös apureseptori NRP-2:een. VEGF-C vaikuttaa verisuonten seinämän läpäisevyyteen signaloimalla soluun VEGFR2:n kautta (Kärkkäinen ym. 2004a). VEGF-D:n rakenne muistuttaa 48 %:sti VEGF-C:ta ja on kooltaan 2 kep:n kokoinen kasvutekijä, jota ilmennetään aikuisessa muun muassa verisuonten endoteelillä sekä sydämessä, luurankolihaksessa, keuhkoissa ja suolessa (Roy ym. 2006). VEGF-D osallistuu kasvaimen angiogeneesiin sekä lymfangiogeneesiin säätelyyn, sen merkitys lymfangiogeneesiin indusoijana ei ole yhtä suuri kuin VEGF-C:lla. VEGFD:lla on tärkeä rooli kasvaimen metastasoinnille (Stacker ym. 2001).

Neuropiliinit ovat solukalvolla olevia 130-140 kDa kokoisia glykoproteiineja. Ne toimivat VEGF:en koreseptoreina, sitoutumalla muun muassa VEGFA:n yleisimpään isoformiin VEGF₁₆₅:een ja tehostaen tämän signtointia VEGFR1:n kautta. Neuropiliinien rakenne poikkeaa tyrosiinikinaasireseptoreiden rakenteesta sillä niillä ei ole solunsisäistä signtointiosaa. NRP-1 toimii VEGFR1:n ja VEGFR2:n apureseptorina tehostaen näihin sitoutuvien ligandien eli VEGF:en affiniteettia reseptoreihin (Soker ym. 1998). Tutkimuksissa on havaittu, että VEGF-A saattaa signaloida soluun suoraan apureseptorinsa NRP-1:n kautta, ilman sitoutumista sen varsinaisiin reseptoreihin VEGFR1:een tai VEGFR2:een (Hicklin ja Ellis, 2005). NRP-2 tehostaa VEGF-C:n ja VEGF-D:n sitoutumista VEGFR3:een ja toimii lähinnä lymfangiogeneesiä aktivoivana apureseptorina (Kärkkäinen ym. 2001).

PlGF on VEGF-perheeseen kuuluva kasvutekijä, jota ilmennetään istukassa koko raskauden ajan. Kasvutekijästä on identifioitu neljä isoformia PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 ja PlGF-4, jotka signaloivat soluun VEGFR1:n kautta. NRP-1 toimii myös näiden kasvutekijöiden apureseptorina (Kuva 5) (Ylä-Herttua ja Alitalo 2003). PlGF:en ilmentymisen on todettu

lisääntyneen useissa patologisissa tautitiloissa, kuten ei-pienisoluisessa keuhkosityövässä, kolorektaalisyövässä, sekä haavan paranemisessa (Roy ym. 2006). Raskausmyrkytyksen aikana PlGF:n määrän on todettu vähentyvän, näin ollen raskauden aikana tapahtuneita muutoksia PlGF:n määrässä voidaan käyttää raskausmyrkytyksen kehittymisen ennustamiseen (Ghosh ym. 2012; Bates ym. 2011)

2.8. Verisuonen endoteelikasvutekijäreseptorit; VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3

VEGF-reseptorit ovat tyrosiinikinaasireseptoreita, joiden kautta VEGF-kasvutekijät signaloivat kohdesoluun. Angiogeneesiä aktivoivia signaaleja välittävät pääasiassa reseptorit VEGFR1 ja VEGFR2, lymfangiogeneesiä säätelee VEGFR3 (Kuva 5). VEGFR1 tunnetaan myös nimellä fms-like tyrosine kinase 1 (Flt-1) (Shibuya ym. 1990) ja VEGFR2 nimellä kinase insert domain receptor (KDR) tai fetal liver kinase 1 (Flk-1) (Terman ym. 1992). VEGFR3 tunnetaan myös nimellä fms-like tyrosine kinase 4 (Flt-4) (Galland ym. 1992).

VEGFR:t ovat tyrosiinikinaasireseptoreita, joiden ekstrasellulaariosa koostuu seitsemästä immunoglobuliinin (Ig) kaltaisesta osasta, transmembraaniosasta sekä tyrosiinikinaasiaktiivisuuden välittävästä 70 aminohapon kokoisesta intrasellulaarisesta signaalin välittävästä karboksiterminaaliosasta (Shibuya ym. 1990). VEGF-reseptorit muodostavat dimeerirakenteita, jolloin niiden ekstrasellulaariosan Ig-osat 4-7 ovat sitoutuneena toisiinsa. Ligandin sitova ekstrasellulaarinen reseptorin osa sijaitsee VEGFR1:lla ja VEGFR2:lla toisen ja kolmannen Ig-osan kohdalla (Barleon ym. 1997). VEGFR:t muodostavat joko hetero- tai homodimeerirakenteita ligandin kiinnittymisen seurauksena, jolloin tyrosiinireseptorin kinaasiaktiivisuus käynnistyy ja reseptorin intrasellulaariset tyrosiinitähteet autofosforyloituvat. Solun sisäiset signalointimekanismit ja toisiohjelmat aktivoituvat edelleen fosforylaation seurauksena ja kuljettavat reseptoreiden välittämän viestin soluun (Olsson ym. 2006). VEGFR2:n ja VEGFR3:n tyrosiinikinaasiosien rakenteet muistuttavat 80 %:sti VEGFR1:n rakennetta. VEGFR3:n rakenne poikkeaa muista reseptoreista viidennen ekstrasellulaarisen Ig-osan perusteella, jonka tilalla tässä reseptorissa on rikkisilta (Kuva 5) (Olsson ym. 2006). Näiden kaikkien

endoteelikasvutekijäreseptoreiden liukoisia muotoja esiintyy sekä normaaleissa että patologisissa tautitiloissa (Hicklin ja Ellis 2005; Maynard ym. 2005; Ebos ym. 2004).

VEGFR1 on 180 kDa kokoinen tyrosiinikinaasireseptori, joka toimii pääasiassa VEGF-B:n signaalia välittävänä reseptorina, myös VEGF-A ja PlGF signaloivat tämän reseptorin kautta (de Vries ym. 1992; Olofsson ym. 1996). Reseptorilla on merkittävä rooli syöpäkudoksen kasvun säätelyssä, kasvaimen metastasoinnissa, fysiologisen angiogeneesin säätelyssä sekä yksilönkehityksessä (Hiratsuka ym. 1998). VEGFR1:n liukoisella muodolla sVEGFR1:lla ja sen määrän kasvulla, sekä samanaikaisella PlGF:n määrän vähenemisellä raskauden aikana on todettu olevan merkittävä yhteys raskausmyrkytyksen muodostumiselle (Levine ym. 2004). VEGFR1:a ilmennetään myös dendriittisoluisissa, osteoklasteissa, perisyyteissä, istukan trofoblasteissa, makrofageissa, monosyyteissä ja hematopoieettisissa kantasoluissa (Zachary ja Glicki 2001). VEGFR1 on angiogeneesin estäjä varhaisessa kehitysvaiheessa, mutta patologiin olosuhteisiin liittyvässä angiogeneesissä sillä on merkittävä rooli kasvaimen kehittymisen säätelyssä (Fong ym. 1996; Shibuya 2006).

VEGFR2 on 200-230 kDa kokoinen reseptori, jonka kautta tärkein signaloiva angiogeeninen kasvutekijä on VEGF-A (Fuh ym. 1998; Takahashi ja Shibuya 2005). Reseptorin kautta soluun signaloivat myös VEGF-C:n ja VEGF-D:n proteolyttisesti muokatut, aktiiviset rakenteet ($\Delta N\Delta C$) sekä VEGF-E ja VEGF-F. VEGFR2 osallistuu angiogeneesin, vaskulogeneesin ja verisuonten läpäisevyyden säätelyyn. VEGFR2:n aktivaatio ja signointi riippuvat myös sen ilmentymisestä yhdessä VEGFR1:n kanssa (Autiero ym. 2003). VEGFR2:a ilmennetään runsaasti varhaisen alkionkehityksen aikana (Shalaby ym. 1995). Se on pääasiallinen VEGF-A:n mitogeenisiä, angiogeenisiä ja suonien läpäisevyyttä aktivoivia signaaleja välittävä reseptori. Tutkimuksissa on havaittu, että VEGFR2 aktivoi lymfangiogeneesiä VEGF-A₁₆₄:aa indusoimalla (Nagy ym. 2002).

VEGFR3 on 195 kDa kokoinen reseptori, jonka kautta soluun signaloivat pääasiassa lymfangiogeneesiä säätelevät VEGF-C:n ja VEGF-D:n epäkypsät eli pitkät muokkaamattomat rakenteet (Achen ym. 1998; Joukov ym. 1996). Reseptorin on osoitettu aktivoivan myös angiogeneesiä lähinnä sikiönkehityksen varhaisvaiheissa, silmän verkkokalvon kehittyessä

sekä syöpäkasvaimissa. VEGFR3:a ilmennetään runsaasti myös angiogeenisten sprouting:ien yhteydessä uuden verisuonen muodostuessa (Tammela ym. 2008). Aikuisella VEGFR3:a esiintyy lähinnä vain imusuonten endoteelisolujen pinnalla (Kaipainen ym. 1995). Tutkimuksissa on osoitettu, että VEGFR3:n liukoisen muodon sVEGFR3-Ig:n yli-ilmentyminen estää ihon alueen imusuoniston kehittymisen siirtogeenisillä hiirillä (Mäkinen ym. 2001).

2.8.1. VEGF-reseptoreiden soluunsigalointi

VEGF-reseptorit signaloivat soluun ligandin (VEGF, PlGF) kiinnittymisen seurauksena. Kun kasvutekijä kiinnittyy reseptorin ekstrasellulaariseen osaan, se dimerisoituu ja solunsisäisten tyrosiinikinaasiosien autofosforylaatio käynnistyy, mistä seuraa lukuisten toisiolähekkien aktivoituminen. Endoteelikasvutekijöiden välityksellä kohdesolussa aktivoituvia toisiolähekkien signaalintimekanismeja ei vielä täysin tunneta. Tässä työssä on esitetty vain muutamia VEGF-reseptoreiden tunnetuimpia signaalintireittejä.

VEGFR1:n autofosforylaation seurauksena aktivoituu muun muassa fosfolipaasi C_γ (phospholipase C_γ, PLC_γ), jonka on todettu aktivoivan myös anti-apoptoottisen kinaasin (anti-apoptotic kinase, Akt) p38-mitogen activated protein kinase -reitillä (MAPK) (Kuva 5) (Takahashi ym. 1999; Takahashi ja Shibuya, 2005). Tämän reseptorin signaalintimekanismi on vielä huonosti tunnettu. Tutkimuksissa VEGF-A:n on todettu aiheuttavan suhteellisen heikon VEGFR1:n tyrosiinikinaasiaktiivisuuden, kun taas kasvutekijän signaloidessa VEGFR2:n kautta saavutetaan tehokkaampi vaste kohdesolussa (Autiero ym. 2003). Waltenberger ym. (1994) osoittivat, että VEGF-A:lla on kuitenkin suurempi sitoutumisaffiniteetti VEGFR1:een kuin VEGFR2:een.

VEGFR2:n proliferaatiota eli solujen kasvua aktivoiva signaali soluun välittyy, kun solunsisäinen tyrosiinikinaasiosien fosforylaatio aktivoi PLC_γ1:n Raf/Mek/Erk signaalintireitillä (Takahashi ym. 1999). Solun selviytymistä ja migraatiota säätelevät signaalit välittyvät PI3K/Akt:n ja fokaaliadheesio kinaasi-reitillä. Reseptori aktivoi myös MAPK, Ca²⁺ ja NO-signaalintireittejä vaikuttaen verisuonen vasodilataatioon (Roy ym. 2006).

VEGFR3:n signalointimekanismeja ei ole vielä täysin selvitetty. Reseptorin C-terminaaliosasta on identifioitu viisi tyrosiinin fosforylaatio osaa, joista Y1337:n tiedetään sitoutuvan Shc:hen ja Grb2:een, jotka aktivoivat edelleen proliferaatiota sekä migraatiota aktivoivan MAPK-reitin (Shibuya ja Claesson-Welsh, 2006). VEGFR3:n toisiolähteenä aktivoituu myös PI3K/Akt-reitti, jonka kautta säädellään solun selviytymistä ja migraatiota (Roy ym. 2006).

2.9. Antiangio- ja antilymfangiogeneesi syövän hoidossa

Antiangiogeneesillä eli verisuonten kasvun estolla pyritään uusien verisuonten kasvun eli angiogeneesin estoon. Antilymfangiogeneesillä tarkoitetaan imusuonten kasvun estoa. Verisuoniston kasvua estämällä kasvaimen hapen- sekä ravinnonsaanti saadaan estettyä, jolloin kasvaimen kasvu ja kehittyminen estyy. Tutkimukset ovat osoittaneet, ettei antiangiogeneesiin perustuva geeniterapia vaikuta merkittävästi olemassa olevaan verisuonistoon vaan lähinnä vain uudisverisuonten syntymiseen (O'Reilly 2007). Antiangiogeeninen ja antilymfangiogeeninen geeniterapia perustuu muun muassa endoteelikasvutekijäreseptoreiden liukoisten muotojen käyttöön. VEGF-reseptoreiden liukoisilta (soluble) muodoilta puuttuu veri- ja imusuonen endoteelisolukalvon läpäisevä transmembraaniosa sekä intrasellulaariset tyrosiinikinaasiaktiivisuuden välittävät osat (Kuva 5). Liukoiset reseptorit eivät pysty välittämään angiogeenisiä tai lymfangiogeenisiä signaaleja endoteelisolujen sisään, sillä kasvutekijän reseptoriin sitoutumisen seurauksena solunsisäiset toisiolähetit eivät aktivoitu (Kendall ja Thomas 1993). VEGF-reseptoreiden toiminta ja kasvaimen veri- ja imusuoniverkoston kehittyminen pystytään siis estämään liukoisten reseptoreiden avulla (Takayama ym. 2000).

Terapiakäyttöön on kehitetty useita VEGF:en toiminnan estoon perustuvia menetelmiä, kuten VEGF:ta tai VEGFR:ta neutralisoivat monoklonaaliset vasta-aineet, liukoiset VEGFR:t sekä tyrosiinikinaasi-inhibiittorit (Spannuth ym. 2008). Tutkimuksissa on osoitettu VEGF:den ja niiden reseptoreiden toiminnan estämisen, mm. liukoisten VEGF-reseptoreiden (sVEGFR1, sVEGFR2, sVEGFR3) tai VEGF-Trap:in avulla vähentävän munasarjasyöpäkasvaimen kehittymistä sekä askitesnesteen muodostumista (Byrne ym. 2003; Sallinen ym. 2009). Sopo

ym. (2012) ovat todenneet antiangio- ja antilymfangiogeenisen geeniterapian pidentävän ihmisen munasarjasyöpää sairastavien koe-eläinten elinikää AdsVEGFR1:n, AdsVEGFR2:n ja AdsVEGFR3:n sekä paklitakseli-sytostaatin avulla. Bevacizumab eli Avastiini® on ensimmäinen USA:n Food and Drug Administration:in (FDA) vuonna 2004 kolorektaalisyövän hoitoon hyväksymä neutralisoiva monoklonaalinen vasta-aine (Hurwitz ym. 2004). Kliinisissä syöpätutkimuksissa on kehitteillä myös toinen antiangiogeeninen VEGF-ligandiin sitoutuva tekijä, VEGF-Trap (Aflibercept®), joka inaktivoi VEGFA:n, VEGFB:n ja PlGF:n toimintaa (Wang-Gillam ym. 2011).

3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TAVOITTEET

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää adenovirusvälitteisen antiangiogeneesiin ja antilymfangiogeneesiin eli veri- ja imusuonten kasvun estoon perustuvan geeniterapian (AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3) ja kemoterapian (paklitakseli ja karboplatiini sytostaatit) sekä näiden yhdistelmähoitojen mahdolliset toksikologiset vaikutukset terveessä koe-eläimessä. Tutkimuksen avulla haluttiin saada käsitys adenovirusvälitteisesti tuotettujen hoitogeenien jakautumisesta elimistöön eli niiden biodistributiosta. Tutkimuksessa selvitettiin hoitojen mahdolliset sivuvaikutukset ja eläinten sietokyky hoidoille normaalin immuunipuolustuksen omaavassa koe-eläimessä. Tulosten avulla oli tarkoitus selvittää ne geenihoido- ja sytostaattiannokset, joilla saavutetaan riittävä hoitoproteiinien tuotto munasarjasyöpäkudoksen antiangiogeenisen sekä antilymfangiogeenisen hoitovasteen aikaansaamiseksi ja samalla vältetään merkittävältä kudostoksisuudelta. Antiangiogeenisen adenovirusvälitteisen geeniterapian on todettu aiheuttavan maksatoksisuutta aiemmissä tutkimuksissa (Mahasreshti ym. 2003), joten tässä tutkimuksessa pyrittiin kiinnittämään erityistä huomiota hoitojen kohdistumisesta maksakudoksiin. Tutkimuksessa pyrittiin noudattamaan mahdollisimman tarkasti niitä menetelmiä ja aikataulua, joita tullaan hyödyntämään jatkossa munasarjasyövän geeniterapiatutkimuksen kliinisissä vaiheissa.

Tutkittaessa munasarjasyövän geeniterapiaa ja liukoisia VEGF-reseptoreita, tutkimukset on tehty aiemmin pääasiassa syöpää sairastavilla koe-eläimillä. Tehty tutkimus oli ensimmäinen

laaja turvallisuus- ja biodistributiotutkimus, jossa adenovirusvälitteistä munasarjasyövän geeniterapiaa sekä tähän yhdistettyä kemoterapiaa tutkittiin terveissä koe-eläimissä.

4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1. Eläimet

Tutkimuksessa käytettiin 90 kpl Wistar-kannan (HsdHan:Wist) naarasrottia. Eläimet hankittiin Sveitsistä Harlan Laboratories Inc., Füllinsdorf:lta. Kokeen alkaessa eläimet olivat 9-13 viikon ikäisiä, eläimet painoivat kokeen alkaessa 147-243 g. Eläimet pidettiin Itä-Suomen yliopistolla Valtakunnallisen koe-eläinkeskuksen tiloissa eristettyinä patogeenivapaassa ympäristössä. Koe-eläinhuone oli konventionaalitiloissa, huoneen olosuhteet olivat vakioituja: lämpötila 21 ± 1 °C, suhteellinen kosteus 55 ± 10 % RH, ilmanvaihto 15 kertaa tunnissa, valorytmi 12/12 h; valoisa aika klo 7.00-19.00. Tutkimus suoritettiin eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen hyväksymän luvan mukaan (ESLH-2008-07202/Ym-23). Eläimillä oli saatavilla vettä ja ruokaa (pellettinä Tekland 2016S) jatkuvasti. Ruoka, vesi ja alustana ollut sahajauho olivat autoklavoituja. Eläimet pidettiin tutkimuksen aikana viiden rotan häkeissä. Jokaisessa aikapisteessä eläimet punnittiin ennen operaatiota mahdollisten painonmuutosten havainnoimiseksi sekä eläinten hyvinvoinnin seuraamiseksi. Eläimet nukutettiin isofluraani-happi-nukutuksella (Isofluran Baxter inhalaatiohöyry, Baxter Medical AB) geeninsiirtojen, sytostaattien annostuksen sekä verinäytteenottojen ajaksi. Anestesia aloitettiin annoksella: ilma 700-800 ml ja isofluraani 4-4,5 %. Eläimen nukahdettua anestesiatasoa laskettiin ylläpitoannokseen: ilma 400-500 ml ja isofluraani 2,3-2,5 %. Operaatioiden jälkeen eläimet virkosivat anestesiasta omilla häkeissään, minkä jälkeen ne siirrettiin viiden eläimen ryhmähäkkeihin. Tutkimuksessa tehdyistä toimenpiteistä ei aiheutunut merkittävää kipua koe-eläimille, joten kipulääkitystä ei käytetty. Eläimet lopetettiin kokeen päättyessä kaasunukutuksella lopetuskammiossa 70 % hiilidioksidilla, tämän jälkeen otettiin verinäytteet sydänpunktiolla ja eläinten kuolema varmistettiin niskavenytyksellä.

4.2. Virusvektorit

Geeninsiirtoihin käytettiin Kuopiossa GMP-virusvektorilaboratoriossa (Biocenter Kuopio, National Virus Vector Laborator) tuotettuja adenovirusvektoreita. Vektorit koodasivat ihmisen sVEGF reseptori-2-IgG-fuusioproteiinia (AdsVEGFR2, tunnetaan myös nimellä AdskDR) (Roy ym. 2005) sekä ihmisen sVEGF reseptori-3-IgG-fuusioproteiinia (AdsVEGFR3, tunnetaan myös nimellä AdsFlt-4) (Veikkola ym. 2001). Kontrollina käytettiin *LacZ*:aa koodaavaa adenovirusta (*AdLacZ*). Virusvektoreiden genomia oli muokattu poistamalla niistä solun jakautumista säätelevät geenialueet E1-E3. Virusvektorit oli tuotettu human embryonic kidney 293T -soluissa.

4.3. Geeniterapia

Geeninsiirroissa adenovirusmäärä vakioitiin viruspartikkeleiden lukumäärän mukaan korkeaan sekä matalaan hoitoannokseen. Korkeana hoitoannoksena käytettiin yksittäisen liukoisen reseptorin (AdsVEGFR2 tai AdsVEGFR3) osalta annosta 1×10^{11} viruspartikkelia (vp) sekä matalana hoitoannoksena 1×10^{10} vp:a. Geenihoidon kokonaisvirusannos oli siten eläintä kohti suurella hoitoannoksella 2×10^{11} vp tai matalalla hoitoannoksella 2×10^{10} vp. Geenihoidoissa eläimiin injisoitiin 500 μ l AdsVEGFR2:a (erät 1066, 1084) ja 500 μ l AdsVEGFR3:a (erät 1024, 1084, 1120). Geeninsiirrot suoritettiin häntälaskimon kautta (iv.) injektionopeudella noin 1 ml/min injisoitavan kokonaistilavuuden ollessa 1000 μ l. Tutkimukseen valittiin verisuonensisäinen annostelutapa, sillä verisuonten välityksellä virusvektorin leviäminen eri kudoksiin on tehokkainta ja näin mahdolliset hoidon toksiset vaikutukset saadaan oletettavasti parhaiten esiin.

4.4. Kemoterapia

Kemoterapiassa käytettiin kliinisessä munasarjasyövän hoidossa käytössä olevia sytostaatteja ja hoidon annostelutavassa pyrittiin noudattamaan mahdollisimman hyvin

kliinisiä käytäntöjä. Hoidoissa käytettiin paklitakselia (Paclitaxel Hospira 6 mg/ml, infuusiokonsentraatti, Hospira UK Limited, Englanti) sekä karboplatiinia (Carboplatin Hospira 10 mg/ml, infuusiokonsentraatti, Hospira UK Limited, Englanti). Paklitakselia annettiin eläimille 6 mg/kg ja karboplatiinia 40 mg/kg. Hoidoissa paklitakselia laimennettiin steriiliin 0,9 % NaCl:iin suhteessa 1:3, karboplatiini annosteltiin laimentamattomana. Injektiot suoritettiin 24 G:n kanyylillä injektionopeudella noin 1 ml/min häntälaskimoon (*iv.*), annostelemalla ensin paklitakseli- ja sitten karboplatiini-sytostaatit. Injisoitava sytostaattimäärä oli eläimen painosta riippuen yhteensä noin 1000 µl.

4.5. Hoitoryhmät

Kokeen alussa eläimet jaettiin sattumanvaraisesti seitsemään hoitoryhmään: kontrolliryhminä toimivat *AdLacZ* (15 eläintä) sekä *AdLacZ* ja kemoterapian eli paklitakseli ja karboplatiini sytostaatit (10 eläintä) saaneet ryhmät I ja II (Taulukko 1). Koe-eläimistä 15 sai *AdsVEGFR2:a* ja *AdsVEGFR3:a* matalan hoitoannoksen 1×10^{10} vp:a (ryhmä III) ja 15 eläintä *AdsVEGFR2:a* ja *AdsVEGFR3:a* korkean hoitoannoksen 1×10^{11} vp:a (ryhmä IV). Kymmenen eläintä sai *AdsVEGFR2:a* ja *AdsVEGFR3:a* matalan hoitoannoksen 1×10^{10} vp:a sekä paklitakseli että karboplatiini sytostaatit (ryhmä V). Toiset 10 eläintä sai *AdsVEGFR2:a* ja *AdsVEGFR3:a* korkean hoitoannoksen 1×10^{11} vp:a sekä paklitakseli ja karboplatiini sytostaatit (ryhmä VI). Viisitoista eläintä sai ainoastaan kemoterapiahoidon (ryhmä VII).

Taulukko 1. Tutkimuksen hoitoryhmät. Tutkimuksessa oli seitsemän hoitoryhmää (I-VII), joihin kuului 10-15 Wistar-rottaa. Eläimet saivat joko geeniterapiaa (AdsVEGFR2, AdsVEGFR3), geeniterapiaa ja kemoterapiaa (paklitakseli ja karboplatiini sytostaatit) tai pelkän kemoterapiahoidon. Kontrolliryhmien eläimet saivat joko *AdLacZ*:aa tai *AdLacZ*:aa ja kemoterapiaa.

Ryhmä	I	II	III	IV	V	VI	VII
n	15	10	15	15	10	10	15
Adenovirusvektori	<i>LacZ</i>	<i>LacZ</i>	sVEGFR-2 sVEGFR-3	sVEGFR-2 sVEGFR-3	sVEGFR-2 sVEGFR-3	sVEGFR-2 sVEGFR-3	-
Kemoterapia	-	Paklitakseli Karboplatiini	-	-	Paklitakseli Karboplatiini	Paklitakseli Karboplatiini	Paklitakseli Karboplatiini
Virusvolume (μl)	500	500	500	500	500	500	-
Pitoisuus (vp)* / vektori	1 x 10 ¹¹	1 x 10 ¹¹	1 x 10 ¹⁰	1 x 10 ¹¹	1 x 10 ¹⁰	1 x 10 ¹¹	-
Kemoterapia mg/kg							
Paklitakseli	-	6	-	-	6	6	6
Karboplatiini	-	40	-	-	40	40	40

* vp, viruspartikkeli

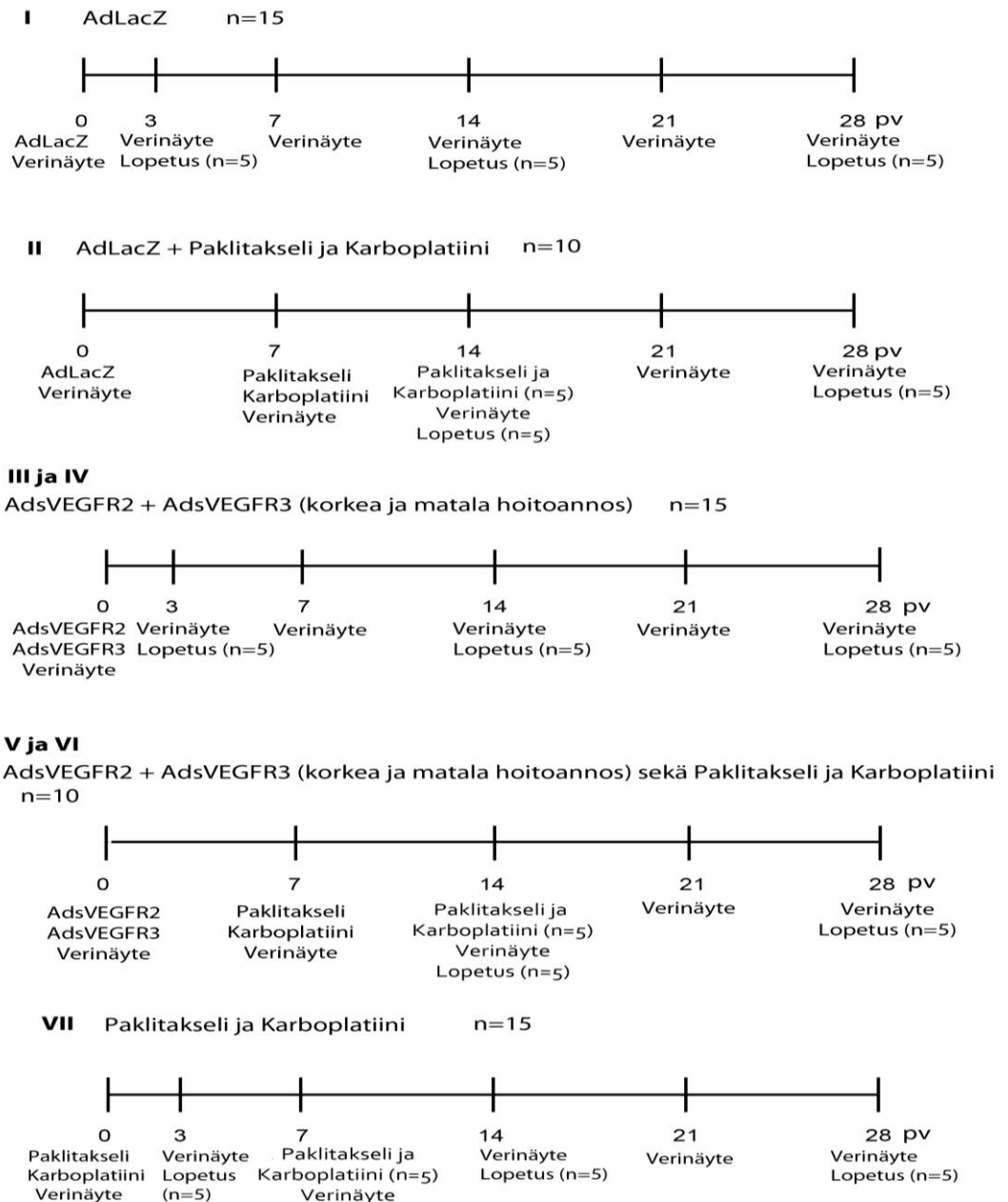
4.6. Kokeen aikataulu

Kontrolliryhmässä *AdLacZ* (ryhmä I) 15 eläintä sai kokeen aloituspäivänä aikapisteessä 0 *AdLacZ*:aa 1x10¹¹ vp:a. Aikapisteissä 3, 14 ja 28 päivää lopetettiin viisi eläintä kunakin päivänä (Kuva 6). Toisessa kontrolliryhmässä (ryhmä II) 10 eläintä sai kokeen aloituspäivänä *AdLacZ*:aa 1x10¹¹ vp:a sekä aikapisteissä 7 ja 14 päivää paklitakseli- ja karboplatiini-sytostaatit. Ryhmässä II eläimistä lopetettiin viisi kappaletta aikapisteissä 14 ja 28 päivää. Kokeen pituus oli neljä viikkoa kaikissa hoitoryhmissä.

Geenihoitoryhmissä (ryhmät III ja IV) 15 eläintä sai kokeen aloituspäivänä AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 yhdistelmägeenihoitoa korkean tai matalan hoitoannoksen. Kokeessa käytetty korkea geenihoitoannos oli 1x10¹¹ vp:a ja matala hoitoannos 1x10¹⁰ vp:a yhden liukoisen VEGF-reseptorin osalta. Päivinä 3, 14 ja 28 lopetettiin viisi eläintä kussakin aikapisteessä. Geenihoitoja sekä kemoterapiaa saaneissa hoitoryhmissä (ryhmät V ja VI) 10 eläintä sai kokeen aloituspäivänä korkean tai matalan geenihoitoannoksen AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 hoitogeenejä. Aikapisteissä 7 ja 14 päivää näille eläimille annettiin kemoterapiahoito eli

paklitakseli ja karboplatiini sytostaatit. Yhdistelmähoidon saaneissa hoitoryhmissä lopetettiin viisi eläintä aikapisteissä 14 ja 28 päivää.

Kemoterapiahoitoryhmä (ryhmä VII) toimi kokeessa kontrolliryhmänä ryhmien I ja II lisäksi. Tässä ryhmässä 15 eläintä sai aikapisteessä 0 päivää paklitakseli- ja karboplatiini-sytostaatteja ja toisen hoitokerran samoja sytostaatteja aikapisteessä 7 päivää. Aikapisteissä 3, 14 ja 28 päivää lopetettiin viisi eläintä kussakin aikapisteessä.



Kuva 6. Hoitoryhmien V-VII kokeen aikataulu. Rotat saivat hoidon päivänä 0 ja niiden vointia seurattiin pisimmillään neljän viikon ajan, eläimiä lopetettiin aikapisteissä 3 ja 14 päivää ja niistä otettiin verinäytteet viidessä aikapisteessä. Kemoterapiaa saaneissa hoitoryhmissä eläimet saivat sytostaatteja kaksi kertaa viikon välein.

4.7. Näytteet

4.7.1. Verinäytteet

Kokeen aikana eläimistä otettiin verinäytteitä häntälaskimosta liukoisten reseptoreiden määrän analysoimiseksi sekä kliinisen kemian ja hematologian analyysiin aikapisteissä 0, 3, 7, 14, 21 ja 28 päivää (ryhmät I, III, IV, VII) (Kuva 6). Hoitoryhmissä, joissa eläimet saivat yhdistelmähoidon eli geeni- ja kemoterapiaa (ryhmät II, V ja VI) verinäytteitä otettiin aikapisteissä 0, 7, 14, 21 ja 28 päivää. Hepariiniverinäytteet otettiin 24 G:n kanyyllillä (BD, NeoflonTM) litiumhepariini-putkiin (BD, Microtainer®). Näytteiksi eläimistä otettiin noin 1-2ml laskimoverta. Verinäytteen oton yhteydessä näyteputkia käsiteltiin niiden valmistajan ohjeiden mukaan kääntelemällä putkia 10 kertaa hepariinin sekoittumiseksi. Näytteet säilytettiin jäissä ja niistä erotettiin plasma sentrifugoimalla näyteputkia 3 min 2000 g. Plasmanäytteet säilytettiin jääkaapissa noin 8 asteessa ennen kliinisen kemian ja hematologian analyysijä, jotka tehtiin 10 tunnin sisällä näytteenotosta. ELISA:a varten plasmanäytteet säilytettiin -70 °C:ssa ja sulatettiin ennen analyysiä. Hematologista neutrofiilien sivelylaskentaa varten muutamasta eläimestä otettiin myös verinäytteet K2E-EDTA -verinäyteputkiin (BD, Microtainer®). Analyysien jälkeen plasmanäytteet säilytettiin -70 °C:ssa mahdollisia jatkoanalyysijä varten.

4.7.2. Kudosnäytteet

Eläinten lopetusten yhteydessä aikapisteissä 3, 14 ja 28 päivää otettiin kudosnäytteet histologisia leikkeitä, hoitoproteiinien biodistribuoitun selvittämistä sekä mahdollisia immunovärijäkyksiä varten (Kuva 6). Kudosnäytteet otettiin seuraavista elimistä: luurankolihas, vatsakalvo, munasarja, kohtu, haima, suoli, munuainen, sydänlihas, keuhko, perna ja maksa. Biodistribuoitotutkimuksessa on tärkeää huomioida kudosnäytteiden steriili kerääminen ristikontaminaatioiden estämiseksi, joten kudosnäytteet otettiin

kertakäyttöisillä pinseteillä (Verdier ja Descotes 1999). Kudosnäytteiden kerääminen aloitettiin kudoksista, joissa oletettavasti oli löydettävissä vähiten siirtogenejä ja edeten lopulta siirtogenejä runsaimmin ilmentäviin kudoksiin (Imboden ym. 2003).

Histologisten kudosnäytteiden lisäksi kudoksista otettiin nestetyssä (-196 °C) syväjäädytetyt näytteet hoitoproteiinien kudokohtaisen jakautumisen ja niiden mRNA-määrien kudokohtaisen ilmentymisen arvioimiseksi. Syväjäädytetyt kudosnäytteet säilytettiin -70 °C:ssa qRT-PCR:aa varten. Kudoksista otettiin myös isopentaaninestetyypinäytteet mahdollisesti myöhemmin valmistettavia jääleikkeitä ja immunovärjäyksiä varten. Kudosleikkeet jäädytettiin nestetyellä jäähdetyssä isopentaaniliuoksessa (2-metyylibutaani, Fluka Chemika) ja syväjäädytettiin nestetyssä ennen säilytystä -70 °C:ssa.

4.8. Näytteiden analysointi

4.8.1. qRT-PCR

Real Time quantitative Reverse Transcription PCR:lla eli kvantitatiivisella RT-PCR:lla (qRT-PCR) määritettiin siirtogeenien sVEGFR2 ja sVEGFR3 ilmentyminen aikapisteissä 3, 14 ja 28 päivää seuraavista kudoksista: luurankolihas, munasarja, kohtu, munuainen, sydänlihas, keuhko, perna ja maksa. qRT-PCR:aa ei tehty lopetuksen yhteydessä otetuille vatsakalvo-, haima- ja suolinäytteille. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet adenoviruksen kulkeutuvan enimmäkseen maksakudokseen käytettäessä verisuonensisäistä annostelutapaa, jolloin myös hoitoproteiinin tuotto tapahtuu maksakudoksessa (Hiltunen ym. 2000; Tao ym. 2001). Tutkimuksessa selvitettiin geeninsiirtojen onnistuminen sekä siirtogeenien ilmentyminen eri kudoksissa, eli adenoviruksen biodistributio.

Kokonais-RNA eristettiin 50-100 mg:sta kudosnäytettä 1 ml:ssa TRI Reagent-RNA -eristysliuosta (Applied Biosystems). Munasarjakudosten osalta RNA eristettiin kudoksen

pienen koon vuoksi 25-50 mg:sta näytettä 0,5 ml:ssa TRI Reagent -liuosta. Kudosnäytteet homogenisoitiin steriileissä lyysausputkissa (Precellys Lysing Kit; soft tissue CK14, hard tissue CK28). Kudosnäytteet punnittiin ja lisättiin jäällä säilytettäviin lyysausputkiin, joihin oli pipetoitu 1 ml (tai 0,5 ml) TRI Reagent -liuosta. Kudokset homogenisoitiin Precellys 24 (EG-RD-135) -homogenisaattorilla, 5000 rpm, 2x10 s, 10 s tauko. Mikäli näytteet eivät olleet homogenisoituneet riittävästi, niin edellinen ohjelma toistettiin näille näytteille. Kontaminaatioiden estämiseksi kaikki työvaiheet tehtiin steriileissä työskentelyolosuhteissa ja kudoksia käsiteltiin kertakäyttöisillä pinseteillä sekä veitsillä. RNA-pelletit liuotettiin steriiliin DEPC-veteen ja näytteiden RNA-pitoisuudet määritettiin spektrofotometrisesti (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000). Eristetyt RNA-näytteet säilytettiin -70 °C:ssa. Eri kudosnäytteistä eristettyjen RNA-pitoisuuksien välillä oli havaittavissa jonkin verran vaihtelua, näin ollen cDNA-synteesiä varten valmistettiin näytteet, jotka sisälsivät 3 µg eristettyä kokonais-RNA:ta. Näytteiden laimentamiseen ja RNA-määrien tasaamiseen käytettiin ultrapuhdasta vettä.

Kokonais-RNA -näytteet käsiteltiin DNAasi-entsyymillä (RQ1 RNase-Free DNase 1 U/µl, Promega, Madison, WI) mahdollisesti näytteissä olevan DNA:n poistamiseksi. DNAasi-käsittely tehtiin 3 µg:lle kokonais-RNA -näytettä valmistajan ohjeiden mukaan. RNA käännettiin cDNA:ksi käyttäen kaupallista High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix:ia (Applied Biosystems, USA), joka sisälsi random heksameereja sekä oligo-dT-alukkeita. Reaktioon otettiin 0,5 µg kokonais-RNA:ta ja 4 µl High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix:ia, näytetilavuus täydennettiin 20 µl:aan steriilillä DEPC-vedellä. Osalle näytteistä valmistettiin myös negatiiviset kontrollinäytteet mahdollisen kontaminoivan genomisen DNA:n havaitsemiseksi käyttämällä High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix No-RT-control:ia, joka ei sisältänyt käänteiskopioijaentsyymiä (RT). cDNA synteesiin käytettiin PCR-laitetta (MJ Research, PTC-200, Petit Thermal Cycler, Finnzymes) ja seuraavaa ohjelmaa: 1. vaihe, alukkeiden kiinnittyminen: 5 min 25 °C; 2. vaihe, käänteiskopioijaentsyymien ja alukkeiden avulla muodostetaan yksijuosteinen cDNA käyttäen RNA:ta templaattina: 30 min 42 °C; 3. vaihe, käänteiskopioijaentsyymien denaturointi: 5 min 85 °C; 4. vaihe: säilytys 4 °C. cDNA:sta valmistettiin 1:5 laimennokset steriiliin DEPC-veteen qPCR:aa varten, jotta liian suuri cDNA-

määrä ei inhiboisi analyysiä. cDNA-näytteet ja niistä valmistetut laimennokset säilytettiin -20 °C:ssa.

Hoitogeenien ilmentyminen määritettiin qPCR:llä (StepOnePlus Real-Time PCR, Applied Biosystems) käyttäen 20x TaqMan Gene Expression Assay:ta, joka sisälsi sVEGFR2:lle alukeparin ja koettimen Hs00911704_m1 sekä vastaavasti sVEGFR3:lle käytettiin alukeparia ja koetinta Hs01047680_m1 (Applied Biosystems, USA). Yhdessä reaktiossa käytettiin 1 µl 20x TaqMan Gene Expression Assay:ta sekä 10 µl 2x TaqMan Gene Expression Master Mix:ia, cDNA-templaattia lisättiin 3 µl ja reaktiutilavuus täydennettiin 20 µl:aan lisäämällä 6 µl steriiliä DEPC-vettä. qPCR suoritettiin 96-kuoppalevyllä standardiolosuhteissa (Taulukko 2). Siirtogeenien ilmentyminen kudoksenäytteissä selvitettiin standardisuorien avulla valmistamalla standardisuora sVEGFR2:lle eristämällä DNA:ta sVEGFR2:a koodaavista adenoviruksista ja valmistamalla tästä laimennossuora. sVEGFR3:lle valmistettiin standardisuora vastaavasti käyttäen sVEGFR3-plasmidia.

Taulukko 2. TaqMan Gene Expression Assaylla suoritettujen qPCR-ohjelman vaiheet standardiolosuhteissa. Rottien kudoksenäytteistä eristettiin RNA ja niistä valmistettiin cDNA-näytteet qPCR:aa ja hoitogeenien (sVEGFR2, sVEGFR3) ilmentymisen määrittämistä varten.

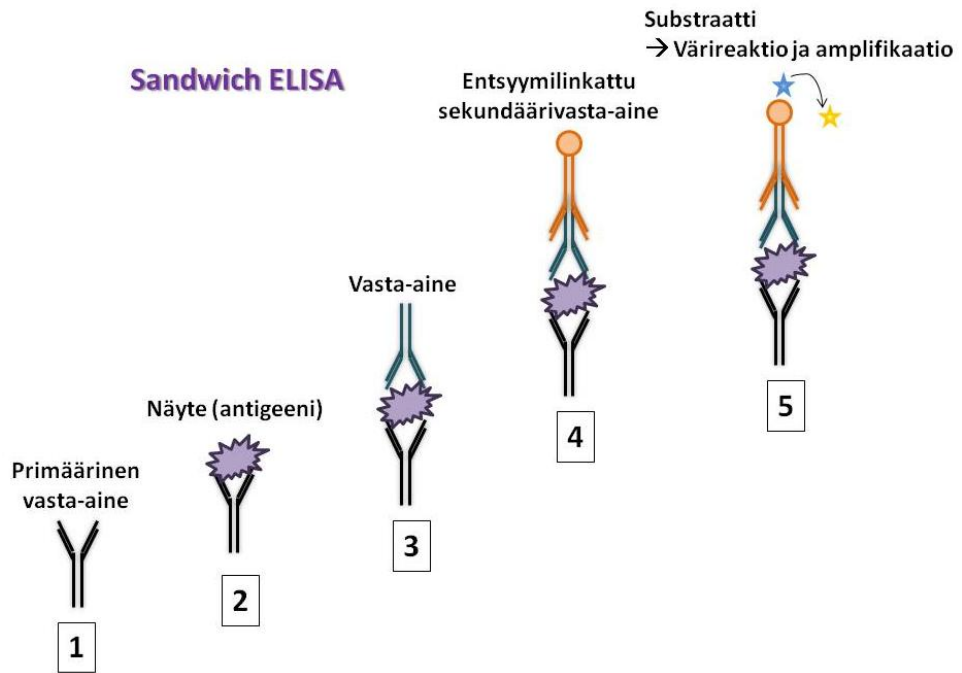
			PCR (40 Sykliä)	
Vaihe	UNG- inkubaatio	Polymeraasin aktivaatio	Denaturointi	Alukkeiden liittyminen ja pidentyminen
Lämpötila °C	50	95	95	60
Aika (min:sek)	2:00	10:00	0:15	1:00

4.8.2. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA

Liukoisten endoteelikasvutekijäreseptoreiden sVEGFR2 ja sVEGFR3 määrä verenkierrossa määritettiin kussakin aikapisteessä enzyme-linked immunosorbent assay:lla (ELISA)

hoitoryhmissä III-VI. Analyysit tehtiin koe-eläimistä otetuista plasmanäytteistä aikapisteissä 0, 7, 14 ja 28 päivää kaupallisella Quantikine, human sVEGFR2 ELISA -menetelmällä (R&D Systems, Minneapolis MN). Analyysissä käytettiin 96-kuoppalevyä ja näytteet analysoitiin kahtena rinnakkaisena. Kuoppalevyn pesuvaiheet suoritettiin Wellwash 4Mk2 automaattipesurilla (Labsystems). Näytteiden optiset tiheydet määritettiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 450 nm sekä aallonpituuden korjauksella 540 nm (Multiskan Ascent, Labsystems). Tulokset analysoitiin Multiskan Ascent -ohjelmalla vähentämällä aallonpituudella 450 nm saaduista tuloksista 540 nm:lla saadut tulokset. Näytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin standardisuoran avulla.

sVEGFR3-hoitoproteiinin analysoiminen plasmanäytteistä ei onnistunut kaupallisella menetelmällä, sillä sen havaittiin tunnistavan näytteistä myös rotan endogeenisen sVEGFR3:n. sVEGFR3-hoitoproteiinin analysoimiseksi plasmanäytteistä rakensimme "kotitekoisen" sandwich ELISA:n (Kuva 7). Menetelmää ei saatu toimimaan, joten sVEGFR3-proteiinin määrittäminen plasmanäytteistä ei onnistunut. Menetelmässä 96-kuoppalevylle sidottiin neljän eri valmistajan toimittamaa primaarista sVEGFR3 vasta-ainetta sekä VEGFC:ta. Näytteenä eli antigeeninä käytettiin VEGFR3-Fc-proteiinia, jonka tulisi sitoutua primaariseen vasta-aineeseen spesifisesti eli levyllä sidotun primaarisen vasta-aineen määrästä riippuen. Sekundaarivasta-aineina menetelmässä käytettiin kahta vasta-ainetta, jotka eivät kuitenkaan havainneet sitoutunutta proteiinia spesifisesti. Ongelma menetelmän kehittämisessä oli primaari- ja sekundaarivasta-aineiden aiheuttama suuri taustamittaustuloksissa, lisäksi saatujen tulosten avulla ei voitu määrittää tarkkaa primaariseen vasta-aineeseen sitoutuneen VEGFR3-Fc-proteiinin määrää.



Kuva 7. Sandwich ELISA:n vaiheet. 1) Näytelevylle kiinnitetään primaarinen vasta-aine. 2) Lisätään näyte eli antigeeni, joka sitoutuu primaariseen vasta-aineeseen. 3) Lisätään antigeenin tunnistava vasta-aine. 4) Lisätään vasta-aineen Fc-rakenteeseen sitoutuva sekundaarivasta-aine, johon on liitetty entsyymi. 5) Lisätään substraatti, johon entsyymi vaikuttaa aiheuttaen värireaktion ja määritetään näytteen absorbanssi.

4.8.3. Histologia

Eläinten lopetuksen yhteydessä otetuista kudospäyteistä valmistettiin histologiset kudokset mahdollisten histologisten muutosten havaitsemiseksi. Kudospäyteitä säilytettiin kudosten fiksoimiseksi noin 4 ml:ssa 4 % paraformaldehydi (PFA) -sakkaroosiliuoksessa neljä tuntia ja tämän jälkeen vähintään yön yli noin 4 ml:ssa 15 % sakkaroosia. Kudospäytteet käsiteltiin kuljetuskoneessa (Shandon Citadel 1000/2000, Thermo Fisher Scientific, Englanti) näytteissä olevan veden korvaamiseksi etanolilla. Kudospäyteisiin imeytettiin ksyleeni-liuotin, joka korvattiin lopulta parafiinilla. Kudokset valettiin parafiiniin ja niistä valmistettiin 5 µm histologiset leikkeet (Microtomi HM355, Microm, Saksa) hematoksyliini-eosiinivärjäykseen. Hematoksyliini-eosiini värjätyt leikkeet kuvattiin Provis AX70 -elektronimikroskoopilla (Olympus, Japani) ja kuvia käsiteltiin

kuvanmuokkausohjelmalla Photoshop CS4 (Adobe). Histologiset kuvat analysoitiin patologin toimesta.

4.8.4. Kliininen kemia ja hematologia

Aikapisteissä 0, 3, 7, 14, 21 ja 28 päivää otetuista plasmanäytteistä analysoitiin näytteenottopäivänä kliinisen kemian ja hematologian parametrit MoVet- laboratoriossa. Analyseissä näytteitä oli aikapisteittäin n=5-15. Näytteiden määrä vähentyi aikapisteissä 3 ja 14 päivää viidellä näytteellä kummassakin aikapisteessä eläinten lopetuksesta johtuen.

Hematologian osalta plasmanäytteistä määritettiin täydellinen verenkuvaa eli hemoglobiini (HGB), hematokriitti (HCT), punasolut (RBC), valkosolut (WBC) ja punasoluideksit: punasolujen hemoglobiinin massa (MCH), punasolujen keskimääräinen hemoglobiinin konsentraatio (hemoglobiinin määrä litrassa punasoluja, MCHC), punasolujen keskitilavuus (MCV), verihiutaleet (verihiutaleiden määrä litrassa verta, PLT). Lisäksi hepariiniverinäytteistä määritettiin neutrofiilien osuus valkosoluista valkosolujen erittelylaskennalla (B-Diff).

Kliinisen kemian parametreista määritettiin maksan toiminnasta kertovat alkalinen fosfataasi (AFOS) ja alaniiniaminotransferaasi (ALAT), munuaisten toiminnasta kertova kreatiniini (Krea) sekä yleisemmin kudosten toiminnasta kertova laktaattidehydrogenaasi (LDH). Kohonneita LDH-arvoja voidaan havaita esimerkiksi akuutin sydäninfarktin, hemolyyttisten tilojen tai syöpäsairauksien yhteydessä, mutta tämän arvon nousu voi olla kudoslähteen suhteen epäspesifinen.

4.9. Tilastolliset menetelmät

Kliinisen kemian ja hematologian sekä ELISA:n analyysistä saaduille tuloksille määritettiin keskiarvot, keskihajonnat (standard deviation, SD) sekä keskiarvon keskivirhe (standard error of mean, SEM) Excel-ohjelmalla (Microsoft Office). Tulokset ilmoitettiin keskiarvo \pm SEM -muodossa. Eläinten painoissa tapahtuneita muutoksia arvioitiin käyttäen sekamallimenetelmää (IBM SPSS Statistics). Saatujen tulosten todettiin olevan merkitseviä kun $p < 0,05$. Tuloksia verrattiin viitearvoihin, jotka saatiin eläinten toimittajalta (Harlan 2011) sekä kirjallisuuslähteestä (Tucker 1997).

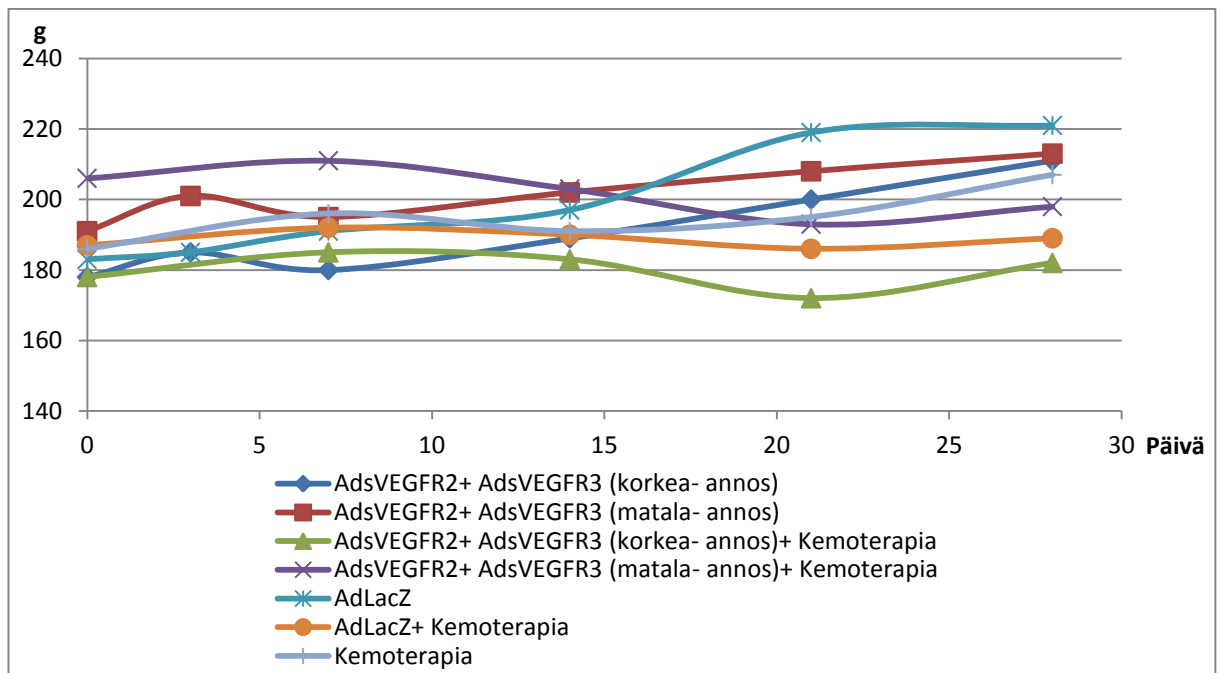
5. TULOKSET

5.1. Eläinten hyvinvointi ja painonkehitys

Eläinten hyvinvoinnissa tai niiden käyttäytymisessä ei havaittu kokeen aikana merkittäviä muutoksia. Eläimet selvisivät hyvin niille suoritetuista toimenpiteistä ja verinäytteiden otosta sekä virkosivat nopeasti anestesiasta. Muutamalla eläimellä havaittiin hetkellistä huonovointisuutta välittömästi anestesiasta virkoamisen jälkeen, kun niille oli annettu sytostaattihoitoja. Huonovointisuus havaittiin eläinten turkin pystyyn nousemisena sekä eläinten aktiivisuuden vähentymisenä. Näiden eläinten vointi palasi normaaliksi puolen tunnin sisällä hoitojen annostelun jälkeen. Useiden häntäpistosten seurauksena kolmen eläimen hännät tulehtuivat, mutta näitä eläimiä ei tarvinnut lopettaa tulehduksen seurauksena ennen kokeen loppua. Lopetusten yhteydessä eläinten rinta- ja vatsaontelot avattiin, eikä eläimillä havaittu sisäistä verenvuotoa tai silmämääräisiä kudosuutoksia.

Tutkimuksen alussa koe-eläimet painoivat 158-220 g (Taulukko 3). Kokeen aikana eläimet punnittiin jokaisessa aikapisteessä 0, 3, 7, 14, 21, 28 päivää niiden hyvinvoinnin seuraamiseksi (Kuva 8). Painonkehitys oli tasaista kaikissa hoitoryhmissä lukuunottamatta geeniterapian matalan hoitoannoksen ja kemoterapian yhdistelmähoidon saanutta hoitoryhmä, jossa painonpudotus oli tilastollisesti merkitsevää aikapisteissä 21 ja 28 päivää

($p < 0,05$). Tulokset koe-eläinten painonmuutoksista on esitetty myös aiemmin projektista ilmestyneessä opinnäytetyössä (Kokki, 2011).



Kuva 8. Rottien painonkehitys kokeen aikana eri hoitoryhmissä (I-VII). Painojen muutosta tarkasteltiin niiden rottien osalta, jotka lopetettiin aikapisteessä 28 päivää (N=5). Painot ilmoitettiin hoitoryhmien keskiarvoina kussakin aikapisteessä 0, 3, 7, 14, 21 ja 28 päivää (Kokki, 2011).

Taulukko 3. Rottien painonkehitys kokeen aikana eri hoitoryhmissä (I-VII) aikapisteissä 0, 7, 14, 21 ja 28 päivää, N=5 rottaa/hoitoryhmä. Tulokset ilmoitettiin muodossa painojen keskiarvo \pm SEM. Tulosten todettiin olevan tilastollisesti merkitseviä, kun $p < 0,05$ (merkitty *).

Hoitoryhmä	Aikapiste (päivä)				
	0	7	14	21	28
AdsVEGFR-2 + AdsVEGFR-3 (korkea-annos)					
Keskiarvo \pm SEM	172 \pm 12	182 \pm 16	189 \pm 19	200 \pm 18	211 \pm 19
AdsVEGFR-2 + AdsVEGFR-3 (matala-annos)					
Keskiarvo \pm SEM	186 \pm 10	193 \pm 13	202 \pm 10	208 \pm 11	213 \pm 15
AdsVEGFR-2 + AdsVEGFR-3 (korkea-annos) + Kemoterapia					
Keskiarvo \pm SEM	158 \pm 6	167 \pm 2	169 \pm 6	172 \pm 9	182 \pm 8
AdsVEGFR-2 + AdsVEGFR-3 (matala-annos) + Kemoterapia					
Keskiarvo \pm SEM	207 \pm 15	213 \pm 16	204 \pm 18	193 \pm 17*	198 \pm 16*
AdLacZ					
Keskiarvo \pm SEM	188 \pm 17	195 \pm 18	197 \pm 6	219 \pm 23	221 \pm 22
AdLacZ + Kemoterapia					
Keskiarvo \pm SEM	183 \pm 18	187 \pm 17	187 \pm 12	186 \pm 11	189 \pm 12
Kemoterapia					
Keskiarvo \pm SEM	180 \pm 18	182 \pm 17	182 \pm 17	195 \pm 20	207 \pm 20

5.2. AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 hoitogeenien ilmentyminen kudospäyteissä

Siirtogeenien AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 kudospäyteinen ilmentyminen eri aikapisteissä määritettiin qRT-PCR:lla eli kvantitatiivisella käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktiolla. Analyysit tehtiin seuraavista eläinten lopetuksen yhteydessä otetuista kudospäyteistä: luurankolihas, munasarja, kohtu, munuainen, sydänlihas, keuhko, perna ja maksa.

qRT-PCR:n herkkyysrajaksi sVEGFR2 ja sVEGFR3 hoitogeenien ilmentymisessä määritettiin standardisuoran avulla 10 mRNA kopiota, näin ollen menetelmällä pystyttiin määrittämään positiiviseksi ne näytteet, joissa hoitogeeniä ilmennettiin tätä enemmän. Näytteet, joissa hoitogeenin ilmentyminen jäi alle menetelmän herkkyysrajan merkittiin ei havaittu (not detected, ND). Osalle näytteistä valmistetuissa käänteistranskriptiitaasia sisältämättömissä negatiivikontrollinäytteissä ei ilmennetty kumpaakaan hoitogeeniä, tämä tulos osoittaa että positiiviseksi hoitogeenien osalta analysoidut näytteet todella ilmentävät hoitogeeniä, eikä positiivinen tulos ole peräisin mahdollisesti näytteeseen jääneestä kontaminoivasta genomisesta DNA:sta. Kontrollina toimineissa hoitoryhmissä eli kemoterapia, *AdLacZ* sekä *AdLacZ* ja kemoterapia hoitogeeniä ei odotetusti ilmennetty missään aikapisteessä.

sVEGFR2-hoitogeeniä ilmennettiin maksa- ja pernakudoksissa. Hoitogeeniä ei ilmennetty keuhko-, munuais-, sydän-, luurankolihas-, munasarja- ja kohtunäytteissä (Taulukko 4). Hoitogeeniä ilmennettiin useimpien eläinten maksa- ja pernakudoksissa kolme päivää geeninsiirron jälkeen kaikissa geeninsiirron saaneissa hoitoryhmissä. Yleisesti kokeen aikana sVEGFR2-hoitogeeniä ilmennettiin useamman eläimen kudospäyteissä kun ne olivat saaneet korkean geenihoidoannoksen verrattuna ilmentymiseen matalan geenihoidoannoksen saaneissa ryhmissä. Siirtogeenin ilmentyminen oli vähäisempää matalan geenihoidoannoksen saaneissa hoitoryhmissä kuin korkean geenihoidoannoksen saaneissa hoitoryhmissä aikapisteessä 28 päivää (Taulukko 4). Kemoterapian ja geeniterapian matalan annoksen yhdistelmähoidon saaneessa hoitoryhmässä sVEGFR2-hoitogeeniä ilmennettiin kahden eläimen maksanäytteessä aikapisteessä 28 päivää, mutta pelkän geeniterapian matalan annoksen saaneessa hoitoryhmässä hoitogeeniä ei ilmennetty tässä aikapisteessä. Korkean geenihoidoannoksen sekä kemoterapian saaneessa hoitoryhmässä ei havaittu että

kemoterapialla olisi vaikutusta hoitogeenin pidentyneeseen ilmentymiseen. Kemoterapia ei pidentänyt hoitogeenin ilmentymistä pernakudoksissa, sen sijaan korkea geenihoitoannos lisäsi hoitogeeniä ilmentävien näytteiden määrää kaikissa aikapisteissä matalaan hoitoannokseen verrattuna.

Taulukko 4. sVEGFR2-hoitogeenin ilmentyminen rottien kudospäätteissä aikapisteissä 3, 14 ja 28 päivää qRT-PCR:lla analysoituna. Ilmentyminen määritettiin niissä hoitoryhmissä, joissa eläimet saivat geeniterapiaa tai geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon. Kun kudoksen ei havaittu ilmentävän hoitogeeniä, tulos merkittiin not detected (ND). Tulokset on ilmoitettu muodossa; hoitogeeniä ilmentävien näytteiden määrä/analysoitujen näytteiden määrä.

Hoito	Päivä	Maksa	Perna	Keuhkot	Munuaiset	Sydän	Luurankolihas	Munasarjat	Kohtu
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (matala-annos) + Kemoterapia	3	5/5	5/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14	5/5	3/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	28	2/4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (korkea-annos) + Kemoterapia	3	5/5	5/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14	4/4	3/4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	28	4/5	3/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (matala-annos)	3	5/5	5/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14	4/5	2/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	28	ND	1/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (korkea-annos)	3	5/5	5/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	14	4/4	3/4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	28	4/5	5/5	ND	ND	ND	ND	ND	ND

sVEGFR3-hoitogeeniä ilmennettiin yleisesti useamman koe-eläimen kudospäätteissä sVEGFR2-hoitogeenin ilmentymiseen verrattuna (Taulukko 5). sVEGFR3:a ilmennettiin useimmissa maksa-, keuhko- ja sydänkudoksissa, lisäksi hoitogeeniä ilmennettiin perna-, luurankolihas- ja munasarjakudoksissa. Analysoiduissa munuais- ja kohtunäytteissä sVEGFR3-hoitogeeniä ei ilmennetty missään hoitoryhmässä tai aikapisteessä. sVEGFR3:a ilmennettiin useimpien eläinten kudospäätteissä aikapisteessä 3 päivää geeninsiirtojen jälkeen kaikissa hoitoryhmissä, eikä geenihoitoannoksen suuruudella näyttänyt olevan vaikutusta ilmentymiseen tässä aikapisteessä. Kemoterapia pidensi sVEGFR3-hoitogeenin ilmentymisaikaa maksa- ja munasarjakudoksissa, sillä geeni- ja kemoterapian

yhdistelmähoidon saaneissa hoitoryhmissä siirtogeeniä ilmennettiin vielä aikapisteessä 28 päivää ja pelkän geenihoidon saaneissa ryhmissä hoitogeeniä ei ilmennetty tässä aikapisteessä.

Kaikissa hoitoryhmissä sVEGFR3-hoitogeeniä ilmennettiin pernakudosnäytteissä aikapisteessä 3 päivää. Myöhemmissä aikapisteissä hoitogeeniä ilmennettiin pernakudoksessa ainoastaan korkean geenihoidoannoksen ja kemoterapian yhdistelmähoidon saaneissa hoitoryhmässä aikapisteessä 14 päivää (Taulukko 5). Keuhkokudoksissa pelkän geeniterapian saaneissa hoitoryhmissä hoitogeeniä ilmennettiin kaikissa aikapisteissä, kun taas geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä siirtogeeniä ilmennettiin harvempien eläinten kudoksenäytteissä aikapisteen 3 päivää jälkeen. Sydän- ja luurankolihasnäytteissä sVEGFR3-hoitogeeniä ilmennettiin useammassa näytteessä niissä hoitoryhmissä, joissa eläimet saivat korkean geenihoidoannoksen verrattuna ilmentymiseen matalan geenihoidoannoksen saaneissa hoitoryhmissä. Luurankolihasnäytteissä kemo- ja geeniterapian yhdistelmähoidon saaneissa hoitoryhmissä hoitogeenin ilmentyminen vähentyi aikapisteen 3 päivää jälkeen eikä hoitogeeniä ilmennetty enää aikapisteessä 28 päivää. Munasarjakudoksissa sVEGFR3-hoitogeeniä ilmennettiin kaikissa aikapisteissä geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä, mutta pelkän geeniterapian saaneissa hoitoryhmissä hoitogeeniä ei ilmennetty aikapisteessä 28 päivää.

Taulukko 5. sVEGFR3-hoitogeenin ilmentyminen rottien kudoksenäytteissä aikapisteissä 3, 14 ja 28 päivää qRT-PCR:lla analysoituna. Ilmentyminen määritettiin niissä hoitoryhmissä, joissa eläimet saivat geeniterapiaa tai geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon. Kun kudoksen ei havaittu ilmentävän hoitogeeniä, tulos merkittiin not detected (ND). Tulokset on ilmoitettu muodossa; hoitogeeniä ilmentävien näytteiden määrä/ analysoitujen näytteiden määrä.

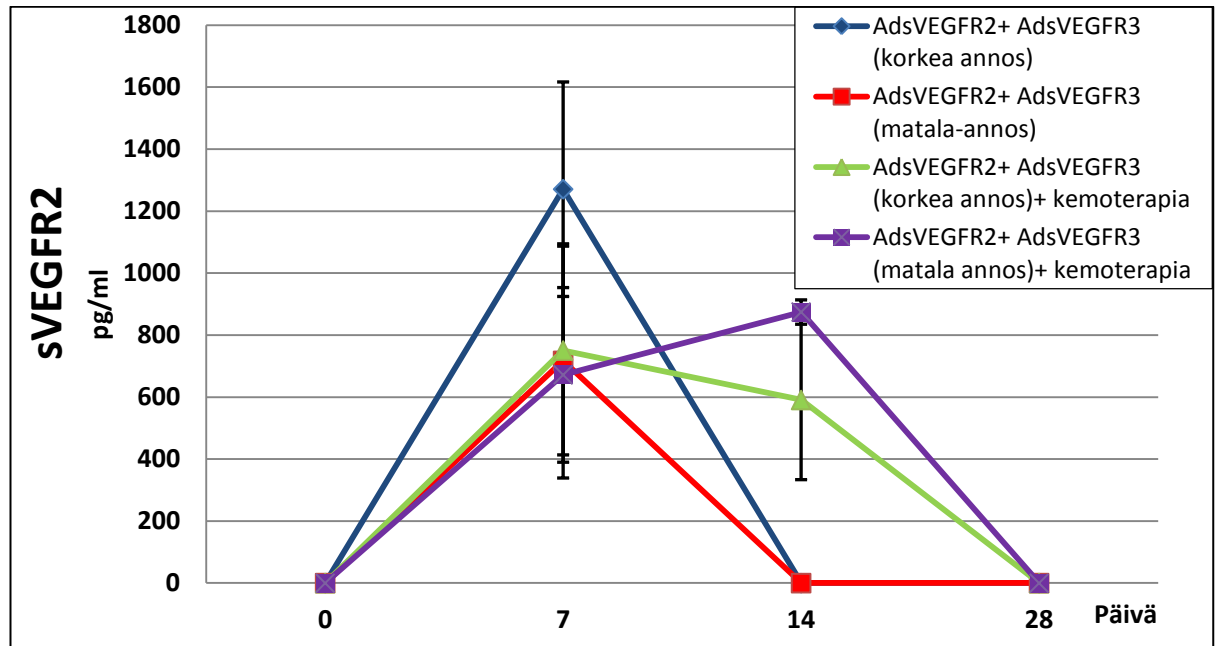
Hoito	Päivä	Maksa	Perna	Keuhkot	Munuaiset	Sydän	Luurankolihas	Munasarjat	Kohtu
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (matala-annos) + Kemoterapia	3	5/5	5/5	5/5	ND	1/5	1/2	5/5	ND
	14	3/5	ND	ND	ND	2/5	ND	1/5	ND
	28	1/4	ND	ND	ND	1/3	ND	1/4	ND
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (korkea-annos) + Kemoterapia	3	5/5	5/5	5/5	ND	3/5	3/5	4/4	ND
	14	3/4	3/4	2/4	ND	4/4	1/5	2/4	ND
	28	1/5	ND	ND	ND	3/5	ND	3/3	ND
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (matala-annos)	3	5/5	5/5	5/5	ND	1/5	1/2	5/5	ND
	14	1/5	ND	2/5	ND	3/5	1/4	2/5	ND
	28	ND	ND	5/5	ND	1/5	1/5	ND	ND
AdsVEGFR2+ AdsVEGFR3 (korkea-annos)	3	5/5	5/5	5/5	ND	3/5	3/5	4/4	ND
	14	ND	ND	2/3	ND	4/4	1/4	1/4	ND
	28	ND	ND	3/4	ND	3/5	1/5	ND	ND

5.3. sVEGFR2 ja sVEGFR3 hoitoproteiinien pitoisuus verenkierrassa

Viikon kuluttua geeninsiirroista eli aikapisteessä 7 päivää sVEGFR2-proteiinia oli verenkierrassa 1271 ± 346 pg/ml korkean geenihoitoannoksen saaneessa hoitoryhmässä (Kuva 9). Samassa aikapisteessä matalan geenihoitoannoksen saaneessa ryhmässä hoitoproteiinin pitoisuus verenkierrassa oli 717 ± 378 pg/ml. Geenihoitoryhmissä sVEGFR2-hoitoproteiinin pitoisuus jäi alle määrittäysrajan aikapisteissä 0, 14 ja 28 päivää.

AdsVEGFR2+AdsVEGFR3 (korkea-annos)+kemoterapia -hoitoryhmässä sVEGFR2-hoitoproteiinin pitoisuus oli viikon kuluttua geeninsiirrosta 750 ± 337 pg/ml (aikapiste 7 päivää), minkä jälkeen päivään 14 mennessä proteiinipitoisuus laski 591 ± 257 pg/ml:aan. AdsVEGFR2+AdsVEGFR3 (matala-annos)+kemoterapia -hoitoryhmässä sVEGFR2-hoitoproteiinin pitoisuus oli aikapisteessä 7 päivää 672 ± 282 pg/ml. Tässä hoitoryhmässä sVEGFR2-proteiinipitoisuus oli suurin aikapisteessä 14 päivää 875 ± 39 pg/ml. Aikapisteeseen

28 päivää mennessä sekä kemo- että geeniterapian saaneissa hoitoryhmissä sVEGFR2-proteiinipitoisuus verenkierrossa laski alle detektorajan. Kontrollinäytteinä analysoitujen eli terveiden hoitamattomien eläinten plasmanäytteet olivat negatiivisia hoitoproteiinin suhteen aikapisteessä 0 päivää. Kontrollinäytteistä saatu negatiivinen tulos osoittaa, että käytetty menetelmä ei detektoi eläimen endogeenistä liukoista VEGFR2-proteiinia.



Kuva 9. sVEGFR2-hoitoproteiinin pitoisuus verenkierrossa eri aikapisteissä. Hoitoproteiinin pitoisuus määritettiin geeniterapiaa (AdsVEGFR2+AdsVEGFR3) tai geeni- ja kemoterapiaa (paklitakseli ja karboplatiini sytostaatit) saaneiden rottien plasmanäytteistä ELISA-menetelmällä aikapisteissä 0, 7, 14 ja 28 päivää. Tulokset on esitetty hoitoproteiinin pitoisuutena plasmanäytteessä (pg/ml) aikapisteittäin (keskiarvo)± SEM (N=4-15).

sVEGFR3-hoitoproteiinin pitoisuutta verenkierrossa ei voitu määrittää (4.8.2. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

5.4. Histologia

Histologiset leikkeet valmistettiin luurankolihas-, vatsakalvo-, munasarja-, kohtu-, haima-, suoli-, munuainen-, sydänlihas-, keuhko-, perna- ja maksanäytteistä. Histologian tulokset on esitetty jo aiemmin tutkimuksesta valmistuneessa pro gradu-tutkielmassa (Kokki 2011).

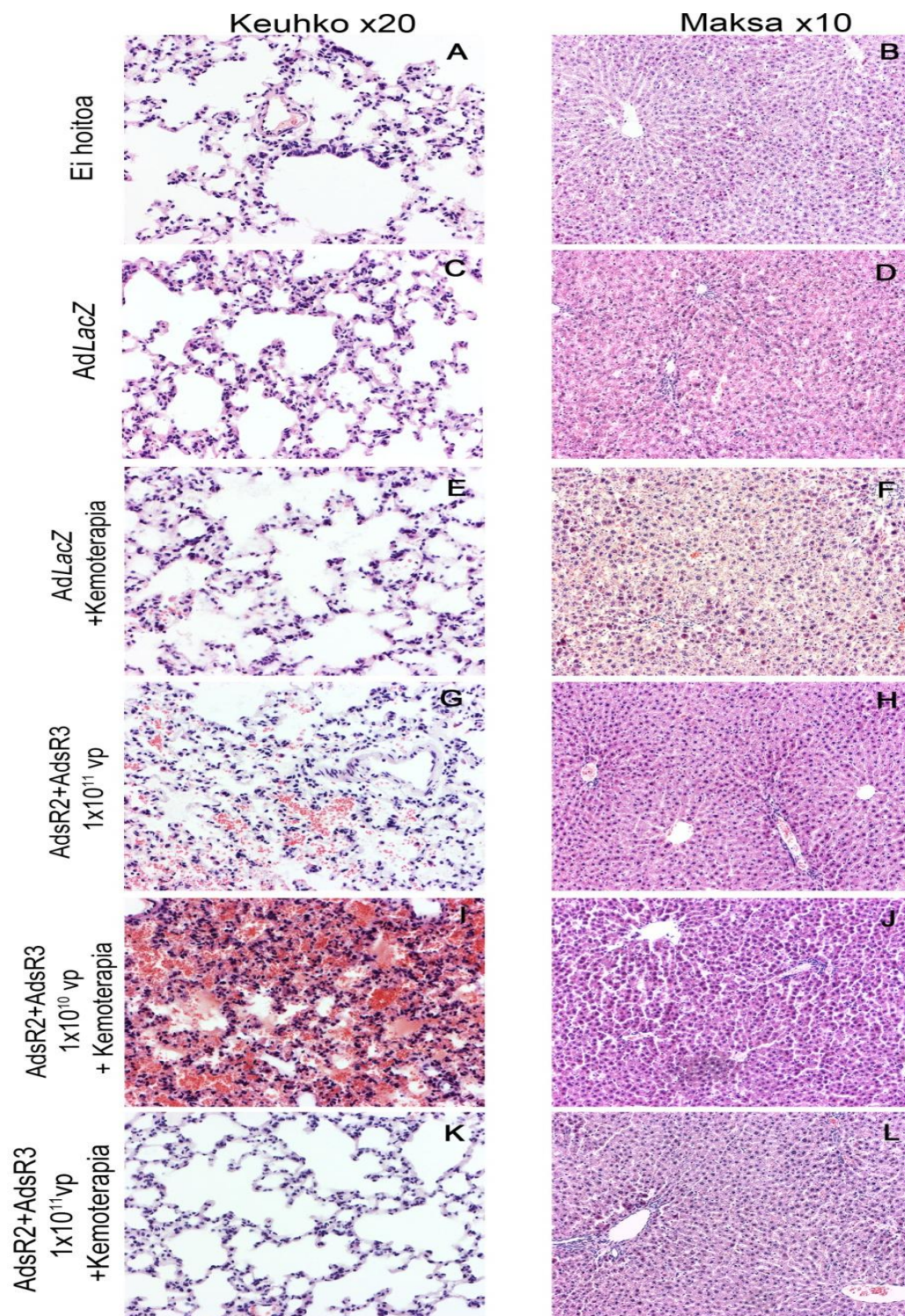
Kudosmuutokset näyttivät kohdistuvan pääasiassa keuhko- ja maksakudoksiin. Muiden kudosten histologinen rakenne oli pääosin normaali. Kahta eläintä lukuun ottamatta kudoksen regeneraatiota tai verenvuotoa havaittiin vain adenoviruksen (geenihoito tai *AdLacZ*) ja sytostaatit saaneilla eläimillä aikapisteissä 14 ja 28 päivää (Taulukko 6).

Tässä työssä keskityttiin maksa- ja keuhkokudosmuutosten analysoimiseen, sillä adenoviruksen tiedetään kulkeutuvan elimistössä pääasiassa maksaan (Alemany ja Curiel 2001; Hakkarainen ym. 2005). Havaitut kudosmuutokset olivat kohtalaisia tai lieviä ja niitä havaittiin pääasiassa koko kudoksenäytteessä aikapisteissä 14 ja 28 päivää. Aikapisteessä 3 päivää ei havaittu histologisia kudosmuutoksia. Muutokset oli havaittavissa kudoksen regeneraationa, jolloin nähtävissä voi olla solujen tumakoon ja niiden muodon muutoksia sekä nukleolien suurenemista. Havaitut maksan kudosmuutokset aiheutuivat todennäköisesti maksan hepatosyyttien läpi kulkevien lääkeaineiden aiheuttamasta rasituksesta. Kontrollina toimineiden, hoitoja saamattomien eläinten keuhko- ja maksanäytteet olivat normaalit (Kuva 10A ja B). Myöskään kontrolliryhmänä toimineen *AdLacZ*-hoitoryhmän kudoksenäytteistä ei löydetty poikkeavuuksia (Kuva 10C ja D, Taulukko 6). *AdLacZ* ja kemoterapia -hoitoryhmässä havaittiin maksan lievää tai kohtalaista regeneraatiota kuudella koe-eläimellä (60 % ryhmän eläimistä) (Kuva 10F, Taulukko 6). Kemoterapiaa saaneessa ryhmässä ei havaittu histologisia kudosmuutoksia. Korkean geenihoitoannoksen saaneessa ryhmässä yhden koe-eläimen keuhkokudoksenäytteessä (Kuva 10G) ja yhdessä munasarjakudoksenäytteessä havaittiin lievää verenvuotoa. Verenvuotoa pidetään epäspesifisenä muutoksena, joten varmuudella ei voi sanoa johtuiko muutos annetusta hoidosta vai liittyikö se eläinten lopetukseen. Matalan geenihoitoannoksen saaneiden eläinten keuhko- ja maksakudokset olivat normaalit.

Geenihoidon matalan annoksen ja kemoterapiaa saaneessa ryhmässä (ryhmä V) havaittiin keuhkoödeemaa sekä verenvuotoa yhdellä koe-eläimellä aikapisteessä 28 päivää (Kuva 10I). Ödeema aiheutuu usein sydämen vajaatoiminnasta. Sytostaattihoitojen ei tiedetä aiheuttavan sydänmuutoksia, joten havaittu muutos voi aiheutua geeniterapiasta (Elektroninen Pharmaca Fennica 2010). Koska ödeemaa havaittiin ainoastaan yhdellä koe-eläimellä, muutoksen perusteella ei voi sanoa onko geeniterapialla ja keuhkoödeeman kehittymisellä yhteys toisiinsa. Samassa hoitoryhmässä (ryhmä V) aikapisteessä 28 päivää havaittiin myös lievää maksakudoksen regeneraatiota yhdellä koe-eläimellä (Kuva 10J). Korkean geenihoidoannoksen sekä kemoterapiaa saaneessa hoitoryhmässä havaittiin lievää maksakudoksen regeneraatiota 53 %:lla koe-eläimistä aikapisteissä 14 ja 28 päivää (Kuva 10L), sen sijaan hoitoryhmän keuhkokudosleikkeet näyttivät normaaleilta (Kuva 10K). Geenihoidon aiheuttamat kudostenmuutokset ovat epäspesifisiä, joten varmuudella ei voi sanoa johtuuko muutokset tästä hoidosta vai ovatko ne lopetukseen liittyviä.

Taulukko 6. Histologiset kudostenmuutokset eri hoitoryhmissä. Rottien kudostenleikkeistä valmistettuja histologisia näytteitä tarkasteltiin kaikissa hoitoryhmissä sekä kontrolliryhmissä (ryhmät I-VII). N= havaittujen kudostenmuutosten lukumäärä.

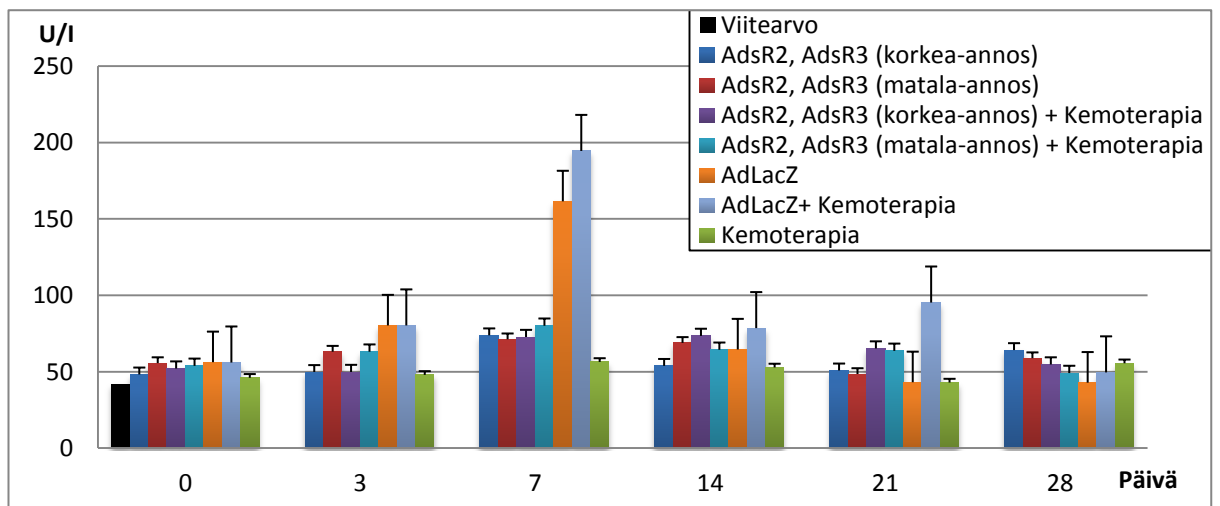
Hoitoryhmä	Kudos	Kudostenmuutos	N
I (AdLacZ)	-	-	-
II (AdLacZ+Kemoterapia)	maksa	lievä/kohtalainen regeneraatio	6
III Geeniterapia (matala-annos)	-	-	-
IV Geeniterapia (korkea-annos)	munasarja	verenvuoto	1
	keuhko		1
V Geeniterapia (matala-annos)+Kemoterapia	keuhko	ödeema,verenvuoto	1
	maksa	lievä regeneraatio	1
	maksa	verenvuoto	1
VI Geeniterapia (korkea-annos)+Kemoterapia	maksa	lievä regeneraatio	8
VII Kemoterapia	-	-	-



Kuva 10. Hematoksyliini-eosiini värjättyt histologiset keuhko- ja maksakudosnäytteet x20 ja x10 suurennoksilla. A-E, H ja K, ei kudostuutoksia; F, kohtalainen maksan regeneraatio (AdLacZ ja kemoterapia -hoitoryhmä); G, keuhkokudoksen verenvuotoa (geeniterapian korkea hoitoannos); I, keuhkoödeema ja verenvuotoa (geeniterapian matala hoitoannos ja kemoterapia -hoitoryhmä); J ja L, lievä maksan regeneraatio (geeniterapian matala hoitoannos sekä geeniterapian korkea hoitoannos ja kemoterapia -hoitoryhmät) (Kokki 2011).

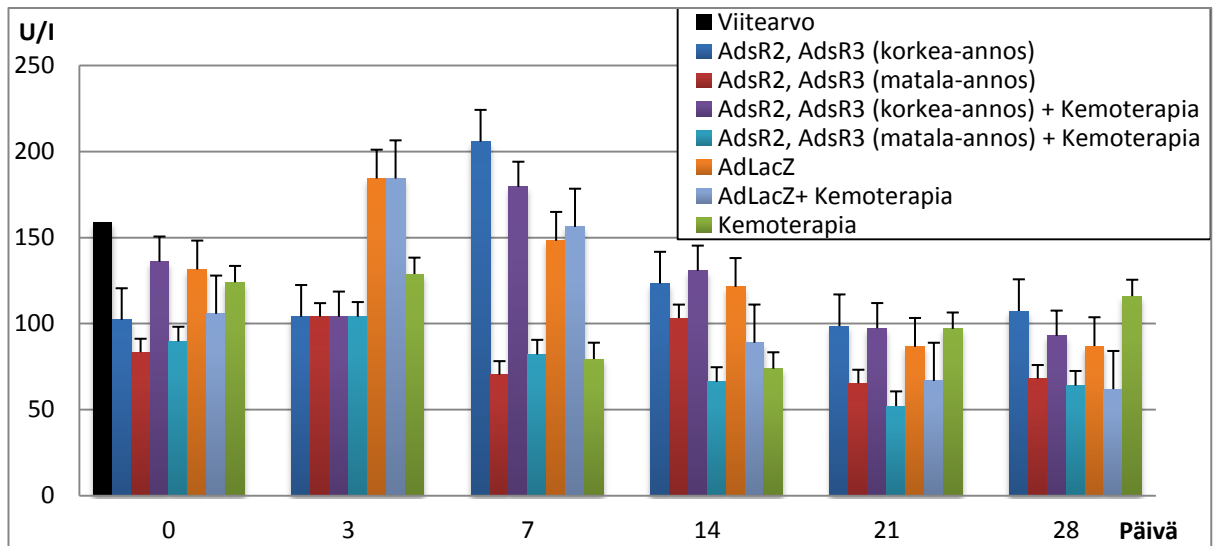
5.5. Kliininen kemia ja hematologia

ALAT-arvojen perusteella AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 geeniterapia oli hyvin siedetty ja seuranta-ajan lopussa arvot olivat samalla tasolla kuin lähtötilanteessa (Kuva 11). ALAT-arvot nousivat ohimenevästi viikon kuluttua geeninsiirrosta hoitoryhmissä AdLacZ sekä AdLacZ ja kemoterapia (ryhmät I ja II).



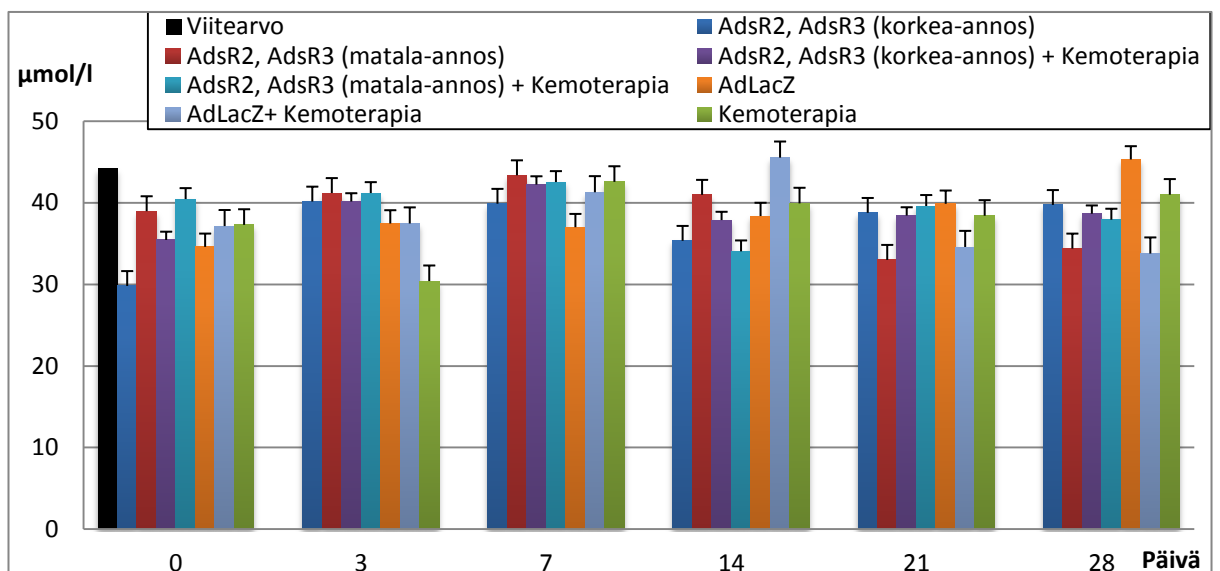
Kuva 11. Rottien maksan alaniiniaminotransferaasi (ALAT) pitoisuudet veressä geeniterapialla, kemoterapialla tai näiden yhdistelmähoidolla hoidetuissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (AdLacZ, kemoterapia). AdsR2=AdsVEGFR2 geeniterapia, AdsR3=AdsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.

Kontrollina toimineissa AdLacZ (ryhmä I) sekä AdLacZ ja kemoterapia-ryhmissä (ryhmä II) havaittiin AFOS-arvon väliaikainen nousu 3 päivää AdLacZ:n injisoinnin jälkeen. AFOS-arvo laski näissä hoitoryhmissä päivän 3 jälkeen ja palautui lähtötasolle seuranta-ajan loppuun mennessä (Kuva 12). Aikapisteessä 7 päivää geeniterapian korkean hoitoannoksen (ryhmä IV) sekä geeniterapian korkean annoksen ja kemoterapian (ryhmä VI) saaneissa hoitoryhmissä AFOS-arvot nousivat väliaikaisesti. Arvot kuitenkin palasivat lähtötasolle aikapisteeseen 28 päivää mennessä.



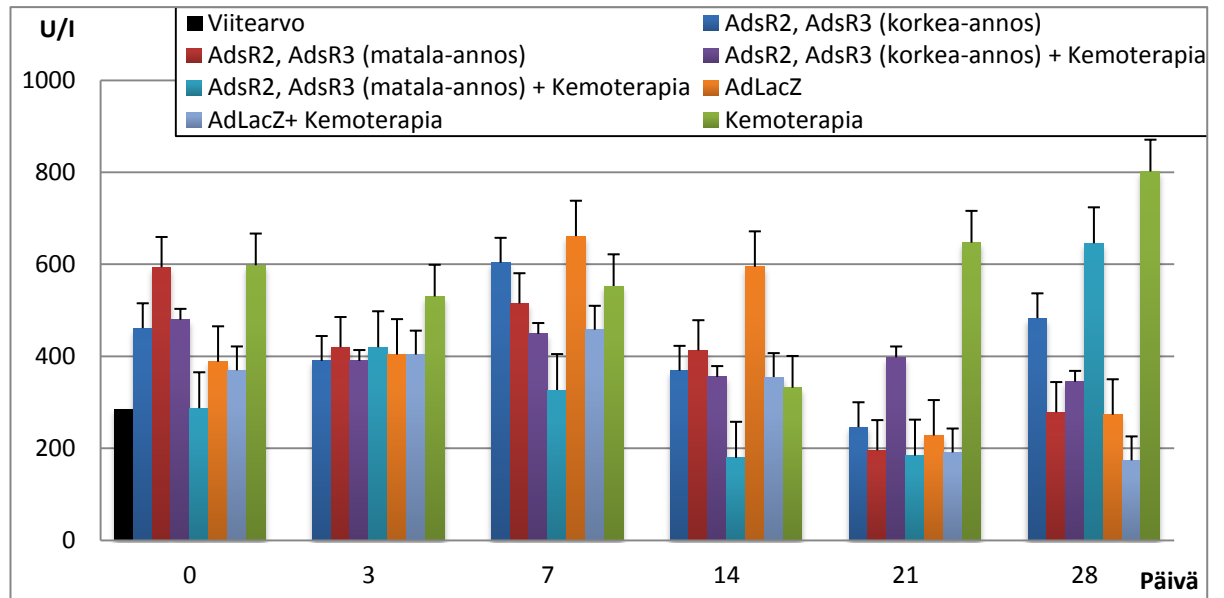
Kuva 12. Rottien alkaalinen fosfataasi (AFOS) pitoisuudet verenkierrassa geeniterapialla, kemoterapialla tai näiden yhdistelmähoidolla hoidetuissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (*AdLacZ*, kemoterapia). AdsR2=AdsVEGFR2 geeniterapia, AdsR3=AdsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.

Munuaistoiminnan markkerin eli kreatiniinin (KREA) arvot pysyivät normaalialueella koko seuranta-ajan kaikissa hoitoryhmissä (Kuva 13).



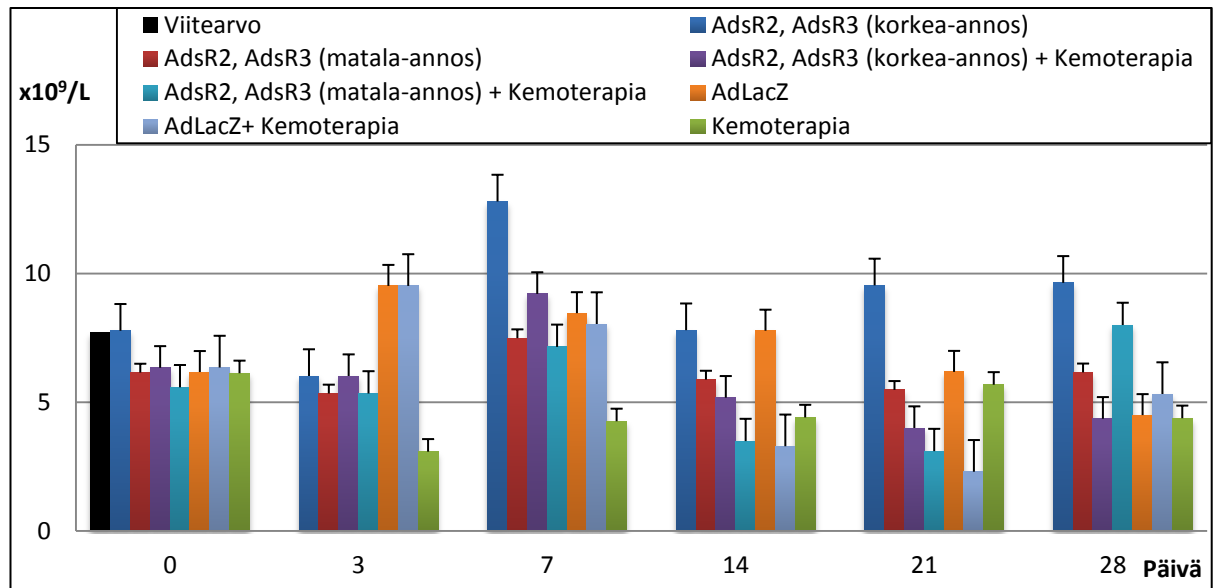
Kuva 13. Rottien kreatiniini (KREA) pitoisuudet verenkierrassa geeniterapialla, kemoterapialla tai näiden yhdistelmähoidolla hoidetuissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (*AdLacZ*, kemoterapia). AdsR2=AdsVEGFR2 geeniterapia, AdsR3=AdsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.

LDH-arvoissa oli havaittavissa vaihtelua kaikissa hoitoryhmissä jo kokeen alussa päivänä 0, kun eläimet eivät olleet saaneet hoitoja (Kuva 14). Sama vaihtelu arvossa jatkui koko seuranta-ajan. Seuranta-ajan lopussa korkeimmat LDH-arvot havaittiin kemoterapiaa saaneessa kontrolliryhmässä (ryhmä VII).



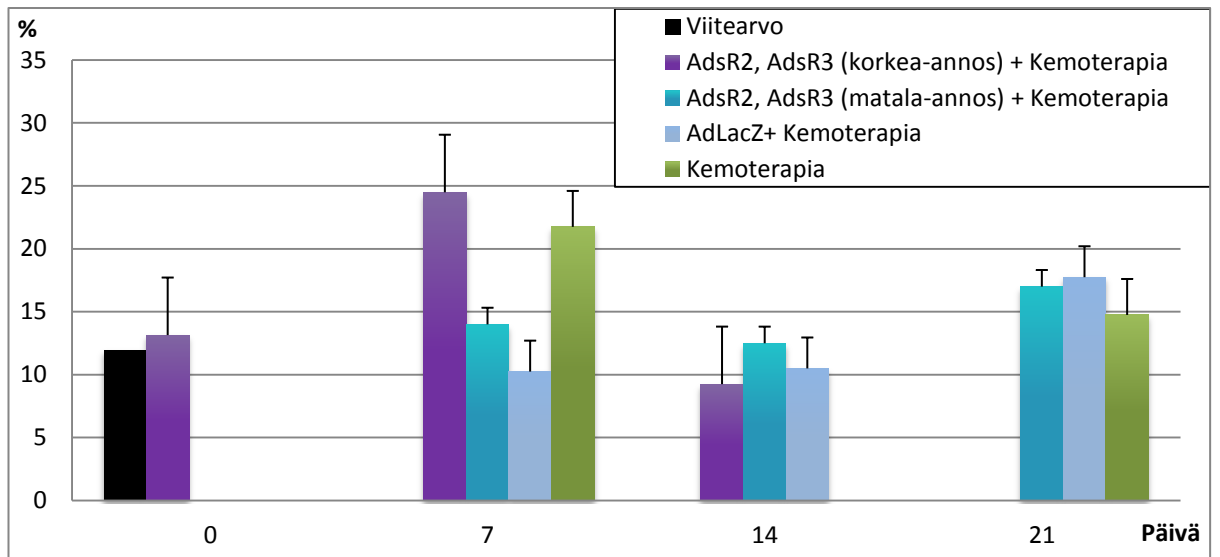
Kuva 14. Rottien laktaattidehydrogenaasi (LDH) pitoisuudet veressä geeniterapialla, kemoterapialla tai näiden yhdistelmähoidolla hoidetuissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (AdLacZ, kemoterapia). AdLR2=AdLRVEGFR2 geeniterapia, AdLR3=AdLRVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.

Adenovirusvälitteinen geeniterapia aiheutti lievää leukosytoosia eli lisäsi valkosolujen määrää aikapisteessä 3 ja 7 päivää geeninsiirron jälkeen (Kuva 15). Muutos oli selvimmin nähtävissä korkean geenihoidoannoksen saaneessa hoitoryhmässä (ryhmä IV) 7 päivää geenihoidon jälkeen, jonka jälkeen valkosolujen määrä kääntyi laskuun. Kemoterapia vähensi valkosolujen määrää eli aiheutti odotetusti leukopeniaa.



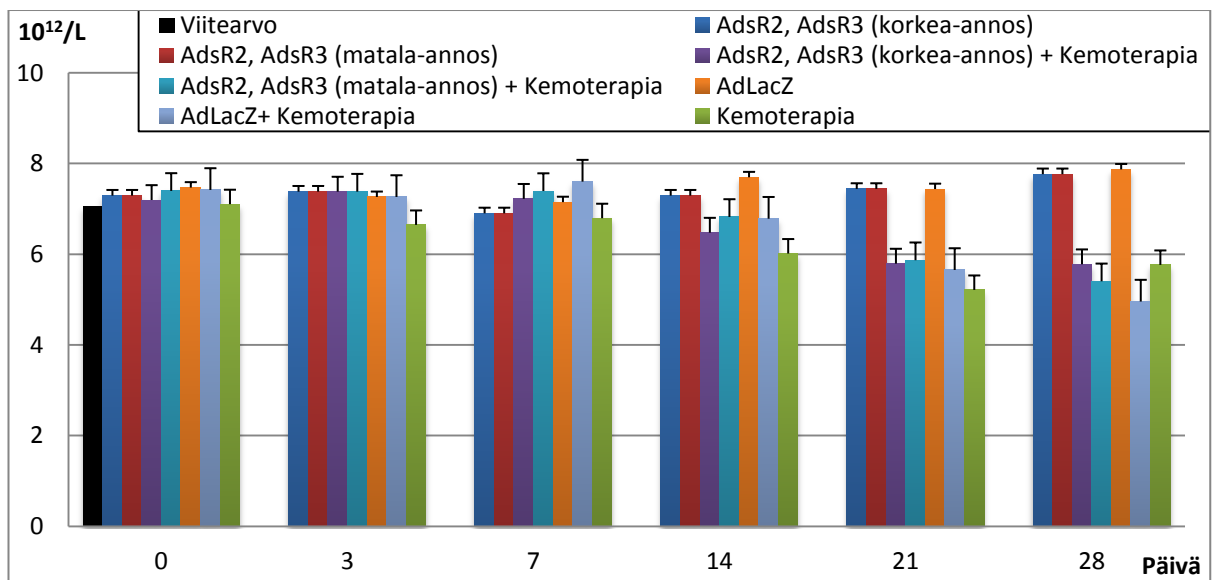
Kuva 15. Valkosolujen määrä verenkierrossa geeniterapian, kemoterapian tai näiden yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (AdLacZ, kemoterapia). AdSR2=AdSR2 geenihoito, AdSR3=AdSR3 geenihoito. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.

Neutrofiilien % -osuus laskettiin käsilaskennalla EDTA-sivelynäytteistä (Kuva 16). Neutrofiilien osuus terveessä hoitamattomassa eläimessä määritettiin vain geeniterapian (korkea-annos) ja kemoterapian saaneissa hoitoryhmissä. Kemoterapia-hoitoryhmässä neutrofiilien osuutta ei määritetty aikapisteessä 14 päivää. Neutrofiilien osuus laski aikapisteeseen 21 päivää mennessä verrattuna solujen osuuteen aikapisteessä 7 päivää, tätä muutosta pidetään normaalina kemoterapian sivuvaikutuksena. Geeniterapian korkean hoitoannoksen ja kemoterapian saaneissa hoitoryhmissä (ryhmä VI) havaittiin neutrofiilien osuuden kasvu viikon kuluttua geenihoidosta (Kuva 16), tämä muutos havaittiin myös valkosolujen kokonaismäärityksessä (Kuva 15). Kaksi viikkoa geenihoidon jälkeen sekä viikko kemoterapiahoidon jälkeen neutrofiilien osuus oli lähtötasolla kaikissa analysoiduissa hoitoryhmissä.



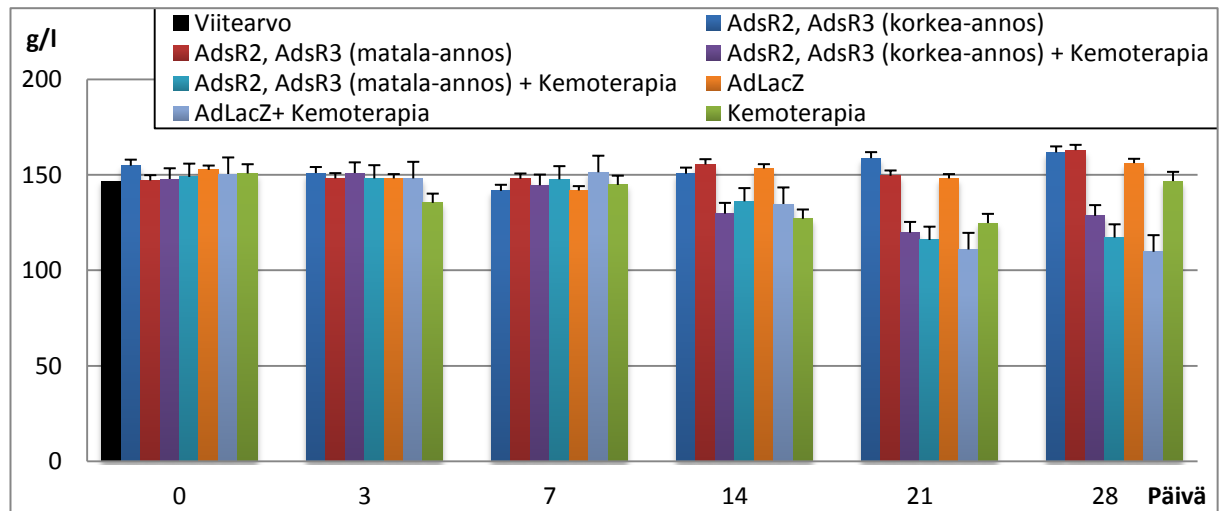
Kuva 16. Neutrofiilien % -osuus kaikista valkosoluista geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon, AdLacZ:aa ja kemoterapiaa sekä pelkän kemoterapian saaneissa hoitoryhmissä. Osuus määritettiin käsilaskennalla aikapisteissä 0, 7, 14 ja 21 päivää. AdsR2=AdsVEGFR2 geeniterapia, AdsR3=AdsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.

Kaikissa kemoterapiaa saaneissa hoitoryhmissä (ryhmät V, VI, VII) punasolujen määrän havaittiin vähentyvän kahden viikon kuluttua ensimmäisestä kemoterapiahoitokerrasta (Kuva 17). Pelkän geeniterapian saaneissa hoitoryhmissä (ryhmät III ja IV) punasolujen määrä pysyi lähtötasolla koko seuranta-ajan riippumatta geenihoitoannoksen suuruudesta.

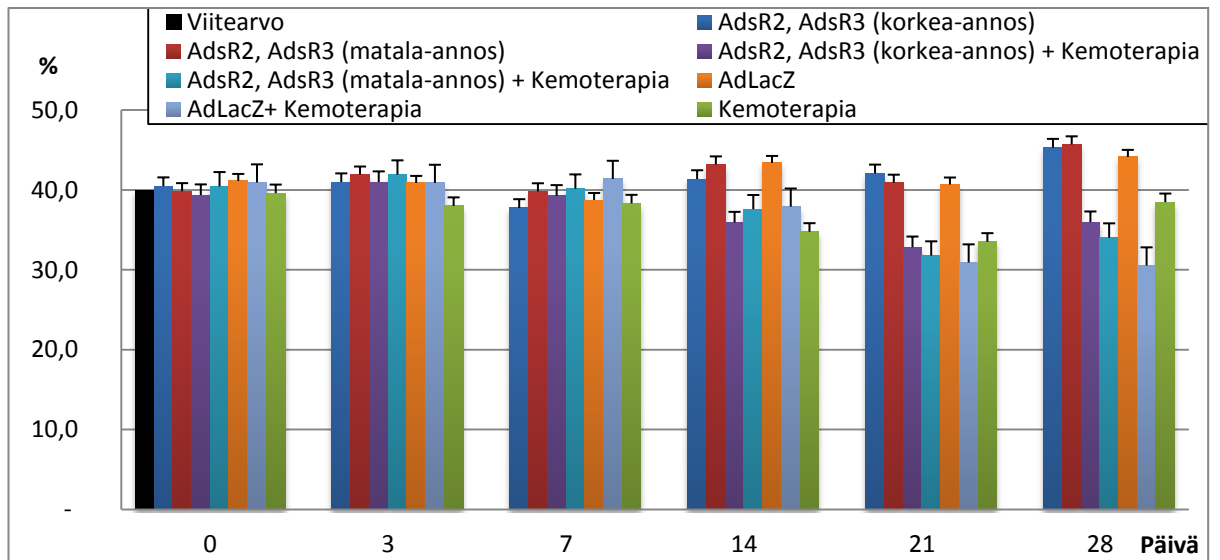


Kuva 17. Punasolujen määrä rottien verenkierrossa geeniterapian, kemoterapian tai näiden yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (AdLacZ, kemoterapia). AdsR2=AdsVEGFR2 geeniterapia, AdsR3=AdsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.

Geeniterapian korkean tai matalan hoitoannoksen saaneissa ryhmissä (ryhmät III ja IV) hemoglobiini ja hematokriitti olivat normaalialueella koko seuranta-ajan (Kuva 18 ja 19). *AdLacZ*:aa saaneissa hoitoryhmässä (ryhmä I) arvoissa havaitut vaihtelut olivat samanlaiset kuin geeniterapiaa saaneissa hoitoryhmissä, näin ollen muutokset eivät todennäköisesti aiheutuneet käytetyistä hoitogeeneistä. Kemoterapiaa saaneissa ryhmissä (ryhmät V, VI, VII) hemoglobiinin ja hematokriitin arvot laskivat aikapisteestä 14 päivää lähtien. Pelkän kemoterapian saaneissa hoitoryhmässä hemoglobiinin ja hematokriitin arvot palautuivat normaalitasolle päivään 28 mennessä, kun taas geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä arvot jäivät hieman matalemmiksi lähtötasoon verrattuna.

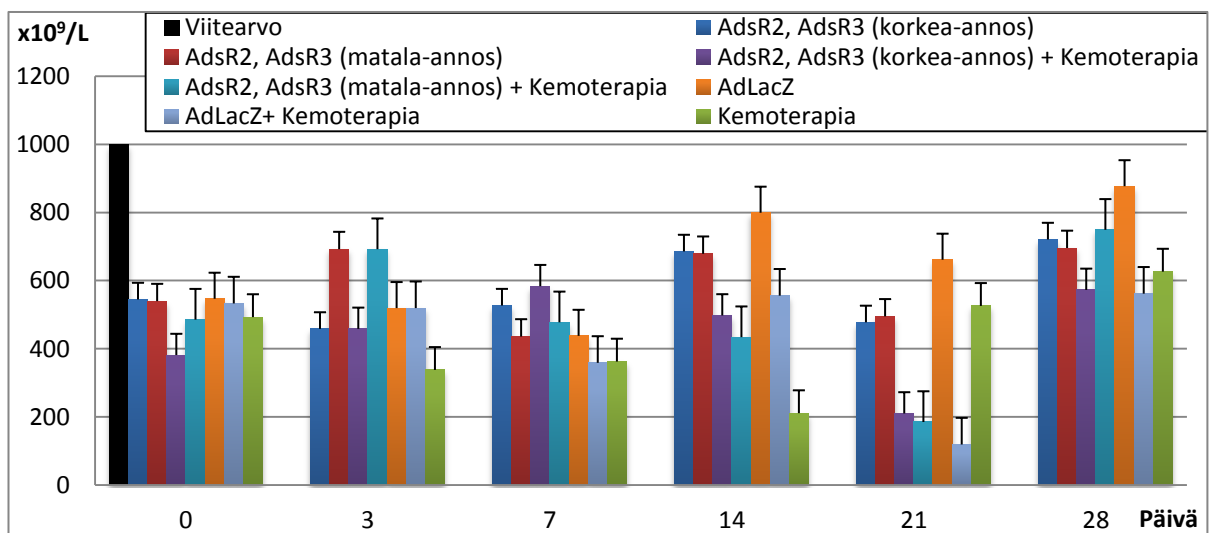


Kuva 18. Rottien hemoglobiini pitoisuus verenkierrossa geeniterapian, kemoterapian tai näiden yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (*AdLacZ*, kemoterapia). AdsR2=AdsVEGFR2 geeniterapia, AdsR3=AdsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin \pm SEM.



Kuva 19. Rottien veren hematokriitti -arvot eri aikapisteissä geeniterapian, kemoterapian tai näiden yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (AdLacZ, kemoterapia). AdRs2=AdRsVEGFR2 geeniterapia, AdRs3=AdRsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin ± SEM.

Verihiutaleiden määrässä havaittiin normaalia vaihtelua kaikissa hoitoryhmissä koko seuranta-ajan (Kuva 20). Kemoterapiaa saaneissa hoitoryhmissä (ryhmät V, VI, VII) havaittiin väliaikaista verihiutaleiden määrän laskua kahden viikon kuluttua hoidosta.



Kuva 20. Verihiutaleiden (PLT) määrä rottien verenkierrössä eri aikapisteissä geeniterapian, kemoterapian tai näiden yhdistelmähoidon saaneissa ryhmissä sekä kontrolliryhmissä (AdLacZ, kemoterapia). AdRs2=AdRsVEGFR2 geeniterapia, AdRs3=AdRsVEGFR3 geeniterapia. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina aikapisteittäin ± SEM.

Näiden tulosten lisäksi verinäytteistä määritettiin seuraavat punasoluindeksit: MCH, MCHC ja MCV. Näiden analyysien tuloksissa ei havaittu muutoksia missään hoitoryhmässä eikä tuloksia pidetä merkittävänä tämän työn tulosten analysoinnin kannalta, näin ollen kyseiset kuvaajat on jätetty työn ulkopuolelle.

6. POHDINTA

Tutkimus oli ensimmäinen laaja terveille koe-eläimille suoritettu turvallisuus- ja biodistribuuotitutkimus käytettäessä liukoisia VEGF-reseptoreita sekä hoitoon yhdistettyä kemoterapiaa. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää adenovirusvälitteisen antiangio- ja antilymfangiogeenisen munasarjasyövän geeniterapian ja tähän yhdistetyn kemoterapian mahdolliset haittavaikutukset terveessä koe-eläimessä. Tarkoitus oli myös selvittää, kuinka adenovirusvälitteinen sVEGFR2:n ja sVEGFR3:n käyttöön perustuva geeniterapia jakautuu elimistöön ja eri kudoksiin eli selvittää geenihoidon biodistributio. Geenilääkkeiden kehityksessä on välttämätöntä selvittää hoidon leviäminen ja kohdistuminen eri elimiin ja kudoksiin jo varhaisten prekliinisten tutkimusten aikana (Gonin ja Gaillard 2004).

Adenovirusvektorin käyttöön geeniterapiassa liittyvät tutkimukset ovat osoittaneet, että viruksen käyttöön voi liittyä turvallisuusongelmia, kuten immuunipuolustuksen aktivoituminen ja viruksen leviäminen ei-kohdesoluihin (Bessis ym. 2004). Käytettäessä virusvektoria geeninkuljettimena on sen biodistributioon ja mahdollisiin toksisiin vaikutuksiin kiinnitettävä huomiota ennen siirtymistä kliinisiin tutkimuksiin. Tutkimuksessaan Hiltunen ym. (2000) osoittivat sekä verisuonensisäisesti että periaadventitiaalitalaan (eli verisuonen uloimman kerroksen, adventitian ympäröivän alueen) annostellun adenovirusvälitteisen geenihoidon johtavan laajaan viruksen leviämiseen elimistössä. He totesivat, että adenovirusvälitteisesti tuotettua siirtogeeniä ilmennetään eniten maksakudoksessa. Lisäksi tutkimuksessa todettiin, että verisuonen sisäinen annostelutapa voi aiheuttaa ohimenevää maksasolujen toiminnan häiriötä. Tutkimuksessa he totesivat myös molempiin annostelutapoihin liittyvän mahdollisuus immuunivasteen kehittymiseen

adenovirusta vastaan. Munasarjasyövän geeniterapian biodistributio- ja turvallisuustutkimuksesta saadut tulokset osoittivat myös virusvälitteisen geeninsiirron kohdistuvan useisiin eri kudoksiin. Immuunipuolustuksen aktivoitumisesta kertoo myös tässä tutkimuksessa saadut tulokset neutrofiilien määrän kasvusta, kun koe-eläimille annettiin geenihoidona korkea hoitoannos.

Adenovirusvektorin käytön turvallisuutta on tutkittu pahanlaatuisen aivokasvaimen geeniterapiahoidon kehittämisessä käyttäen Cerepro[®] -virusvektoria. Tutkimuksessa tämän virusvektorin käytön todettiin olevan turvallinen käytettäessä rottaa koe-eläimenä. Siirtogeenin ilmentymisen todettiin olevan tehokasta ja sen jakautuminen kohdistui pääasiassa syöpäkasvaimen alueelle aivoihin (Langford ym. 2009). Tämä prekliininen gliooman geeniterapiatutkimus osoitti adenovirusvälitteisesti tuotetun hoitoproteiinin tuoton olevan tehokkainta päivänä 3 geeninsiirron jälkeen, mikä todettiin myös kyseisessäolevassa munasarjasyövän geeniterapiatutkimuksessa ELISA-menetelmällä sVEGFR2-hoitoproteiinin ilmentymisen osalta. Langford ym. (2009) totesivat samassa tutkimuksessaan hoitoproteiinin määrän verenkierrossa laskevan alle määrittystason päivään 90 mennessä, jolloin adenoviruksen toiminta elimistössä heikkenee. Tutkimuksessa hoitogeenin todettiin ilmentyvän aivokudoksen lisäksi eniten perna-, maksa- ja sydänekudoksissa käytettäessä i.v. annostelua, tämä tulos on linjassa myös tässä tutkimuksessa saatujen qRT-PCR:n tulosten kanssa.

Suorittamassamme tutkimuksessa saadut tulokset ovat hyvin samansuuntaisia verrattuna aiempien prekliinisten adenovirusvälitteisten geeniterapiatutkimusten tuloksiin. Tulokset vahvistavat käsitystä siitä, että adenovirusvälitteinen geeniterapia on turvallinen käytettäessä verisuonensisäistä annostelutapaa.

6.1. Eläinmallin soveltuvuus

Tutkimustulokset osoittivat eläinmallin soveltuvan geeniterapian sekä geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoidon tutkimiseen erinomaisesti. Käytettäessä koe-eläimenä

normaalin immuniteetin omaavaa tervettä rottaa, aiemmissa projektiin liittyvissä töissä käytetyn immuunipuutteisen hiiren sijaan, saatiin tietoa immuunipuolustuksen vaikutuksesta geeni- ja kemoterapiahoitoihin. Koe-eläimet sietivät hyvin niille annettuja hoitoja, sillä injisointeihin tai nukutukseen liittyvien komplikaatioiden vuoksi menetettiin vain kaksi eläintä. Toksikologiatutkimuksissa rottaa on käytetty yleisesti koe-eläimenä, joten se valittiin myös tähän tutkimukseen. Eläinten hyvinvointia seurattiin tutkimuksen aikana neljä viikkoa, jonka aikana adenovirusvälitteinen geenihoito toimii tehokkaimmin. Hoitojen pitkäaikaisten vaikutusten selvittämiseksi olisi tarvittu pidempi seuranta-aika. Ihmiseen kohdistuvissa geeniterapiatutkimuksissa Hedman ym. (2009) totesivat adenovirusvälitteisen geeniterapian olevan turvallinen, kun hoidoissa käytettiin samaa adenovirusvektoria kuin tässä tutkimuksessa. Tutkimuksessa geenihoidon pitkäaikaisvaikutuksia tutkittiin 7-10 vuoden ajan kliinisen sepelvaltimotaudin hoidossa.

Geeniterapian matalan hoitoannoksen ja kemoterapian yhdistelmähoidon saaneessa ryhmässä painojen lasku oli tilastollisesti merkitsevää lähtötilanteeseen verrattuna aikapisteissä 21 ja 28 päivää ($p < 0,05$), jolloin eläinten painot laskivat tilapäisesti enemmän kuin muissa hoitoryhmissä (Taulukko 3). Geeniterapiahoitoryhmissä eläinten painot noudattivat hyvin läheisesti kontrolliryhmä *AdLacZ*-hoitoryhmän eläinten normaalia painonnousua (Kuva 8). Tulokset koe-eläinten painojen seurannasta osoittivat, ettei geeniterapia tai geeni- ja kemoterapian yhdistelmähoito aiheuta merkittävää painonmuutosta.

6.2. Hoitojen turvallisuus ja biodistribuuatio

6.2.1. Hoitogeenien ilmentyminen kudospäätteissä

Biodistribuuutiota ja mahdollisia hoitojen toksisia vaikutuksia tutkittaessa yleisimmin käytetty menetelmä on qRT-PCR, jolla pystytään selvittämään geeninsiirtovektorin kudospäiteinen ilmentyminen *in vivo*-olosuhteissa. Tärkeää tässä analyysissä on määrittää menetelmän herkkyys eli geenikopiomäärä, joka kudospäyteistä voidaan havaita. FDA:n suosituksen

mukaan biodistribuuotitutkimuksissa qRT-PCR:n herkkyuden tulisi olla alle 100 geenikopiota/ μ g genomista DNA:ta, mutta yleisimmin tutkimuksissa herkkyudeksi saadaan 10-50 geenikopiota/ μ g genomista DNA:ta (Gonin ja Gaillard 2004). Biodistribuuotitutkimuksissa on oleellista määrittää se geeninsiirtoannos, jolla ilmenee kudostoksisuutta ja jolla pystytään saavuttamaan kudoksen maksimaalinen hoitoproteiinin tuotto. Tällöin geenihoidon aiheuttamat mahdollisimman vakavat haittavaikutukset pystytään havainnollistamaan ja pystytään kehittämään kliiniseen käyttöön soveltuva geenihoitoannos, lisäksi hoidon mahdollisia sivuvaikutuksia voidaan verrata maksimaalisen hoitoannoksen aiheuttamiin vaikutuksiin (Gonin ja Gaillard 2004).

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella sVEGFR2- ja sVEGFR3-hoitogenejä ilmennetään tehokkaimmin maksakudoksessa kolme päivää geeninsiirron jälkeen, minkä jälkeen hoitogeeniä ilmennettiin yleisesti harvemmin tutkituissa kudoksissa. Tuloksen perusteella voidaan päätellä, että geeninsiirrot olivat onnistuneet ja adenovirusvälitteisellä geeninsiirrolla tuotetun hoitogeenin ilmentymisen olevan tehokkainta maksakudoksessa (Wei ym. 2008). Tulokset osoittivat adenovirusvälitteisellä geenihoidolla tuotetun hoitogeenin ilmentyvän myös pernakudoksessa. Geenihoidon annosmäärällä ei todettu olevan vaikutusta hoitogeenin ilmentymiseen kudoksissa päivänä 3, mutta korkea geenihoitoannos lisäsi hieman positiivisten näytteiden määrää matalaan hoitoannokseen verrattuna myöhemmissä aikapisteissä 14 ja 28 päivää. Kemoterapia pidensi hoitogeenien ilmentymistä maksakudoksissa, kun paklitakseli ja karboplatiini sytostaatteja annettiin koe-eläimille 1 ja 2 viikkoa geeninsiirron jälkeen. Tulos vahvistaa ELISA-analysistä saatuja tuloksia sVEGFR2-hoitoproteiinin pitoisuudesta verenkierrossa, minkä mukaan hoitoproteiinia esiintyy verenkierrossa vielä aikapisteessä 14 päivää (Kuva 9).

Sytostaattien tiedetään heikentävän elimistön puolustusmekanismeja ja aiheuttavan immuunipuutosta, sillä kemoterapia vähentää valkosolujen ja neutrofiilien määrää, tämä voitiin havaita myös saaduista hematologian analyyseistä (Kuva 15 ja 16). Aiemmissä tutkimuksissa on todettu, että immuunipuutos pidentää verenkierrossa havaittavan hoitoproteiinin ilmentymisaikaa koe-eläimissä verrattuna normaalin immunitetin omaavaan eläimeen (Wei ym. 2008). Tässä tutkimuksessa saadut tulokset sytostaattien

vaikutuksesta sVEGFR2- ja sVEGFR3-hoitogeenien pidentyneeseen ilmentymisaikaan verenkierrassa vahvistavat aiempia tutkimustuloksia. Tutkimuksissa on todettu, että sytostaattien käytöstä seuraa immuunipuolustuksen heikkeneminen, mikä saattaisi puolestaan vähentää virusvasta-aineiden muodostumista. Virusvasta-aineiden tuoton väheneminen parantaisi todennäköisesti myös geenihoidon tehokkuutta, kun adenoviruksen vaikutusaikaa elimistössä saataisiin pidennettyä, tämä saattaisi mahdollistaa myös adenovirusvälitteisen geenihoidon toistamisen (Thaci ym. 2011). Näiden tulosten perusteella kemoterapian voidaan todeta olevan geeniterapian ohella merkittävä tekijä geenihoidon vaikutuksen tehostamiseksi ja hoitotuloksen parantamiseksi. Kemoterapian vaikutus virusvasta-aineiden tuoton vähentäjänä voi olla myös merkittävää, tämä havainto on hyvä huomioida arvioitaessa geeniterapian tehokkuutta.

Hoitogeenien sVEGFR2 ja sVEGFR3 kudskohtaisessa ilmentymisessä havaittiin vaihtelua. sVEGFR3:a ei ilmennetty munuais- ja kohtunäytteissä, kun taas sVEGFR2:a ei ilmennetty keuhko-, munuais-, sydän-, luurankolihas-, munasarja- ja kohtunäytteissä. Useat geeniterapiatutkimukset ovat osoittaneet verisuonensisäisesti annostellun adenovirusvälitteisen geeninsiirron kohdentuvan tehokkaimmin runsasverisuonisiin kudoksiin kuten maksaan, keuhkoihin, munuaisiin, sydämeen ja munasarjoihin (Alemany ja Curiel 2001; Wood ym. 1999; Garcia-Banuelos ym. 2002). Tutkimuksessamme saatu tulos vahvistaa aiempia tutkimustuloksia siirtogeenien kudskohtaisesta ilmentymisestä. Tutkimuksessa sVEGFR3-hoitogeeniä ilmennettiin yleisesti useamman eläimen kudonäytteissä kuin sVEGFR2-hoitogeeniä. Siirtogeenien ilmentymisessä havaitut vaihtelut saattoivat johtua vaihtelusta todellisten infektiivisten viruspartikkeleiden määrässä eri adenovirusvektorin tuotantoerien välillä.

qRT-PCR:n tulokset osoittivat sekä sVEGFR2- että sVEGFR3-hoitogeenien ilmentyvän useimpien koe-eläinten maksakudoksessa. ELISA:lla saadut tulokset (Kuva 9) vahvistavat qRT-PCR:lla saatuja tuloksia hoitoproteiinien tuoton nopeasta käynnistymisestä, sillä hoitoproteiineja havaittiin plasmanäytteistä jo kolmen päivän kuluttua geeniterapiahoiton jälkeen (Langford ym. 2009). qRT-PCR:n tulosten perusteella siirtogeeniä ilmennettiin jonkin verran vielä kuukauden kuluttua geeninsiirroista. Tätä tulosta vahvistavat myös aiemmat

tutkimustulokset, joissa on osoitettu että adenovirusvektoria käytettäessä hoitogeenin ilmentyminen alkaa vähentyä alle määritysrajan 30 päivän kuluttua geeninsiirrosta ja adenoviruksen tehokkuus hoitoproteiinin tuottamiseksi vähenee (Langford ym. 2009).

Tutkimuksen tuloksia tullaan hyödyntämään adenovirusvektorin toimintaan perustuvien geeniterapiamenetelmien turvallisuuden ja biodistribuuution arviointiin, sekä virusvektorin käyttömahdollisuuksien arviointiin siirryttäessä kliinisiin tutkimuksiin.

6.2.2. Hoitoproteiinien pitoisuus verenkierrassa

Munasarjasyöpäkasvain leviää usein laajalle vatsaonteloon ja elimistöön. Syövän luonteesta johtuen sen hoitamisessa verisuonensisäistä hoidon annostelutapaa pidetään oletettavasti tehokkaimpana ja menetelmän avulla pystytään tehokkaimmin vaikuttamaan kehittyvän kasvaimen veri- ja imusuonitukseen. Liukoisen hoitoproteiinin sVEGFR2-pitoisuus eläinten verenkierrassa määritettiin aikapisteittäin hoidon tehokkuuden arvioimiseksi (Kuva 9). Takei ym. (2007) ovat osoittaneet, että sVEGFR1:n käyttöön perustuvalla AAV-välitteisellä geeninsiirrolla saavutetaan riittävä tehokkuus munasarjasyöpäkasvaimen koon pienentämiseksi silloin, kun liukoisen reseptorin pitoisuus verenkierrassa on yli 1000 pg/ml:ssa. sVEGFR2-hoitoproteiinin osalta tämä aiemmissä tutkimuksissa riittävän tehokkaaksi osoitettu hoitoproteiinin pitoisuus saavutettiin aikapisteessä 7 päivää eli viikko geeninsiirron jälkeen korkean geenihoidoannoksen saaneessa hoitoryhmässä (Kuva 9). Liukoisen VEGFR2-proteiinin pitoisuus verenkierrassa lisääntyi myös matalan geenihoidoannoksen saaneessa hoitoryhmässä tässä aikapisteessä mutta jäi vähäiseksi verrattuna korkean hoitoannoksen saaneen ryhmän proteiinipitoisuuteen. Tulokset osoittavat adenovirusvälitteisestä geeninsiirrosta seuraavan hoitoproteiinin tuoton olevan runsainta aikapisteessä 7-14 päivää, minkä jälkeen proteiinipitoisuus verenkierrassa laskee ja loppuu neljän viikon kuluessa viruksen injisoinnista verenkiertoon (Yang ym. 1994). Adenoviruksen käyttöä geeniterapiassa voi hankaloittaa hoidon kertaluonteisuus. Viruksia vastaan elimistössä mahdollisesti kehittyvät virusvasta-aineet saattavat estää toisen hoitokerran antamisen, kun vasta-aineet estävät virusvektoreiden tehokkaan toiminnan

(Bessis ym. 2004). Tolcher ym. (2006) osoittivat kliinisessä vaiheen I tutkimuksessaan adenovirusvälitteisen Ad5CMV-p53 geeniterapian olevan turvallinen annettaessa hoitoa potilaille verisuonensisäisesti kolmen päivän välein. Vatsaontelonsisäisesti annostellun Adp53-geenihoidon on myös osoitettu olevan turvallinen kliinisessä tutkimuksessa, kun munasarjasyöpäpotilaille annettiin adenovirusvälitteistä geenihoidoa viiden päivän ajan kolmen viikon välein (Wolf ym. 2004). Edellä mainituissa tutkimuksissa saadut tulokset ovat lupaavia ja viittaavat siihen, että adenovirusvälitteistä geeniterapiaa pystyttäisiin antamaan hoidettaville potilaille useampana hoitokertana.

Tutkimuksessa suoritettun qRT-PCR:n ja sen tulosten perusteella sVEGFR3-siirtogeeniä ilmenettiin useamman koe-eläimen maksakudoksessa eri aikapisteissä verrattuna sVEGFR2-siirtogeenin ilmentymiseen. sVEGFR3-hoitoproteiinia olisi todennäköisesti löytynyt myös koe-eläinten verenkierrosta, mikäli sen pitoisuuden määrittäminen plasmanäytteistä olisi onnistunut ELISA-menetelmällä.

Tässä tutkimuksessa saadut tulokset osoittivat kemoterapian pidentävän sVEGFR2-hoitogeenin ilmentymistä viikolla (Kuva 9). Pidentynyt sVEGFR2:n ilmentyminen verenkierrossa on todennäköisesti seuraus kemoterapiahoidon aiheuttamasta heikentyneestä vastustus- ja puolustautumiskyvystä. Arvioitaessa geenihoidon tehokkuutta ja vaikutusaikaa, on merkittävää että hoidon kestoa saadaan pidennettyä kemoterapian avulla.

6.2.3. Histologia

Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää geenihoidon maksimaalinen määrä, jolla saavutetaan kudosuutoksia. Kudosuutoksia saatiin esille histologisten tulosten perusteella korkealla geenihoidon annoksella ja hoitojen vaikutukset näyttivät kohdistuvan pääasiassa maksakudokseen. Kahden koe-eläimen keuhkokudosten leikkeissä havaittiin lieviä kudosuutoksia, mutta havaintojen pienestä määrästä johtuen niitä ei voida pitää merkittävänä yleisinä. Histologisia kudosuutoksia oli havaittavissa aikapisteissä 14 ja 28 päivää eli kahdesta neljään viikkoon geeninsiirron jälkeen, mutta aikapisteessä 3 päivää hoidot eivät olleet aiheuttaneet näkyviä muutoksia.

Tulokset osoittivat, että kemoterapia yhdistettynä geeniterapian korkeaan hoitoannokseen 1×10^{11} vp:a yksittäisen VEGF-reseptorin osalta voi aiheuttaa histologisia muutoksia, kudosuutosten esiintyessä kahdeksalla koe-eläimellä tässä hoitoryhmässä. Kudosuutoksia havaittiin huomattavasti vähemmän kun geenihoidon annosta vähennettiin 1×10^{10} vp:iin, joten geenihoidon voidaan todeta olleen turvallinen tällä hoitoannoksella. Korkean geenihoidon annoksen saaneissa hoitoryhmässä havaittu verenvuoto kahden koe-eläimen keuhkokudosten näytteissä (Kuva 10G) saattoi johtua teknisistä syistä ja mahdollisesta verenvuodosta kudosten leikkeitä otettaessa. Tässä hoitoryhmässä yhdellä koe-eläimellä havaittiin lieviä epäspesifisiä maksan tumakoon muutoksia (Kuva 10L).

Kudosuutoksia oli eniten havaittavissa *AdLacZ*:n ja kemoterapian yhdistelmähoidon saaneissa hoitoryhmässä sekä geenihoidon korkean annoksen ja kemoterapian yhdistelmähoidon saaneissa hoitoryhmissä. Kudosuutosten rajoittuessa viiteen näytteeseen, voidaan todeta hoitojen aiheuttamien muutosten olleen vähäisiä. Kontrollina toimineissa hoitoryhmissä *AdLacZ* tai kemoterapia ei havaittu kudosuutoksia, mikä osoittaa sytostaattien sekä adenovirusten käytön olevan turvallista. Geeniterapian ja kemoterapian yhdistelmähoidon aiheuttamat epäspesifiset kudosuutokset voivat johtua sytostaattien sekä geeniterapian aiheuttamasta rasituksesta maksakudosta kohtaan, kun lääkeaineet kulkeutuvat kudoksen läpi, näin ollen näitä muutoksia ei voi pitää merkittävänä suurina arvioitaessa hoitojen kudostoksisuutta.

6.2.4. Kliininen kemia ja hematologia

Kliinisen kemian ja hematologian analyyseistä saadut tulokset osoittivat, etteivät geeniterapia, kemoterapia tai näiden yhdistelmähoito aiheuta koe-eläimille merkittäviä sivuvaikutuksia tai tulehdusreaktioita. Kliinisen kemian analyyseissä maksakudoksen toiminnasta kertovien ALAT ja AFOS arvojen osalta saadut tulokset osoittivat, etteivät geeniterapia tai tähän yhdistetty kemoterapian yhdistelmähoito aiheuta koe-eläimille pitkäaikaisia maksa-arvojen muutoksia (Kuva 11 ja 12). Maksa-arvot ovat normaalit niiden pysyessä viitearvon alapuolella. Väliaikainen nousu mahdollisista maksan vaurioista kertovissa tuloksissa aiheutuu todennäköisesti geeninsiirtovektorin kohdistamasta hetkellisestä rasituksesta maksakudokseen. Vektorin aiheuttama rasitus maksakudosta kohtaan voidaan todeta myös histologian analyyseistä, joissa *AdLacZ*:aa ja kemoterapiaa saaneessa hoitoryhmässä havaittiin lieviä maksan tumakoon muutoksia. Syöpätutkimuksissa kohonneet maksa-arvot voivat myös johtua syövän metastasoinnista kudokseen, joten geenihoidon vaikutusta on tärkeä tutkia terveillä koe-eläimillä. Toksisuus- ja biodistributiokoe osoitti, että terveiden koe-eläinten maksatoksisuutta voidaan vähentää pienentämällä käytettyä geenihoidoannosta. Käytettäessä matalaa geenihoidoannosta sVEGFR2-hoitoproteiinin määrä verenkierrossa oli kuitenkin vähäisempi kuin käytettäessä korkeaa geenihoidoannosta (Kuva 9). Tässä tutkimuksessa hoitojen ei todettu vaikuttavan munuaisten toimintaan KREA-arvojen (Kuva 13) pysyessä normaalitasolla kaikissa hoitoryhmissä ja histologisten näytteiden ollessa normaalit munuaiskudosten osalta. LDH-arvoissa havaittiin vaihtelua kun eläimet eivät olleet saaneet hoitoja, tämä tulos kertoo suuresta LDH-arvon vaihteluvälistä myös normaalitilassa ja kuuluu normaaliin fysiologiseen vaihteluun, sama muutos on havaittavissa myös ihmisellä (Kuva 14).

Valkosolujen määrän vähentyminen eli leukopenia kuuluu normaaliin kemoterapiahoidon sivuvaikutukseen, tämä muutos havaittiin myös koe-eläimillä (Kuva 15). Valkosolujen määrän vähentyminen johtaa odotettavasti myös neutrofiilien määrän vähentymiseen, muutos havaittiin kemoterapiahoidon jälkeen geeniterapian korkean hoitoannoksen ja kemoterapian saaneessa hoitoryhmässä (ryhmä VI) (Kuva 16). Geeniterapian todettiin lisäävän ohimenevästi valkosolujen sekä neutrofiilien määrää viikon kuluttua geeninsiirrosta.

Tutkimuksissa ainakin VEGFR2:n ja VEGFA:n on todettu aktivoivan luuydintä ja siellä tapahtuvaa valkosolujen kypsymistä, mikä voi selittää havaittua muutosta valkosolujen määrän lisääntymisessä myös tässä geeniterapiatutkimuksessa (Larrivee ym. 2003; Podar ja Anderson, 2005). Neutrofiilien osuuden kasvu saattoi olla seuraus elimistön normaalin puolustusreaktion käynnistymisestä virusinjektion jälkeen, sen sijaan kemoterapiahoitojen seurauksena havaittu neutrofiilien määrän väheneminen on normaali sytostaattihoidon sivuvaikutus. Punasolujen määrän vähentyminen eli anemia on normaali kemoterapiahoidon sivuvaikutus, mikä havaittiin kaikissa sytostaatteja saaneissa hoitoryhmissä (Kuva 17). Samankaltainen muutos havaittiin hemoglobiinin ja hematokriitin arvoissa ja tätä pidetään normaalina kemoterapiahoidon sivuvaikutuksena (Kuva 18 ja 19). Kemoterapia aiheutti väliaikaisesti trombosytopeniaa sytostaatteja saaneissa hoitoryhmissä (ryhmät V, VI, VII). Verihiutaleiden määrän väheneminen kuuluu myös normaaliin paklitakselin ja karboplatiinin sivuvaikutukseen (Kuva 20). Hematologian tuloksissa ei havaittu hoidosta aiheutuneita muutoksia geeniterapiaa saaneissa hoitoryhmissä (ryhmät III ja IV), tämän perusteella voidaan todeta ettei adenovirusvälitteinen AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 -geeniterapia vaikuta merkittävästi hematologian parametreihin. MCH, MCHC ja MCV ovat perusveren kuvan ja punasolujen ominaisuuksia kuvaavia arvoja eli punasoluindeksejä, joissa ei havaittu muutoksia missään hoitoryhmässä.

6.3. Biologisten lääkkeiden tulevaisuus

Biologiset lääkkeet ovat geenitekniikalla tuotettuja, kemiallisten lääkkeiden käytön kanssa kilpailevia täsmälääkevalmisteita, joilla pyritään vaikuttamaan sairauden kehittymisen taustalla oleviin molekyyli-tason muutoksiin. Nämä niin sanotut Advanced Therapy Medicinal Product -valmisteet (ATMP) ovat geeniterapia- valmisteita, joilla muokataan ihmisen perimää tai kudoksia terapeuttisessa tarkoituksessa. Biologisten lääkkeiden käyttö perustuu esimerkiksi tietyn geenin ilmentämiseen ja tästä seuraavan proteiinin tuottoon elimistössä, kuten tässä tutkimuksessa tuotettiin munasarjasyöpäkasvaimelle hoitoproteiinina toimivia sVEGFR2:a ja sVEGFR3:a. Perinteiset kemialliset lääkkeet on yleisesti tarkoitettu sairauksien oireiden hoitoon, sen sijaan biologisilla täsmälääkkeillä tähdätään vakavien ja tehokasta

hoitomuotoa vailla olevien sairauksien kuten syöpien, sydän- ja verisuonisairauksien sekä immuunipuutostautien kehittymisen estämiseen tuottamalla terapeuttisia molekyylejä (Salmikangas 2011; Vesterinen ja Ekman 2011). Biologisia lääkkeitä on käytetty menestyksekkäästi reuman hoidossa inhiboimalla TNF:den ja interleukiini-1:n toimintaa (Maini ym. 1995). Täsmälääkkeiden käyttö tulevaisuudessa on perusteltua myös vaikeasti parannettavan munasarjasyövän hoidossa, tällä hetkellä tämän syövän hoidossa on jo käytössä esimerkiksi monoklonaalinen vasta-aine Bevacizumabi eli Avastiini® (Hurwitz ym. 2004; Mabuchi ym. 2008).

ATMP-lääkkeiden kehitystä valvotaan ja niiden myyntiin liittyviä lupahakemuksia käsitellään Euroopan lääkevirastossa (www.ema.europa.eu). Lääkekehitystä valvoo myös Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (<http://www.fda.gov/>). Biologisten lääkkeiden tutkimus- ja kehitystyö on hyvin kallista, näin ollen ainoastaan yksittäisille solu- ja geenilääkkeille on hyväksytty myyntilupa maailmanlaajuisesti. Suurin osa biologisten täsmälääkkeiden kehitystä koskevista tutkimuksista keskittyy hoitojen turvallisuuden arviointiin, mikä on oleellista tutkittaessa hoitojen mahdollisia sivuvaikutuksia (Hedman ja Puomila 2011). Tähän mennessä Euroopassa ei ole myönnetty yhtään myyntilupaa geeniterapiaan tai vektorirokotteiden käyttöön perustuvalla lääkevalmisteelle, mikä johtuu muun muassa puutteista ATMP-lääkkeiden tuotantomenetelmissä sekä tiukasta lääkkeiden tuotantoon liittyvästä lainsäädännöstä (Shaw ja Ylä-Herttua 2011).

Biologisten täsmälääkkeiden kehitys ja niiden käytön turvallisuus on haasteena lääkkeiden tuotannossa. Geeninsiirtovektoreiden ei-toivottu kohdistuminen ihmisen perimään voi johtaa ennalta arvaamattomien sairauksien kehittymiseen ja virusten käyttöön voi liittyä infektio- sekä tuumorigeenisyyriski, mikä puolestaan liitetään virusten mahdollisuuteen aktivoida onkogenejä (Salmikangas 2011). Geeniterapian riskit ovat tulleet esille muun muassa kehitettäessä hoitoa vakavaan perinnölliseen SCID-immuunipuutesairauteen, kun retrovirusvektorin genomiin integroitumisen seurauksena hoidetulle lapsipotilaalle kehittyi leukemia (Fischer ym. 2002). Perimään integroituvien vektoreiden käyttöön liittyneet tutkimukset, joissa vektoreiden käytöllä havaittiin olevan vakavia haittavaikutuksia, ovat yli 10 vuoden takaisia. Geenitekniikan nopean kehityksen myötä virusvektoreiden toimintaa ja

niiden käyttöön liittyvää mutageneesiriskiä osataan nykyään tutkia ja ennakoida aiempaa paremmin (Vesterinen ja Ekman 2011). Biologisten täsmälääkkeiden kehittäminen on herättänyt odotuksia ja mahdollisuuksia uusien hoitomuotojen kehittämiseksi. Samalla kuitenkin geenihoidoihin liittyviin riskeihin ja turvallisuuteen on kiinnitettävä erityistä huomiota. Biologisten lääkkeiden käytön kehittäminen munasarjasyövän hoitoon on perusteltua syövän aggressiivisuuden ja suuren kuolleisuuden vuoksi. Leikkaus- ja kemoterapiahoitojen rinnalle tarvitaan nykyistä tehokkaampia hoitomuotoja, jotta munasarjasyövän paranemisennustetta saadaan kohennettua. Tärkeää olisi kehittää tehokas hoitomuoto, joka kohdistuu nykyisiä menetelmiä paremmin itse syöpäkudokseen.

6.4. Geenihoidon kliiniset sovellukset tulevaisuudessa

Tämän tutkimuksen tulokset osoittivat verisuonensisäisesti annetun adenovirusvälitteisen AdsVEGFR2 ja AdsVEGFR3 geeniterapian olevan hyvin siedetty käytettäessä rottaa koe-eläimenä. Tulosten perusteella voidaan todeta ettei matala geenihoidoannos (2×10^{10} vp) yhdistettynä kemoterapiaan ole toksinen terveille koe-eläimille, sen sijaan lieviä kudosuutoksia havaittiin 10 kertaa suuremmalla kokonaisgeenihoidoannoksella (2×10^{11} vp) kun hoito yhdistettiin kemoterapiaan. AdLacZ-kontrolliryhmän tulokset olivat hyvin samansuuntaisia pelkän geeniterapian saaneiden hoitoryhmien tuloksiin verrattuna, näin ollen ei voi sanoa aiheutuuko havaitut geeniterapian sivuvaikutukset adenoviruksen vai hoitogeenin käytöstä. Pelkän kemoterapiahoitoon ei todettu aiheuttavan kudosuutoksia, lisäksi itsenäisesti annettu geeniterapia ei aiheuttanut merkittäviä sivuvaikutuksia. Kemoterapian todettiin pidentävän hoitogeenien ilmentymistä verenkierrossa, tämä havainto on eduksi kun arvioidaan geenihoidon tehokasta vaikutusaikaa. Biodistributiitutkimus osoitti, että hoitogeeniä ilmennetään useimpien koe-eläinten maksa- ja pernakudoksissa kolme päivää geeninsiirron jälkeen. Tutkimuksessa saatujen tulosten sekä aiempien projektiin liittyneiden lupaavien tutkimustulosten perusteella on tavoitteena aloittaa adenovirusvälitteisen antiangio- ja antilymfangiogeenisen geeniterapian ja kemoterapian yhdistelmähoitoon soveltaminen kliinisissä ihmisen munasarjasyövän tutkimuksissa (Sallinen ym. 2009; Sopo ym. 2012).

7. LÄHDELUETTELO

Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;95:548-553.

Alemaný R, Curiel DT. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther.* 2001;8:1347-1353.

Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. 2005;438:946-953.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am.J.Hum.Genet.* 2003;72:1117-1130.

Artini PG, Ruggiero M, Monteleone P, Carpi A, Cristello F, Cela V, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in benign and malignant ovarian tumors. *Biomed.Pharmacother.* 2008;62:373-377.

Auranen A, Pukkala E, Mäkinen J, Sankila R, Grenman S, Salmi T. Cancer incidence in the first-degree relatives of ovarian cancer patients. *Br.J.Cancer* 1996;74:280-284.

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat.Med.* 2003;9:936-943.

Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2005;15:102-111.

Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J.Biol.Chem.* 1997;272:10382-10388.

Bates DO. An unexpected tail of VEGF and PlGF in pre-eclampsia. *Biochem.Soc.Trans.* 2011;39:1576-1582.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-1323.

Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 2004;11 Suppl 1:S10-7.

Boyd J, Sonoda Y, Federici MG, Bogomolny F, Rhei E, Maresco DL, Saigo PE, Almadrones LA, Barakat RR, Brown CL, Chi DS, Curtin JP, Poynor EA, Hoskins WJ. Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA* 2000;283:2260-2265.

Burger RA. Overview of anti-angiogenic agents in development for ovarian cancer. *Gynecol.Oncol.* 2011;121:230-238.

Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, Yancopoulos GD, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin.Cancer Res.* 2003;9:5721-5728.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat.Med.* 2003;9:653-660.

Connelly S. Adenoviral Vectors, in *Gene Therapy Technologies, Applications and Regulations: From Laboratory to Clinic* (ed A. Meager), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 2001; 87-107.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc.Res.* 2001;49:507-521.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.

Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol.Cancer.Res.* 2004;2:315-326.

Eerola H, Aittomaki K, Asko-Seljavaara S, Nevanlinna H, von Smitten K. Hereditary breast cancer and handling of patients at risk. *Scand.J.Surg.* 2002;91:280-287.

Elektroninen Pharmaca Fennica 2010. Solunsalpaajiin liittyvien haittojen hoito. http://www.terveysportti.fi.ezproxy.uef.fi:2048/dtk/ltk/koti?p_artikkeli=ykt00395&p_haku=sytostaatti (linkki 19.5.2012).

ELLA-eläinlääkärilautakunta:
<http://www.laaninhallitus.fi/lh/etela/hankkeet/ellapro/home.nsf/pages/indexfin> (linkki 27.3.2012).

- Eskens FA. Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *Br.J.Cancer* 2004;90:1-7.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989;161:851-858.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.* 2003;9:669-676.
- Fischer A, Hacein-Bey S, Le Deist F, de Saint Basile G, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. *Isr.Med.Assoc.J.* 2002;4:51-54.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.* 1971;285:1182-1186.
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58-61.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 1992;267:10931-10934.
- Fong GH, Klingensmith J, Wood CR, Rossant J, Breitman ML. Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. *Dev.Dyn.* 1996;207:1-10.
- Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 2008;11:121-140.
- Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J.Biol.Chem.* 1998;273:11197-11204.
- Galland F, Karamysheva A, Mattei MG, Rosnet O, Marchetto S, Birnbaum D. Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. *Genomics* 1992;13:475-478.
- Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion. *Gene Ther.* 2002;9:127-134.
- Geenitekniikkalaki 377/1995.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J.Cell Biol.* 2003;161:1163-1177.
- Ghosh SK, Raheja S, Tuli A, Raghunandan C, Agarwal S. Serum PLGF as a potential biomarker for predicting the onset of preeclampsia. *Arch.Gynecol.Obstet.* 2012;285:417-422.

Gonin P, Gaillard C. Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development. *Gene Ther.* 2004;11 Suppl 1:S98-S108.

Grunewald FS, Prota AE, Giese A, Ballmer-Hofer K. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim.Biophys.Acta* 2010;1804:567-580.

Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. Regulation of vascular endothelial growth factor-A and its soluble receptor sFlt-1 by luteinizing hormone in vivo: implication for ovarian follicle angiogenesis. *Fertil.Steril.* 2008;89:922-926.

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JL, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302:415-419.

Hakkarainen T, Kanerva A, Hemminki A. Adenoviruksen syövän hoidossa. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 2005;121:2195-2203.

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

Harlan. Harlan datasheet HsdHanWist. 2011.

Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M, Kohno T, Takeuchi K, Kume A, Momoeda M, Yoshikawa H, Tsuruo T, Shibuya M, Taketani Y, Ozawa K. Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res.* 2002;62:2019-2023.

Hedman M, Muona K, Hedman A, Kivelä A, Syväne M, Eranen J, Rantala A, Stjernvall J, Nieminen MS, Hartikainen J, Ylä-Herttuala S. Eight-year safety follow-up of coronary artery disease patients after local intracoronary VEGF gene transfer. *Gene Ther.* 2009;16:629-634.

Hedman M, Puomila A. Vain pieni osa kehitellyistä solu- ja geeniterapioista päätyy markkinoille. *Lääketietoa Fimeasta, Sic!* 2011;3.

Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S, Beller U. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 2006;95 Suppl 1:S161-92.

Hemminki A, Kanerva A, Liu B, Wang M, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT. Modulation of coxsackie-adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression. *Cancer Res.* 2003;63:847-853.

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:1011-1027.

Hiltunen MO, Turunen MP, Turunen AM, Rissanen TT, Laitinen M, Kosma VM, Ylä-Herttuala S. Biodistribution of adenoviral vector to nontarget tissues after local in vivo gene transfer to arterial wall using intravascular and periadventitial gene delivery methods. *FASEB J.* 2000;14:2230-2236.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;95:9349-9354.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol.Endocrinol.* 1991;5:1806-1814.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N.Engl.J.Med.* 2004;350:2335-2342.

Imboden M, Shi F, Pugh TD, Freud AG, Thom NJ, Hank JA, Hao Z, Staelin ST, Sondel PM, Mahvi DM. Safety of interleukin-12 gene therapy against cancer: a murine biodistribution and toxicity study. *Hum.Gene Ther.* 2003;14:1037-1048.

Indraccolo S, Habeler W, Tisato V, Stievano L, Piovan E, Tosello V, Esposito G, Wagner R, Uberla K, Chieco-Bianchi L, Amadori A. Gene transfer in ovarian cancer cells: a comparison between retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Res.* 2002;62:6099-6107.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer.J.Clin.* 2010;60:277-300.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996;15:290-298.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995;92:3566-3570.

Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73:751-762.

Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993;90:10705-10709.

Klasa-Mazurkiewicz D, Jarzab M, Milczek T, Lipinska B, Emerich J. Clinical significance of VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in ovarian cancer patients. *Pol.J.Pathol.* 2011;62:31-40.

Kokki E. Liukoiset VEGF-reseptorit syövän geenihoidossa. Pro Gradu- tutkielma, Itä-Suomen yliopisto 05/2011.

Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001;98:4605-4610.

Kärkkäinen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Ylä-Herttua S, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001;98:12677-12682.

Kärkkäinen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat.Immunol.* 2004a;5:74-80.

Kärkkäinen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat.Immunol.* 2004b;5:74-80.

Kärpänen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu.Rev.Pathol.* 2008;3:367-397.

Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Munasarjasyövän Käypä hoito -suositus, 2012.

Langford G, Dayan A, Ylä-Herttua S, Eckland D. A preclinical assessment of the safety and biodistribution of an adenoviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene (Cerepro) after intracerebral administration. *J.Gene Med.* 2009;11:468-476.

Larrivee B, Lane DR, Pollet I, Olive PL, Humphries RK, Karsan A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 induces survival of hematopoietic progenitor cells. *J.Biol.Chem.* 2003;278:22006-22013.

Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 1999;401:517-518.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N.Engl.J.Med.* 2004;350:672-683.

Li L, Liu B, Li X, Yang S, Xiao J, Chen M, Zhang Y, Ma J. Vascular endothelial growth factor D and intratumoral lymphatics as independent prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma. *Anat.Rec.(Hoboken)* 2009;292:562-569.

Lähteenvuo JE, Lähteenvuo MT, Kivelä A, Rosenlew C, Falkevall A, Klar J, Heikura T, Rissanen TT, Vähäkangas E, Korpisalo P, Enholm B, Carmeliet P, Alitalo K, Eriksson U, Ylä-Herttua S. Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and

arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1- and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. *Circulation* 2009;119:845-856.

Lääkeläki 395/1987.

Mabuchi S, Terai Y, Morishige K, Tanabe-Kimura A, Sasaki H, Kanemura M, Tsunetoh S, Tanaka Y, Sakata M, Burger RA, Kimura T, Ohmichi M. Maintenance treatment with bevacizumab prolongs survival in an in vivo ovarian cancer model. *Clin.Cancer Res.* 2008;14:7781-7789.

Mahasreshti PJ, Navarro JG, Kataram M, Wang MH, Carey D, Siegal GP, Barnes MN, Nettelbeck DM, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT. Adenovirus-mediated soluble FLT-1 gene therapy for ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:2057-2066.

Mahasreshti PJ, Kataram M, Wang MH, Stockard CR, Grizzle WE, Carey D, Siegal GP, Haisma HJ, Alvarez RD, Curiel DT. Intravenous delivery of adenovirus-mediated soluble FLT-1 results in liver toxicity. *Clin.Cancer Res.* 2003;9:2701-2710.

Mahendra G, Kumar S, Isayeva T, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Stockardt CR, Grizzle WE, Alapati V, Singh R, Siegal GP, Meleth S, Ponnazhagan S. Antiangiogenic cancer gene therapy by adeno-associated virus 2-mediated stable expression of the soluble FMS-like tyrosine kinase-1 receptor. *Cancer Gene Ther.* 2005;12:26-34.

Maini RN, Elliott MJ, Brennan FM, Feldmann M. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA). *Clin.Exp.Immunol.* 1995;101:207-212.

Matthews KS, Alvarez RD, Curiel DT. Advancements in adenoviral based virotherapy for ovarian cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:836-841.

Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr.Res.* 2005;57:1-7.

McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase III randomized trial in patients with suboptimal stage III/IV ovarian cancer (from the Gynecologic Oncology Group). *Semin.Oncol.* 1996;23:40-47.

Montero S, Guzman C, Cortes-Funes H, Colomer R. Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin.Cancer Res.* 1998;4:2161-2168.

Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, KärpänenKärpänen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Ylä-Herttua S, Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat.Med.* 2001;7:199-205.

Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J.Exp.Med.* 2002;196:1497-1506.

Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm.Pharmacol.Ther.* 2006;19:61-69.

Newman KD, Dunn PF, Owens JW, Schulick AH, Virmani R, Sukhova G, Libby P, Dichek DA. Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J.Clin.Invest.* 1995;96:2955-2965.

NORDCAN, Association of the Nordic Cancer Registries: [http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=222\(\)&country=246](http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=222()&country=246) (linkki 9.1.2012)

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996;93:2576-2581.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2006;7:359-371.

O'Reilly MS. Antiangiogenesis and vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor targeting as part of a combined-modality approach to the treatment of cancer. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 2007;69:S64-6.

Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Ohira S, Ota M, Katsuyama Y, Konishi I. Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum.Pathol.* 2006;37:1414-1425.

Parks R, Eveleigh C, Graham F. Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration. *Gene Ther.* 1999;6:1565-1573.

Pasqualini R, Arap W, McDonald DM. Probing the structural and molecular diversity of tumor vasculature. *Trends Mol.Med.* 2002;8:563-571.

Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005;105:1383-1395.

Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat.Med.* 2003;9:677-684.

Puumalainen AM, Vapalahti M, Ylä-Herttuala S. Gene therapy for malignant glioma patients. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1998;451:505-509.

Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol.Genet.Metab.* 2003;80:148-158.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.

Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N.Engl.J.Med.* 1990;323:570-578.

Roy H, Bhardwaj S, Babu M, Jauhiainen S, Herzig KH, Bellu AR, Haisma HJ, Carmeliet P, Alitalo K, Ylä-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum.Gene Ther.* 2005;16:1422-1428.

Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 2006;580:2879-2887.

Räty JK, Pikkarainen JT, Wirth T, Ylä-Herttuala S. Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Curr.Mol.Pharmacol.* 2008;1:13-23.

Saharinen P, Tammela T, Kärkkäinen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol.* 2004;25:387-395.

Sallinen H, Anttila M, Närväinen J, Koponen J, Hämäläinen K, Kholova I, Heikura T, Toivanen P, Kosma VM, Heinonen S, Alitalo K, Ylä-Herttuala S. Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice. *Mol.Ther.* 2009;17:278-284.

Sallinen H, Anttila M, Närväinen J, Orden MR, Ropponen K, Kosma VM, Heinonen S, Ylä-Herttuala S. A highly reproducible xenograft model for human ovarian carcinoma and application of MRI and ultrasound in longitudinal follow-up. *Gynecol.Oncol.* 2006;103:315-320.

Salmikangas P. Pitkälle kehitetyistä terapioidista uutta toivoa sairauksien ja kudosaivurioiden hoitoon. *Lääketietoa Fimeasta, Sic!* 2011;3.

Santoso JT, Tang DC, Lane SB, Hung J, Reed DJ, Muller CY, Carbone DP, Lucci JA 3rd, Miller DS, Mathis JM. Adenovirus-based p53 gene therapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1995;59:171-178.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66.

Shaw R, Ylä-Herttua S. Eläviä viruksia sisältävien lääkkeiden kehityksen haasteet Euroopassa. *Lääketietoa Fimeasta, Sic!* 2011;3.

Shayakhmetov DM, Gaggar A, Ni S, Li ZY, Lieber A. Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. 2005;79:7478-7491.

Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O, Shimizu H, Jin E, Araki T, Sugisaki Y. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *Br.J.Cancer* 2000;83:196-203.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5:519-524.

Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006;9:225-30; discussion 231.

Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp.Cell Res.* 2006;312:549-560.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-845.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer.J.Clin.* 2012;62:10-29.

Sleeman JP, Thiele W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int.J.Cancer* 2009;125:2747-2756.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-745.

Sopo M, Anttila M, Sallinen H, Tuppurainen L, Laurema A, Laidinen S, Hämäläinen K, Tuunanen P, Koponen JK, Kosma VM, Heinonen S, Alitalo K, Ylä-Herttua S. Antiangiogenic gene therapy with soluble VEGF-receptors -1, -2 and -3 together with paclitaxel prolongs survival of mice with human ovarian carcinoma. *Int.J.Cancer* 2012.

Sowter HM, Corps AN, Evans AL, Clark DE, Charnock-Jones DS, Smith SK. Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. *Lab.Invest.* 1997;77:607-614.

Spannuth WA, Sood AK, Coleman RL. Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 2008;5:194-204.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat.Med.* 2001;7:186-191.

Stone D, Liu Y, Shayakhmetov D, Li ZY, Ni S, Lieber A. Adenovirus-platelet interaction in blood causes virus sequestration to the reticuloendothelial system of the liver. *J.Virol.* 2007a;81:4866-4871.

Stone D, Liu Y, Li ZY, Tuve S, Strauss R, Lieber A. Comparison of adenoviruses from species B, C, E, and F after intravenous delivery. *Mol Ther.* 2007b;15:2146-2153.

Suomen syöpärekisteri: <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/ajantasaiset-perustaulukot/koko-maa/> (linkki 9.1.2012)

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-1180.

Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999;18:2221-2230.

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin.Sci.(Lond)* 2005;109:227-241.

Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, Sakamoto T, Inoue K, Shimizu K, Oohashi H, Hara N. Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor into a remote organ. *Cancer Res.* 2000;60:2169-2177.

Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Yoshimura I, Hasumi Y, Takayama T, Kohno T, Matsushita T, Okada T, Kume A, Suzuki M, Ozawa K. Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int.J.Cancer* 2007;120:278-284.

Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc.Res.* 2005;65:550-563.

Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomaki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellstrom M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Ylä-Herttua S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008;454:656-660.

Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010;140:460-476.

Tao N, Gao GP, Parr M, Johnston J, Baradet T, Wilson JM, Barsoum J, Fawell SE. Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol. Ther.* 2001;3:28-35.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;187:1579-1586.

Thaci B, Ulasov IV, Wainwright DA, Lesniak MS. The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses. *Oncotarget* 2011;2:113-121.

Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009;12:125-137.

Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* 2000;6:460-463.

Tolcher AW, Hao D, de Bono J, Miller A, Patnaik A, Hammond LA, Smetzer L, Van Wart Hood J, Merritt J, Rowinsky EK, Takimoto C, Von Hoff D, Eckhardt SG. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53, an adenoviral vector containing the wild-type p53 gene, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:2052-2058.

Tong X, Engehausen DG, Freund CT, Agoulnik I, Guo Z, Oehler MK, Kim TE, Hasenburger A, Contant CF, Woo SL, Kieback DG. The efficacy of adenovirus-mediated gene therapy of ovarian cancer is enhanced by using the cytomegalovirus promoter. *Anticancer Res.* 1998;18:719-725.

Tucker MJ. Diseases of the Wistar rat 1997:9-14.

Vapalahti M, Puumalainen A, Ylä-Herttua S. Geenihoidon lainsäädännölliset ja eettiset ongelmat. *Suom Lääkäril* 1997;52:2546-9.

Veikkola T, Jussila L, Mäkinen T, Kärpänen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001;20:1223-1231.

Verdier F, Descotes J. Preclinical safety evaluation of human gene therapy products. *Toxicol. Sci.* 1999;47:9-15.

Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 1997;389:239-242.

Vesterinen J, Ekman N. Geeniterapia tulevaisuuden täsmähoitona. *Läketietoa Fimeasta, Sic!* 2011;3.

Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J.Biol.Chem.* 1994;269:26988-26995.

Wang-Gillam A, Tew WP, Rothenberg ML, Dupont J, Cooper W, Sternas L, Buzenet G, Sosman JA, Spriggs DR, Lockhart AC. A phase I study of subcutaneously administered aflibercept (VEGF trap) in a new formulation in patients with advanced solid tumors. *Invest.New Drugs* 2011.

Wei K, Kuhnert F, Kuo CJ. Recombinant adenovirus as a methodology for exploration of physiologic functions of growth factor pathways. *J.Mol.Med.(Berl)* 2008;86:161-169.

Wolf JK, Bodurka DC, Gano JB, Deavers M, Ramondetta L, Ramirez PT, Levenback C, Gershenson DM. A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer. *Gynecol.Oncol.* 2004;94:442-448.

Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L, Wilson DR. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther.* 1999;6:367-372.

Wu Y, Li ZY, Zhao X, Kan B, Wei YQ. Inhibition of ovarian tumor growth by gene therapy with recombinant soluble vascular endothelial growth factor receptor 2. *Hum.Gene Ther.* 2006;17:941-948.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:4407-4411.

Ylä-Herttuala S, Ollikainen A, Vapalahti M. Human gene therapy. *Duodecim* 1996;112:77-79.

Ylä-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000;355:213-222.

Ylä-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat.Med.* 2003;9:694-701.

Ylä-Herttuala S. Geenihoito, Matti Äyräpään luento. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 2009;125(16):1729-1739.

Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc.Res.* 2001;49:568-581.