

**POLYAMIINIEN MERKITYS SYÖVÄN HAJUSSA –  
SOLUMALLEJA HYÖDYNTÄVÄ TUTKIMUS**

Jere Majamaa  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Ap. Prof. Oksalan ryhmä  
Helmikuu 2017

---

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Ap. Prof. Oksalan tutkimusryhmä

JERE MAJAMAA: POLYAMIINIEN MERKITYS SYÖVÄN HAJUSSA – SOLUMALLEJA  
HYÖDYNTÄVÄ TUTKIMUS

Kirjallinen työ, 26 s.

Ohjaaja: Ap. Prof., LT, FT, Verisuonikirurgian erikoislääkäri Niku Oksala

Helmikuu 2017

Avainsanat: *Polyamiinit, kaasuanalysaattori, ChemPro 100, solulinja, eturauhassyöpä, diagnostiikka*

---

Tässä tutkimuksessa selvitettiin polyamiinien roolia syöväälle ominaisen hajuprofiilin tuottajana, ja kuinka tätä tietoa voitaisiin hyödyntää eturauhassyövän diagnosoimisessa. Polyamiinit ovat solun tuottamia haihtuvia yhdisteitä, joita aktiivisesti jakautuva solu tarvitsee lisääntymiseen ja kasvuun. Eturauhassyöpäsolut (LNCaP) altistettiin synteettiselle polyamiinianalogille, N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-dietyylinorspermiinille (DENSpm), jonka tiedettiin aiheuttavan polyamiinien erityistä solusta ulos, viljelynesteeseen. DENSpm:llä tiedettiin myös olevan sytotoksisia ominaisuuksia. Vertailemalla solunäytteiden ja niiden viljelynesteiden hajuprofiileja toisiinsa, pyrittiin osoittamaan kohonnut polyamiinipitoisuus eturauhassyöpäsoluissa. Rinnakkaisina näytteinä eturauhassyöpäsoluille verrattiin eturauhasen tervettä liikakasvua (EP-156T). Hajuprofiilien tunnistamiseen käytettiin kaupallista kaasuanalysaattoria, sekä matemaattista analyysia.

DENSpm aiheutti tutkittavissa eturauhassyöpäsoluissa voimakkaampia sytotoksisia muutoksia kuin oli osattu ennakoida. Eturauhassyöpäsolujen ja viljelynesteiden hajuprofiilin muutoksia ei voitu tulkita polyamiinien aiheuttamiksi, sillä DENSpm ei oletetulla tavalla aiheuttanut polyamiinien ulospumppausta solusta. Kaasuanalysaattori kuitenkin kykeni erottelemaan eturauhassyöpäsolut ja eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun solut toisistaan erinomaisella tarkkuudella.

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO .....	1
2	ETURAUHASSYÖPÄ .....	2
3	POLYAMIINIT .....	2
3.1	Yleistä polyamiineista .....	2
3.2	Polyamiinien synteesi .....	4
3.3	Polyamiinien katabolia ja erityis solusta .....	6
3.4	Polyamiinit ja syöpä .....	6
3.5	DENSpm .....	8
4	ELEKTRONISET NENÄT .....	9
4.1	Elektronisten nenien toimintaperiaate .....	9
4.2	Elektroniset nenät syövän tunnistamisessa .....	10
5	AINEISTO JA MENETELMÄT .....	10
5.1	Solulinjat: LNCaP ja EP-156T .....	10
5.2	ChemPro100 .....	11
5.3	Mittausjärjestelyt .....	12
5.4	Tulosten analysointi .....	12
5.5	Tutkimushypoteesit .....	13
6	TULOKSET .....	14
7	JOHTOPÄÄTÖKSET .....	25
8	POHDINTA .....	25

# 1 JOHDANTO

Syöpäsolut tuottavat suuria määriä polyamiineja, jotka ovat haihtuvia orgaanisia yhdisteitä (Koide ym. 1990). Ne ovat kasvutekijöitä, joita tarvitaan solujen kasvuun ja jakautumiseen, ja niiden erittymisestä erilaisissa syövissä on vahvaa näyttöä (Casero ym. 2007). On havaittu, että polyamiinien asetyloitujen muotojen pitoisuus virtsassa vaikuttaa lupaavalta merkkiaineelta useissa syövissä (Hiramatsu ym. 1997). Ihmisen eturauhassyövässä on osoitettu polyamiineja syntetisoivien entsyymien geenien transkription kiihtyminen (Rhodes ym. 2002), sekä lisääntynyt polyamiinien synteesi (Simoneau ym. 2001, Schipper ym. 2003). Syövän hajun taustalla olevat mekanismit ovat toistaiseksi epäselviä. Polyamiinit ovat yksi ehdokas hajun selittäjäksi. Muun muassa nämä löydökset puhuvat polyamiinien tutkimisen puolesta syövän diagnosoimisessa.

Elintarvikkeiden laadunvalvontaan, sekä taistelukaasujen, räjähteiden ja huumausaineiden tunnistamiseen on käytetty jo pitkään elektronisiksi neniksi kutsuttuja laitteita, jotka koostuvat kemiallisista sensoreista sekä algoritmista, joka luokittelee hajujäljet tunnistettaviksi hahmoiksi. Ne ovat pienikokoisia kannettavia laitteita, jotka antavat mittaustuloksen reaaliajassa, ja kykenevät havaitsemaan haihtuvia yhdisteitä erittäin pieninä pitoisuuksina. Elektronisten nenien on tähän asti osoitettu kykenevän mm. tunnistamaan hengityselinsairauksia kuten astma, COPD ja keuhkosyöpä (Montuschi ym. 2013). Toistaiseksi valtaosa elektronisella nenällä tehtävästä syöpätutkimuksesta on ollut keskittynyt keuhkosyövän tunnistamiseen uloshengitysilmaasta.

Elektronisella nenällä on aiemmin kyetty tunnistamaan polyamiineja vesiliuoksista. Polyamiinit spermidiini, ornitiini, kadaveriini ja putreskiini voitiin erottaa vedestä pitoisuusvälillä 0,1 M–0,1 mM (Roine 2010). Myös kaksi eri eturauhassolulinjaa (LNCaP ja EP-156T) on kyetty erottamaan toisistaan elektronisella nenällä (Roine ym. 2012). Nämä havainnot muodostavat pohjan tälle tutkimukselle.

## **2 ETURAUHASSYÖPÄ**

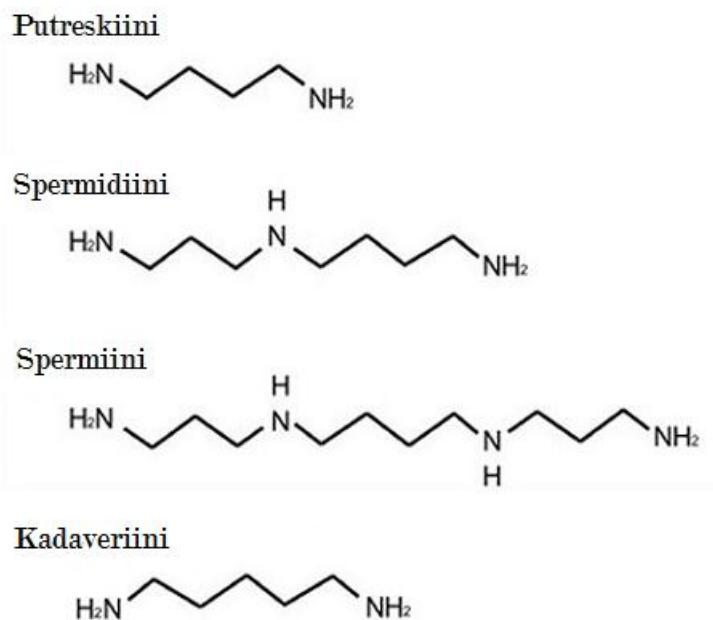
Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä Suomessa. Vuonna 2010 uusia eturauhassyöpiä todettiin 4700, ja siihen menehtyi 845 miestä. Kaiken kaikkiaan eturauhassyöpää sairastavia on Suomessa noin 40 000, ja keskimääräinen sairastumisikä on 70 vuotta. Eturauhassyöpä esiintyy pääsääntöisesti latentissa muodossa, vain yksi kymmenestä syövästä kehittyy kliiniseksi syöväksi. Varhaisvaiheen eturauhassyöpä on yleensä oireeton, tai oireet ovat samankaltaisia virtsaamisoireita kuin eturauhasen hyvänlaatuisessa liikakasvussa tai virtsarakkosairauksissa. Eturauhassyövän diagnoosi perustuu tällä hetkellä koepalojen (biopsia) ottamiseen eturauhasesta ja näytteen mikroskooppiseen tutkimukseen. Verestä mitattava prostataspesifinen antigeeni (PSA) antaa viitteitä eturauhaskudoksen hyvän- tai pahanlaatuisuudesta, mutta sen perusteella ei kuitenkaan voida osoittaa eikä poissulkea syöpää. Eturauhasen palpoiminen peräaukon kautta kuuluu perustutkimuksiin. Transrektaalinen ultraääni antaa tarkempaa tietoa kasvaimen koosta. Luustometastaasien selvittämiseksi, luuston gammakuvaus tehdään kun PSA-pitoisuus on yli 20 µg / l, tai kun potilaalla on luustoperäisiä kipuja, tai muu oirekuva viittaa pahanlaatuisuuteen. Paikallisen eturauhassyövän hoito valitaan yksilökohtaisesti taudin ja potilaan mukaan. Hoitovaihtoehtoja (ja niiden yhdistelmiä) ovat mm. aktiiviseuranta, radikaalileikkaus, ulkoinen sädehoito, sekä hormonihoido. Eturauhassyövän suhteellinen elossaolo-osuus viiden vuoden kohdalla on 93 %. Metastasoineen eturauhassyövän elinajanodote on 2-3 vuotta. (Käypä hoito 2014).

## **3 POLYAMIINIT**

### **3.1 Yleistä polyamiineista**

Polyamiinit ovat orgaanisia molekyyliä, joita löytyy kaikista organismeista. Ensimmäinen polyamiini, spermiini, löydettiin spermasta vuonna 1678. Polyamiinit ovat välttämättömiä solun kasvun, jakautumisen ja erilaistumisen kannalta. Ne koostuvat hiilivetyketjusta, johon on kiinnittynyt useita aminoryhmiä. Polyamiinit ovat pitkiä, fysiologisessa pH:ssa suuren positiivisen varauksen omaavia polykationeita. Näiden ominaisuuksien ansiosta ne pystyvät vuorovaikuttamaan

monien negatiivisesti varautuneiden rakenteiden, kuten DNA:n, RNA:n, fosfolipidien ja ATP:n kanssa (Ignatenko 2011). Nisäkässolut tuottavat kolmea polyamiinia; putreskiinia, spermiidiinia ja spermiinia. Polyamiinien rooli solun toimintojen säätelyssä on keskeinen, ne osallistuvat mm. DNA:n synteesiin ja stabilointiin sekä transkription säätelyyn, ionikanavien säätelyyn, proteiinien fosforylaatioon sekä ekstrasellulaaritalan korjaamiseen (Roine 2014, Soda 2011). Kasveissa ne toimivat mm. ikääntymistä säätelevinä hormoneina (Pandey 2000). Niiden synteesin pysäyttäminen aiheuttaa solun kasvun hidastumisen tai pysähtymisen, tai solun ajautumisen apoptoosiin (Wang 2003). Liian suuret polyamiinipitoisuudet taas häiritsevät solun toimintoja, joten niiden synteesi on tarkkaan säädeltyä (Ignatenko 2011). Lähes kaikki solut pystyvät tuottamaan polyamiineja, mutta niiden tuotanto on erityisen tehokasta nopeasti kasvavissa soluissa (Soda, 2011).



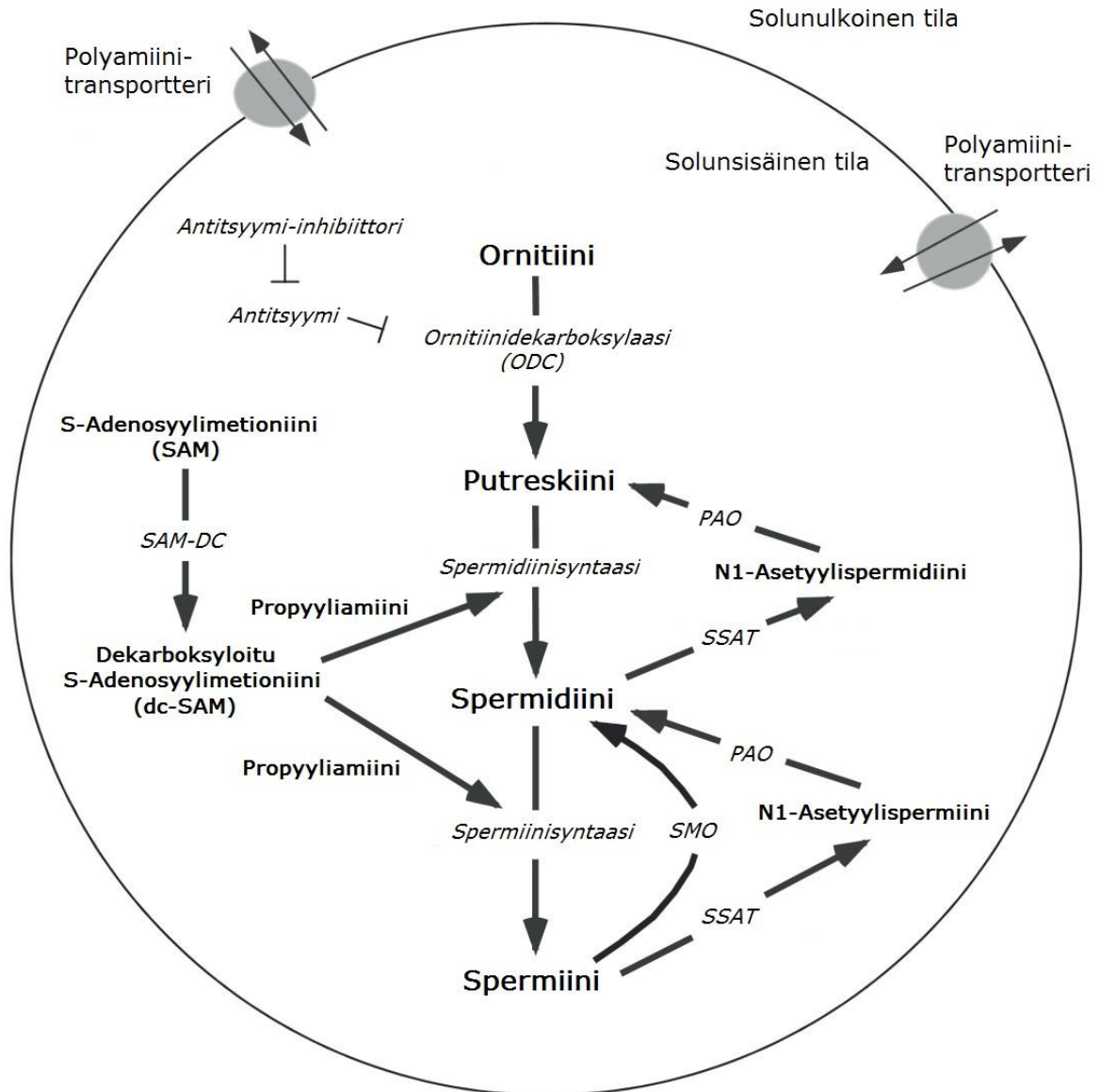
**Kuva 1.** Nisäkässolujen tuottamat kolme polyamiinia (putreskiini, spermiidiini ja spermiini), sekä rakenteellisesti samankaltainen kadaveriini, jota muodostuu mätänemisessä.

Putreskiini, spermiidiini ja spermiini ovat kolme nisäkässolujen tuottamaa polyamiinia. Putreskiinilla on kaksi, spermiidiinillä kolme, ja spermiinillä neljä aminoryhmää. Polyamiinit syntetisoidaan aminohappo ornitiinista, joka on ureasyklin välituote. Kadaveriini muistuttaa rakenteeltaan muita polyamiineja, mutta sitä muodostuu ainoastaan eläinkudoksen mädäntymisessä. Myös putreskiinia muodostuu tällä tavoin, ja nämä kaksi yhdistettä ovatkin pääasiallisesti vastuussa mätänevän lihan hajusta.

## 3.2 Polyamiinien synteesi

Varsin monimutkainen koneisto säätelee polyamiinien tuotantoa (Kuva 2). Niiden synteesi edellyttää kahden erillisen reaktioreitin koordinoitua toimintaa. Polyamiinien synteessin pääreitit muodostavat ornitiinidekarboksylaasi (ODC), spermidiinisyntaasi ja spermiinisyntaasi. Toisesta reitistä vastaa S-adenosyylimetioniini-dekarboksylaasi (SAM-DC), jonka tehtävä on tuottaa substraattia (propyyliamiini) spermidiinisyntaasille sekä spermiinisyntaasille. Lisäksi polyamiinien kataboliaan sekä synteessin jälkeiseen muokkaamiseen osallistuvat spermiinioksideasi (SMO), spermidiini-spermiini-N<sup>1</sup>-asetyyli transferaasi (SSAT), sekä polyamiinioksideasi (PAO). Muokatut (asetyloidut) polyamiinit kulkevat solukalvon yli polyamiinitransportterien avulla. Polyamiineja syntetisoivilla entsyymeillä (erityisesti ODC, SAM-DC, SSAT ja SMO) on nopea vaihtuvuus, lyhyt puoliintumisaika, ja niihin kohdistuu tarkka transkriptionaalinen ja posttranskriptionaalinen säätely. Nämä keskeiset entsyymit pidetään matalilla pitoisuuksilla solussa, kunnes solu tarvitsee polyamiinien synteesiä nopeasti reaktionä muuttuneisiin olosuhteisiin.

Polyamiinien synteesi nisäkässoluissa alkaa ornitiinin muodostuksella arginiinista, joka on ureasyklin väliaine. Reaktiota katalysoi arginaasi. Seuraavaksi ODC muodostaa ornitiinista putreskiinia. ODC:n määrä solussa on tarkasti säädeltyä, ja tämä on ensimmäinen polyamiinien synteessin nopeutta rajoittava vaihe. Tämän jälkeen spermidiinisyntaasi muokkaa putreskiinista spermidiinia liittämällä putreskiiniin propyyliamiiniryhmän, joka on peräisin dekarboksyloidusta S-adenosyylimetioniinista (dc-SAM). Spermidiinista voidaan edelleen muokata spermiinia samalla mekanismilla, liittämällä dc-SAM:n luovuttama propyyliamiiniryhmä spermidiiniin. Reaktiota katalysoi spermiinisyntaasi. Sekä spermidiinin että spermiinin synteessissä substraattina tarvittava dc-SAM muodostetaan erillisessä reaktiossa. SAM-DC irrottaa S-adenosyylimetioniinista (SAM) karboksyyli ryhmän, muodostaen dc-SAM:ia. Tämä reaktio on toinen polyamiinien synteessin nopeutta rajoittava vaihe. Dc-SAM:n määrä on myös tarkkaan säädelty ja sillä on lyhyt puoliintumisaika.



**Kuva 2.** Polyamiinien metabolia ja transmembraaninen kuljetus nisäkässolussa. ODC = ornitiinikarboksylaasi; SSAT = spermiidiini-spermiini- $N^1$ -asetyyli transferaasi; PAO = polyamiinioksideasi; SAM-DC = S-adenosyyli metioniinidekarboksylaasi; SMO = spermiinioksideasi. SSAT voi lisäksi asetyloidä spermiidiinia ja spermiinia kahteen kertaan, tuottaen  $N^1,N^{12}$ -diasetyylispermiidiinia ja  $N^1,N^{12}$ -diasetyylispermiinia (ei näy kuvassa). Mukailtu alkuperäisestä kuvasta, Soda ym. 2011.



### **3.3 Polyamiinien katabolia ja erityis solusta**

Katabolia tapahtuu kahta erillistä reittiä pitkin ja käyttää kolmea entsyymiä: SSAT, PAO ja SMO. SSAT asetyloi sekä spermiinia että spermidiinia, tuottaen asetyloituja polyamiineja. SSAT voi asetyloida spermiinia ja spermidiinia kerran tai kahdesti. Spermiinin asetyloidut muodot ovat N<sup>1</sup>-asetyyylispermiini ja N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-diasetyylispermiini; spermidiinin vastaavat ovat N<sup>1</sup>-asetyyylispermidiini ja N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-diasetyylispermidiini. Asetyloidut polyamiinit päätyvät joko substraatiksi PAO:lle tai eritettäväksi ulos diamiinieksportterin kautta. Solusta ulos eritetyt polyamiinit päätyvät ensin vereen, ja lopulta virtsaan. Asetyloidut polyamiinit ovat stabiileja yhdisteitä ja säilyvät hyvin virtsassa, tehden niistä erinomaisia merkkiaineita. PAO muuntaa asetyloituja polyamiineja myös takaisin spermidiiniksi tai putreskiiniksi. PAO kykenee lisäksi myös hajottamaan putreskiinia. Vaihtoehtoista metaboliareittiä hyödyntävä SMO voi myös muuntaa spermiinin takaisin suoraan spermidiiniksi. Näiden eri reittien tarkoitus on toisaalta muuntaa spermiinia ja spermidiinia putreskiiniksi jota solun on helppo erittää ulos, ja toisaalta tuottaa asetyloituja polyamiineja ulos solusta eritettäväksi. Kyseisten reittien aktivaatio näin siis vähentää solunsisäisten polyamiinien määrää.

Solu vähentää polyamiinien määrää myös vähentämällä niiden synteesiä. Tässä säätelyssä erityisesti polyamiinien synteesin aloittavalla ODC:lla on keskeinen osa. ODC:n transkriptio, translaatio ja hajotus ovat tarkkaan säädeltyjä. ODC:n hajoituksesta vastaa erityinen säätelyproteiini, ODC-antitsyymi (kuva 2), joka kuljettaa sen hajotettavaksi 26S-proteasomiin. ODC:n puoliintumistaika on erityisen lyhyt (10-30 minuuttia), joten antitsyymien rooli on keskeinen ODC:n hajoituksessa ja kokonaisuudessaan polyamiinien synteesin hidastamisessa. Tarkan säätelyn alainen on myös substraatti dc-SAM:n määrä solussa. Dc-SAM muodostaa toisen polyamiinien synteesinopeuden säätelykohdan, ODC:n lisäksi. Kun solunsisäisen spermiinin ja spermidiinin määrä nousee, negatiivinen palautejärjestelmä aktivoituu ja vähentää dc-SAM:n transkriptiota, translaatiota ja lisää sen hajotusta. Näin dc-SAM:n pitoisuus pienenee ja polyamiinien synteesi hidastuu.

### **3.4 Polyamiinit ja syöpä**

Jo useita vuosikymmeniä on tiedostettu polyamiinien yhteys syöpään. Polyamiinien määrät ovat olleet säännönmukaisesti koholla normaalitasoon nähden, tutkittaessa neoplastisia soluja ja kudoksia niin ihmisistä kuin jyrsijöistäkin. Tästäkin huolimatta tietämys tarkoista solutason

mekanismeista polyamiinien metaboliassa karsinogeneesissa on edelleen puutteellista. Vieläkään ei ole pystytty osoittamaan polyamiinien aiheuttavan syöpää, vaikka selkeä korrelaatio on havaittu. Polyamiinien biosynteesi on kiihtynyt kaikissa aktiivisesti jakautuvissa soluissa. Niiden pitoisuudet, geeniekspressio, sekä niitä syntetisoivien entsyymien pitoisuudet ovat yleisesti korkeampia syöpäkudoksissa kuin normaaleissa kudoksissa. Nämä seikat ovat ilmeisiä myös eturauhassyövän kohdalla.

Polyamiinien on osoitettu olevan koholla eturauhasen hyvänlaatuisessa liikakasvussa (Dunzendorfer 1978). Myös eturauhassyövässä on osoitettu polyamiinien transkriptiota säätelevien geenien muuttunut ekspresio (Rhodes 2002). Normaali eturauhanen tuottaa kokoonsa nähden yksiä suurimmista polyamiinipitoisuuksista elimistössä, ja eturauhassyövässä nämä pitoisuudet ovat kohonneet vieläkin suuremmiksi (Devens 2000). Kuitenkin eturauhassyövässä spermiinipitoisuus on alentunut, vaikka polyamiinien pitoisuudet kokonaisuudessaan ovatkin moninkertaistuneet (Giskeødegård 2013). ODC on polyamiinisynteesin keskeisin entsyymi, ja sen aktivaatio ja sitä seuraava polyamiinien määrän nouseminen on yhteydessä syövän kehitykseen ja kasvuun (Pegg 1988). ODC:n aktiivisuuden on osoitettu lisääntyneen eturauhassyöpäkudoksissa, sekä niiden tuottamissa eritteissä (Babbar 2011). Siemenneste normaalisti sisältää suuria määriä polyamiineja, jotka ovat peräisin eturauhasesta (Dunzendorfer 1978). Eturauhassyöpäsolujen on havaittu lopettavan kasvunsa tai ajautuvan apoptoosiin *in vitro*, kun ne on käsitelty polyamiinien metabolisten entsyymien inhibiittoreilla tai synteettisillä polyamiinianalogeilla. Polyamiinianalogit inhiboivat solun kasvua luultavasti käynnistämällä antisyymiin säätelemän ODC:n hajotuksen. (Schipper 2003.)

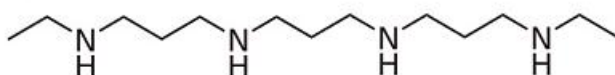
Munuaiskarsinoomassa, virtsanjohdinsyövässä sekä rakkosyövässä polyamiineja tuotetaan suurentuneita määriä. Etenkin spermiinin ja spermidiinin pitoisuudet olivat näissä syöpätyypeissä koholla. Toisaalta spermiini / spermidiini -suhteessa ei kuitenkaan ollut eroa verrattuna normaaliin kudokseen. (Koide 1990.) Syöpäpotilailla polyamiinipitoisuudet kohoavat sekä veressä että virtsassa (Linsalata 2002). Mikäli kasvain saadaan leikattua onnistuneesti, pitoisuudet veressä ja virtsassa palaavat normaalille tasolle. Jos syöpä uusiutuu, polyamiinien pitoisuudet nousevat uudestaan. (Kawakita 2006.) Lisäksi huomionarvoista on, että solut paitsi erittävät polyamiineja verenkiertoon, myös kykenevät ottamaan niitä verestä (Devens 2000). Onkin arveltu, että yritykset rajoittaa tuumorin kasvua polyamiinien synteesiä inhiboimalla eivät tästä syystä ole olleet kovin onnistuneita.

### 3.5 DENSPm

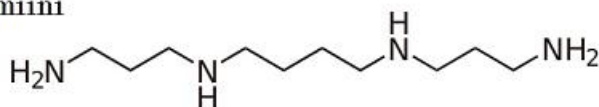
$N^1$ ,  $N^{11}$ -dietyylinorspermiini (DENSPm) on polyamiinianalogi, joka muistuttaa rakenteeltaan spermiinia (kuva 3). Sillä on osoitettu olevan syövältä suojaavia ominaisuuksia useissa solutyypeissä, sillä se vähentää polyamiinien synteesiä. DENSPm on tutkimuksen alaisena uudeksi syöpälääkkeeksi. Sen on osoitettu indusoivan apoptoosia niin kolorektaalisyövässä, rintasyövässä, melanoomassa, keuhkosityövässä, leukemiassa eturauhassyövässä kuin glioblastoomassakin. Sen käytöllä on myös osoitettu olevan synergistisiä etuja muiden yleisesti käytössä olevien kemoterapeuttien kanssa. (Jiang 2007). Mekanismit, joilla DENSPm saa aikaan solujen kuoleman eivät ole vielä täysin ymmärrettyjä.

DENSPm imitoi spermiinia ja muita polyamiineja, saaden aikaan ODC:n ja SAM-DC:n tuotannon alasajon, pysäyttäen solun oman polyamiinisynteesin. Tilanne johtaa solun täyttymiseen tästä polyamiinianalogista, joka ei tue sen kasvua eikä erilaistumista. (Wolff 2003.) DENSPm myös stimuloi polyamiineja asetyloivan SSAT:n synteesiä, ja näin lisää asetyloitujen polyamiinien eritystä solusta (Tian 2012). Samoin stimuloituvat polyamiineja hajottavat entsyymit PAO ja SMO (Wolff 2003). PAO ja SMO tuottavat toimiessaan suuret määrät soluille haitallista vetyperoksidia ( $H_2O_2$ ), joka lisää solun oksidatiivista stressiä ja saa aikaan monentyyppisten syöpäsolujen kuoleman (Jiang 2007, Seiler 1987). Lisäksi DENSPm vahingoittaa solujen mitokondrioita, saaden aikaan sytokromi C:n vapautumisen mitokondrioista. (Jiang 2007).

DENSPm



Spermiini



**Kuva 3.** DENSPm ja spermiini.

## 4 ELEKTRONISET NENÄT

### 4.1 Elektronisten nenien toimintaperiaate

Elektroniset nenät ovat laitteita, joita on käytetty jo pitkään mm. taistelukaasujen, räjähteiden ja huumausaineiden tunnistamiseen. Ne ovat pienikokoisia kannettavia laitteita, jotka antavat mittaustuloksen reaaliajassa ja kykenevät havaitsemaan haihtuvia yhdisteitä erittäin pieninä pitoisuuksina. Haihtuva aine sitoutuu ensin kemialliseen sensoriin, joka tuottaa sähköisiä signaaleja perustuen aineen ominaisuuksiin. Signaalit luokitellaan ja käsitellään matemaattisella algoritmilla tunnistettaviksi kuvioiksi.

Ihmisenä on paljon monimutkaisempi kuin elektroninen nenä, sisältäen 10 – 100 miljoonaa reseptoria, jotka kykenevät tuottamaan tarkan hajuaistimuksen pitoisuuksista, jotka lähentelevät muutamaa ppt:ta (parts per trillion) (Deisingh 2004). Elektronisten nenien etuna on, että ne pystyvät tunnistamaan ihmisnenälle hajuttomia kaasuja. Lisäksi niillä saatavat tulokset ovat tarkasti toistettavissa, sillä luotettavan kalibroinnin ansiosta niillä tehdyt mittaukset ovat objektiivisia. Ihmisnenän reaktio tunnistettavaan hajuun saattaa vaihdella päivästä toiseen, riippuen henkilön terveydentilasta, mielialasta tai ympäristöstä. Elektronisilla nenillä voidaan myös testata ihmiselle myrkyllisiä näytteitä. Toisaalta ne eivät ole herkkiä monillekaan aineille, jotka ihmisen nenä pystyy haistamaan. (Baldwin 2011.) Lisäksi ne ovat häiriöherkkiä taustalla vaikuttaville tekijöille, kuten ilman kosteudelle ja lämpötilalle (Montuschi 2013). Nämä mittausten taustakohinaa aiheuttavat tekijät on pyritty minimoimaan mm. paremmilla kalibraatiojärjestelmillä ja sisäänrakennetuilla algoritmeilla (Baldwin 2011).

Tarkin saatavilla oleva mittausten menetelmä haihtuvien yhdisteiden analysoimiseen on massaspektrometri. Se on hyvin tarkka, mutta samalla hidas ja kallis menetelmä. Sillä pystytään erittäin tarkasti tunnistamaan yksittäisiä molekyyliä. Massaspektrometri soveltuu kuitenkin huonosti useista molekyyleistä koostuvien, vaihtelevien hajuprofiilien kartoittamiseen. Näimpä sen käyttö on jäänyt vähälle.

## **4.2 Elektroniset nenät syövän tunnistamisessa**

Elektronisia neniä on onnistuneesti käytetty useiden eri syöpätyyppien tunnistamiseen potilasnäytteistä. Tähänastisissa tutkimuksissa eniten huomiota on saanut keuhkosityöpä, jossa on tutkittu potilaan uloshengitysilmaa. Machado työryhmineen saavutti elektronisella nenällä 71 % herkkyuden ja 91 % tarkkuuden verrattessaan keuhkosityöpäpotilaita kroonista keuhkosairautta sairastaviin sekä terveisiin verrokkeihin (Machado 2005). Eräässä toisessa tutkimuksessa keuhkosityöpä kyettiin erottamaan COPD:sta sekä terveistä kontrolleista 85 % tarkkuudella (Dragonieri 2009). Vielä parempiin tuloksiin päästiin D'Amicon tutkimuksessa 2010, jossa keuhkosityövän ja terveen verrokin välille saavutettiin 85 % herkkyys ja 100 % tarkkuus (D'Amico 2010). Edellä mainitut tutkimukset ovat perustuneet syövästä löydetyille hajuprofiileille, jotka ovat voineet kattaa useita kymmeniä orgaanisia haihtuvia molekyyliä.

Haihtuvina yhdisteinä polyamiinit ovat sopivia ehdokkaita syövän hajun selittäjäksi. Elektronisella nenällä on aiemmin kyetty tunnistamaan polyamiineja vesiliuoksista haihduttamalla. Polyamiinit spermiini, ornitiini, kadaveriini ja putreskiini voitiin erottaa vedestä pitoisuuksilla 0,1 M–0,1 mM (Roine 2010). Lisäksi kaksi eri eturauhassolulinjaa on kyetty erottamaan toisistaan elektronisella nenällä, saaden laitteen erottelukyvyyksi 96,4 - 97,1 % (Roine 2012).

## **5 AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **5.1 Solulinjat: LNCaP ja EP-156T**

Tutkimuksen solumalleina käytettiin eturauhassyövän solulinjaa LNCaP (Horoszewitz 1983), sekä eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun solulinjaa EP-156T (Kogan 2006). Molemmat solulinjat ovat olleet laajalti käytössä vastaavanlaisissa tutkimuksissa. LNCaP-solut ovat peräisin levinnyttä eturauhaskarsinoomaa sairastaneelta valkoihoiselta mieheltä, etäispesäkkeen sijaitessa vasemmassa supraklavikulaarisessa imusolmukkeessa. EP-156T -solut ovat peräisin 66-vuotiaan miehen eturauhasesta, ja ne ovat telomeraasi-immortalisoituja. EP-156T solut käyttäytyvät kuten eturauhasen tyvisolut.

Solulinjat kasvatettiin tuottajan ohjeiden mukaan. LNCaP: American Type Culture Collection (LGC Standards, Teddington, YK). EP-156T: V Rotter (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). LNCaP-linjan viljelynesteenä oli RPMI-1640 medium (BioWhitaker/Lonza), johon lisättiin 10 % naudan sikiön seerumia (HyClone Laboratories, Inc.) sekä 2 mM L-glutamiinia (BioWhitaker/Lonza). EP-156T-solujen viljelyneeste oli seerumitonta keratinosyyttiä (Gibco, Life Technologies), johon lisättiin 1 % standardoitua naudan sikiön seerumia (HyClone) sekä 5 ng/ml natriumseleniittiä (Sigma-Aldrich), 5 ng/ml epidermaalista kasvutekijää (Invitrogen), 50 µg/ml naudan aivolisäkeuutetta (Invitrogen), sekä 10 nM dihydrotestosteronia (A2570-000, Steraloids Inc). Viljelyssä käytettiin 100 x 20 mm soluviljelymaljoja (NUNC, International, NY, USA). Viljelynesteen määrä oli 10 ml.

Kasvun yltäessä 80 % konfluenssiin näytteet kerättiin analysoimista varten. LNCaP-solut saavuttivat tämän vaiheen keskimäärin neljässä vuorokaudessa, EP-156T-solut noin kuudessa. Viljelyneeste kerättiin talteen ja jäädytettiin (-80 °C). Solut käsiteltiin trypsiinillä ja sentrifugoitiin (200 x G, huoneenlämpö). Solut pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin uudelleen. Kontrollinäytteenä toiminut pelkkä viljelyneeste käsiteltiin myös edellä mainituilla tavoilla. Molemmista solulinjoista (LNCaP ja EP-156T) tehtiin kaksi viiden viljelmän (2 x 5) sarjaa. Toinen näistä sarjoista käsiteltiin DENSpm:llä. Näytteiden keräys tapahtui 0 ja 96 tunnin kohdalla. Aineistoksi kertyi yhteensä 20 näytettä soluja sekä 20 näytettä mediumia.

## **5.2 ChemPro100**

Tutkimuksessa käytettiin Environics OY:n valmistamaa kaupallista ChemPro 100 – kaasuanalysointilaitetta. Laite kytkettiin Windows UIP -ohjelmistoa hyödyntävään kannettavaan tietokoneeseen. Laitteisto sallii kemiallisen spektrin tallentamisen reaaliajassa myöhempää analysointia varten. ChemPro 100:n toiminta perustuu IMS-tekniikkaan (Ion mobility sensor). IMS-tekniikassa mittalaite analysoi imuilman hiukkasten massan ja varauksen, ja ilmoittaa mittauskennoissa sähkökentän ylläpitämiseen tarvittavan virran (pA), joka muuttuu hiukkasten koon ja varauksen mukaan. Molekyylin kykyä liikkua ilmassa määrittävät mm. molekyylin koko ja muoto. Analysointia varten molekyylit on ionisoitava. Laite käyttää Am-241-säteilylähdettä, jolla laitteeseen imetyt molekyylit ionisoidaan. Tämän jälkeen ionit ohjataan virtausputkeen, jossa ne kiihdytetään heikon sähkökentän avulla kohti detektoria. Ionien törmäily ilman molekyylin kanssa

haittaa niiden etenemistä, joten suuremmat ionit törmäilevät pienempiä voimakkaammin. Tähän perustuu ionien erittely koon ja muodon mukaan. Laitteistossa on elektrodeja, jotka reagoivat positiivisesti tai negatiivisesti varautuneisiin molekyyliihin. Yhteen laskettu mitattu arvo antaa informaatiota partikkelin luonteesta, mm. muodosta, koosta, konsentraatiosta, sekä varauksesta.

### **5.3 Mittausjärjestelyt**

Tutkittavat soluviljelynäytteet asetettiin lasisille 10 cm halkaisijaltaan oleville parafiinikalvolla peitetyille petrialjoille. Imuilmanäytteen ChemPro otti kanyyliputken kautta parafiinikalvoon tehdystä suljettavasta aukosta. Korvausilma toimitettiin paksulla neulalla. Mittaukset tehtiin laminaarivirtauskaapissa (Kojair). Näytteitä pidettiin 37 °C vesihauteessa 10 minuuttia ennen mittausta. Mittaukset suoritettiin keraamisissa kennoissa, joita oli 16. Mittaukset toistettiin myös erityisissä kaasujen havaitsemiseen tarkoitetuissa puolijohdekennoissa, joita oli 2 kappaletta. Mittauskennot kalibroitiin ja puhdistettiin isopropanolilla mittauskertojen välillä.

### **5.4 Tulosten analysointi**

Tulosten analysointi tapahtui Tampereen teknillisessä yliopistossa. Puolijohdekanavista (2 kpl) saatu aineisto jätettiin analyysin ulkopuolelle. Keraamisista kennoista (16 kpl) kerätty aineisto analysoitiin Matlab-ohjelmistolla (Mathworks, Natick, MA). Moniulotteinen, pienellä aineistolla tuotettu tulosjoukko edellyttää dimensioreduktiota. Dimensioreduktioon käytettiin principal component-analyysia (PCA), sekä multidimensional scaling (MDS) –menetelmää. Lisäksi määritettiin Mahalonbis-etäisyys (MD). Tulosdata esitettiin 2-ulotteisessa kaanonisessa kuvaajassa, jossa merkittävänä erona pidettiin  $MD > 3$ . Ristiinvalidointi tehtiin leave-one-out –menetelmällä, joka arvioi tulosten yleistettävyyttä. Tulokset visualisoitiin sammon mapping –menetelmällä.

Dimensioreduktiossa 6-ulotteinen aineisto supistetaan 2-ulotteisiksi scatter-diagrammeiksi, jotka ovat silmämääräisesti arvioitavissa. Kaksi eri menetelmää (PCA sekä MDS) tuottavat virheluokitteluprosentin kustakin kuudesta dimensiosta. Virheluokitteluprosentti kertoo, kuinka epävarmana luokittelua voidaan pitää. Eri menetelmillä tuotetuista virheluokitteluprosenteista voidaan myös laskea keskiarvo, joka antaa tarkemman arvion luokittelun onnistumisesta.

## 5.5 Tutkimushypoteesit

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, aiheuttavatko polyamiinit syöväälle ominaisen hajuprofiilin. Tässä hyödynnettiin kahta eturauhassolulinjaa, joista toinen (LNCaP) edusti eturauhassyöpää ja toinen (EP-156T) eturauhasen hyvänlaatuista liikakasvua, eli tervettä kudosta. Molemmat solulinjat käsiteltiin dietylinorspermiinillä (DENSpm), joka saa solut pumppaamaan polyamiineja solun sisältä solunulkoiseen tilaan, josta ne pääsevät edelleen haihtumaan. Kiinnostuksen kohteena oli, muuttaako DENSpm-käsittely solujen hajujälkeä. Jos näin kävisi, tukisi se käsitystä polyamiinien roolista syövän hajun aiheuttamina molekyyleinä.

Ensimmäiseksi haluttiin selvittää, eroavatko kahden solulinjan hajuprofiilit suhteessa toisiinsa alkuhetken ja 96 tuntia DENSpm-annostelun jälkeen. Seuraavaksi tutkittiin, muuttuvatko molempien solulinjojen hajuprofiilit alkuhetkestä 96 tunnin kohdalle. Tämän jälkeen selvitettiin, muuttuvatko solulinjojen viljelynesteen (mediumin) hajuprofiilit alkuhetkestä 96 tunnin kohdalle. Vertailtiin myös molempien solulinjojen solujen hajuprofiilia niiden viljelynesteiden hajuprofiileihin 0 tunnin kohdalla, sekä 96 tuntia DENSpm-annostelun jälkeen. Mikäli eturauhassyöpäsoluissa (LNCaP) ja niiden viljelynesteiden hajuprofiilissa ilmenisi muutos 96 tunnin kohdalla, voitaisiin polyamiineja pitää hajun aiheuttajana.



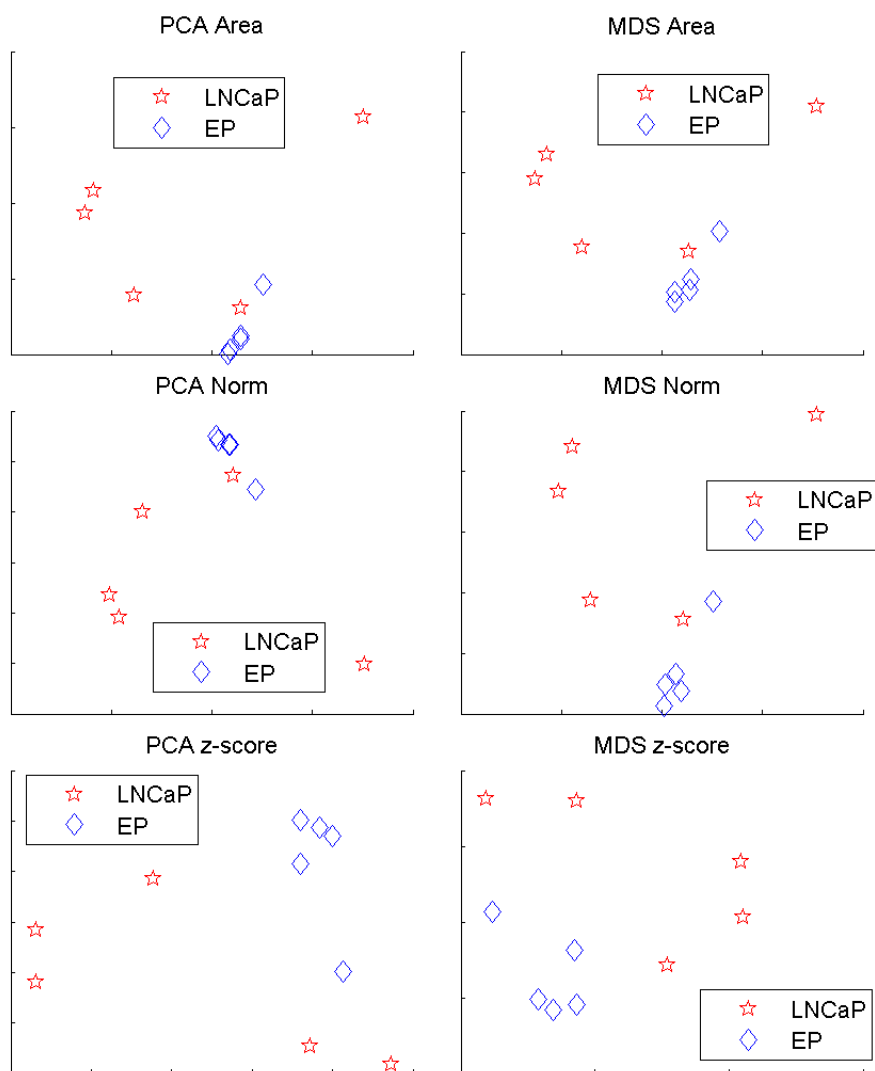
## 6 TULOKSET

Keskeiset tulokset on koottu taulukkoon 1.

**Taulukko 1.** Soluilla tehtyt ChemPro-mittaukset ja niiden tulokset. Tutkittavina olivat kahden eri solulinjan (LNCaP ja EP-156T) hajuprofiilit suhteessa toisiinsa eri ajanhetkinä, yksittäisten solulinjojen hajun muutos ajan kuluessa, viljelynesteiden (medium) hajun muutos ajan kuluessa, sekä yksittäisten solulinjojen ja niiden viljelynesteiden hajun muutos eri ajanhetkinä.

Mittaus	Aika	Erottelun onnistuminen
LNCaP vs. EP-156T	0 h	hyvä
LNCaP vs. EP-156T	96 h	hyvä
LNCaP	0 ja 96 h	kohtalainen
EP-156T	0 ja 96 h	heikko
LNCaP (medium)	0 ja 96 h	heikko
EP-156T (medium)	0 ja 96 h	ei eroa
LNCaP vs. LNCaP (medium)	0 h	kohtalainen
EP-156T vs. EP-156T (medium)	0 h	erinomainen
LNCaP vs. LNCaP (medium)	96 h	ei eroa
EP-156T vs. EP-156T (medium)	96 h	erinomainen

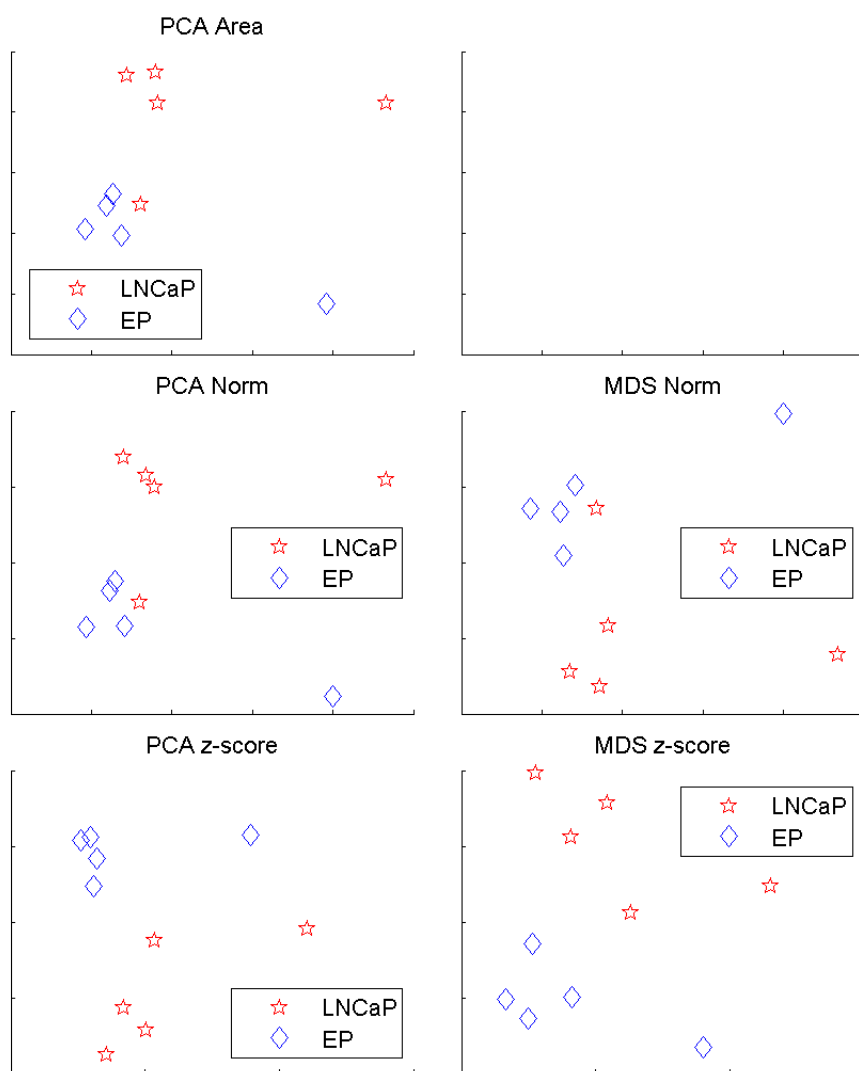
LNCaP-solulinjan ja EP-156T-solulinjan hajuprofiilit erosivat toisistaan merkittävästi sekä 0 tunnin (kuva 4, taulukko 2) että 96 tunnin kohdalla (kuva 5, taulukko 3). Tämä tarkoittaa että terve eturauhasen liikakasvu (EP-156T) ja eturauhassyöpä (LNCaP) voitiin erotella toisistaan hajujäljen perusteella luotettavasti. Virheluokitteluprosenttien keskiarvo oli 15 % 0 tunnin kohdalla, ja 12 % 96 tunnin kohdalla.



**Kuva 4.** LNCaP ja EP-156T-solujen hajuprofiilien erottelu 0 h kohdalla.

**Taulukko 2.** LNCaP ja EP-156T-solujen erottelu 0 h kohdalla. Virheluokitteluprosenttien tulokset eri dimensioissa, sekä niistä laskettu keskiarvo (KA). Eri menetelmien keskiarvoksi saadaan 15 %. LNCaP- ja EP-156T-solujen hajut eroavat toisistaan 0 tunnin kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	20	30	20	20	20	20
3	20	10	20	10	20	20
4	10	20	10	20	10	20
5	10	10	20	10	10	10
6	20	-	0	0	10	10
<b>KA</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>16</b>

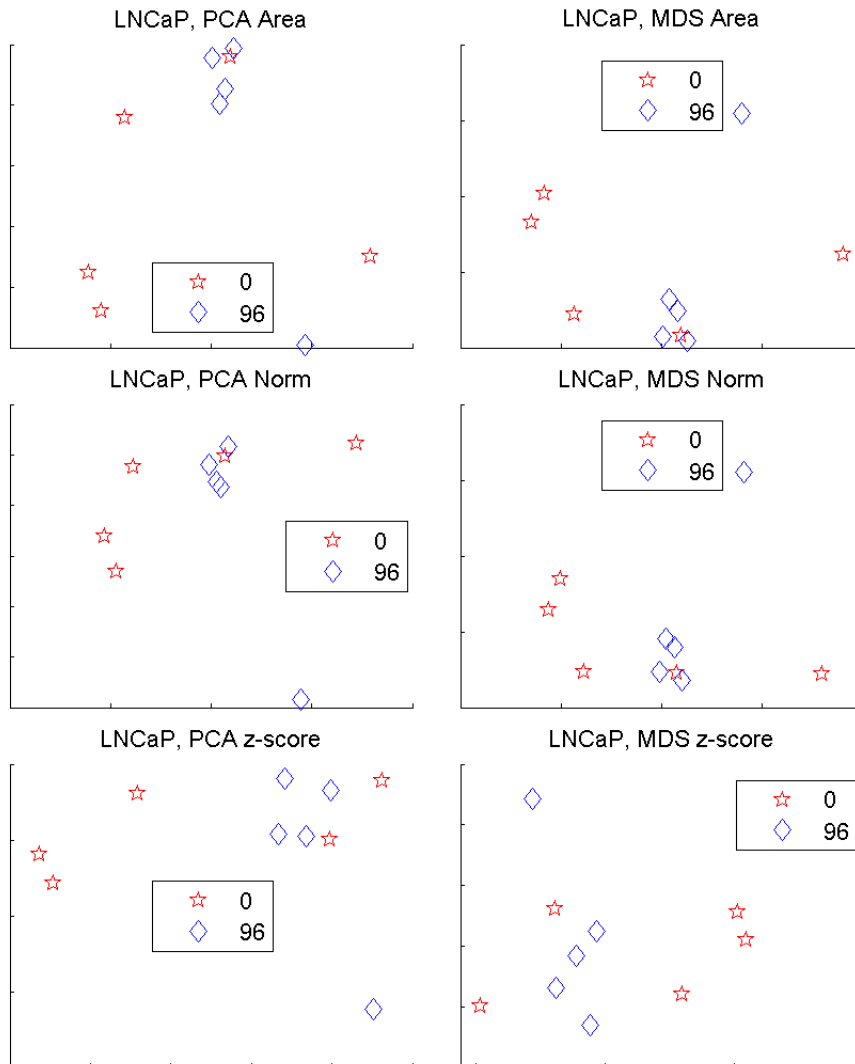


**Kuva 5.** LNCaP ja EP-156T-solujen hajuprofiilien erottelu 96 h kohdalla. MDS-Area on epäonnistunut.

**Taulukko 3.** LNCaP ja EP-156T-solujen erottelu 96 h kohdalla. Virheluokitteluprosenttien tulokset eri dimensioissa, sekä niistä laskettu keskiarvo (KA). Eri menetelmien keskiarvoksi saadaan 12 %, MDS-Area:n puuttuessa. LNCaP- ja EP-156T –solujen hajut eroavat toisistaan 96 tunnin kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	10	-	10	10	0	0
3	10	-	10	10	30	30
4	30	-	30	30	0	0
5	0	-	20	20	0	0
6	10	-	20	20	0	0
<b>KA</b>	<b>12</b>	<b>-</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

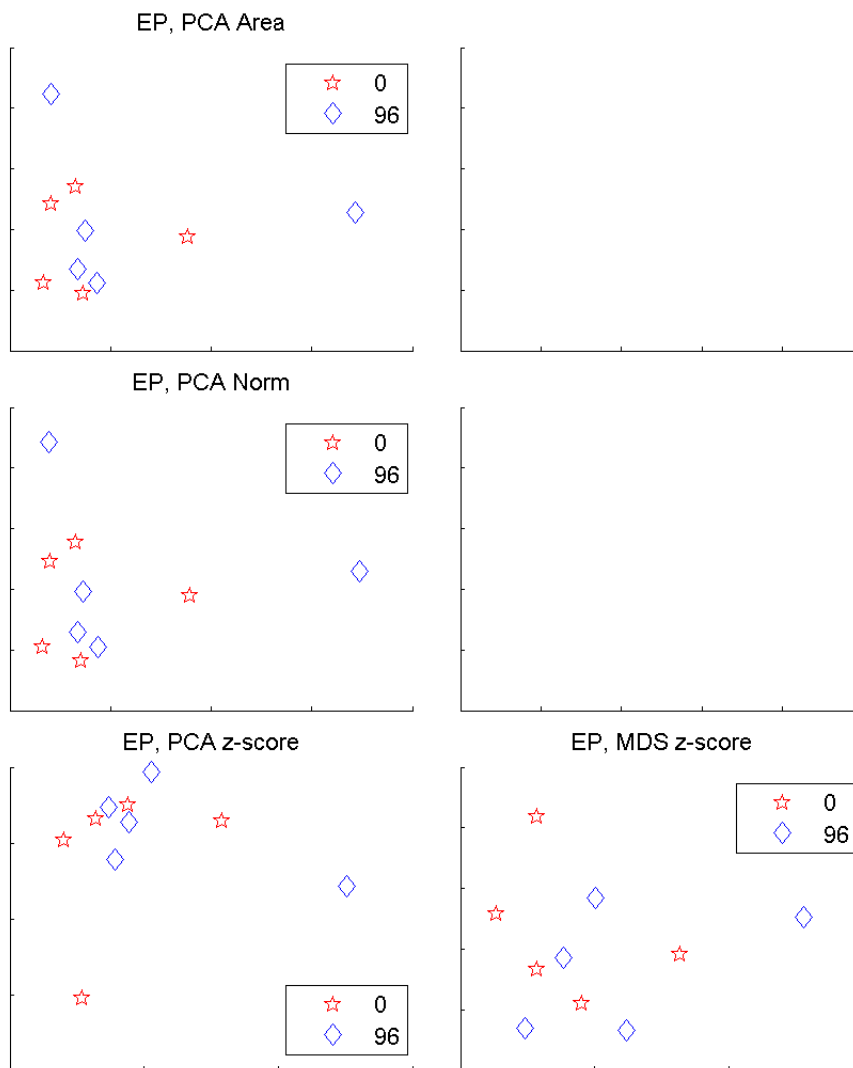
Eturauhassyöpäsolujen (LNCaP) hajuprofiili muuttui kohtuullisesti, kun DENSpm-annostelusta oli kulunut 96 h (kuva 6, taulukko 4). Sen sijaan eturauhasen terveen liikakasvun (EP-156T) hajuprofiilin ei havaittu muuttuneen merkittävästi 96 tunnin kohdalla (kuva 7, taulukko 5).



**Kuva 6.** LNCaP-solujen hajuprofiilin erottelu 0 h ja 96 h kohdalla.

**Taulukko 4.** LNCaP-solujen hajuprofiilin erottelu 0 ja 96 tunnin kohdalla DENSpm-annostelusta. Virheluokitteluprosenttien keskiarvoksi saadaan 33 %, joten luokittelu onnistuu kohtalaisesti. LNCaP-solujen haju muuttuu jonkin verran 96 tunnin kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	30	30	70	80	30	40
3	20	20	20	20	40	40
4	20	20	20	20	30	30
5	30	30	20	20	30	30
6	40	50	40	40	50	50
<b>KA</b>	<b>28</b>	<b>30</b>	<b>34</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>38</b>

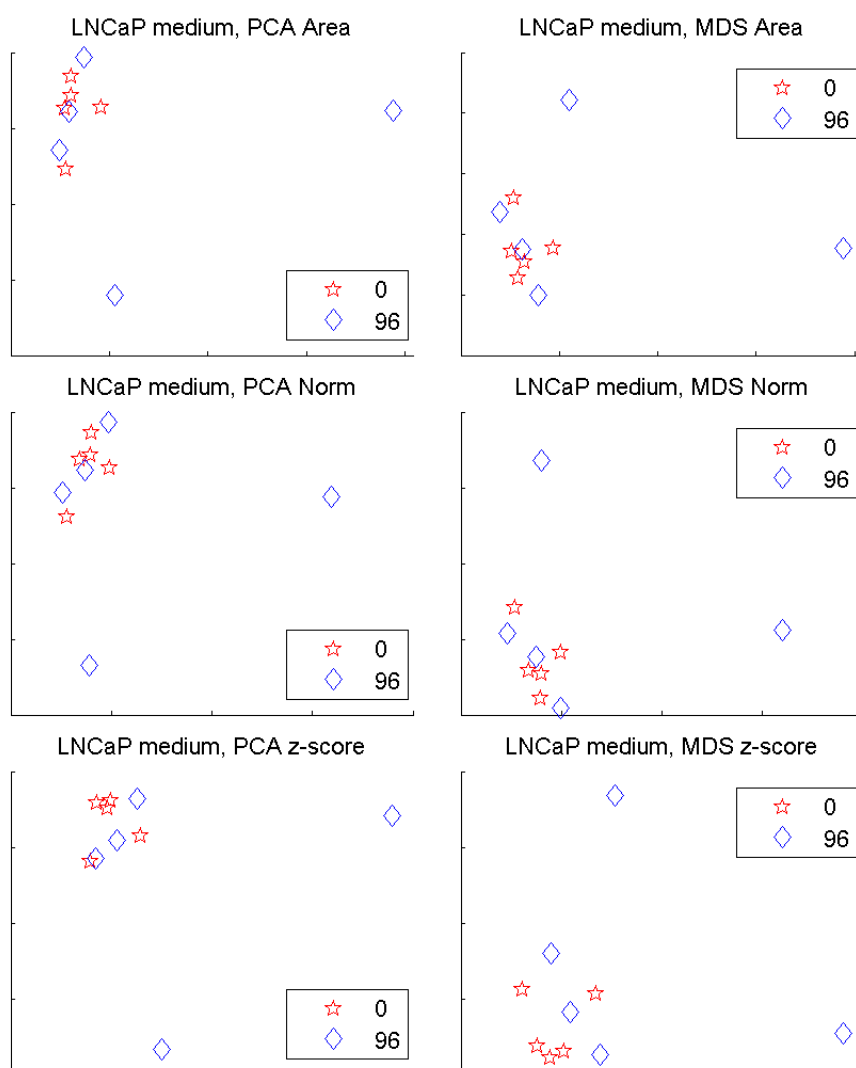


**Kuva 7.** EP-156T-solujen hajuprofiilin erottelu 0 h ja 96 h kohdalla.

**Taulukko 5.** EP-156T-solujen hajuprofiilin erottelu 0 ja 96 tunnin kohdalla DENSp<sub>m</sub>-annostelusta. Virheluokitteluprosenttien keskiarvoksi saadaan 45 %, keskihajonnan ollessa suuri (vaihteluväli 30 – 60 %). MDS-Area ja MDS-Norm epäonnistuivat. EP-156T-solujen haju ei oleellisesti muuttunut 96 tunnin kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	80	-	80	-	60	60
3	90	-	90	-	70	70
4	70	-	50	-	90	70
5	70	-	70	-	30	40
6	60	-	60	-	30	30
<b>KA</b>	<b>60</b>	<b>-</b>	<b>60</b>	<b>-</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

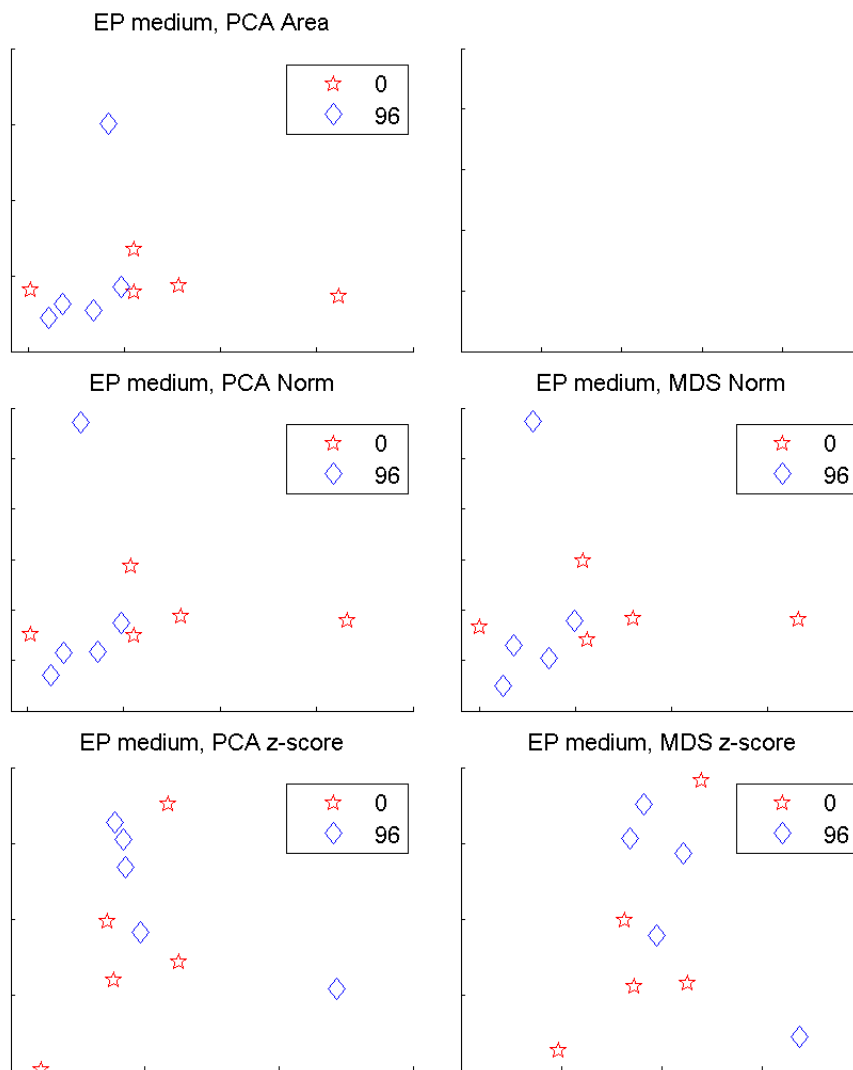
Kummassakaan solulinjassa viljelynesteen hajuprofiili ei oleellisesti muuttunut 96 tunnin kohdalla. LNCaP-solujen virheluokitteluprosentiksi saatiin 40 % (kuva 8, taulukko 6), ja EP-156T-solujen 54 %, vastaavasti (kuva 9, taulukko 7).



**Kuva 8.** LNCaP-solujen viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h ja 96 tunnin kohdalla.

**Taulukko 6.** LNCaP-solujen viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h ja 96 tunnin kohdalla. Virheluokitteluprosentiksi saadaan 40 %, joten luokittelu onnistuu huonosti. LNCaP-solujen viljelynesteen haju ei oleellisesti muuttunut.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	50	50	50	50	30	40
3	50	50	40	60	50	40
4	70	70	60	70	30	30
5	20	50	10	10	30	40
6	30	30	20	10	30	40
<b>KA</b>	<b>44</b>	<b>50</b>	<b>36</b>	<b>40</b>	<b>34</b>	<b>38</b>

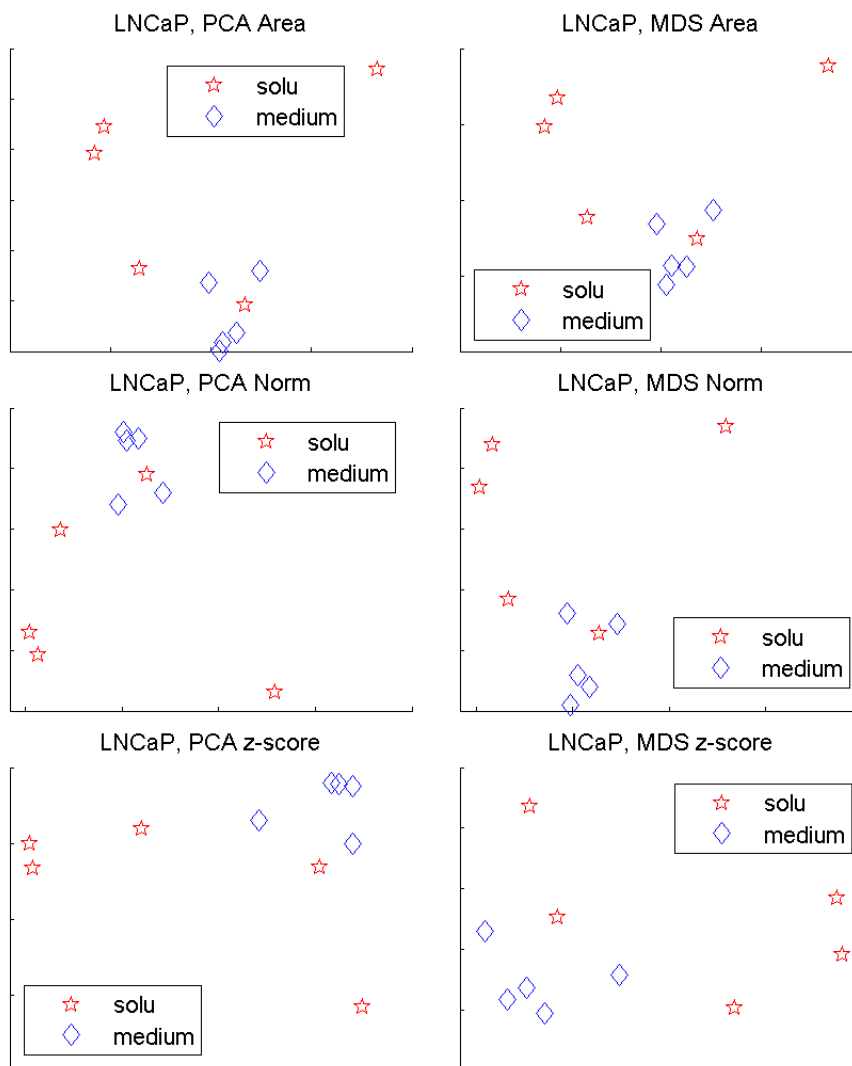


**Kuva 9.** LNCaP-solujen viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h ja 96 tunnin kohdalla.

**Taulukko 7.** EP-156T -solujen viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h ja 96 tunnin kohdalla. Virheluokitteluprosentiksi saadaan 54 %, joten luokittelu onnistuu huonosti. MDS-Area epäonnistui. EP-156T -solujen viljelynesteen haju ei oleellisesti muuttunut.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	40	-	40	40	40	50
3	50	-	40	80	60	60
4	50	-	50	40	60	50
5	60	-	40	60	60	50
6	70	-	70	70	70	60
<b>KA</b>	<b>54</b>	<b>-</b>	<b>48</b>	<b>58</b>	<b>58</b>	<b>52</b>

Eturauhassyövän (LNCaP) sekä eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun (EP-156T) solujen ja niiden viljelynesteiden hajuprofiilit erosivat toisistaan merkitsevästi 0 h kohdalla. LNCaP-solujen osalta luokittelu onnistui kohtuullisen hyvin (kuva 10, taulukko 8), ja EP-156T –solujen osalta erinomaisesti (kuva 11, taulukko 9).

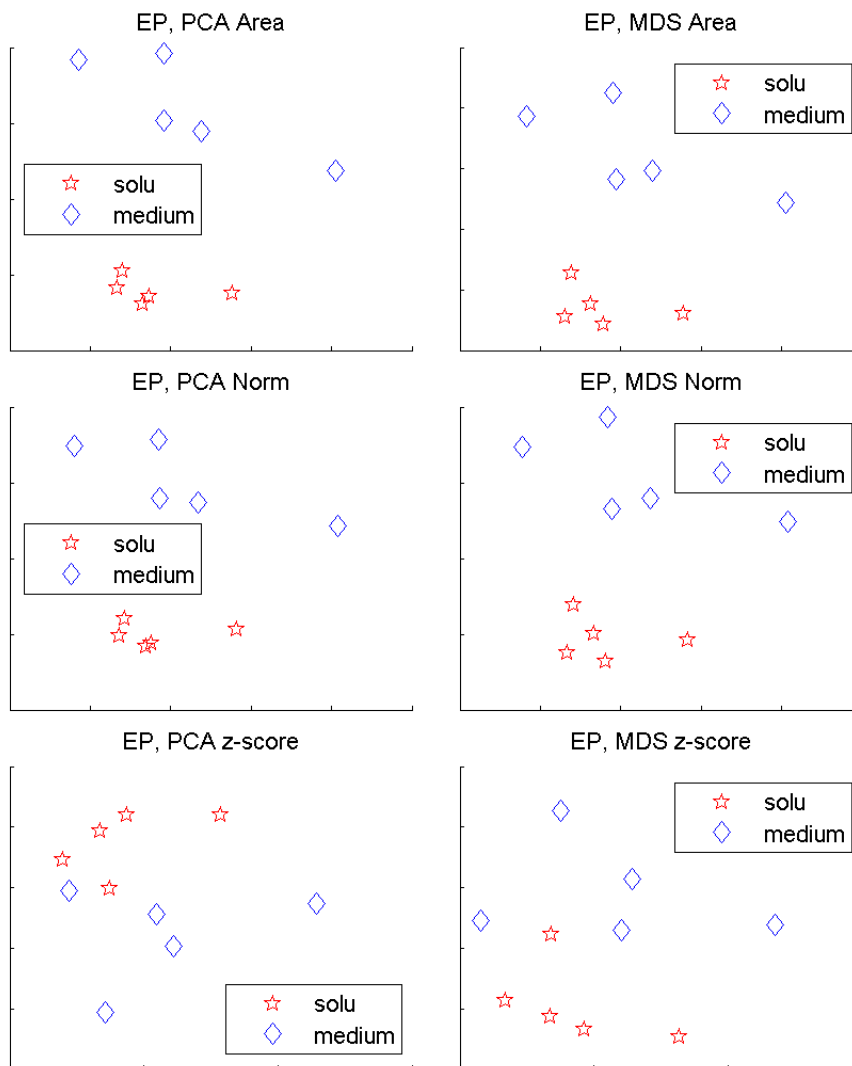


**Kuva 10.** LNCaP-solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h kohdalla DENSpm-altistuksesta.



**Taulukko 8.** LNCaP-solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h kohdalla DENSPm-altistuksesta. Virheluokitteluprosentiksi saadaan 21 %. LNCaP-solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilit eroavat toisistaan 0 h kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	30	30	20	30	10	20
3	30	40	30	30	10	10
4	30	30	40	40	10	0
5	40	40	20	40	0	0
6	10	0	10	10	0	10
<b>KA</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>24</b>	<b>30</b>	<b>6</b>	<b>8</b>

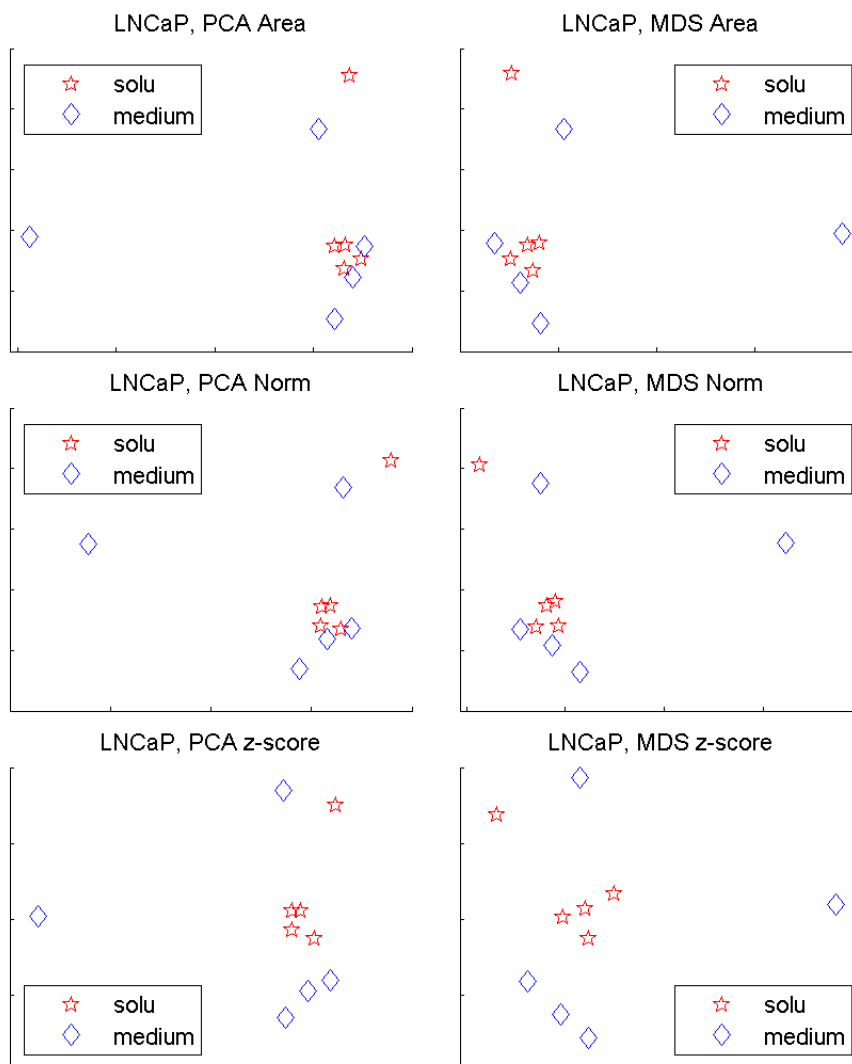


**Kuva 11.** EP-156T -solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h kohdalla DENSPm-altistuksesta.

**Taulukko 9.** EP-156T -solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 0 h kohdalla DENSPm-altistuksesta. Virheluokitteluprosentiksi saadaan 1 %. EP-156T -solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilit eroavat toisistaan 0 h kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	0	0	0	0	10	20
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	-	0	0	0	0
6	0	-	0	0	0	0
<b>KA</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>

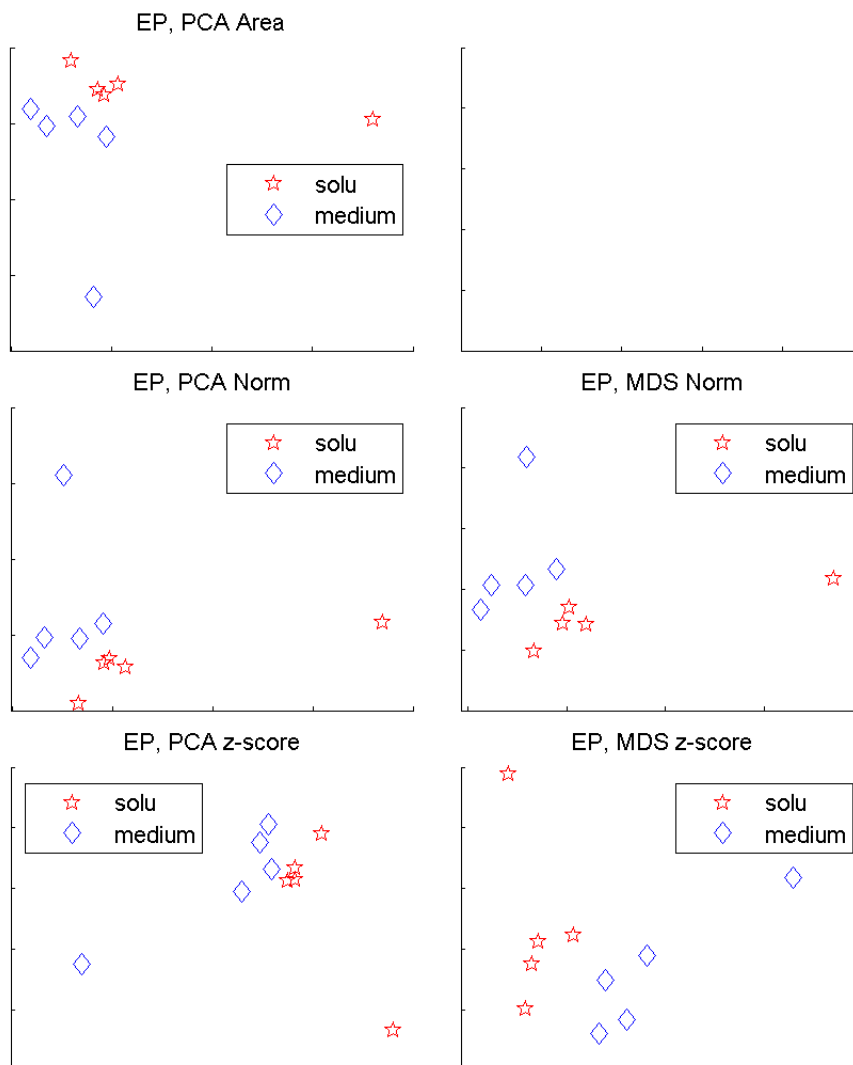
Sama vertailu toistettiin molemmilla solulinjoilla 96 h kohdalla. LNCaP-solujen ja niiden viljelynesteen haju ei eronnut toisistaan 96 h DENSPm -käsittelystä (kuva 12, taulukko 10). Sen sijaan EP-156T-solujen ja niiden viljelynesteen haju erosivat toisistaan, erottelun onnistuessa erinomaisesti (kuva 13, taulukko 11).



**Kuva 12.** LNCaP-solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 96 h kohdalla DENSpm-altistuksesta. Erottelu ei onnistu.

**Taulukko 10.** LNCaP-solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 96 h kohdalla DENSpm-altistuksesta. Virheluokitteluprosentiksi saadaan 52 %. LNCaP -solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilit eivät eroa toisistaan 96 h kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	60	50	60	50	30	40
3	80	80	80	80	20	30
4	70	60	70	60	40	40
5	40	50	50	50	50	40
6	60	50	50	50	50	50
<b>KA</b>	<b>62</b>	<b>58</b>	<b>62</b>	<b>58</b>	<b>38</b>	<b>32</b>



**Kuva 13.** EP-156T-solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 96 h kohdalla DENSpm-altistuksesta. Erottelu onnistuu erinomaisesti

**Taulukko 11.** EP-156-solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilin erottelu 96 h kohdalla DENSpm-altistuksesta. Virheluokitteluprosentiksi saadaan 4 %. EP-156T -solujen ja niiden viljelynesteen hajuprofiilit eroavat toisistaan 96 h kohdalla.

Dimensio	Area		Norm		z-score	
	PCA	MDS	PCA	MDS	PCA	MDS
2	0	-	0	0	0	0
3	10	-	10	0	0	0
4	10	-	0	0	0	0
5	0	-	0	0	10	0
6	10	-	10	10	10	10
<b>KA</b>	<b>6</b>	<b>-</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>

## 7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Keskeinen tulos oli, että eturauhassyöpäsolujen (LNCaP) ja eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun solujen (EP-156T) hajuprofiilit erosivat toisistaan. Syöväällä siis vaikuttaa olevan sille ominainen haju. Polyamiinien merkitys hajuun jää kuitenkin epäselväksi, sillä erottelu onnistui hyvällä tarkkuudella sekä lähtötilanteessa että 96 tuntia DENSpm-annostelun jälkeen. LNCaP-solujen hajuprofiilit erosivat toisistaan 0 ja 96 tunnin kohdalla hieman, mikä voisi mahdollisesti selittyä DENSpm:n aiheuttamilla apoptoottisilla muutoksilla. Samaa ei havaittu EP-156T-soluissa. Kummankaan solulinjan kohdalla ero viljelynesteen (medium) hajuun ei ollut merkittävä 0 tai 96 tunnin kohdalla. Hyvänlaatuisen eturauhasen liikakasvun (EP-156T) solujen haju eroaa merkittävästi niiden viljelynesteen hajusta sekä 0 että 96 tunnin kohdalla. LNCaP-solujen ja niiden mediumin ero 0 tunnin kohdalla oli kohtalainen, mutta 96 tunnin kohdalla eroa ei enää havaittu. Kaiken kaikkiaan tässä tutkimuksessa DENSpm:n vaikutus solujen hajuun polyamiinien ulospumppausta kiihdyttävänä tekijänä jää toteamatta.

## 8 POHDINTA

Tutkimus lähti siitä olettamuksesta, että DENSpm saisi syöpäsoluissa tehokkaasti aikaan polyamiinien asetyloimisen ja ulospumppauksen. Tämän olisi kuulunut näkyä selkeänä erona

syöpäsolujen ja niiden mediumin hajuissa 96 tunnin jälkeen (mutta ei vielä 0 tunnin kohdalla). Syöpäsolujen (LNCaP) ja niiden mediumin hajussa ei kuitenkaan havaittu eroa 96 tunnin kohdalla. Eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun (EP-156T) solujen ja niiden mediumin hajuissa sen sijaan havaittiin merkittävä ero sekä 0 tunnin että 96 tunnin kohdalla. DENSPm-lisäys ei selitä tätä havaintoa, koska ero havaittiin jo 0 tunnin kohdalla. LNCaP-solujen haju muuttui kohtalaisesti 96 tunnin kohdalla DENSPm-lisäyksestä, vaikka solujen ja niiden mediumin hajussa ei ollut eroa. DENSPm ei siis oletetulla tavalla tehostanut LNCaP-soluissa polyamiinien ulospumppausta, ja polyamiinit eivät voi selittää muutosta LNCaP-solujen hajuprofiilissa 96 tunnin kohdalla.

Erot LNCaP-solujen hajussa 0 ja 96 tunnin kohdalla saattavat selittyä DENSPm:n apoptoottisilla vaikutuksilla. Eturauhassyöpäsolujen on havaittu lopettavan kasvunsa tai ajautuvan apoptoosiin *in vitro*, kun ne on käsitelty synteettisillä polyamiinianalogeilla, kuten DENSPm. Polyamiinianalogit inhiboivat solun kasvua luultavasti käynnistämällä antisyymini säätelemän ODC:n hajotuksen. Ne pienentävät solujen polyamiinipitoisuutta vähentämällä niiden synteesiä ja lisäämällä niiden ulospumppausta, sekä lisäävät solun oksidatiivista stressiä saaden aikaan vetyperoksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tuotannon. Niiden on havaittu aikaansaavan apoptoosia useissa eri syöpätyypeissä. Tarkat mekanismit joilla polyamiinianalogit aikaansaavat apoptoosin, ovat kuitenkin vielä puutteellisesti ymmärrettyjä.

Eturauhassyöpäsolut ovat ilmeisesti herkempiä DENSPm:n vaikutuksille kuin eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun solut, vaikka molemmissa solutyypeissä polyamiinien kokonaistuotanto on suurentunut. Toisin kuin eturauhasen hyvänlaatuisessa liikakasvussa, eturauhassoluja leimaa matala spermiinipitoisuus. DENSPm alentaa spermiinin määrää entisestään, saamalla aikaan spermiinin asetylaation ja pumppauksen ulos solusta. Solu ei siedä näin matalia spermiinipitoisuuksia ja ajautuu apoptoosiin. DENSPm näyttääkin vaikuttavan eturauhassoluihin (LNCaP) ensisijaisesti sytostaatin tavoin. Tällaista vaikutusta ei havaittu eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun (EP-156T) soluissa.

## Viitteet

- Babbar N, Eugene GW. Targeting polyamines and inflammation for cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.* 188: 49-64. (2011)
- Baldwin EA, Bai J, Plotto A, Dea S. Electronic Noses and Tongues: Applications for the Food and Pharmaceutical Industries. *Sensors (Basel)*. 2011; 11(5): 4744–4766
- Casero RA, Jr., Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 6(5):373-390. (2007)
- D'Amico A, Pennazza G, Santonico G, Martinelli E, Roscioni C, Galluccio G, Paolesse R, Di Natala C. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer. *Lung Cancer.* May;68(2):170-6. (2010)
- Deisingh AK, Stone DC, Thompson M: Applications of electronic noses and tongues in food analysis. *Int J Food Sci Technol.* 39:587–604. (2004)
- Devens BH, Weeks RS, Burns MR, Carlson CL, Brawer MK. Prostate Cancer *Prostatic Dis.* 2000 Dec;3(4):275-279. Polyamine depletion therapy in prostate cancer.
- Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratú P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer.* May;64(2):166-70 (2009)
- Dunzendorfer U, Russell DH. Altered polyamine profiles in prostatic hyperplasia and in kidney tumors. *Cancer Res.* 38(8):2321-2324. (1978)
- Giskeødegård GF, Bertilsson H, Selnes KM, Wright AJ, Bathen TF, Viset T, Halgunst J. Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. *PLOS ONE* 8(4): e62375. doi: 10.1371/journal.pone.0062375. (2013)
- Hiramatsu K, Sugimoto M, Kamei S, et al. Diagnostic and prognostic usefulness of N1,N8-diacetylspermidine and N1,N12-diacetylspermine in urine as novel markers of malignancy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 123(10):539-545. (1997)
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. LNCaP model of human prostatic carcinoma. American association for cancer research. (1983)
- Ignatenko NA, Gerner EW, Besselsen DG. Defining the role of polyamines in colon carcinogenesis using mouse models. *J Carcinog.* 2011;10:10. (2011)
- Jiang R, Choi W, Hu L, Gerner EW, Hamilton SR, Zhang W. Activation of polyamine catabolism by N1,N11-diethylnospermine alters the cellular localization of mTOR and downregulates mTOR protein level in glioblastoma cells. *Cancer Biology & Therapy.* 6:10, 1644-16. (2007)
- Kawakita M, Hiramatsu K. Diacetylated derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers. *J Biochem.* Mar; 139(3):315-22. (2006)
- Kogan I, ym. hTERT-immortalized prostate epithelial and stromal-derived cells: an authentic in-vitro model for differentiation and carcinogenesis. *Cancer Research,* 66(7), pp.3531- 40. (2006)

Koide T, Sakai S, Kawada Y, Hara A, Sawada H. [Detection of polyamines by a new enzymatic differential assay. (8) Studies on tissue polyamine concentrations in patients with genitourinary malignant diseases]. *Hinyokika Kyo*. 36(10):1109-1116. (1990)

Käypä Hoito –suositus 2014, eturauhassyöpä.  
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=hoi11060>. (2014)

Linsalata M, Caruso MG, Leo S, Guerra V, D'Attoma B, Di Leo A: Prognostic value of tissue polyamine levels in human colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 22: 2465-2469. (2002)

Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, et al. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med*. 171(11):1286-1291. (2005)

Montuschi P, Mores N, Trove A, Mondino C, Barnes PJ. The Electronic Nose in Respiratory Medicine. *Respiration*. 85:72-84. (2013)

Pandey S., Ranade SA, Nagar PK. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Biosciences*. 25 (3):291-299 (2000)

Pegg AE: Perspectives in cancer research. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth as a target for chemotherapy. *Cancer Res*. 48:751-774. (1988)

Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res*. 62(15):4427-4433. (2002)

Roine A, Veskimäe E, Tuokko A, Kumpulainen P, Koskimäki J, Keinänen TA, Häkkinen MR, Vepsäläinen J, Paavonen T, Lekkala J, Lehtimäki T, Tammela TL, Oksala NKJ. Detection of Prostate Cancer by an Electronic Nose: A Proof of Principle Study. *The Journal of Urology*. Vol. 192, 230-235. (2014)

Roine A, ym. Detection of smell print differences between nonmalignant and malignant prostate cells with an electronic nose. *Future Medicine*. 2012; 8(9), 1157-1165.

Roine A, Mäkelä K. Munuaissyövän havaitseminen “elektronista nenää” käyttäen. TamPub 2010.

Seiler N. Functions of polyamine acetylation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 65(10): 2024-2035. (1987)

Schipper RG, Romijn JC, Cuijpers VM, Verhofstad AA. Polyamines and prostatic cancer. *Biochem Soc Trans*. 31(2):375-380. (2003)

Simoneau AR, Gerner EW, Phung M, McLaren CE, Meyskens FL, Jr. Alpha-difluoromethylornithine and polyamine levels in the human prostate: results of a phase IIa trial. *J Natl Cancer Inst*. 93(1):57-59. (2001)

Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. (2011)

Tian Y, Wang S, Wang B, Zhang J, Jiang R, Zhang W. Overexpression of SSAT by DENSPm treatment induces cell detachment and apoptosis in glioblastoma. *Oncol Rep*. 2012 Apr; 27(4):1227-1232

Wolff AC, Armstrong DK, Fetting JH, Carducci MK, Riley CD, Bender JF, Casero RA Jr., Davidson NE. A phase II study of the polyamine analog N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-diethylnorspermine (DENSPm) daily for five days every 21

days in patients with previously treated metastatic breast cancer. Clin Cancer Res. 2003 Dec 1; 9:5922-5928.  
Cancer Research. Dec; 9:5922-5928. (2003