

**ETURAUHASSYÖVÄN JA VIRTSARAKKOSYÖVÄN  
TUNNISTAMINEN ELEKTRONISEN NENÄN AVULLA**

Miki Sipiläinen ja Mikko Tolvanen  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Tammikuu 2014

---

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Dosentti Oksalan tutkimusryhmä

MIKI SIPILÄINEN JA MIKKO TOLVANEN: ETURAUHASSYÖVÄN JA VIRTSA-  
RAKKOSYÖVÄN TUNNISTAMINEN ELEKTRONISEN NENÄN AVULLA

Kirjallinen työ, 31 s.

Ohjaaja: Dosentti, LT, FT, Verisuonikirurgian erikoislääkäri Niku Oksala

Tammikuu 2014

Avainsanat: *Polyamiinit, VOC, solulinja, elatusneste, ChemPro 100 -kaasuanalysaattori, kemiallinen spektri, urologiset syövät, diagnostiikka*

---

Tämä syventäviksi opinnoiksi tarkoitettu työ on kolmas osa laajempaa tutkimuskokonaisuutta. Tutkimuksen tavoitteena on kehittää syöpien diagnostiikkaa, seuranta ja hoitoa.

Elimistön solut tarvitsevat proliferoituessaan endogeenisiä polyamiinikasvutekijöitä. Polyamiinit ovat haihtuvia orgaanisia yhdisteitä (VOC), jotka tuoksuvat voimakkaasti. Syöpäkudoksessa soluproliferaatio on kiihtynyt ja näin ollen myös polyamiinien synteesi häiriintynyt. Tämä johtaa polyamiinien pitoisuuksien kasvuun normaalisti toimivaan kudokseen verrattuna. Hajuominaisuutensa vuoksi polyamiineja voidaan pitää potentiaalisina kasvainkudosten markkerimolekyyleinä.

Tutkimushankkeen ensimmäisessä vaiheessa tutkittiin ChemPro 100-kaasuanalysaattorin (elektroninen nenä) kykyä tunnistaa polyamiineja kaasufaasista. Toisessa vaiheessa jatkettiin ensimmäistä vaihetta tutkimalla ChemPro 100:n polyamiinien tunnistamiskyvyn konsentraatorajaa. Tämän lisäksi toisessa vaiheessa tutkittiin ChemPro 100:n kykyä erottaa hyvänlaatuinen munuaiskudos pahanlaatuisesta ja munuaissyöpäpotilaiden virtsan kemiallista spektriä. ChemPro 100:lla analysoidut näytteet analysoitiin myös kaasukromatografilla. Tämän tarkoituksena oli varmentaa ChemPro 100:lla saadut mittausarvot ja selvittää menetelmien käytännön ongelmia. Aiemman tutkimuksen tärkein tulos on, että kaasukromatografilla tehdyissä mittauksissa osa pahanlaatuisista virtsanäytteistä eroaa merkittävästi hyvänlaatuisesta näytteestä.

Tutkimuksen kolmannesta vaiheesta, jota tämä tutkimusraportti käsittelee, julkaistiin artikkeli, Detection of smell print differences between nonmalignant and malignant prostate cells with an electronic nose, kansainvälisesti tunnetussa Future Oncol lehdessä vuonna 2012. Tässä tutkimusvaiheessa analysoimme ChemPro 100:n avulla kahta eturauhassolulinjaa ja yhtä virtsarakkosolulinjaa sekä niiden elatusnesteitä. Toinen eturauhassolulinja vastasi ominaisuuksiltaan hyvänlaatuista eturauhaskudosta ja toinen eturauhassyöpäkudosta. Virtsarakkosolulinja vastasi puolestaan virtsarakkosyöpäkudosta. Tutkimuksesta julkaistiin samana vuonna myös katsaus Duodecim-lehdessä.

Tutkimuksen tärkein tulos on, että ChemPro 100:n avulla kyettiin erottamaan normaalit eturauhassolut syöpäsoluista. Erotuskyky oli 95 %:n luokkaa. Virtsarakkosaluot eivät sen sijaan merkittävästi eronneet hyvänlaatuisista soluista. Analyysissä saatiin viitteitä siitä, että syöpäsolut muuttavat elatusnesteensä hajua. Tutkimuksen tulokset ovat merkittävät, sillä kyseessä on ensimmäinen kerta, kun elektronisen nenän käytön on osoitettu olevan tehokas keino urologisten syöpäsolujen tunnistamisessa. Elektronista nenää kehittämällä ja hyödyntämällä onkin mahdollista saada halpa ja kajoamaton menetelmä ainakin eturauhassyövän diagnostiikkaan ja seulontaan. Menetelmä vaatii kuitenkin vielä runsaasti kehitystyötä.

Olemme läpikäyneet tätä tutkimusraporttia varten aiemmin julkaistuja elektronista nenää koskevia tutkimuksia, urologisia lehtiä sekä hakeneet elektronista nenää koskevia tutkimuksia ja tapausselostuksia MedlineOvid- ja PubMed -tietokannoista. Cochrane-katsauksia (urologiset syövät) ja muita katsauksia on käyty läpi ajalta 2009-2013.

# SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	5
2 TEOREETTINEN VIITEKEHYS JA AIEMPI TUTKIMUS .....	7
2.1 Elektroniset nenät tautidiagnostiikassa .....	7
2.2 Urologiset syövät.....	9
2.2.1 Eturauhassyövän ilmaantuvuus .....	9
2.2.2. Virtsarakkosyövän ilmaantuvuus.....	10
2.3 Solulinjat .....	11
2.3.1 LNCaP-solulinja .....	11
2.3.2 EP-156T solulinja .....	12
2.3.3 Solulinja 5637.....	14
2.4 Ongelmat nykytekniikassa .....	15
2.5 Tutkimushypoteesit .....	16
3 MENETELMÄT .....	17
3.1 ChemPro 100.....	17
3.2 Näytteiden mittaaminen .....	17
3.3. Mittaustulosten analysointi: .....	18
3.4 Aineisto .....	20
4 TULOKSET .....	21
4.1 Eturauhassolulinja .....	22
4.2 Virtsarakkosolulinja .....	24
5 POHDINTA .....	26
5.1 Tutkimusmenetelmän arviointi.....	26
5.2 Johtopäätökset .....	27
5.3 Tulevaisuuden näkymät.....	27
LÄHTEET.....	30

# 1 JOHDANTO

Elimistön solut tarvitsevat endogeenisiä polyamiinikasvutekijöitä proteiini- ja nukleiinihapposynteesissä. Tämän vuoksi ne ovat välttämättömiä solun kasvulle ja normaalille toiminnalle. Polyamiinit ovat volatiilisia eli haihtuvia orgaanisia yhdisteitä (VOC) ja ne tuoksuvat voimakkaasti. Useissa erilaisissa tautitiloissa, kuten syövässä, autoimmuunisairauksissa, infektioissa ja erilaisissa aivoihin liittyvissä sairauksissa, on havaittu muutoksia luonnollisten polyamiinien pitoisuuksissa ja niiden metaboliaan liittyvien entsyymien toiminnassa. Syöpäkudoksessa soluproliferaatio on lisääntynyt ja polyamiinien synteesin säätely häiriintynyt. Tämä johtaa polyamiinien pitoisuuksien huomattavaan kasvuun kudoksissa. (Moinard ym. 2004.)

Potilailla, jotka sairastavat leukemiaa tai lymfoomaa tai joilla on histologisesti diagnosoitu kasvain, on todettu elimistössä olevan moninkertainen määrä polyamiineja. Suurentuneen polyamiinimäärän on osoitettu heijastuvan myös virtsaan kohonneena polyamiinimääränä. Polyamiinitason on puolestaan todettu laskevan lähelle normaalitasoa potilailla, joiden syöpä on saatu lääkehoidolla remissioon sekä potilailla, joilta syöpäkasvain on kirurgisesti poistettu. Onkin perusteltua ajatella, että tutkimalla virtsaan erittyvien polyamiinien määrää, on mahdollista jo varhaisessa vaiheessa tunnistaa syöpäkasvain. Jo vuonna 1971 Diane ym. esittivät tämän hypoteesin virtsaan erittyvistä polyamiineista ja osoitti sen harvoja poikkeuksia lukuun ottamatta todeksi. Poikkeuksena olivat keskushermoston syöpää sairastavat potilaat, joilla virtsan polyamiinipitoisuudet eivät merkittävästi nousseet. (Russell ym. 1971.) Syöpäsolut siis tuottavat suuria määriä polyamiineja. Tämä on osoitettu erityisesti munuaisyövässä, rakkosyövässä ja eturauhassyövässä (Koide ym. 1990). Polyamiinien merkityksestä myös muissa syövässä on vahvaa näyttöä (Casero & Marton 2007).

Aikaisemmissa tutkimuksissa koirien on osoitettu tunnistavan muun muassa poikkeavia ihomuutoksia, virtsarakkosyöpää sairastavat virtsan hajun ja keuhkosyöpää sairastavat hengitysilman perusteella. (Ehmann ym. 2012, Williams & Pembroke 1989). Onkin epäilty, että syövällä on ominaishaju. On myös perusteltua ajatella, että polyamiinit ovat tuon hajun taustalla. Dosentti Oksalan tutkimusryhmä on aiemmassa tutkimusvaiheessa osoittanut elektronisen nenän kykenevän tunnistaa eri polyamiineja. Herääkin ajatus siitä, että elektronisen nenän avulla voisi olla mahdollista objektiivisesti tunnistaa syöpäpotilas.

Kokonaisuudessaan tutkimus toteutetaan useammassa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa tutkittiin elektronisen nenän kykyä tunnistaa eri polyamiineja ja toisessa vaiheessa tutkittiin elektronisen nenän kykyä erottaa hyvänlaatuinen munuaiskudos pahanlaatuisesta. Kolmannessa vaiheessa, jota tämä tutkimusraportti käsittelee, tutkittiin elektronisen nenän kykyä tunnistaa pahanlaatuiset urologiset syöpäsolulinjat ja erottaa ne hyvänlaatuisista. Tutkimuskokonaisuus jatkuu edelleen. Parhaillaan ovat käynnissä oikeiden syöpäpotilaiden virtsanäytteiden tutkimukset.

Vaiheessa kolme tutkimuskohteiksi valikoitui kolme urologista solulinjaa: eturauhassyöpäsolulinja LNCaP, virtsarakkosyöpäsolulinja 5637 (ATCC nro HTB-9), sekä telomeraasi-immortalisoitu uroteelilinja (EP-156T). Analysoimme siis ChemPro 100:n avulla kahta eturauhassolulinjaa ja yhtä virtsarakkosolulinjaa sekä niiden elatusnesteitä. Toinen eturauhassolulinja vastasi ominaisuuksiltaan hyvänlaatuista eturauhaskudosta ja toinen eturauhassyöpäkudosta. Virtsarakkosolulinja vastasi puolestaan virtsarakkosyöpäkudosta.

## 2 TEOREETTINEN VIITEKEHYS JA AIEMPI TUTKIMUS

### 2.1 Elektroniset nenät tautidiagnostiikassa

Elimistön tiettyjen metabolisten muutosten tiedetään olevan yhteydessä tyypillisiin hajuihin. Elimistön tuottamat hajut sisältävät erilaisia volatiilisia orgaanisia yhdisteitä, joita voidaan havaita ja mitata hengitysilmosta, hiestä ja muista ihmisen eritteistä. Kokeet erityiskoulutetuilla koirilla ovat osoittaneet, että koirat kykenevät haistamaan ja tunnistamaan erilaisia tautitiloja kuten syövän, hypoglykemian tai hyperglykemian. Vieläkään ei tarkasti tiedetä, mitä hajukomponentteja nämä koirat tunnistavat ja mitkä hajun komponentit ovat yhteydessä kuhunkin sairauteen. Jos tiedettäisiin nämä tautispesifiset hajukomponentit, olisi elektronisen hajuntunnistussysteemin kehitys huomattavasti helpompaa. (Voss ym. 2013.)

Aiemmat tutkimukset ovat todistaneet, että mikro-organismit tuottavat monia volatiilisia eli haihtuvia orgaanisia yhdisteitä (VOC), kuten polyamiineja, alkoholeja, alifaattisia happoja ja hiilivetyjä. Näillä kaikilla yhdisteillä on todettu olevan luonteenomainen haju. Tämän vuoksi näitä yhdisteitä on mahdollista käyttää biomarkkereina tautidiagnostiikassa. (Turner ym. 2004.)

Kaasukromatografia-massaspektrometriaa käyttämällä on jo vuosia pystytty identifioimaan ja mittaamaan yksittäisiä molekyyliä hyvinkin suurella tarkkuudella. Vuonna 2004 Turner ym. osoittivat kaasukromatografia-massaspektrometriaa käyttämällä, että esimerkiksi keuhkosityöpää tai rintasyöpää sairastava potilas on mahdollista erottaa hengitysilmaa analysoimalla. Montuschi ym. (2013) puolestaan osoittivat samanlaista menetelmää käyttämällä, että useita volatiilisia orgaanisia yhdisteitä pystytään identifioimaan sekä terveiden että hengityselinten sairautta sairastavien ihmisten uloshengitysilmosta. Myös elektronisen nenän avulla näitä yhdisteitä (VOC) analysoimalla tutkimusryhmä pystyi erottelemaan astmaa, COPD:tä ja keuhkosityöpää sairastavat potilaat toisistaan ja terveistä verrokeista. Kaasukromatografia-massaspektrometria –menetelmä on toki elektronista nenää huomattavasti tarkempi, mutta sillä on ongelmansa. Sitä ei ole suunniteltu erottelemaan volatiilisten yhdisteiden seoksia, menetelmä on kallis, vie runsaasti aikaa ja näytteiden sekä mittausdatan analysointi on haastavaa. Tämän vuoksi kaasukromatografia-massaspektrometria –menetelmä ei sovellu kliiniseen diagnostiikkaan. (Montuschi ym. 2013.)

Vuonna 1982 Persaud ja Dodd kehittivät ensimmäinen elektronisen nenän. Tämän jälkeen ja erityisesti viimeisen kahden vuosikymmenen aikana, elektronisen nenän kehitystyö on ollut nopeaa. Elektronisen nenän peruseräite on matkia biologisen nenän toimintaa. Ne ovat kädessä pidettäviä, kannettavia laitteita, joissa on joukko hajusensorikenoja. Kennot tunnistavat ilmassa olevia haihtuvia molekyyliä ja laite tuottaa mittausdataa reaaliajassa. Kyseessä on lähinnä laadullinen havainnointi, jossa molekyyliä pyritään erottamaan toisistaan. (Turner ym. 2004.)

Elektronisen nenän toiminnassa on kolme vaihetta: (1) volatiilinen ainesosa kiinnittyy hajusensoriin; (2) sensori aktivoituu ja tuottaa ainesosalle spesifisen signaalin; (3) laitteen useiden hajusensorien tuottama tieto integroidaan ja tämän signaalitiedon perusteella eri ainesosat pystytään erottamaan toisistaan. Ihmisen hajuistin ja keinotekoisien nenän välillä myös on tiettyjä merkittäviä eroja. Järjestelmät kykenevät erottamaan luonteeltaan erilaisia volatiilisia orgaanisia yhdisteitä ja ne ovat eri tavalla alttiita ympäristön olosuhteille kuten ilmankosteudelle ja lämpötilalle. Ihmisen hajuisti on paljon monimutkaisempi järjestelmä kuin keinotekoinen nenä. Ihmisen nenän hajuepoteeli käsittää 10-100 miljoonaa hajureseptoria, joihin kiinnittyy lukematon määrä reseptoreille spesifisiä yhdisteitä. Elektroniset nenät kykenevät puolestaan tunnistamaan ja erottamaan myös ei-tuoksuvia kaasuja kuten hiilimonoksidin, mutta laitteen sensorit eivät ole yhtä herkkiä monillekaan ihmisen nenän tunnistamille yhdisteille. Elektroninen nenä on ihmisenä alttiimpi ympäristön vaikutuksille. Sen tuottamaan dataan vaikuttavat muut ilmassa yhtä aikaa leijuvat haihtuvat yhdisteet, ilmankosteus ja lämpötila. (Montuschi ym. 2013.)

Jo vuosia sitten elektronisia neniä on käytetty onnistuneesti laadunvalvonnassa muun muassa elintarviketeollisuudessa ja farmasiassa sekä haitallisten kaasujen tunnistamisessa auto- ja metalliteollisuudessa. Elektronisen nenän hyödyntäminen myös lääketieteen saralla on lisääntynyt viime vuosina nopeasti. Elektronista neniä on käytetty onnistuneesti ainakin bakteri- ja virtsatieinfektiodiagnostiikassa. Lisäksi elektronisella nenällä hengitysilmaa analysoimalla on tunnistettu skitsofrenia- ja diabetespotilaita sekä astma- ja keuhkosityöpötilaita. Voss ym. (2013) osoittivat tutkimuksessaan elektronisen nenän kykenevän tunnistaa munuaisten vajaatoimintaa sairastavat terveistä potilaista 100 %:n erotuskyvyllä. Elektroninen nenä kykeni erottamaan myös maksakirroosia ja alkoholiriippuvuutta sairastavat terveistä verrokeista. Sama tutkimusryhmä osoitti, sydämen vajaatoiminnan aiheuttavan muutoksia elimistön metaboliaan ja sitä kautta muutoksia hien koostumukseen ja volatiilisten yhdisteiden määriin. Tutkimus osoitti elektronisen nenän erottavan kompensaatiossa olevaa sydämen vajaatoimintaa sairastavat potilaat terveistä verrokeista 85 %:n tarkkuudella. (Voss ym. 2013.)



Edellä mainitut tutkimustulokset antavat luotettavan todistuksen siitä, että elektroninen nenä kykenee tunnistamaan suuren osan metabolisista muutoksista ja sitä kautta elimistön fysiologiset ja patofysiologiset mekanismit. Onkin aiheellista olettaa, että elektronisen nenän avulla pystytään havaitsemaan tautitiloja. Kun vielä huomioidaan syöpäkudoksen lisääntynyt soluproliferaatio ja sitä kautta myös volatiilisten yhdisteiden suurentunut tuotto, syövän erottaminen on varmasti jopa herkempää kuin monien muiden tautitilojen.

## **2.2 Urologiset syövät**

### **2.2.1 Eturauhassyövän ilmaantuvuus**

Eturauhassyöpä on maailmanlaajuisesti miesten toiseksi yleisin syöpä. Sen maailmanlaajuinen ilmaantuvuus vuonna 2008 oli noin 900 000 ja kuolleisuus 258 000 tapausta vuodessa. (Cancer Research UK.) Eturauhassyöpä on yleisin teollistuneissa länsimaissa, kuten Pohjoismaissa, Länsi-Euroopassa ja Yhdysvalloissa, jossa se on tummaihoisilla yleisempi kuin valkoihoisilla. Vähiten eturauhassyöpää esiintyy Japanissa ja Kiinassa. Tunnettuja riskitekijöitä ovat runsas rasvan käyttö, lihavuus, tupakointi, tulehdukselliset sairaudet ja beetakaroteeni. (Merril ym. 1997.) Skandinaavisessa kaksostutkimuksessa osoitettiin ympäristötekijöillä olevan suurempi merkitys eturauhassyövän kehittymisessä kuin perinnöllisillä tekijöillä (Lichtenstein ym. 2002).

Suomessa eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä. Vuonna 2005 todettiin 5539 uutta tapausta ja eturauhassyövän ikävakioitu ilmaantuvuus oli 100 tapausta 100 000:ta henkeä kohti. Samana vuonna eturauhassyöpään kuoli 776 miestä. Ilmaantuvuuden ennustetaan olevan edelleen nousussa. Myös kuolleisuudella mitattuna eturauhassyöpä on miehillä yleisin syöpä. Vuosittain eturauhassyöpään kuolee Suomessa lähes 800 miestä. (Suomen syöpärekisteri.)

Eturauhassyövän ennusteen kannalta tärkeimmät tekijät ovat kasvaimen levinneisyys, syövän erilaistumisaste ja kokonais-PSA-pitoisuus diagnosoitavaksi (Lu-Yao ym. 1997). Taudin varhainen diagnosoiminen parantaa ennustetta. Ongelmana on kuitenkin se, että varhaisvaiheen eturauhassyöpä on usein hyvin oireeton ja tutkimuslöydökset vähäisiä. Näin ollen kliininen diagnostiikka saattaa olla hankalaa.

Eturauhassyövän seulonta on jo pitkään ollut kiistelty aihe. Eturauhassyöpä täyttää suuren joukon seulonnalle asetettavia ehtoja. Sillä on suuri kansanterveydellinen merkitys, varhaisvaiheen eturauhassyöpä on mahdollista hoitaa parantavasti, eikä taudille ole primaaripreventiota. Eturauhassyövälle tällä hetkellä olemassa olevia seulontamenetelmiä ovat PSA-pitoisuuden määrittäminen, rektaalinen palpaatio ja transrektaalinen kaikututkimus. On todettu, että PSA-pitoisuutta voidaan pitää varsin elinspesifisenä mutta ei syövälle spesifisenä. Pitoisuus saattaa suurentua myös eturauhasen hyvänlaatuisessa liikakasvussa ja eturauhastulehduksessa. PSA-pitoisuuden määrittäminen ei siis ole riittävän sensitiivinen eturauhassyövän seulonnassa. Tämän vuoksi rutiinimaista seulontaa eturauhassyövän löytämiseksi ei voida toistaiseksi suositella. (Wolf ym. 1996.)

Voidaankin todeta, että eturauhassyövän seulontaan ja diagnostiikkaan tarvittaisiin uusia sensitiivisempiä menetelmiä, koska varhainen diagnoosi on merkittävästi ennustetta parantava tekijä.

### **2.2.2. Virtsarakkosyövän ilmaantuvuus**

Virtsarakkosyöpä on maailman seitsemänneksi yleisin syöpä ja sen ilmaantuvuus on suurin teollisuusmaissa. Tupakanpolto ja ammattialtistus kemikaaleille (aromaattisille amiineille) ovat rakkosyövälle altistavista vaaratekijöistä tärkeimmät. Työperäiset syöpää aiheuttavat aineet (karsinogeenit), etupäässä väriteollisuudessa käytetyt aromaattiset amiinit, aiheuttavat jopa joka neljännen rakkosyövästä maailmanlaajuisesti. (Blanco ym. 2007, Kirkali ym. 2005.)

Virtsarakkosyöpä on Suomessa miesten neljänneksi ja naisten kahdeksanneksi yleisin syöpä. Vuonna 2009 todettiin 898 uutta tapausta, joista naisilla vajaa neljännes. Tautiin kuolee vuosittain noin 230 potilasta. (Suomen syöpärekisteri.) Uusiutumistaipumus on erittäin tyypillistä virtsarakon syövälle riippumatta levinneisyydestä tai erilaistumisasteesta. Suuresta uusiutumistaipumuksesta johtuva jatkuvan seurannan ja hoidon tarve tekee rakkosyövästä yhden kalleimmista syövästä (Riley ym. 1995).

Perustutkimuksina virtsarakkosyöpää epäiltäessä ovat virtsan tutkiminen verivirtsaisuuden toteamiseksi ja virtsan irtosolututkimus. Nämä menetelmät ovat nopeita, edullisia ja potilaan

kannalta helppoja, mutta ongelmana on, että niiden sensitiivisyys ja spesifisyys ovat huonoja. Tämän vuoksi virtsarakkosyöpää epäiltäessä joudutaan usein tekemään rakon tähystys eli kystoskopia. Kystoskopia on invasiivinen ja potilaalle ikävä tutkimus. Voidaankin todeta, että tilausta uudelle, edulliselle ja non-invasiiviselle diagnoosi- ja seulontamenetelmälle on todella paljon.

## **2.3 Solulinjat**

### **2.3.1 LNCaP-solulinja**

LNCaP-solulinja on luotu eturauhasen adenokarsinooman metastaasista. Metastaasi on kasvanut subclavikulaarisessa imusolmukkeessa. LNCaP-solut kasvatettiin valmistajan ohjeen mukaisesti soluviljelyalustoilla (koko: 100x20 mm) 10 ml:ssa solujen elatusnestettä.

LNCaP-solut kasvavat helposti maljalla jakaantuen puolikiinteässä elatusaineessa. Nämä solut ovat erittäin vastustuskykyisiä ihmisen fibroblastien interferoneille ja niillä on huomattu olevan useiden merkitsevien kromosomien osalta samanlainen karyotyyppi kuin miehellä. LNCaP-soluissa on saatu säilytettyä syöpää aiheuttavat ominaisuudet. Syövän muodostuskyvyn säilymistä testattiin hiirillä, joilta oli poistettu kateenkorva. Kun hiiriin pistettiin LNCaP-solulinjan soluja, hiiret muodostivat syövän pistoalueelle. Tutkimuksissa on myös todettu, että solujen toiminnalliset erot ovat säilyneet. Sekä syöpäkudoksen solut että viljellyt solulinjan solut tuottavat fosfataasihappoa. Näiden molempien solujen sytosolissa ja tumassa on todettu esiintyvän korkean affiniteetin androgeenireseptoreja ja estrogeenireseptoreita. LNCaP-solulinjan solujen on myös todettu reagoivan herkästi hormoneihin. Solumaljalla 5-alfa-dihydrotestosteroni muutti solujen kasvua ja lisäsi fosfataasihapon eritystä. (Horoszewicz ym. 1983.)

Tutkittaessa ihmiselimistön syöpäsoluja havaittiin, että sukupuoli vaikuttaa tuumorin kehittymisnopeuteen. Tutkimuksissa todettiin myös, että uros hiiret kehittivät tuumorin aikaisemmin ja nopeammin kuin naaras hiiret. Hormonaalinen manipulointi osoitti, että riippumatta sukupuolesta, tuumorin kehittymisnopeus korreloi seerumin androgeenipitoisuuteen. Tuumorin kasvunopeus on siis riippuvainen sukupuolesta ja kantajan hormonaalisesta tilasta. (Horoszewicz ym. 1983.)

LNCaP-solut ovat kromosomistoltaan poikkeavia. Niillä on täydellinen ihmisen kromosomisto sisältäen Y-kromosomin, mutta tämän lisäksi niillä on useita merkkikromosomeja. Niiden karyotyyppi on täysin erilainen kuin aiemmin käytetyissä HeLa-soluissa. HeLa-solut otettiin virheellisesti tarkemmin määrittelemättömästä syöpäsolulinjasta. (Horoszewicz ym. 1983.)

Koska LNCaP-solulinjan solut pohjautuvat ihmisen eturauhassyöpäsoluihin, soluilla on tutkimuksen kannalta useita hyviä ominaisuuksia. Soluilla on täysin sama morfologia. Lisäksi toiminnallisten erojen ja syöpäominaisuuksien on todettu säilyneen hiirillä tehdyissä tutkimuksissa. Soluviljelmissä, solujen elatusnesteessä ja hiirelle kehittyneessä tuumorikudoksessa ja plasmassa on todettu esiintyvän eturauhaselle tyypillisiä glykoproteiineja, kuten ihmisen eturauhasen fosfataasihappoa ja eturauhasantigeenia. (Horoszewicz ym.1983.)

Toiminnallisten erojen todettiin olevan yhteneväiset myös ihmisen eturauhasenepiteelin eri linjojen kanssa. Tämä nähtiin siinä, että LNCaP-solut reagoivat pahanlaatuisten eturauhassolujen tavoin androgeeneille. Solujakautumista solumaljalla säätelee elatusnesteeseen dihydrotestosteroni (DHT). Sen lisäksi DHT:lla on vaikutusta LNCaP-solujen androgeenin tuottoon. Ilmiö on todennäköisesti DHT:n aikaansaama itsenäinen spesifinen vaikutus. Näiden havaintojen perusteella ajatellaan, että juuri DHT on ratkaiseva tekijä eturauhassolun muuntumisessa pahanlaatuiseksi. (Horoszewicz ym. 1983.)

LNCaP-solulinjan soluissa todettiin esiintyvän spesifistä, korkean affiniteetin androgeenireseptoria ja lisäksi erityistä estrogeenireseptoria. Tämä tarjosi molekulaarisen pohjan sille, että solulinjan solut ovat morfologialtaan samanlaisia elimistön vastaavien solujen kanssa. (Horoszewicz ym. 1983.)

### **2.3.2 EP-156T solulinja**

Ihmisen terveen kudoksen solut tuhoutuvat luonnollisesti ohjelmoidulla solukuolemalla, jota kutsutaan apoptoosiksi. Tätä ennen solut jakautuvat useita kertoja. Solujen kasvun pysäyttäjää on kutsuttu jakautumisvanhenemiseksi ja sitä pidetään yhtenä solumuuttumista rajoittavana tekijänä. Siitä lähtien, kun DNA-syöpävirukset saatiin kehitettyä, on ollut mahdollista valmistaa kuolemattomia soluviljelmiä ihmisen normaaleista soluista ja primaarituumorin soluista. Useista

kudoksista, mukaan lukien eturauhanen ja virtsarakko, onkin virusonkogeeni valmisteilla onnistuttu valmistamaan kuolemattomia solulinjoja. (Kogan ym. 2006.)

Vaihtoehtoinen ja uusi menetelmä normaalien solujen apoptoosin estämiseksi on infektoida solut retroviruksella, johon on lisätty ihmisen telomeraasin katalyyttinen alayksikkö hTERT. hTERT aiheuttaa solujen kromosomien päihin elongaatiota estäen solukuoleman, joka normaalisti primaarilla hyvänlaatuisella solulinjalla tapahtuisi. Tutkimuksissa huomattiin, että hTERT:n avulla kuolemattomaksi tehdyt solut toimivat fysiologisesti samalla tavalla kuin normaalit ihmisen terveen kudoksen solut. (Kogan ym. 2006.)

Eturauhasen epiteelisolulinjat luotiin neljästä erillisestä radikaali prostatektomialla saadusta solulinjasta. Ne nimettiin EP-152, EP-153, EP-156 ja EP-157. Nämä solulinjat infektoitiin hTERT-retroviruksella, johon oli koodattu ihmisen käänteinen telomeraasi transkriptaasi. Tämän jälkeen solulinjoja alettiin kutsua nimillä EP-152T, EP-153T, EP-156T ja EP-157T. Näistä linjoista kuitenkin vain EP-156T onnistui niin, että sen solut jatkoivat jakautumistaan ja sitä pystyttiin käyttämään tutkimustyössä. (Kogan ym. 2006.)

EP-156T solulinja valittiin terveen primaarin epiteelisolulinjan sijasta, koska se vastaa paremmin luminaalisia epiteelisoluja; soluissa on androgeenisia reseptoreita ja se tuottaa prostata spesifistä antigeenia (PSA), kun sen sijaan primaarit epiteelisolut, kuten kaupallisesti saatavissa olevat eturauhasepiteelisolut, eivät yleensä tuota androgeenireseptoreita eivätkä PSA:ta ja ovat basaalista fenotyyppiä.

Tutkimusryhmän oli luonnollisesti varmistettava, että kuolemattomaksi tehdyt EP-156T solut vastasivat ominaisuuksiltaan alkuperäisiä eturauhassoluja. Tämä varmistus tehtiin vertaamalla sytokeratiinien ja steroidireseptoreiden ilmaantuvuutta solulinjan solujen ja varsinaisten eturauhassolujen välillä. Eturauhasen syöpäsolulinjoja käytettiin lisäkontrollina. Tutkimuksissa todettiin, että kuolemattomaksi tehdyt solulinjat erittivät aineita, jotka vastasivat eturauhasepiteelin basaalista fenotyyppiä. Löydettiin suuria määriä basaalisolujen merkkiaineita kuten sytokeratiini 5, 7, 14 ja p63 ja puolestaan vähäisiä määriä luumenin solumerkkiaineita kuten sytokeratiini 8 ja 18. Steroidireseptoreiden vastaavuutta tutkittiin Western Blot –menetelmällä arvioimalla estrogeeni- $\beta$ -reseptorin esiintyvyyttä. Se oli samanlainen kuin primaareilla epiteelisoluilla ja LNCaP-solulinjalla. Näiden, eturauhaselle tyypillisten markkereiden ilmentymisen perusteella, tutkijat totesivat, että hTERT-retroviruksen avulla kuolemattomaksi tehdyt epiteelisolut vastaavat pääosin basaalisten

solujen fenotyyppejä. EP-156T-solulinjan solut eivät pystyneet käymään läpi solun erilaistumista. Nämä löydökset osoittavat, että solulinjan solut ovat säilyttäneet useita primaarin terveen eturauhassolun ominaisuuksia, mutta eivät kaikkia. (Kogan ym. 2006.)

### **2.3.3 Solulinja 5637**

Solulinja 5637 edusti tässä tutkimuksessa virtsarakkosyöpää. Solulinjasta tehtyjä kaupallisia solulinjoja kutsutaan myös nimillä ATCC ja HTB-9.

Fogh tutkimusryhmineen vuonna 1977 esitti artikkelissaan, että he olivat pystyneet viljelemään 127 erilaista ihmisen syöpäsolulinjaa. Kunkin näistä solulinjoista osoitettiin kehittävän hiirelle syövän, kun niitä injektoidiin ihonalaisesti hiireen 1-20 miljoonaa yksikköä. Solulinjoista 56 oli karsinoomalinjoja, 14 sarkoomalinjoja ja 57 muita erilaisia syöpäsolulinjoja. Yhden kuukauden aikana pistämisestä 29 % solulinjoista muodosti 1 cm<sup>3</sup> kokoisen tuumorin ja vastaavasti 41 % kahden kuukauden aikana pistämisestä. Näiden syöpien histopatologia oli samanlainen kuin ihmisen kudoksilla kaikissa näistä tapauksista. (Fogh ym. 1977.)

Yksi näistä Foghin tutkimusryhmän kasvattamista solulinjoista oli käyttämämme virtsarakkosyöpäsolulinja 5637. Solulinja 5637 on gradus II –solulinja ja se on virtsarakon epiteelisolukkoa. Alun perin se on tehty 68-vuotiaalta kaukaasialaista alkuperää olevalta ihmiseltä resekoidusta virtsarakkosyövästä. (Fogh ym. 1977.)

Syöpäsolulinjaa 5637 tehdään nykyään myös kaupallisesti. Kaupallisen solulinjan internetsivuilta löytyi tietoa solulinjan karyotyypistä. Solulinjan karyotyypissä modaalin kromosomimäärä on 67 kromosomia. Vaihteluväli on 59-71. 26 %:ssa tapauksista kantasolun kromosomiluku on 67. Kaikissa näissä solulinjan soluissa 14 merkkikromosomia olivat samanlaisia ja 8 oli muista tuntemattomista kudoksista. Normaalia N13-kromosomia ei esiintynyt ja N21-kromosomia esiintyi vain vähemmistössä solulinjoista. Ylimääräisiä markkereita löytyi vain vähemmistöstä solukantoja. Jokaisessa solussa oli muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta yksi Y-kromosomi. (LGC Standards.)

## 2.4 Ongelmat nykytekniikassa

Kaasukromatografia-massaspektrometria -menetelmään perustuvilla laitteilla on omat heikkoutensa. Erityisesti haihtuvien yhdisteiden seoksien ja polyamiinien tutkiminen on haasteellista. Lisäksi herkkyys heikkenee nopeasti aineen vähäisissä konsentraatioissa. Monimutkaisuuden, tulosten saamisen hitauden ja kalliiden kustannusten takia se on diagnostisena menetelmänä käytännön lääkärin työhön ja sairaalalaboratorioihin soveltumaton. (Wilson ym. 2011.) Vastaavasti, vaikka koirien on osoitettu melko tarkastikin tunnistavan syöpäpotilas, on koirien tuominen sairaalaolosuhteisiin mahdotonta (Gordon ym. 2008).

Elektronisen nenän kehitystyötä lääketieteen saralla on hidastanut se, että elektronisia neniä koskevissa tutkimuksissa ympäri maailman on käytetty useita erilaisia elektronisen nenän prototyyppejä. Tutkimuksia, joissa näitä eri laitteita olisi verrattu, on valitettavasti hyvin vähän. Lisäksi eri tutkimukset on tehty erilaisilla tutkimusprotokollilla erilaisissa tutkimusolosuhteissa ja mittaustulosten käsittelyssä on käytetty erilaisia tiedonkäsittelyohjelmia. Nämä asiat tekevät tutkimustulosten vertaamisesta hankalaa ja osin epäluotettavaa. Jotta tulevaisuudessa pystytään määrittämään, onko neoplastisten muutosten hajuprofiililla yleistettävissä olevia piirteitä, on identtisillä mittalaitteilla ja tutkimusmenetelmillä tutkittava vielä suuri määrä erilaisia syöpäsolulinjoja ja elimistön eri kudoksia.

Aiempiä tutkimuksia elektronisesta nenästä eturauhassyövän osalta ei ole julkaistu ja useat muut elektronista nenää koskevat tutkimukset on tehty suhteellisen pienillä potilasmäärillä. Jatkossa tarvitaankin suuremman otoskoon prospektiivisiä tutkimuksia, jotta saamme lisää tietoa ja pystymme entisestään kehittämään tätä menetelmää. Kuten kaasukromatografia-massaspektrometria -menetelmän tuottaman datan analysointi, myös elektronisen nenän antaman mittaustulosten analysointi on suhteellisen monimutkaista ja vaatii osaamista. Sekin rajoittaa vielä tällä hetkellä elektronisen nenän käyttöä diagnostisena apuvälineenä käytännön työssä.

Tutkimuksessamme saimme viitteitä siitä, että pH:n nosto parantaa elektronisen nenän erotuskykyä. Mittausolosuhteet, kuten ilmankosteus, pH, lämpötila ja analysoitavan näytteen koko on jatkossa standardisoitava, jotta saatuja tuloksia voidaan varmuudella verrata ja analysoida luotettavasti (Turner ym. 2004). Suurin ongelma ChemPro 100:lle, jota tässä tutkimuksessa käytimme, on sen alttius kosteudelle. Höyrystyvä vesi aiheuttaa elektroniselle nenällä häiriötä ja laite tarvitsee

suhteellisen pitkän palautumisajan mittausten välillä. Erilaisia hajusensorikenoja ja suodattimia käyttämällä tätä ongelmaa on kuitenkin mahdollista vähentää (Bartolazzi ym. 2010). On myös mahdollista, että haihtuvien merkkiaineiden välillä tapahtuvat kemialliset reaktiot vaikuttavat jossain määrin tutkittavan aineen hajuprofiiliin ja sitä kautta tuloksiin. Näitä mahdollisia reaktioita ja niiden vaikutusta hajuun emme vielä täysin tunne.

## 2.5 Tutkimushypoteesit

Aiemmissa tutkimuksissa on todistettu, että syöpäkasvaimissa vilkastunut soluproliferaatio heijastuu virtsaan kohonneena polyamiinipitoisuutena (Russell ym. 1971). Dosentti Oksalan tutkimusryhmän aiempien töiden perusteella tiedämme ChemPro 100-kaasuanalysaattorin kykenevän haistamaan polyamiinit 0,1-0,001 molaarisista vesiliuoksista ja pystyvän myös erottamaan polyamiinit toisistaan. Elektroniselle nenälle tyypillisesti aineiden konsentraatio ei juuri vaikuta erotuskykyyn. Tutkimusryhmän aiemman tutkimusvaiheen perusteella tiedämme myös, että pahanlaatuisen virtsan hajuprofiili eroaa merkittävästi hyvänlaatuisesta virtsasta. Sen sijaan hyvänlaatuisesta ja pahanlaatuisesta munuaiskudoksesta ei pystytty luotettavasti havaitsemaan eroa.

Tutkimuksen kolmannen vaiheen tarkoituksena oli selvittää, eroavatko solut ja niiden elatusnesteet vedestä. Toiseksi tutkimme eroavatko solulinjat toisistaan ja kolmanneksi eroavatko solulinjat vastaavista elatusnesteistä.

Tutkimushypoteesina oli, että ChemPro100 kykenee erottelemaan hyvänlaatuiset solut pahanlaatuisista soluista.



## 3 MENETELMÄT

### 3.1 ChemPro 100

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 molekyylit erotellaan niiden massan ja varauksen mukaan ja lisäksi niiden liikkuvuuden avulla. Molekyylin kykyä liikkua ilmassa määrittävät mm. molekyylin koko ja muoto. (Kuva 1.)

IMS-laitteistossa molekyylit on ensin ionisoitava. Yleisin ionisaatioon käytettävä tekijä on radioaktiivinen beetasäteilijä, kuten  $^{63}\text{Ni}$  tai  $^{241}\text{Am}$ . Tämän jälkeen ionit ohjataan virtausputkeen, jossa ne kiihdytetään heikon sähkökentän avulla ja josta ne kulkevat kohti detektoria. Ionien kulkua haittaa törmäily ympäröivän ilman molekyylin kanssa, jolloin suuremmat ionit törmäilevät pienempiä voimakkaammin. Tämän takia ionien erittely muodon ja koon mukaan mahdollistuu. Laitteistossa on elektrodeja, jotka reagoivat positiivisesti tai negatiivisesti varautuneisiin molekyyleihin. Näin saadaan tietoa molekyylin varauksista. Yhteen laskettu mitattu arvo antaa informaatiota partikkelin luonteesta, mm. muodosta, koosta, konsentraatiosta, sekä varauksesta. (Röck ym. 2008.) Suomalainen tutkimusryhmä Utriainen ym. (2003) on kirjoittanut laitteesta yksityiskohtaisen kuvauksen.

### 3.2 Näytteiden mittaaminen

Kaikki mitattavat näytteet valmistettiin ensin sulattamalla näyte ja sitten pipetoimalla tutkittavaa näytettä 250  $\mu\text{l}$  petrialjalle suoraan näyteputkesta. Petrialjalle pipetoitiin tämän lisäksi 4,75 ml steriiliä vettä, jolloin kokonaistilavuudeksi saatiin 5 ml. Tämä tilavuus muodosti petrialjalla ohuen yhtenäisen kerroksen taaten maksimaalisen haihtumis-pinta-alan. Teoriassa on mahdollista, että hypotoninen steriili vesi aiheuttaisi tutkittaville soluille häiriötä ja siten maksimoisi volatiilisten yhdisteiden haihtumisen.

Petrimalja peitettiin muovisella kannella, jossa oli kolme reikää. Rei'istä kaksi olivat korvausilmalle ja kolmanteen reikään asetettiin 16 G laskimokanyyli. Injektioportista kanyylin ja muovisen Teflon pillin avulla näyteilma ohjattiin analysoitavaksi elektroniselle nenälle. (Kuva 2). Petrimalja asetettiin 37C vesihauteeseen ja mittaukset suoritettiin laminaarivirtauskaapissa. Mittaus aloitettiin, kun näyte alkoi höyrystyä kannen alla. Kukin mittaus kesti 15 minuuttia, jonka jälkeen analysaattorin ilmanotto-osat kuivattiin ja analysaattorin annettiin haistella puhdasta ilmaa 10 minuuttia spektrin tasaantumiseksi. Tutkimuksen aiemmassa vaiheessa näiden mittausaikojen todettiin olevan riittävät sekä tuottamaan maksimaalinen signaali että palauttamaan elektroninen nenä perustilaan. Jokaista mittausta varten valmistettiin uusi petrimaljanäyte. Aiemmassa vaiheessa todistettiin myös, ettei mittalaitteeseen jää jäännöksiä näytteiden mittaamisen yhteydessä.

Imuilmanäytteen keruuta seurattiin laitteen trendinäytöltä pyrkien ajoittamaan kemiallinen profiili hetkeen, jolloin kaikista kennoista mitattu signaali saavutti ns. "plateau"-vaiheen. Tämä hetki pystyttiin ajoittamaan myös raakadatasta etsien signaalien maksimi. Tämä mittausjakson korkein absoluuttinen arvo valittiin edustamaan kyseistä näytettä myöhemmässä analyysissä. Jokainen solunäyte mitattiin ainoastaan kerran, mutta kustakin solujen kanssa olleesta elatusnesteestä tehtiin 4 mittausta.

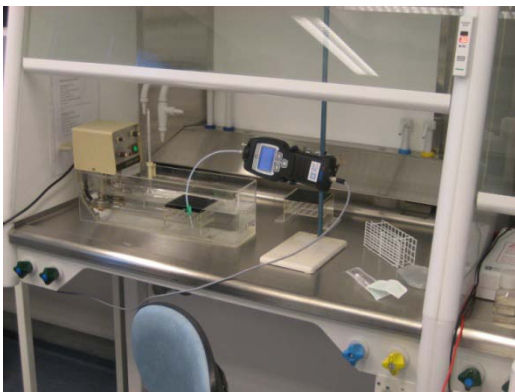
Laite analysoi imuilman hiukkasten massan ja varauksen ja ilmoittaa keraamisissa kennoissa (16 kpl) ja kaasujen havaitsemiseen tarkoitetuissa erillisissä puolijohdekennoissa (2 kpl) sähkökentän ylläpitämiseen tarvittavan virran (pA), joka muuttuu hiukkasten koon ja varauksen mukaan. Jokaisen näytteen hajuprofiili voitiin tämän jälkeen ilmaista 18 reaalitylvun sarjana. Kahdella kanavalla näistä 18 kanavasta ei ollut vastaavuutta mittausten kanssa, joten näiden kanavien antama data jätettiin pois analyysistä ja siten lopulliseen analyysiin käytettiin 16 kanavaa. Mittauskertojen välillä anturi altistettiin isopropanolia sisältävälle näytteelle, joka puhdisti mittauskennot.

### **3.3. Mittaustulosten analysointi:**

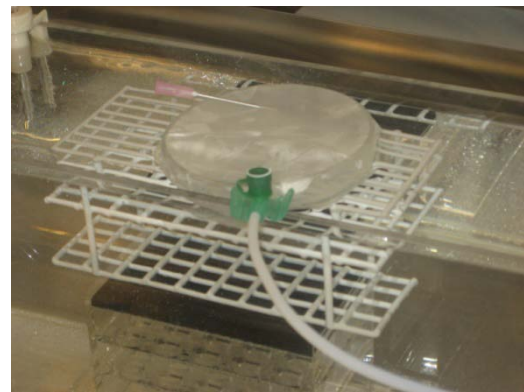
Saatava 16-kanavainen aineisto analysoitiin käyttäen datan muunnokseen ja prosessointiin Matlab-ohjelmistoa (Mathworks, Natick, MA). 16-kanavaisen tilan visualisointi vaatii prosessointia. Se tehtiin principal component-analyysin (PCA) avulla. Siinä suuresta määrästä parametrejä saatiin esille ne, jotka edustivat tutkittavan aineen aiheuttamia muutoksia (data reduction). Periaatteena oli, että aineistosta vähennettiin pois ne kanavat, jotka eivät korreloineet lainkaan mitattavan näytteen

konsentraation kanssa ja toisaalta ne kanavat, jotka korreloivat voimakkaasti toistensa kanssa eli eivät sisältäneet lisäinformaatiota. Tämän jälkeen näytteiden välinen ero määritettiin määrittämällä ns. Mahalonbis-etäisyys (MD) ja data esitettiin 2-ulotteisessa ns. kaanonisessa kuvaajassa, jossa merkittävä erona pidetään  $MD > 3$ . (Gendron ym. 2007, Lee & Verleysen 2007.) Tämä mittausdatan matemaattinen analysointi suoritettiin Tampereen teknillisessä yliopistossa.

Nämä edellä mainitut analyysimenetelmät tarjosivat kaksi erilaista mittausdatan tarkastelu mahdollisuutta. Tulokset pystyttiin visualisoimaan ja luokittelemaan. Ennen datan analyysiä se normalisoitiin. Tämä korosti elektronisen nenän tuottamaa hajuprofiilia ja vähensi mahdollista virhettä tuloksissa. 16-kanavaisen aineiston absoluuttiset arvot muodostivat summan, jonka perusteella jokainen näyte luokiteltiin. 16-ulotteisen tilan visualisointi edellytti data reductionia. PCA on lineaarinen projektio, jossa moniulotteinen data esitetään 2-ulotteisessa tilassa siten, että datan maksimaalinen variaatio säilyy. MDS (multidimension scaling) puolestaan siirtää datan pienempään ulottuvuuteen siten, että pisteiden väliset etäisyydet uudessa ulottuvuudessa ovat mahdollisimman samanlaiset kuin alkuperäisessä. MDS mahdollistaa myös non-lineaariset muutokset. Datan visualisoimiseksi se siirrettiin 2-ulotteiseksi Sammon mapping –menetelmällä. Akselit kuvissa 3-7 ovat suuntia jotka optimaalisesti säilyttävät data-pisteiden etäisyyden. (Lee & Verleysen 2007.)



Kuva 1. ChemPro100 -elektroninen nenä.



Kuva 2. Mittauskammio.

### 3.4 Aineisto

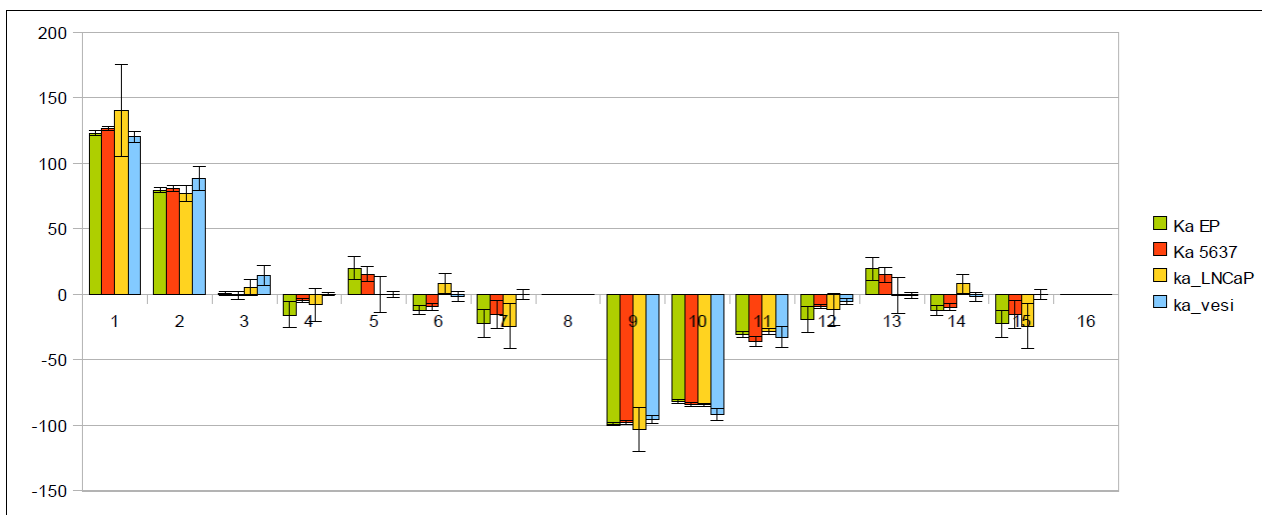
Tutkimuksen alussa tutkimme elektronisen nenän johdonmukaisuutta mittaamalla uudelleen polyamiineista aiemmin mitattu putreskiini-sarja. Tämän teimme sen vuoksi, että oli herännyt huoli ChemPro 100:lla aiemmin mitattujen ja toisessa vaiheessa mitattujen vesikontrollien suuresta erosta. Mittasimme myös spermiini-sarjan suuremmalla konsentraatiolla (1mM). Tutkimme näin, paraneeko elektronisen nenän erotuskyky suuremmalla konsentraatiolla. Lisäksi saimme Kuopiosta professori Jouko Vepsäläisen syntetisoimia asetyloituja polyamiineja (asetyloitu N1-spermidiini). Asetyloituneita polyamiineja ei löydy mistään kaupallisena ja ne ovat nimenomaan syövässä virtsaan erittyviä aineita. Tutkimme haisevatko syöväälle ominaiset huomattavan volatiilit asetyloidut polyamiinit erityisesti ja kykeneekö kone erottamaan asetyloidut polyamiinit ei-asetyloiduista. Koska aiemmissa tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että polyamiinit haihtuvat voimakkaammin pH:n noustessa, testasimme myös pH:n vaikutuksen erotuskykyyn. Tutkimme parantaako pH:n nosto erotuskykyä nostamalla pH:n 7:stä 10:een eli selvästi emäksiseksi.

Loppuvuodesta 2010 teimme viljeltyjä syöpäsolulinjoja koskevat mittaukset. Mittasimme kolmen eri solulinjan hajuprofiilit ja selvitimme ChemPro 100:n kykyä erottaa ne toisistaan. Tutkimuskohteiksi valikoitui kolme urologista solulinjaa: Eturauhasen adenokarsinooma syöpäsolulinja (LNCaP), joka vastasi ominaisuuksiltaan pahanlaatuista eturauhassyöpäkudosta (Horoszewicz ym. 1983), telomeraasi-immortalisoitu eturauhasen uroepiteelisolulinja (EP\_156T), joka vastasi hyvänlaatuista eturauhaskudosta (Kogan ym. 2006), sekä virtsarakkosyöpäsolulinja S5637 (ATCC nro HTB-9), joka vastasi virtsarakkosyöpäkudosta (Fogh ym. 1977). Tutkimuksessa analysoimme elektronisen nenän avulla näitä kolmea solulinjaa ja niiden elatusnesteitä.

Analysoimme 13 mittausta LNCaP-solulinjan soluista, 4 mittausta solujen kanssa olleesta elatusnesteestä ja 8 mittausta puhtaasta elatusnesteestä. EP-156T- ja S5637-solulinjoista molemmista analysoimme 15 solumittausta, 4 mittausta solujen kanssa olleesta elatusnesteestä ja 8 mittausta puhtaasta elatusnesteestä. Lisäksi teimme 37 mittausta kontrollinäytteenä toimineesta puhtaasta neutraalista vedestä (pH7).

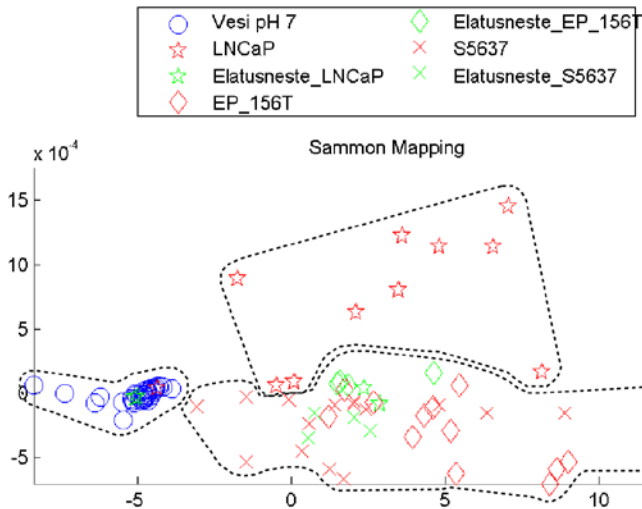
## 4 TULOKSET

Tässä tutkimuksessa pyrittiin saamaan vastaus kolmeen kysymykseen. Ensimmäkin, kykeneekö elektroninen nenä erottamaan solu- ja elatusnesteinäytteet puhtaasta vedestä. Toiseksi, eroavatko tutkittavat solulinjat toisistaan ja, kykeneekö elektroninen nenä erottamaan pahanlaatuisen eturauhassyöpäsolu- (LNCaP), virtsarakkosyöpäsolu- (S5637) ja hyvänlaatuisen eturauhassolulinjan (EP-156T) toisistaan. Lisäksi tutkittiin, vaikuttavatko solut elatusnesteensä hajuun. Tätä asiaa tutkittiin vertaamalla solunäytteitä elatusnesteeseen, jossa soluja oli kasvatettu, sekä vertaamalla soluja inkubaattorissa olevaan puhtaaseen elatusnesteeseen. Tätä tutkittiin sen takia, että pystyttiin varmistamaan, etteivät erot solulinjojen välillä johtuneet mahdollisista solunäytteiden elatusnestejäämistä.



Kuva 3: Elektronisen nenän 16-kanavainen kemiallinen spektri ja näytteiden eroaminen eri kanavilla. Kuvasta nähdään, että lähestulkoon kaikilla kanavilla on jonkin verran eroa solulinjojen välillä. Tämän perusteella näyttäisi siltä, että jokaisella solulinjalla on omanlaisensa hajuprofiili.

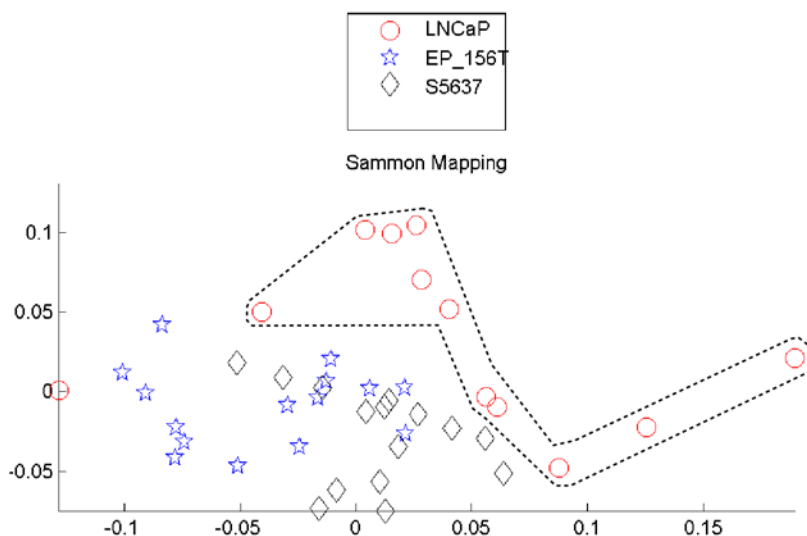
Ensimmäiseen tutkimuskysymykseen, pystyykö elektroninen nenä erottamaan solu- ja elatusnesteinäytteet vedestä, saatiin selvä vastaus. Vesinäytemittauksista 15/15 erosi solulinja- ja elatusnesteinäytemittauksista. Elektroninen nenä kykeni siis erottamaan kaikki vesinäytteet solu- ja elatusnesteinäytteistä (Kuva 4). Linearisella diskriminantti luokituksella MCRs (misclassification rates) luvut olivat 1,4-1,7%. Samasta kuvasta nähdään, että LNCaP-solulinja eroaa muista solulinjoista selvästi. Sen sijaan EP-156T- ja S5637-solujen välille ei saatu tilastollisesti merkittävää eroavaisuutta. Tutkimustulokset visualisoitiin Sammon Mapping –menetelmällä, jotta tulokset saatiin havainnollisempaan muotoon.



Kuva 4: Solu- ja elastunestenäytteiden eroaminen vedestä (Sammon mapping). Kuvasta nähdään, että vesinäyte eroaa muista kahta outlier-tapausta lukuunottamatta. LNCaP-näyte eroaa sekä vedestä että muista solulinjoista.

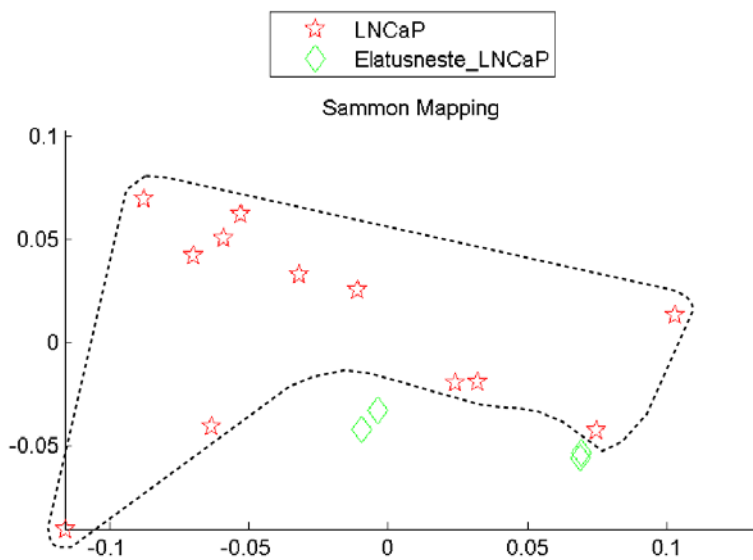
## 4.1 Eturauhassolulinja

Tutkimuksessa osoitettiin, että pahanlaatuiset eturauhassyöpäsolut (LNCaP) eroavat muista solulinjoista MCRs lukujen ollessa 2,9-3,6 %. 12/13 LNCaP-solunäytteistä erosi muista solulinjoista (Kuva 5). Erotuskyky oli 95 %:n luokkaa. Sen sijaan hyvänlaatuiselle eturauhassolulinjalle ja virtsarakkosyöpäsolulinjalle ei saatu tilastollisesti merkittävää eroa tutkimuksissa (Kuva 5).

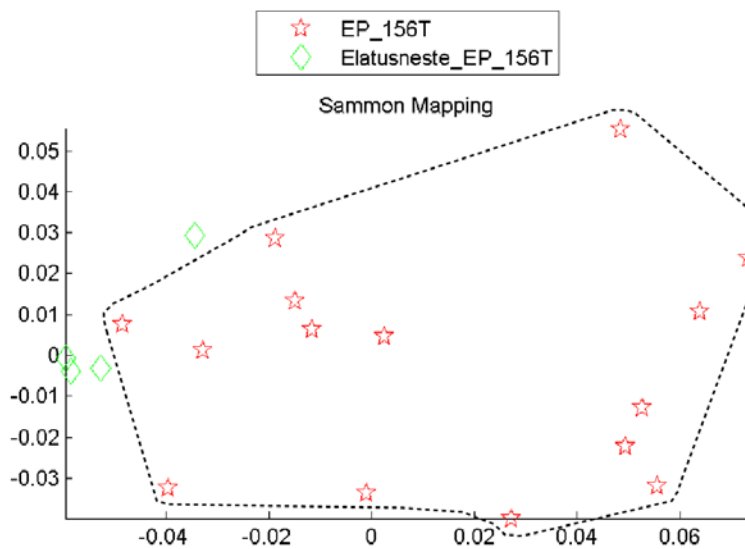


Kuva 5: Eri solulinjojen eroaminen toisistaan (Sammon Mapping). LNCaP-solunäytteistä 12/13 eroaa muista solulinjoista. EP-1567 ja S5637 eivät eroa toisistaan.

EP-156T-solulinjan elatusneste erosi solunäytteistä (MCR: 5,3 %). Sen sijaan LNCaP-solulinjan elatusneste ei merkittävästi eronnut. Puhtaan elatusnesteeseen hajuprofiili puolestaan erosi merkittävästi solunäytteistä (Kuvat 6 ja 7). MCRs LNCaP-soluilla oli 23,8-25,6 % ja EP-156T-soluilla 0,0-0,9 %. Tämän eron aiheuttaa mahdollisesti yksittäinen outlier, joka on päällekkäin puhtaan elatusnesteeseen kanssa. Nämä tulokset antavat viitteen siitä, että LNCaP ja EP-156T solut muuttavat elatusnesteensä hajuprofiilia.



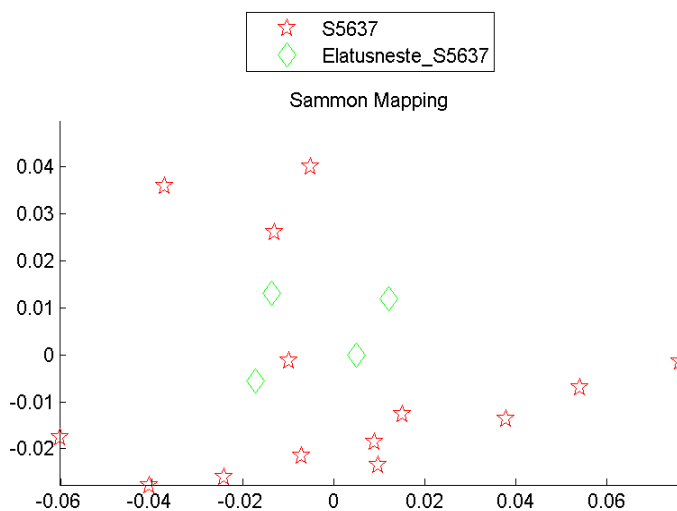
Kuva 6: LNCaP-solujen eroaminen niiden puhtaasta elatusnesteestä (Sammon mapping). Kuvasta nähdään, että LNCaP- solut eroavat merkittävästi puhtaasta elatusnesteestä (MCRs 23,8-25,6 %).



Kuva 7: EP-156T-solujen eroaminen niiden puhtaasta elatusnesteestä (Sammon mapping). Kuvasta nähdään, että EP-156T solut eroavat merkittävästi puhtaasta elatusnesteestä (MCRs 0,0-0,9 %).

## 4.2 Virtsarakkosolulinja

S5637-solulinjan solunäytteet eivät tämän tutkimuksen mittauksissa eronneet hyvänlaatuisista eturauhassoluista eli EP-156T-soluista (Kuva 5). Pahanlaatuisista LNCaP-eturauhassyöpäsoluista se kuitenkin erosi merkittävästi (Kuva 5). S5637-solulinja erosi myös selvästi puhtaasta vedestä (Kuva 4), mutta ei puhtaasta elatusnesteestä (Kuva 8). Tämä osoittaa, että jostakin syystä S5637-solut eivät vaikuttaneet elatusnesteensä hajuprofiiliin samalla tavalla kuin eturauhaskudoksen solut.

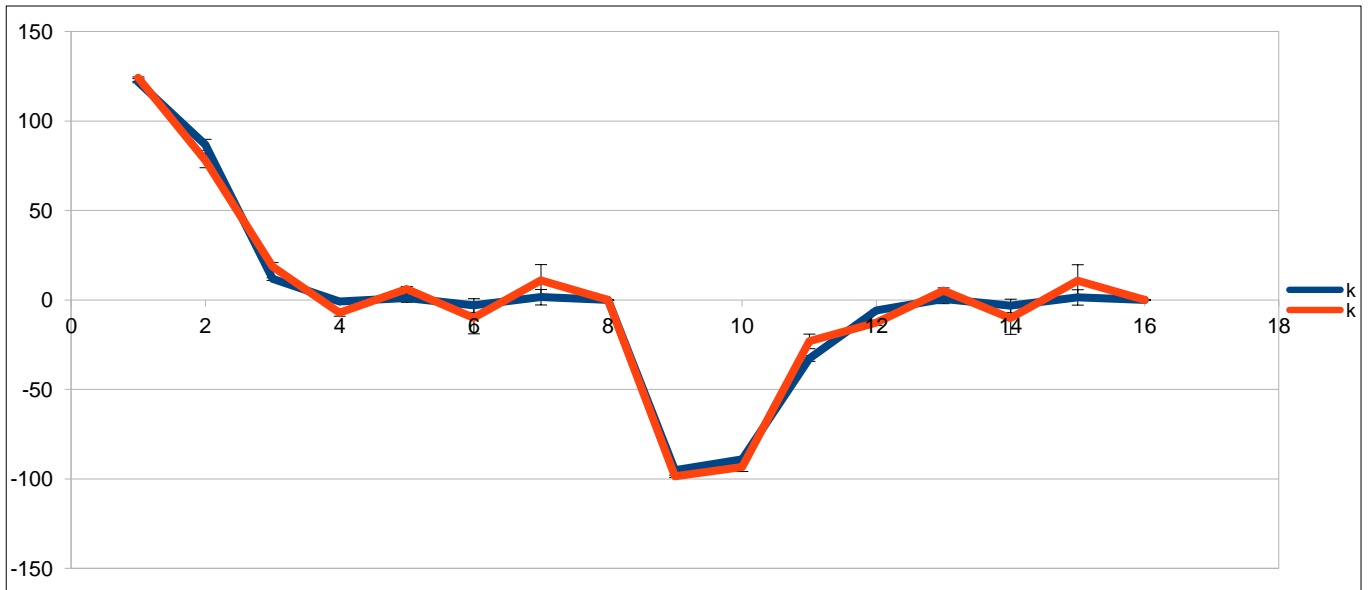


Kuva 8: S5637-solujen eroaminen niiden puhtaasta elatusnesteestä (Sammon mapping). Kuvasta nähdään, että solut ja niiden puhdas elatusneste eivät merkittävästi eroa toisistaan.

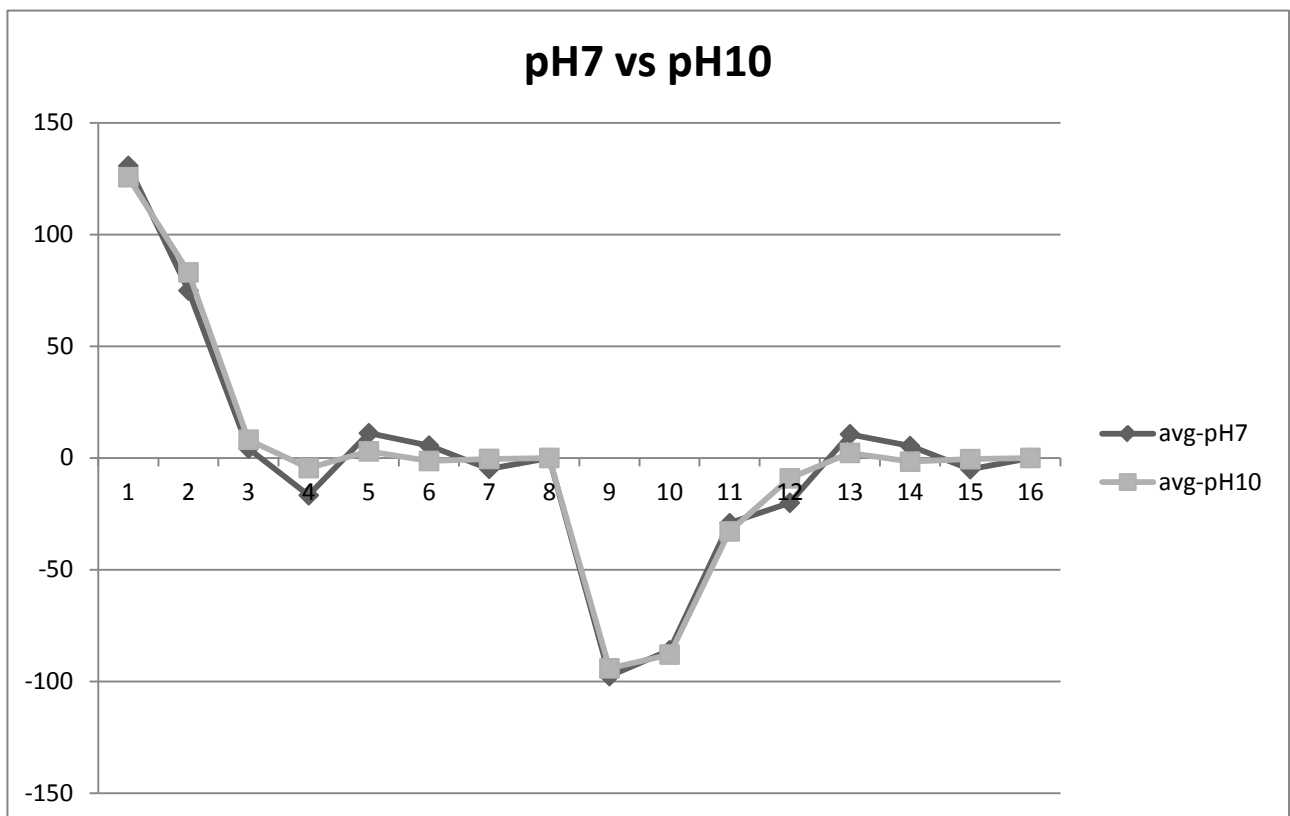
Tutkimuksen tärkeimpänä löydöksenä on, että elektronisen nenän avulla pystytään erottamaan hyvänlaatuiset eturauhassolut pahanlaatuisista eturauhassyöpäsoluista. Erotuskyky on 95 %:n luokkaa. Uskommekin, että elektronista nenää kehittämällä, sitä voidaan tulevaisuudessa hyödyntää eturauhassyövän diagnostiikassa ja hoitovasteen seurannassa. Lisäksi analyysissä saatiin viitteitä siitä, että eturauhassyöpäsolut muuttavat elatusnesteensä hajua. Sen sijaan virtsarakkosolulinja ei merkittävästi eronnut muista solulinjoista.

Varsinaisten tutkimustulosten ohella saatiin varmistettua, että asetyloidut polyamiinit erottuvat vedestä asetyloitumattomia paremmin (Kuva 9). Lisäksi saatiin viitteitä siitä, että pH:n nosto parantaa erotuskykyä (Kuva 10).





Kuva 9: Asetyloitujen ja asetiloitumattomien polyamiinien eroaminen toisistaan. Punaisella viivalla piirrettyinä ovat asetylloidut polyamiinit. Sinisellä viivalla asetiloitumattomat. Kuviosta nähdään, että tietyillä kanavilla asetylloidut polyamiinit tuoksuvat voimakkaammin



Kuva 10: pH:n vaikutus erotuskykyyn. Korkeammalla pH:lla volatiilisten aineiden haihtuminen lisääntyy ja siten aineiden tuoksuvuus paranee.

## 5 POHDINTA

### 5.1 Tutkimusmenetelmän arviointi

Aiempien tutkimusten perusteella tiedetään, että viljellyillä syöpäsoluilla on yksilöllinen hajuprofiili (Bartolazzi ym. 2010, Gendron ym. 2007). Useimmissa elektronista nenää koskevissa tutkimuksissa on kuitenkin analysoitu melko pieniä näytemääriä, eikä tutkimuksissa ole analysoitu tai kontrolloitu solujen vaikutusta elatusnesteeseen. Bartolazzi ym. (2010) kontrolloivat tutkimuksessaan elatusnesteeseen vaikutuksen hajuprofiiliin. Tutkimusryhmä myös tehokkaasti vähensi IMCell-laitteelle ominaista kosteusongelmaa käyttämällä Nafion (Perma Pure LLC, NJ, USA) suodattimia. Suodattimien käyttö paransi myös erotuskykyä. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa samanlainen laadukas tutkimus urologisista syöpäsolulinjoista ja käyttää mittaustulosten analysoimisessa kehittyneitä matemaattisia metodeja.

Tämän tutkimuksen tulokset saavutettiin hyvin valvotuissa olosuhteissa ja ne antavat viitteen siitä, että pahanlaatuisten solujen hajuprofiili eroaa hyvänlaatuisista, ja että eri solulinjojen solut on tietyillä rajoituksilla mahdollista erottaa toisistaan käyttämällä elektronista nenää. Solut näyttävät myös muuttavan elatusnesteensä hajuprofiilia. Tämä näkyy tuloksissa siinä, että solujen kanssa ollut elatusneste eroaa merkittävästi puhtaasta elatusnesteestä ja solujen kanssa olleen elatusnesteeseen hajuprofiili on siirtynyt kohti solujen hajuprofiilia. Vaikka virtsarakkosolulinjalla muutokset eivät olleetkaan yhtä merkittäviä, ilmiö on silti nähtävissä kaikilla kolmella solulinjalla. Tämä puolestaan viittaa siihen, ettei ilmiö ole spesifistä syöväälle. On muistettava, että solujen kanssa olleesta elatusnesteestä tehtiin varsin vähän mittauksia. Tämä estää tekemästä lopullista johtopäätöstä tästä löydöksestä.

Tuloksia tulkittaessa on otettava huomioon mahdollisia näytteisiin ja polyamiinipitoisuuksiin vaikuttavia tekijöitä. Aiemmissa tutkimuksissa on saatu viitteitä siitä, että polyamiinien pitoisuuden virtsassa voivat vaikuttaa ainakin ruokavalio, käytetyt lääkkeet ja inflammaatio (Russell ym. 1971). Varmuudella ei tiedetä, erittyvätkö markkerimolekyyleinä toimivat polyamiinit virtsaan oikeilla syöpäpotilailta suoraan syöpäkudoksesta, tässä tapauksessa eturauhasesta ja virtsarakosta. Toinen mahdollisuus on, että ne eritetään verestä munuaisten glomerulusfiltraation avulla. Jälkimmäisessä tapauksessa myös munuaisfunktiolla saattaa olla merkitystä virtsan polyamiinipitoisuuksiin ja sitä

kautta hajuprofiiliin. Jatkossa onkin tutkittava lisää myös terveiden ihmisten virtsaa normaalin polyamiinitason määrittämiseksi.

On myös mahdollista, että primaarikasvaimen hajuprofiiliin vaikuttavat kasvainsolujen ohella elimistön muut solut, kudospaineet ja veri. Tämän vuoksi ei varmuudelle tiedetä, kuinka hyvin viljellyt, huomattavasti yksinkertaistetut, soluviljelmät vastaavat oikean syöpäkudoksen hajuprofiilia. Jatkossa on myös tutkittava, kuinka hyvin syöpäkudoksen hajuprofiili välittyy virtsaan.

Tutkimuksen tulokset ovat joka tapauksessa merkittävät. Kyseessä on ensimmäinen kerta, kun elektronisen nenän käytön on osoitettu olevan tehokas keino urologisten syöpäsolujen tunnistamisessa.

## **5.2 Johtopäätökset**

Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että hyvänlaatuisella ja pahanlaatuisella eturauhassolulinjalla on erilainen hajuprofiili. Elektronisen nenän avulla on siis mahdollista erottaa normaalit eturauhassolut syöpäsoluista. Virtsarakkosyöpäsolulinja ei sen sijaan merkittävästi eronnut muista solulinjoista. Lisäksi tutkimuksessa osoitettiin, että nämä tulokset eivät ole erilaisten elatusnesteiden tai elatusnestejäämien aiheuttamaa harhaa. Saatiin myös viitteitä siitä, että solut muuttavat elatusnesteensä hajua. Tarvitaan vielä lisää tutkimuksia, jotta selviää, voidaanko näitä tuloksia hyödyntää kliinisessä diagnostiikassa ja käytännön lääkärin työssä.

## **5.3 Tulevaisuuden näkymät**

Varsinaisten tutkimustulosten lisäksi saatiin viitteitä siitä, että pH:n nosto parantaa erotuskykyä, ja että asetyloidut polyamiinit erottuvat vedestä asetyloitumattomia paremmin. Nenä-menetelmän kehityksen kannalta onkin olennaista löytää erotuskyvyn kannalta optimaaliset mittausolosuhteet. Oleellista on myös optimoida ja identifioida käytettävät sensorit ja mittausprotokollat sekä eliminoida mahdolliset virhelähteet kuten ilmankosteus. Käyttämämme ChemPro 100 on varsin altis ilmankosteudelle. Markkinoilla on kuitenkin saatavilla uusia elektronisia neniä, jotka eivät ole yhtä alttiita kosteudelle, ja joiden erotuskyky on parempi. Tulevaisuuden tutkimuksissa olisi hyödyllistä käyttää tällaista uutta laitteistoa.

Elektronisen nenän tuottaman datan analysointi on suhteellisen monimutkaista ja vaatii osaamista. Se rajoittaa vielä tällä hetkellä osaltaan elektronisen nenän laajempaa käyttöä. Elektronisen nenän hyödyntäminen käytännön työssä edellyttää myös analysointimenetelmää, joka pystyy hajusensorien suuresta datamäärästä tuottamaan nopeasti, minuuteissa, selkeää ja ymmärrettävää dataa. (Turner ym. 2004.) Menetelmä onkin tulevaisuudessa validoitava ja kehitettävä mahdollisimman yksinkertaiseksi. Ensisijaisen tärkeää on standardisoitu ja määrätietoinen tutkimustyö. Käytettävien laitteiden hajusensoreiden herkkyyden ja tarkkuuden sekä pitkän aikavälin stabiiliuden parantaminen sekä ympäristön vaikutusten identifioiminen on välttämätöntä. (Montuschi ym. 2013.) Vasta tämän jälkeen elektronisen nenän roolia ja kustannushyötyä eturauhassyövän seulonnassa, diagnostiikassa ja hoidossa voidaan lopullisesti arvioida.

Elektronisen nenän käyttö käytännön lääketieteessä on siis vielä vähäistä ja suhteellisen uutta. Esimerkiksi keuhkosairauksien diagnostiikassa erilaiset laboratoriostandardisoidut uloshengitysilman keräysmenetelmät ja kerätyn ilman analysoiminen elektronisella nenällä on jo mahdollista, mutta menetelmää ei kuitenkaan ole vielä maailmanlaajuisesti hyväksytty, eikä otettu käyttöön. (Montuschi ym. 2013.)

Elektroninen nenä –menetelmällä on kaikesta huolimatta valtava potentiaali. Sitä on mahdollista hyödyntää laajasti lääketieteen saralla. Diagnostiikan lisäksi sen avulla on mahdollista saada lisää tietoa monien sairauksien patofysiologisista ja etiologisista tekijöistä aina molekyyalitasolle asti. Tätä tietoa voidaan puolestaan käyttää hyödyksi uusien lääkkeiden ja uusien hoitomuotojen kehitystyössä. (Montuschi ym. 2013.)

Uskommekin jo tässä vaiheessa, että elektroninen nenä on tulevaisuuden nouseva non-invasiivinen diagnostinen työkalu ja, että elektroninen nenä tulee parantamaan syöpäpotilaan hoitoa usealla tavalla. Non-invasiivisena työvälineenä se helpottaa diagnostiikan lisäksi syövän ja hoitovasteen seuranta. Ennustamme, että 5-10 vuoden päästä tämä tutkimusalue kehitty siten, että eturauhassyöpä ja myös muita syöpiä voidaan luotettavasti tunnistaa kädessä pidettävällä elektronisella nenällä.

Tulevaisuudessa tutkimusta jatketaan analysoimalla oikeiden syöpäpotilaiden virtsaa. Syöpävirtsatutkimuksen lisäksi suunnitelmissa on laajentaa syöpäsolulinjoja koskevaa tutkimusta. Itä-Suomen Yliopiston kanssa suunnitellussa projektissa on tarkoitus selvittää urologisten syöpälinjojen polyamiinipitoisuuksia ja metaboliaa tarkemmin käyttäen aineita, joilla polyamiinien eritystä stimuloidaan ja kataboliaa estetään. On myös tutkittava, pystyykö tällaista käsittelyä käyttämällä ja tutkimusolosuhteet (pH, kosteudenpoisto, CO<sub>2</sub>, lämpötila) optimoimalla parantamaan ChemPron erotuskykyä ja löydetäänkö hajuprofiilista polyamiineille tyypillisiä piirteitä. Lisäksi on pyrittävä identifioimaan spesifiset molekyylit, jotka aiheuttavat muutokset elatusnesteiden hajuun ja aiheuttavat erot solulinjojen hajuprofiileissa. Erityisen mielenkiintoinen tutkimuskohde on syövälle spesifiset asetyloituneet polyamiinit. Näytteitä lähetetään myös Itä-Suomen Yliopistoon kaasukromatografia-massaspektrometriaan polyamiinipitoisuuksien tarkkaa määrittystä varten. Näin päästään tulevaisuudessa vertaamaan eri menetelmillä saatuja tuloksia.

## LÄHTEET

- Bartolazzi A, Santonico M, Pnnazza G et al. A sensor array and GC study about VOCs and cancer cells. *Sens. Actuators B Chem.* 146(2), 483-488 (2010)
- Blanco Sequeiros G, Nurmi M, Salminen E. *Virtsaelinten syöpä. Kirjassa Joensuu H, Roberts P J, Teppo L, Tenhunen M (toim). Syöpätaudit. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, (2007)*
- Cancer research UK 2014. (Luettu 22.1.2014). Saatavissa <http://www.cancerresearchuk.org/>
- Casero RA Jr, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discovery* 6(5), 373-390 (2007)
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the national cancer institute* 59(1),221-6 (1977)
- Gendron KB, Hockstein NG, Thaler ER, Vachani A and Hanson CW. In vitro discrimination of tumor cell lines with an electronic nose. *Otolaryngol Head Neck Surg* 137: 269-273, (2007)
- Gordon RT, Schatz CB, Myers LJ, Kosty M, Conczy C, Kroener J, Tran M, Kurtzhals P, Heath S, Koziol JA, Arthur N, Gabriel M, Hemping J, Hemping G, Nesbitt S, Tucker-Clark L, Zaayer J. The use of canines in the detection of human cancers. *J Altern Complement Med.* Jan-Feb;14(1):61-67 (2008)
- Horoszewics JS, Leong SS, Kawinski E et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43(4), 1809-1818 (1983)
- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, ym. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology.*66, 1:4–34. (2005)
- Kogan I, Goldfinger N, Milyavsky M et al. hTERT-immortalized prostate epithelial and stromal-derived cells: an authentic in vitro model for differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res.* 66(7), 3531-3540 (2006)
- Lee JA and Verleysen M. *Nonlinear Dimensionality Reduction.* Springer Science+Business Media, NY, USA (2007)
- LGC Standards. (Luettu 20.12.2013) Saatavissa: [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-9.aspx?geo\\_country=fi](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-9.aspx?geo_country=fi)
- Lichtenstein P, De Faire U, Floderus B ym. The Swedish Twin Registry: a unique resource for clinical, epidemiological and genetic studies. *J Intern Med.*252,184-205 (2002)
- Lu-Yao GL, Yao SL. Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. *Lancet.* 349, 906-10 (1997)
- Merrill RM, Brawley OW. Prostate cancer incidence and mortality rates among white and black men. *Epidemiology.*8,126-31 (1997)
- Montuschi P, Mores N, Trove A, Mondino C, Barnes PJ. The Electronic Nose in Respiratory Medicine. *Respiration.* 85:72-84. (2013)

- Riley GF, Potosky AL, Lubitz JD, Kessler LG. Medicare payments from diagnosis to death for elderly cancer patients by stage at diagnosis. *Med Care*.33, 828–41. (1995)
- Russell DH, Levy CC, Schimpff SC, Hawk IA. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res*. 31(11), 1555-1558 (1971)
- Röck F, Barsan N, Weimar U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem Rev*. Feb; 108(2):705-725 (2008). Epub Jan 19 (2008)
- Suomen syöpärekisteri. (Luettu 18.1.2014) Saatavissa : <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/>
- Turner AP, Magan N. Electronic noses and disease diagnostics. *Nat Rev Microbiol*. 2(2), 161-166 (2004)
- Utriainen M, Kärpänoja E, Paakkanen H. Combining miniaturized ion mobility spectrometer and metal oxide gas sensor for the fast detection of toxic chemical vapors. *Sens. Actuators B Chem*. 938(1-3), 17-24 (2003)
- Voss A, Witt K, Fischer C, Reulecke S, Poitz W, Kechagias V, Surber R, Figulla HR. Smelling heart failure from human skin odor with an electronic nose. *IEEE*. (2013)
- Wilson AD, Manuela B. Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications. *Sensors* 11(1), 1105-1176 (2011)
- Wolf AM, Nasser JF, Wolf AM ym. The impact of informed consent on patient interest in prostate-specific antigen screening. *Arch Intern Med*. 156, 1333-6 (1996)