

**Kansi:**

ORION DIAGNOSTICA

IDeA sTR IT luotettavaan raudanpuutteen ja raudanpuuteanemian määrittämiseen tulehdusreaktiosta huolimatta.

Herkkä CRP IT-menetelmä matalien CRP-pitoisuuksien määrittämiseen sydäntautidiagnostiikassa, piilevän tulehduksen diagnosoimissa, vastasyntyneen tulehduksen toteamisessa ja hoidon tehon seurannassa.

Lisätietoja: Jaana Pykäläinen, puh. 010 429 4997  
Sähköposti jaana.pykalainen@oriondiagnostica.fi**Päätoimittajat:**

Marjaana Ellfolk

Yhtyneet Laboratoriot Oy

Höyläämötie 14, 00381 Helsinki

puh. 09-5060 5214

sähköposti marjaana.ellfolk@

yhtyneetlaboratoriot.fi

Henrik Alfthan

HYKS-Laboratoriodiagnostiikka

Naistenklinikka

Haartmaninkatu 2, 00290 Helsinki

puh. 09-471 61457

sähköposti henrik.alfthan@hus.fi

**Toimituskunta:**

Aimo Harmoinen (03) 247 6533

Pertti Koskinen (02) 313 1890

Timo Kouri (08) 315 4640

Päivi Laitinen (08) 315 4430

Aila Leino (02) 313 1913

Outi Malminiemi (03) 247 5619

Tiina Mäki (09) 580 1581

Ilkka Penttilä (040) 582 5564

Kari Savolainen (017) 173 176

Ursula Turpeinen (09) 471 72845

**Ilmoitukset:**

Aimo Harmoinen

(03) 247 6533, fax (03) 247 5554,

e-mail aimo.harmoinen@tays.fi

**Tilaukset ja osoitteenmuutokset:**

Jaana Ikonen-Toivanen

(016) 243 643, fax (016) 243 657

**Kongressikalenteri:**

Kari Savolainen

(017) 173 176, fax (017) 173 179

e-mail kari.savolainen@kuh.fi

**Tilaushinta:** 30 €**Julkaisija:**

Suomen kliinisen kemian

yhdistys r.y., Föreningen för

klinisk kemi i Finland r.f.

**Kirjapaino:**

Tekstias Oy &amp; Offset

Puh: (03) 31400 900, Fax: (03) 31400 950

**Sisältö***Ajankohtainen katsaus lääkeaineseulantaan*

Ursula Turpeinen ..... 67

*Laaja lääkeaineseulonta*

Ilkka Ojanperä ja Anna Pelander ..... 68

*Väitöskirja**Syklo-oksigenaasi-2 keuhkon ja mahan kasvaimissa*

Kirsi Saukkonen ..... 77

*Atrofien gastriitti-**sairaus, joka jää usein vähälle huomiolle*

Frank Laxén, Pentti Sipponen ja Reijo Tilvis ..... 78

*Over-expression of human prostate-specific**glandular kallikrein 2 in malignant**prostate tissue*

Pirkko Vihko and Annakaisa Herrala ..... 82

*Sirkka-Liisa Karonen**30 vuotta radiokemiaa sairaalalaboratoriossa*

Tessa Lehtinen ..... 84

*Sihteerin palsta* ..... 85*Kongressikalenteri* ..... 88

## Ajankohtainen katsaus lääkeaineseulontaan

Tässä numerossa on Ilkka Ojanperän ja Anna Pelanderin metodologinen yleiskatsaus laajaan lääkeaineseulontaan. Lääkeaineseulontaan kuuluu nykyisin suuri joukko erilaisia analyysitekniikoita ja niiden oikea valinta vaatii useiden tekniikoiden monipuolista hallintaa sekä erilaisia laitteistoja.

Yleisesti ottaen lääkeaineseulontaa tehdään kahdelta eri kannalta, joko kliiniseltä tai oikeuslääketieteelliseltä. Kliinisessä ympäristössä analyysitulokset on tavallisesti vain yksi muuttuja potilaan hoidossa, kun taas oikeuslääketieteellisessä tapauksessa tuloksella voi olla oikeudellisia tai rangaistuksellisia seurauksia. Kummassakin tapauksessa analyysituloksen luotettavuus on ensiarvoisen tärkeää.

Lääkeaineseulonnan tilaa EU:n alueella on selvitetty tutkimuksessa, joka julkaistiin v. 1998 (Badia et al., Clin. Chem. 44; 790-799). Tosin siinä esitetyt tulokset koskevat vuosia 1993-94, mutta on epätodennäköistä, että tilanne olisi siitä ratkaisevasti muuttunut. Euroopassa suurin osa lääkeaineseulontoja tekeviä laboratorioita on ei-kaupallisia ja niistä pääosan muodostavat kliiniset laboratoriot, vaikkakin maakohtaisia eroja esiintyy. Analyyttisen lähestymistavan valinta niissä riippuu selvästi laboratoriotyypistä. Oikeuslääketieteelliset laboratoriot tekevät enemmän identifikaatio- ja kvantitaatioanalyysijä kuin kliiniset laboratoriot. Kuten Ojanperän ja Pelanderin artikkelista ilmenee, ovat immunologiset menetelmät käytetyimpiä seulontamenetelmiä. Immunologisen menetelmän valintaa ohjaa paljolti "kitin" saatavuus ko. maassa. Tämän valinnan jälkeen käyttäjä on valmistajan tuottamien reagenssien varassa voimatta itse juurikaan vaikuttaa määrittämiseen. Toinen asia, johon käyttäjä tällöin joutuu mukautumaan, on valmistajan antamat "cutoff" -arvot. Tämä ei välttämättä ole huono asia, jos ne ovat alunperin asianmukaisesti määritetyt ja voivat siten johtaa yhtenäisiin "cutoff" -arvoihin. Näin on jo osittain Euroopassa käynytkin (Badia et al., 1998). Kuten kirjoittajamme toteavat, immunologisten menetelmien käyttö on sairaalalaboratoriossa käypä ratkaisu, mutta ne eivät yksin riitä. Niiden tueksi tarvitaan kromatografisia menetelmiä.

Lääkeaineseulonnessa on vielä paljon tehtävää metodien standardoinnissa, sillä tällä hetkellä tietyistä näytteistä saadaan hyvin erilaisia tuloksia riippuen käytetystä metodista ja analysoivasta laboratoriosta. Tämän vuoksi tulosten raportoinnin yhteydessä on syytä aina ilmoittaa käytetyt toimenpiderajat ja analyysimenetelmät.

**URSULA TURPEINEN**

*Dosentti*

*HYKS-Laboratoriodiagnostiikka*

# Laaja lääkeaineseulonta

*Ilkka Ojanperä ja Anna Pelander*

## Johdanto

Toksikologiseen tai oikeudelliseen kysymykseen vastaava lääkeaineiden laaja seulonta-analyysi on nykyään kysytty palvelu usealla yhteiskunnan alueella. Vaikka puhutaankin lääkeaineseulonasta, nimikkeen tarkoittamat analyysit saattavat sisältää myös laittomia huumeita, doping-aineita, torjunta-aineita tai muita toksikologisesti merkittäviä vierasaineita. Oikeuslääketieteellisessä kuolemansyynselvityksessä lähes kaikki potentiaaliset myrkyt ovat kiinnostavia. Kliinisen oikeuslääketieteen alueella, kuten rikosten uhrien ja tekijöiden tutkimisessa sekä lastensuojelussa, laaja lääkeaine- ja huumeiden seulonta on myös tarpeellinen. Liikenteeseen liittyvä päihdeanalytiikka on keskittynyt alkoholin lisäksi huumeisiin ja liikenteessä haitallisiin ns. kolmiolääkkeisiin. Doping-analytiikassa rajoitetaan Kansainvälisen Olympiakomitean kieltämiin aineisiin. Huumetestaus työpaikoilla, kouluissa ja laitoksissa käsittää yleensä vain tavanomaiset huumeet ja vääriin käytettävät lääkeaineet. Myrkytyspotilaan hoitoon liittyvä analytiikka on luonteeltaan edellisistä poikkeava:

analyysitulosten tulisi olla valmiina tunneissa eikä päivissä, jotta niillä olisi merkitystä potilaan hoidon kannalta, ja tämä rajoittaa käyttökelpoisten tekniikoiden valikoimaa. Vaikka myrkytyspotilaan oireenmukaisella hoidolla päästäänkin hyviin tuloksiin, varma tieto myrkytyksen aiheuttajasta mahdollistaisi entistä tehokkaammin suunnatun hoidon (1). Taulukossa 1 on esitetty haastavia kysymyksiä, joihin laaja lääkeaineseulonta voi antaa vastauksen.

Suomessa tapahtuvista myrkytyskuolemista noin puolet johtuu lääkeaineista tai huumeista, ja nämä aineryhmät aiheuttavat myös suurimman osan sairaaloissa hoidetuista myrkytystapauksista. Varsinaisten huumeiden seulonta- ja varmistusanalyysi virtsanäytteestä on vakiintunut käsittämään ensin immunologisen seulonnan ja positiivisten tulosten varmistuksen kaasukromatografia-massaspektrometria-tekniikalla. Sen sijaan laaja lääkeaineseulonta mahdollisuksiensa ja rajoituksiensa on useimmille varsin tuntematon alue, joka saattaa kaivata lisävalaistusta. Tässä kirjoituksessa lähestytään asiaa laboratorion näkökulmasta.

### **Taulukko 1. Laaja lääkeaineseulonta voi vastata mm. seuraaviin kysymyksiin:**

- Onko kyseessä myrkytyspotilas, ja jos on, mitä aineita hän on ottanut?
- Käyttääkö potilas hänelle määrättyjä lääkkeitä asianmukaisesti?
- Pitäytyykö hoidossa oleva narkomaani vain hänelle määrättyihin lääkkeisiin?
- Annettiinko sairaalassa potilaalle väärää lääkettä?
- Kuolinsyy ei selviä ruumiinavauksessa, mutta onko kyseessä myrkytys?
- Voiko kyseessä olla myrkyttämällä tehty henkirikos?
- Käyttikö potilas lääkemääräyksen mukaisesti depressiolääkkeitään ennen itsemurhaa?
- Oliko hukkuneella epileptikolla asianmukainen lääkitys?
- Liittyikö työtapaturmaan huumaavien aineiden käyttö?
- Oliko puukottaja teon tehdessään huumaavien aineiden vaikutuksen alainen?
- Kaatuiko lievän pahoinpitelyn uhri lääketokkurastaan johtuen?
- Huumattiinko raiskauksen uhri "tyrmäystipoilla"?
- Voidaanko epäiltyä henkilöä syyttää huumausaineiden käytöstä?
- Syyllystyikö moottoriajoneuvon kuljettaja huumautuneena ajamiseen?
- Käyttääkö odottava äiti raskauden aikana huumaavia aineita?
- Antavatko vanhemmat lapselle rauhoittavia lääkkeitä?
- Johtuuko koululaisen epänormaali käytös lääkkeitä tai huumeista?
- Käyttääkö kilpaurheilija doping-aineita?
- Onko koira myrkytetty rotanmyrkyllä?

## Lääkeaineiden analyttisiä ominaisuuksia

Lääkeaineet ovat pääosin pienimolekyylisiä tyypipitoisia orgaanisia yhdisteitä. Suurin osa aineista on emäksisiä amiineja, joiden hoitopitoisuudet plasmassa ovat alueella 0.05-0.5 mg/L. Happamia ja neutraaleja aineita, fenoleja, imidejä, sulfonamideja, karboksyylihappoja jne., on lukumääräisesti vähemmän, ja niiden hoitopitoisuudet plasmassa ovat yleensä suuruusluokkaa 0.5-50 mg/L. Yleisesti käytetyistä lääkeaineista tyypettömiä ovat mm. asetosalisylihappo, digoksiini, ibuprofeeni ja varfariini. Luonteeltaan amfoteerisia ja samalla analyttisesti haasteellisia aineita esiintyy uusien lääkkeiden joukossa enemmän kuin vanhojen. Taulukossa 2 on lueteltu myrkytyskuolemissa tärkeimpänä löydöksenä esiintyneitä lääkeaineita ja niiden ominaisuuksia. Digoksiinia ja insuliinia lukuun ottamatta kaikki listalla olevat aineet voidaan analysoida laajan kromatografisen lääkeaineseulonnan yhteydessä sellaisenaan ilman johdannaisen valmistusta.

**Taulukko 2. Myrkytyskuolemissa tärkeimpänä löydöksenä esiintyneitä lääkeaineita. Digoksiinia ja insuliinia lukuunottamatta aineet voidaan analysoida kromatografisten lääkeaineseulontojen yhteydessä.**

Lääkeaine	Ionisoituvat ryhmät	Terapeuttinen pitoisuus plasmassa mg/L
Alpratsolaami	imiini	0.01-0.02
Amfetamiini	prim. alif. amiini	0.03-0.6 (viitealue)
Amitriptyliini	tert. alif. amiini	0.04-0.2
Dekstropropoksifeeni	tert. alif. amiini	0.1-0.75
Digoksiini	glykosidi	0.7-2.6 nmol/L
Diltiatseemi	tert. alif. amiini	0.05-0.3
Doksepiini	tert. alif. amiini	0.03-0.15
Insuliini	peptidi	5-20 mU/L
Klooriprotikseeni	tert. alif. amiini	0.04-0.3
Kodeiini	tert. alif. amiini	0.03-0.1
Levomepromatsiini	tert. alif. amiini	0.05-0.14
Melperoni	tert. alif. amiini	0.04-0.06
Mirtatsapiini	tert. alif. amiini	ad 0.2
Morfiini	tert. alif. amiini, fenoli	0.08-0.12
Promatsiini	tert. alif. amiini	0.1-0.4
Propranololi	sek. alif. amiini	0.03-0.25
Sitalopraami	tert. alif. amiini	0.06-0.4
Tematsepaami	imiini	0.4-0.9
Trimipramiini	tert. alif. amiini	0.01-0.3
Tsopikloni	tert. alif. amiini	0.01-0.1
Venlafaksiini	tert. alif. amiini	0.07-0.3

## Näyte ja näytteenvalmistus

Laajaan lääkeaineseulontaan soveltuvia näytteitä ovat veri (kokoveri, plasma, seerumi) ja virtsa. Yksittäisten aineiden tutkimuksia tehdään rutiininomaisesti muiden biologisista näytteistä, kuten hiuksista ja syljestä. Kuolemansyynselvityksessä maksanäyte on arvokas lisä lipofiilisten aineiden toteamisessa. Akuutin lääkevaikutuksen tai myrkytyksen toteamiseen sopii parhaiten verinäyte. Mikäli tarkoituksena on havaita mahdollisimman laaja joukko lääkeaineita, kokoveri on paras näytemateriaali. Terapeuttisia referenssipitoisuuksia on saatavilla eniten plasmasta määritettynä. Verinäyte voidaan ottaa pakkokeinolain perusteella vaikka väkisin, jos henkilöä epäillään rattijuopumuksesta tai rikoksesta, josta ankarin rangaistus on enemmän kuin kuusi kuukautta vankeutta. Virtsanäytteellä on omat etunsa: aineet ovat todettavissa virtsassa pitempään, lipofiiliset aineet metaboliitteinaan, ja usein korkeampina pitoisuuksina kuin veressä, ja tästä on erityisesti etua väärinkäytettyjen aineiden toteamisessa. Virtsanäytteen saaminen voi olla joskus ongelma, mikäli potilas ei suostu

näytettä antamaan. Oikeudellisin perustein virtsanäytteen saa ottaa katetroimalla vain aivan poikkeustapauksessa. Hoitotilanne on asia erikseen.

Näytteenvalmistus tapahtuu kätevimmin ja edullisimmin 0.5-2 mL mittakaavassa liuotin-liuotinuuton avulla. Tällöin on syytä jakaa aineet emäksiseen ja happamaan fraktioon. Esimerkki yksinkertaisesta ja tehokkaasta uuttomenetelmästä typpidektiolla varustettua kaasukromatografiaa varten on esitetty kaaviossa 1. Mikäli tavoitellaan parempaa selektiivisyyttä tai parempaa hydrofiilisten aineiden saantoa, kiinteäfaasiuutto on varteenotettava vaihtoehto. Tällöin kuitenkin kustannukset ja työvaiheiden lukumäärä kasvavat. Ioninvaihto- ja käänteisfaasimekanismin yhdistäminen ns. *mixed mode* -faaseissa mahdollistaa polaarisuusasteikoltaan laajalajaisen uutun, mikä ei ollut mahdollista vielä jokin aika sitten käytettäessä puhtaita silika- tai käänteisfaasimateriaaleja. Uusi, lääkeaineseulontaan sopiva kiinteäfaasimikrouutto (*solid-phase microextraction*), valtaa alaa kaasukromatografisen ana-

### Kaavio 1. Yksinkertainen näytteenvalmistus kaasukromatografista lääkeaineseulontaa varten

#### EMÄKSISET AINEET

1 ml verta (+ sisäinen standardi)  
0.3 ml 1 M Tris-puskuria, pH 11  
0.3 ml butyyliasetaattia

Uutetaan vortex-sekoittajassa 5 min

Sentrifugoidaan

100 µl orgaanista (ylempää) faasia siirretään GC-analyysiin

#### HAPPAMAT JA NEUTRAALIT AINEET

1 ml verta (+ sisäinen standardi)  
0.5 ml saturoitua NH<sub>4</sub>Cl-liuosta  
0.5 ml etyyliasetaattia

Uutetaan vortex-sekoittajassa 5 min

Sentrifugoidaan

100 µl orgaanista (ylempää) faasia siirretään GC-analyysiin

lyysin yhteydessä.

### Kvalitatiivinen vai kvantitatiivinen analyysi?

Kvalitatiivinen seulonta soveltuu lääkeaineiden tai huumaiden käytön osoittamiseen, ja se suoritetaan useimmiten virtsanäytteestä. Kvantitatiivinen seulonta on syytä tehdä verinäytteestä, koska pitoisuudet veressä (plasmassa, seerumissa) kuvaavat parhaiten akuuttia vaikutusta ja vertailupitoisuuksia on kirjallisuudesta helposti saatavissa (2). On suuri ero siinä, kehitetäänkö ja ylläpidetäänkö kvalitatiivista vai kvantitatiivista seulontamenetelmää. Kvalitatiivisessa työskentelyssä aineita tarvitaan menetelmäkehityksen jälkeen vain detektorajojen tarkistukseen ja kvalitatiivisten parametrien ylläpitoon. Joissain spektrometrisissä tekniikoissa on mahdollista selvittää jopa ilman referenssiaineita. Kvantitatiivinen analyysi puolestaan vaatii jatkuvaa laitteistojen kalibrointia ja tarkkojen liuosten ylläpitoa, mikä tulee laajojen seulontojen osalta varsin kalliiksi. Laboratorion kallisarvoisin omaisuus saattaakin olla satojen tai tuhansien referenssiaineiden kokoelma eikä jokin analyysilaitteisto. Vaikka seulonnan yhteydessä määritetyt pitoisuudet eivät ole yhtä tarkkoja kuin kohdeanalyysissä, saavutettava tarkkuus on riittävä erottamaan terapeuttiset, toksiset ja fataalit pitoisuudet toisistaan. Esimerkiksi oikeuskemian laboratorion emäksisten lääkeaineiden kaasukromatografisen seulonta verinäytteistä

käsittää yli sata ainetta kvantitoinnin mittausepävarmuuden ollessa vain 10-20 %. Immunokemialliset tekniikat poikkeavat edellä mainituista periaatteista, koska ylläpito tapahtuu pitkälti reagenssinvalmistajan ehdoilla.

### Immunokemialliset määritykset

Immunokemialliset määritykset ovat helppokäyttöisyytensä ja nopeutensa takia sairaaloiden perusmenetelmiä. Varjopuolena on toisaalta se, että immunomääritysten käyttäjä on valmistajan tuottamien reagenssien armoilla voimatta itse paljoakaan vaikuttaa rutiineihin tai seulonnan laajuuteen. Immunomääritykset on yleensä tarkoitettu seerumille tai virtsalle, mutta jotkut niistä soveltuvat myös kokoverelle laimentamisen tai proteiinien saostuksen jälkeen. Taulukkoon 3 on koottu toksikologisesti tarpeellisia immunomäärityksiä eri valmistajien valikoimasta. Vaikka lista vaikuttaa laajalta, jokainen määrittäminen vaatii omat reagenssinsa, eikä samalla laitteella ole mahdollista tutkia kaikkia aineita. Edelleen,

#### Taulukko 3. Immunomenetelmillä määritettävissä olevia toksikologisesti merkittäviä lääke- ja huumausaineita

Amfetamiinit  
Barbituraatit  
Bentsodiatsepiinit  
Buprenorfiini  
Dekstropropoksifeeni  
Digitoksiini  
Digoksiini  
Disopyramidi  
Etosuksimidi  
Fenobarbitaali  
Fentanyl  
Fenytoliini  
Flunitratsepaami  
Fluoksetiini  
Kannabis  
Karbamatsepiini  
Kiniidiini  
Kokaiini  
Kotiniini  
Lidokaiini  
LSD  
Metadoni  
Metamfetamiini ja MDMA  
Metotraksaatti  
Morfiini  
Opiaatit  
PCP (Fensyklidiini)  
Petidiini  
Primidoni  
Promatsiinit  
Teofylliini  
Trisykliset antidepressantit  
Valproehappo

analysoitavan ryhmän sisällä olevien aineiden vasteet eroavat toisistaan (erilainen ristireaktio) eikä ryhmän aineita voida tunnistaa erikseen. Esimerkiksi eräässä bentsodiatsepiinimäärityksessä 200 µg/L cut off -rajaa (määritetty lormetasepaamille) vastaava pitoisuus alpratsolaamille on 90 µg/L ja loratsepaamille 600 µg/L. Mikäli tuloksella on oikeudellisia tai rangaistusseurauksia, immunomäärityksen tulos on aina varmistettava toisella, ei-immunologisella, tekniikalla.

## Tasokromatografia

Paperikromatografian ja ohutkerroskromatografian (TLC) historiallinen merkitys lääkeaineseulonnassa on kiistaton. Ennen näiden tekniikoiden käyttöönottoa aineiden tunnistus biologisista näytteistä perustui monimutkaisiin eristysprosesseihin ja eristetyn tuotteen, joka saattoi edelleen olla seos, analysoimiseen värireaktioiden ja UV-spektroskopian avulla. Vaikka TLC:n merkitys on viimeisen vuosikymmenen aikana ollut vähenevä, se saattaa olla edelleen hyötykustannus-suhteeltaan paras tekniikka lääkeaineseulonnassa. TLC:llä on runsaasti etuja: noin 15 näytettä voidaan analysoida samanaikaisesti, detektiomahdollisuudet ovat moninaiset värireaktioista massaspektrometriaan ja levyt ovat kertakäyttöisiä mahdollistaen yksinkertaisen näytteenvalmistuksen. Instrumentaalissa tasokromatografiassa, joka luonnollisesti on manuaalista kalliimpi tekniikka, useat toiminnot voidaan automatisoida. Erityisesti korjattujen Rf-arvojen ja *in situ* UV-spektrien avulla tapahtuva kirjastotunnistus on tehokas rutiinimenetelmä. Laajan seulonta-analyysin kannalta TLC:n haittapuolia ovat vaatimaton erotuskyky sekä se, että kvantitatiivista analyysiä ei voi yhdistää seulontaan kuten kolonnikromatografiassa. Tasokromatografiassa kvantitatiivinen kalibrointi ei ole lineaarinen eikä yleensä toistettava, joten standardien tulee olla samalla levyllä analyyttien kanssa.

Varsinkin Pohjois-Amerikan sairaala- ja oikeustoksikologian laboratorioissa on laajasti käytössä tuotteistettu TLC-järjestelmä (Toxi-Lab), joka perustuu standardivälineisiin ja -toimintatapoihin sekä valmistajan ajan tasalla pitämään analyttis-farmakologiseen kirjastoon. Tässä manuaalisessa järjestelmässä tunnistus tapahtuu Rf-arvojen ja perättäisen värireaktiosarjan avulla (3).

Päälämpainestun tasokromatografian (OPLC) käyttö on viime aikoina yleistynyt, vaikka merkittäviä laitevalmistajia on maailmanlaajuisesti vain yksi. OPLC:ssa liikkuva faasi etenee pumpun avulla eikä kapillaarivoimien vaikutuksesta kuten TLC:ssa. OPLC:n erotuskyky on merkittävästi parempi kuin TLC:n, joten tekniikka soveltuu hyvin mm. virtsanäytteiden analysointiin (4).

## Kaasukromatografia

Kaasukromatografia (GC) mahdollisti aikoinaan lääkeaineiden rutiininomaisen kvantitatiivisen analyysin biologisista näytteistä. Pakattujen kolonnien erotuskyky oli kuitenkin keskinkertainen, ja vasta korkean erotuskyvyn omaavien ja kestävien silikakapillaari-

lonnien yleistymisen 1980-luvun alussa teki kaasukromatografiasta tehokkaan seulontavälineen. Tyypiselektiivinen detektio on omiaan lähes kaikille lääkeaineille, kun taas herkkä elektroninsieppausdetektio soveltuu mm. bentsodiatsepiineille. Kvantitatiivinen kaksikanavainen GC tarjoaa peräti kolme tunnistusparametria, jotka ovat ensimmäisen kolonnin retentioparametri, toisen, selektiivisyydeltään erilaisen, kolonnin retentioparametri sekä kvantitatiivisten vastekerrointen (pitoisuuksien) vertailu kolonnien välillä. Näitä ominaisuuksia tehokkaasti hyödyntämällä voidaan päästä jopa varmempaan tunnistukseen kuin kaasukromatografiassa massaspektrometriassa. Erityisesti emäksisille aineille GC tyypiselektiivisellä detektiolla varustettuna on kvantitatiivisen veriseulonnan perusmenetelmä. Tertiaariset amiinit käyttäytyvät GC:ssä esimerkillisesti, mutta sekundaariset ja primaariset vaativat derivatisointia, mikäli halutaan päästä mataliin pitoisuuksiin. Tavanomaisia derivatisointitekniikoita ovat silylointi ja asylointi. Uutena tekniikkana GC:ssä on käytettävissä ns. retentioajan lukitus (*retention time locking*), jonka avulla päästään erinomaiseen pitkän aikavälin kvantitatiiviseen toistettavuuteen ilman retentioindeksien tai muiden korjausstandardien käyttöä (5).

## Kaasukromatografia-massaspektrometria

Mikäli laboratorion varoja on käytettävissä vain yhteen analyysitekniikkaan, valinta voisi hyvin kohdistua kaasukromatografia-massaspektrometriaan (GC-MS). Tässä tekniikassa yhdistyy kapillaarikaasukromatografian hyvä erotuskyky massaselektiivisen detektorin tarjoamaan valtavaan informaatiomäärään. GC-MS on kolmessa vuosikymmenessä kehittynyt helppokäyttöiseksi, varmaksi ja edulliseksi tekniikaksi. Eniten kokemusta on kvadrupolilaitteista ja elektroni-ionisaatiosta. Valmiit seulontamenetelmät ja kaupallisesti saatavilla olevat elektroniset spektrikirjastot satoine tuhansine spektreineen tekevät GC-MS:n käyttäjän muita riippumattomammaksi työläästi hankittavista referenssi-aineista (6). Kvadrupolimassaspektrometriassa voidaan käyttää joko valittujen ionien seuranta (SIM) tai koko spektrin pyyhkäisydetektointia (*scan*). SIM-tekniikka soveltuu alhaisempien detektorajojensa takia matalan hoitopitoisuuden omaaville aineille, mutta seulottavien aineiden lukumäärä on rajoitettava muutama kymmeneen. Uusien laitteiden herkkyyks mahdollistaa lääkeaineseulonnan scan-muodossa jopa verinäytteiden pitoisuustasolla, eikä kirjastojen laajuudesta tällöin tarvitse tinkiä. GC-MS-tekniikan rajoitukset liittyvät aineiden haihtuvuuteen samoin kuin GC:ssä. Toisinaan massaspektrit eivät anna niin paljon informaatiota kuin toivoisi epäsuotuisan fragmentoitumisen takia. Tämä on yleinen ongelma tärkeiden tertiaaristen amiinien, kuten depressio- ja psykoosilääkkeiden, kohdalla.

## Nestekromatografia

Päinvastoin kuin terapeuttisessa lääkeaineseurannassa, nestekromatografinen (LC) tekniikka ei ole seulonnassa parhaimmillaan. Vaikka haihtuvuus ei aiheutakaan

analysoitaville aineille rajoituksia, on LC:n erotuskyky vain kohtalainen eikä UV-diodirividetektion tuottama informaatio aina riitä sitä kompensoimaan. LC-tekniikka on kuitenkin menestyksellisesti hyödynnetty ainakin yhdessä tuotteistetussa järjestelmässä (REMEDi), joka yhdistää näytteenvalmistuksen, kromatografisen erotuksen, satojen aineiden kirjastohauun ja kvantitatiivisen analyysin automatisoiduksi kokonaisuudeksi (7).

## Kapillaarielektroforeesi

Kapillaarielektroforeesi on hyvästä erotuskyvystään ja monipuolisuudestaan huolimatta jäänyt varjoon lääkeaineseulonnassa. Kirjallisuudesta löytyy kuitenkin raportteja, joissa tekniikkaa on hyödynnetty seulonnassa menestyksellisesti ilman, että kvalitatiivinen toistettavuus tai detektorijat veressä olisivat muodostuneet ongelmaksi (8). Diodirividetektio on rutiinia kapillaarielektroforeesissa, mutta liittäminen massaspektrometriin ei ole vielä täysin suoraviivaista.

## Nestekromatografia-massaspektrometria

Nestekromatografia-massaspektrometria (LC-MS) on nopeasti yleistynyt oikeustoksikologisissa laboratorioissa, joissa pyritään ehdottoman varmaan tunnistukseen. Yleisimmät ionisaatiomenetelmät ovat sähkösumutus ja kemiallinen ionisaatio. Ensin mainittu tekniikka on altis matriisin aiheuttamasta ionisuppressiosta johtuville ongelmille kvantitatiivisessa analyysissä, joskin supressioilmiötä voidaan paljolti välttää oikean näytteenvalmistuksen ja kromatografian avulla. Liikkuvan faasin koostumus ei ole yhtä vapaasti valittavissa kuin tavanomaisessa LC:ssä, mikä saattaa heikentää kromatografian tehokkuutta. Massa-analysaattoreista yleisimmät ovat yhden kvadrupolin laitteita, mutta vasta kolmois-kvadrupolilaitteilla (LC-MS/MS) saavutetaan muihin

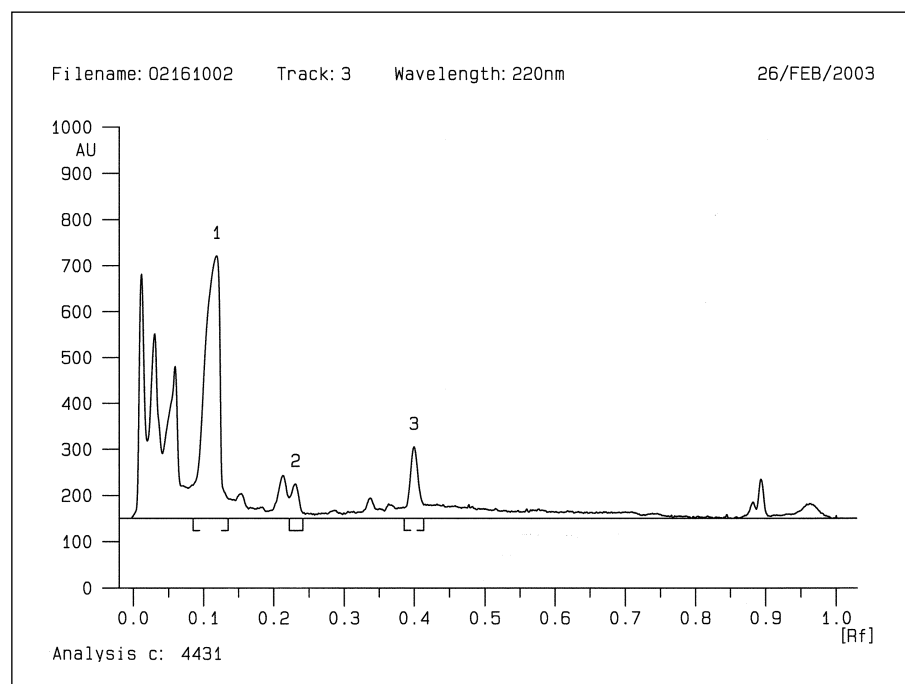
tekniikoihin nähden ratkaisevasti parempi tunnistusvarmuus (tytärionispektrit) tai alhaisemmat detektorijat (*multiple reaction monitoring*). LC-MS/MS -tekniikkaa on alettu viime vuosina soveltaa lääkeaineseulontaan (9), mutta menetelmien yleistymistä haittaa sopivien ohjelmistojen ja julkisesti saatavilla olevien spektrikirjastojen puute. Kvadrupolilaitteiden lisäksi ioniloukkuanalysaattori on ilmeisen käyttökelpoinen seulonnassa, vaikka sovelluksia onkin niukasti.

Korkean erotuskyvyn massaspektrometrioiden hintojen aleneminen on avannut aivan uusia uria laajaan lääkeaineseulonnan kenttään. Erityisesti nestekromatografia yhdistettynä lentoaikamassaspektrometriaan (LC-TOFMS) on osoittautunut käyttökelpoiseksi rutiinianaalytiikassakin (10). Esimerkkinä mainittakoon, että oikeuskemian laboratoriossa LC-TOFMS:n avulla tunnistettujen tematsepaamilöydösten massatarkkuus on 6 ppm (301.0738 +/- 0.0018), ja vastaavasti seulonnassa käytettyyn 20 ppm ikkunaan mahtuu kaksi yhdistettä 637:n aineen kirjastosta (tematsepaami ja klobatsaami). Nämäkin yhdisteet voidaan luonnollisesti erottaa retentioaikojen perusteella. Toistaiseksi vielä toteutumaton, mutta ilmeisesti saavutettavissa oleva unelma on kvalitatiivinen lääkeaineseulonta täysin ilman malliaineita yhdisteiden tarkkojen monoisotooppimassojen avulla. Tällöin voitaisiin nopeasti tunnistaa uudet designerhuumeet ja metaboliitit, joiden hankkiminen on vaikeaa. Katse kohdistuu erityisesti Fourier-muunnosmassaspektrometriaan, jossa rutiininomainen massatarkkuus on luokkaa 1-2 ppm.

## Tapausesimerkki

Oikeuslääketieteellisessä ruumiinavauksessa otetulle virtsanäytteelle suoritettiin kvalitatiivinen laaja lääkeaineseulonta kolmella eri menetelmällä: OPLC, LC-TOFMS ja GC-MS. Esitetöjen mukaan kyseessä oli

**Kuva 1a) Virtsanäytteen laaja kvalitatiivinen lääkeaineseulonta. OPLC-UV -densitogrammi aallonpituudella 220 nm.**

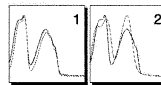


Method : C:\CAMAG\DATA\_SC3\OPLC2.PAM  
 Raw Data : C:\CAMAG\VARASTO2\O2161002.DFS  
 Library : C:\WINCATS\NEWLIB\OPLC22.SCL

Track 3, Analysis c: 4431

Peak # 4, Measured hRfc: 12, Area: 24933.2

No. Substance Name	Diff	Correlation
1. Propranolol	0	0.991158
2. Trimethoprim	1	0.917413



Confirmation:  necessary  not necessary  
 Hit # \_\_\_\_\_ confirmed by: \_\_\_\_\_

Track 3, Analysis c: 4431

Peak # 7, Measured hRfc: 26, Area: 1538.4

No. Substance Name	Diff	Correlation
1. Mirtazapine	1	0.986718

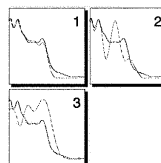


Confirmation:  necessary  not necessary  
 Hit # \_\_\_\_\_ confirmed by: \_\_\_\_\_

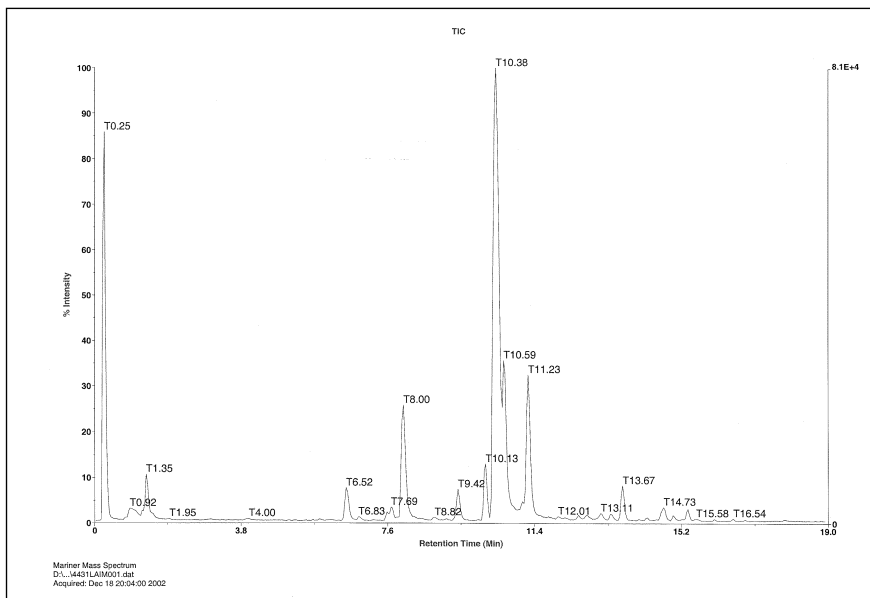
Track 3, Analysis c: 4431

Peak # 9, Measured hRfc: 48, Area: 4203.3

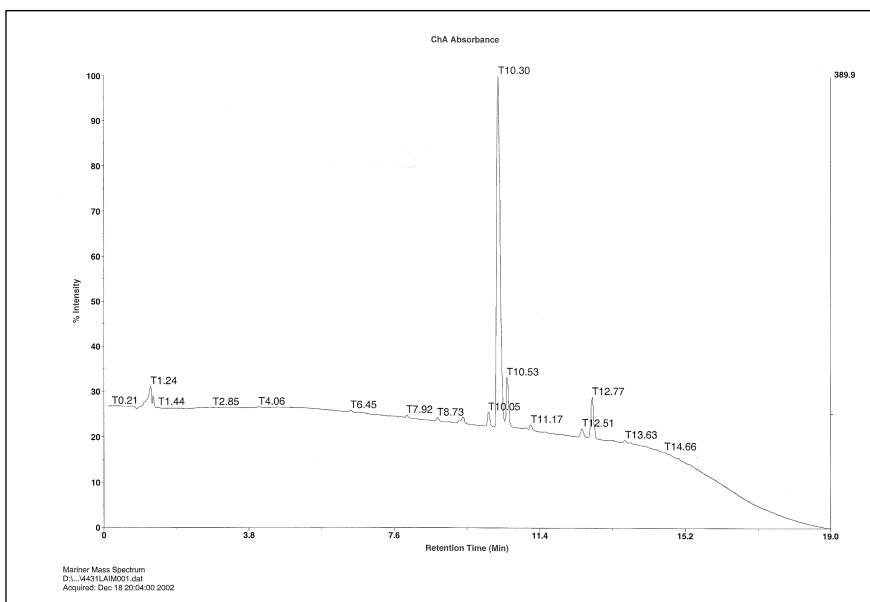
No. Substance Name	Diff	Correlation
1. Mianserin	5	0.995048
2. Nefazodone	-2	0.905690
3. Toremifene	-7	0.839196



Confirmation:  necessary  not necessary  
 Hit # \_\_\_\_\_ confirmed by: \_\_\_\_\_



Kuva 2a)  
LC-TOFMS  
-totaali-ionikromatogrammi  
samalle näytteelle kuin kuvassa 1.

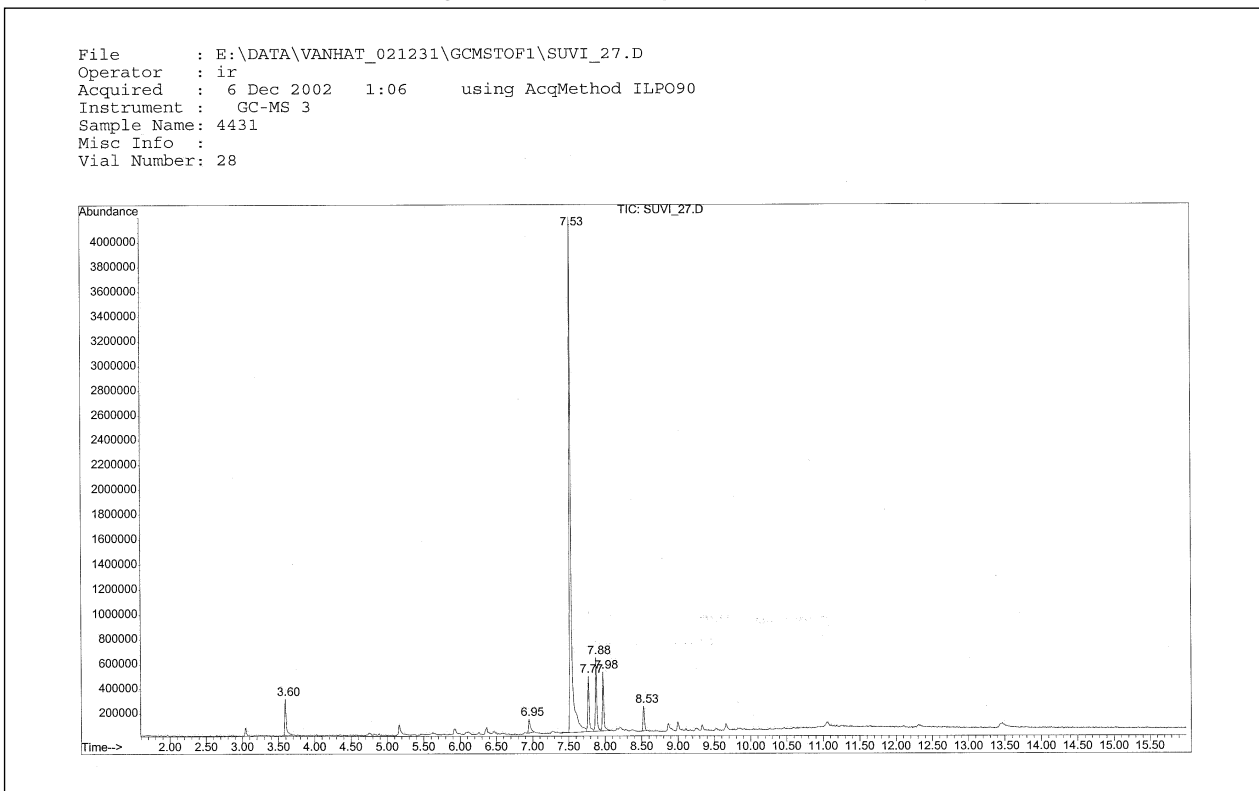


Kuva 2b) Samasta ajosta saatu  
LC-UV-kromatogrammi aallon-  
pituudella 230 nm.

## Kuva 2c) LC-TOFMS -tunnistusraportti.

LC-TOFMS SCREENING Results									
Sample ID:	4431 LAIM		Mass List Used:	C:\Mariner\Program\screening\10-16 l1st.xls					
Acquisition Date:	12/18/02 20:04		Set File Used:	C:\Mariner\Program\screening\Screening2.set					
Report Date:	12/19/02 10:03								
Mass Found	Reference Mass	ppm Error	Retention Time	Reference Retention Time	Retention Time Error	Compound	Formula	Peak Area	Compound Code
310.1429	310.1413	-5.1	13.67	13.6	0.07	FLUOXETINE	C17H18F3NO	3010.9	421
296.1267	296.1257	-3.3	13.35	0	13.35	NORFLUOXETINE	C16H16NOF3	1045.5	422
260.1664	260.1645	-7.4	10.38	10.35	0.03	PROPRANOLOL	C16H21NO2	168462.8	2141
265.1704	265.1699	-1.9	11.23	11.12	0.11	MIANSERINE	C18N2H20	18013.8	4121
163.1221	163.123	5.4	1.1	1.07	0.03	NICOTINE	C10H14N2	979.5	4931
177.1015	177.1022	4.3	1.35	1.42	0.07	COTININE	C10H12N2O	6541.9	4932
266.1656	266.1652	-1.4	8	7.87	0.13	MIRTAZAPINE	C17H19N3	32175.2	8921
252.1495	252.1495	0.1	7.58	0	7.58	NORMIRTAZAPINE	C16H17N3	897.6	8922
283.1655	283.1652	-0.9	6.52	0	6.52	HYDROXYATENOLOL	C14H22N2O4	729.1	9022
296.1762	296.1757	-1.5	9.42	9.34	0.08	DIBENZEPIN	C18H21N3O	4981.5	n/a

## Kuva 3a) GC-MS -totaali-ionikromatogrammi samalle näytteelle kuin kuvissa 1 ja 2.



myrkytyspäily. Näytteenvalmistuksessa käytettiin *mixed-mode* kiinteäfaasiuuttoa. Kuvassa 1a on esitetty OPLC-U-densitogrammi mitattuna aallonpituudella 220 nm ja kuvassa 1b OPLC -tunnistusraportti, joka perustuu korjattujen Rf-arvojen ja UV-spektrien kirjastohakuun. Näytteessä todettiin propranololi (kuva 1a, piikki 1), mirtatsapiini (kuva 1a, piikki 2) ja mianseriini (kuva 1a, piikki 3). Raportin (kuva 1b) vasemman puoleisessa sarakkeessa on esitetty tunnistusehdotukset paremmuusjärjestyksessä sekä korjatun Rf-arvon poikkeama kirjastoarvosta (Diff) ja UV-spektrin korrelaatio kirjastospektrin kanssa (*Correlation*). Oikean puoleisissa kuvakkeissa nähdään mitatut UV-spektrit ja ehdokaslistan kirjastospektrit päällekkäisinä.

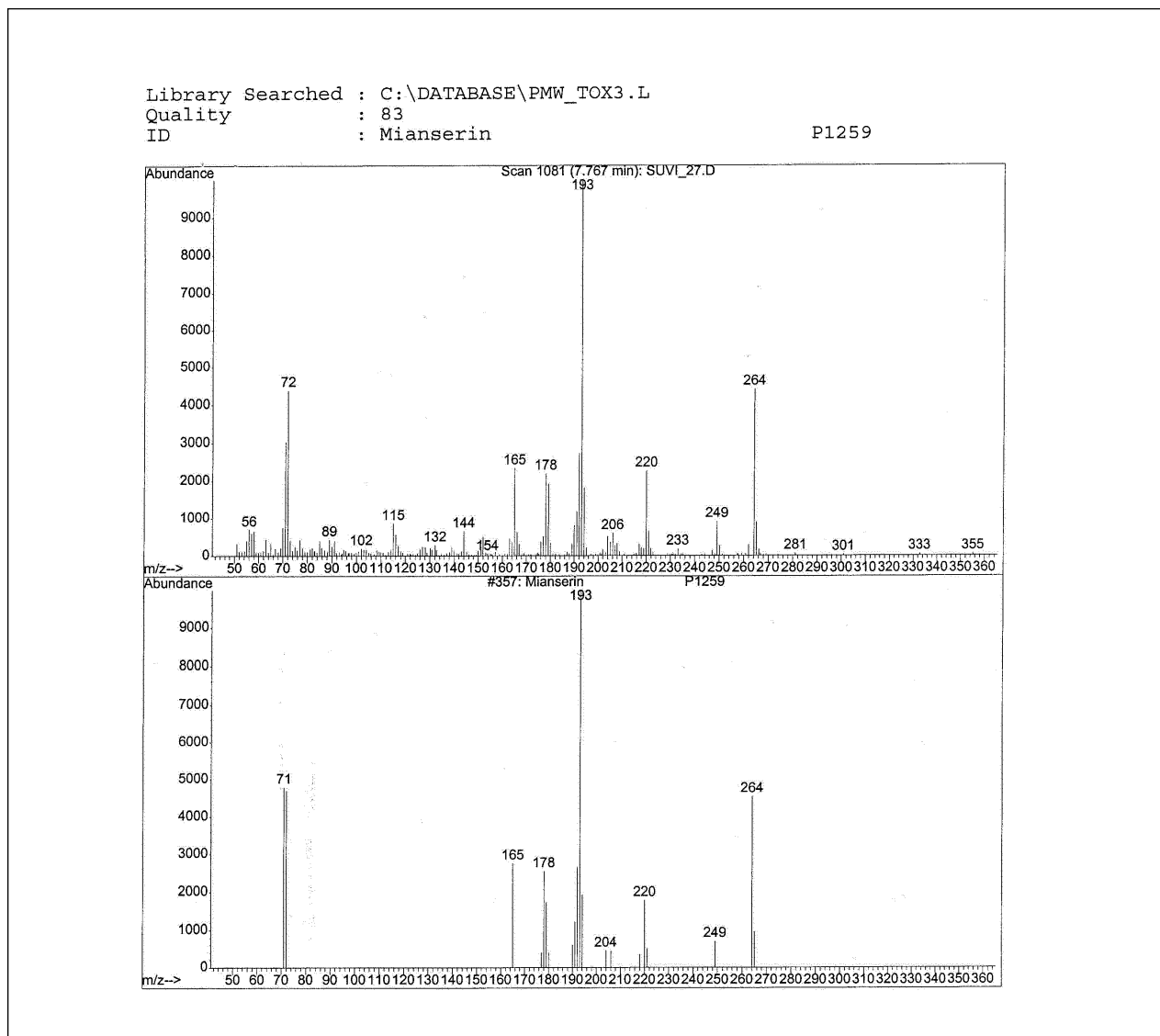
Kuvassa 2a on esitetty LC-TOFMS -totaali-ionikromatogrammi ja kuvassa 2b samasta ajosta saatu informaatio-

sisäisenä standardina. Menetelmässä käytetty toleranssi massatarkkuudelle oli 20 ppm, mutta tässä tapauksessa kaikkien tunnistettujen piikkien massatarkkuus oli parempi kuin 8 ppm.

mi aallonpituudella 230 nm. Kuvassa 2c on esitetty LC-TOFMS -tunnistusraportti, joka perustuu tarkkaan massa- ja myös retentioaikaan, mikäli viimeksi mainittu on tunnettu. Näytteessä todettiin OPLC-löydösten (propranololi, mirtatsapiini ja mianseriini) lisäksi fluoksetiini ja nikotiini metaboliitteineen, sekä mirtatsapiinin metaboliitti. Hydroksiatenololi luettiin vääräksi tunnistukseksi, koska sen retentioaika oli tuntematon eikä kantainetta tai ryhmän muita metaboliitteja ollut raportissa. Dibentsepiini oli menetelmän sisäinen standardi. Menetelmässä käytetty toleranssi massatarkkuudelle oli 20 ppm, mutta tässä tapauksessa kaikkien tunnistettujen piikkien massatarkkuus oli parempi kuin 8 ppm.

Kuvassa 3a on esitetty GC-MS -totaali-ionikromatogrammi. LC-TOFMS-löydöksiin verrattuna näytteessä todettiin lisäksi kofeiini, yksi propranololin metaboliitti ja hydroksimirtatsapiini, mutta ei norfluoksetiinia eikä

**Kuva 3b) Esimerkki tunnistuksesta spektrikirjastohaun avulla: piikin 7,77 min mitattu massaspektri (ylempi) ja mianseriinin kirjastospektri (alempi).**



normirtatsapiinia. Kuvassa 3b on esimerkki spektrikirjastohausta piikille, jonka retentioaika oli 7,77 min, tunnistuksena mianseriini.

Kolmella menetelmällä saadut tulokset poikkesivat hieman toisistaan. Tämä kuvaa eroja seulontamenetelmien luonteessa ja niihin liittyvien kirjastojen koostumuksessa ja laajuudessa. Tapauksen tulkinnan kannalta keskeiset löydökset, propranololi, mirtatsapiini ja mianseriini, olivat kuitenkin identtiset kaikilla menetelmillä.

## Johtopäätökset

Laaja lääkeaineseulonta on haasteellinen analytiikan laji, johon ei ole yhtä tai kahta vakiintunutta ratkaisua, vaan tekniikoiden valinta riippuu laboratorion tehtäväkentästä ja henkilökunnan erikoistumisesta. Sairaala-laboratorioissa immunokemiallisten menetelmien käyttö on luonteva ratkaisu, mutta näiden tueksi tarvittaisiin kromatografisen seulonta, esimerkiksi TLC tai GC-

MS. Erikoislaboratorioissa, joita Suomessa on vain muutama, on välttämätöntä hyödyntää useita analyysitekniikoita mm. tulosten oikeustoimikelpoisuuden vuoksi. LC-MS-tekniikoilta odotetaan tulevaisuudessa paljon myös seulonta-analyysin alueella.

## Kirjallisuus

- 1) Pohjola-Sintonen S, Kivistö KT, Vuori E ym. Identification of drugs ingested in acute poisoning: Correlation of patient history with drug analysis. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 749-52.
- 2) Schulz M, Schmoltdt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs. *Pharmazie* 1997; 52: 895-911.
- 3) Brunk SH. Thin-layer chromatography using the Toxi-Lab system. Kirjassa: Adamovics JA, toim. *Analysis of addictive and misused drugs*. Marcel Dekker, New York. 1995; 41-50.
- 4) Pelander A, Ojanperä I, Sintonen J ym. Improved

identification by in situ UV spectra in planar chromatography. *J Liq Chrom & Rel Technol* 2001; 24: 1425-34.

5) Rasanen I, Kontinen I, Nokua J ym. Precise gas chromatography with retention time locking in comprehensive toxicological screening for drugs in blood. *J Chromatogr B* 2003; (painossa)

6) Maurer HH. Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control. A review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2000; 3: 467-80.

7) Sadeg N, Francois G, Petit B ym. Automated liquid-chromatographic analyser used for toxicology screening in a general hospital: 12 months' experience. *Clin Chem* 1997; 43: 498-504.

8) Hudson JC, Golin M, Malcolm M ym. Capillary zone electrophoresis in a comprehensive screen for drugs of forensic interest in whole blood: An update. *Can Soc Forens Sci J* 1998; 31: 1-19.

9) Marquet P. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 255-76.

10) Gergov M, Boucher B, Ojanperä I ym. Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated target library search based on elemental formulas. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; 15: 521-6.

**ILKKA OJANPERÄ,  
ANNA PELANDER**

*Oikeuslääketieteen laitos  
PL 40 (Kytösuontie 11)  
00014 Helsingin yliopisto  
ilkka.ojanpera@helsinki.fi  
Kirjallisuus*



copyright H. Alfthan

# Väitöskirja

## Syklo-oksigenaasi-2 keuhkon ja mahan kasvaimissa



Kirsi Saukkonen

Prostaglandiinien aiheuttamia tulehdusoireita on jo yli sadan vuoden ajan lievitetty asetyylisalisyylihapolla ja myöhemmin myös monilla muilla prostaglandiinien tuotantoa vähentävillä tulehduskipulääkkeillä. Nämä lääkkeet estävät prostaglandiinien tuotannosta vastaavia syklo-oksigenaasi eli Cox-entsyymejä, joita tunnetaan kahta eri tyyppiä: Cox-1 ja -2. Cox-1 osallistuu elimistön ylläpitotehtäviin, ja sitä on lähes kaikissa elimistön soluissa. Cox-2:ta on terveessä elimistössä löydetty vain eräistä keskushermoston ja munuaisten soluista, mutta sen ilmentymisen on havaittu lisääntyvän tulehduksessa ja syövässä. Epidemiologiset tutkimukset ovat osoittaneet, että pitkäaikainen asetyylisalisyylihapon käyttö vähentää mahasuolikanavan sekä eräiden muiden syöprien riskiä. Monet tutkimustulokset viittaavat siihen, että vaikutus välittyisi ainakin osaksi Cox-2:n eston kautta. Tätä hypoteesia tukevat havainnot, että Cox-2 ilmentyy useissa syövässä, mutta normaalissa epiteelissä sitä ei esiinny. Selvin osoitus Cox-2:n osuudesta syövän synnyssä saatiin, kun Cox-2 poistogeenisiä hiiriä risteytettiin familiaalisen adenomatoottisen polyposin mallina toimivan Apc-poistogeenisen hiirikannan kanssa. Cox-2 geenin poisto vähensi paksusuolisyövän esiastetta edustavien polyyppien määrää. Lisäksi on osoitettu, että Cox-2:n ilmentäminen rintarauhassa transgeenisillä hiirillä saa aikaan invasoivia rintakasvaimia.

Väitöskirjassani olen tutkinut Cox-2 entsyymien ilmentymistä keuhko- ja mahasyövässä. Tulokset osoittivat, että Cox-2 ilmentyy ihmisen keuhkosyövässä ja sen esiasteissa, joihin liittyy lisääntynyt syövän riski. Cox-

2 ilmentyi erityisesti hyvin erilaistuneessa keuhkosyövän muodossa. Mahasyöpä voidaan kudospillisen rakenteen perusteella jakaa kahteen eri muotoon: diffuusiin ja intestinaaliseen mahasyöpään. Intestinaaliselle mahasyöväälle on tyypillistä, että kasvain muodostaa rauhasrakenneita. Lisäksi intestinaalista mahasyöpää edeltävät esiasteet, joita ei ole diffuusissa muodossa. Työssäni osoitin, että Cox-2 ilmentyi erityisesti mahasyövän intestinaalisessa muodossa ja tämän esiasteissa. Tämä tarkoittaa, että Cox-2 ilmentyy jo varhaisessa vaiheessa syövän kehitystä. Molemmissa syövässä Cox-2 ilmentyi erityisesti juuri syöpäsoluissa verrattuna ympäröivän kudoksen soluihin. Tämän työn tulokset siis osoittavat, että Cox-2 ilmentyy tietyissä keuhko- ja mahasyövän alatyypeissä. Lisäksi tutkin Cox-2:n ilmentymistä ja Cox-2 selektiivisen inhibiittorin vaikutusta hiiren mahasyöpämallissa. TFF1 eli trefoil faktori 1:n poisto saa aikaan hiirille mahan pyloruksen alueelle adenooman, joissa osoitin Cox-2:n ilmentyvän. Kolmen kuukauden hoito Cox-2 selektiivisellä inhibiittorilla selekoksibilla sai aikaan adenooman haavautumisen ja voimakkaan paikallisen tulehdusreaktion. Tämä vaikutus oli adenoomaspesifinen ja vastaavaa ei siis löytynyt mistään muulta mahan tai suoliston alueelta.

### Tutkimuksen merkitys:

Tulevaisuudessa on mahdollista, että Cox-2 entsyymiä estäviä lääkkeitä käytetään perinteisten syövän hoitomuotojen liitännäishoitona. Siksi on tärkeää tunnistaa ne syöpätyypit ja niiden alatyypit, jotka ovat mahdollisesti herkkiä tällaiselle hoidelle. Tutkimustuloksistani on apua pohdittaessa Cox-2 estäjien mahdollisuuksia maha- ja keuhkosyövän hoidossa.

Väitöskirja tarkastettiin Helsingin yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa 11.2.2003. Väitöskirjan ohjaajana toimi dosentti Ari Ristimäki ja vastaväittäjänä professori Raymond N DuBois Vanderbiltin yliopistosta.

**KIRSI SAUKKONEN** (kirsi.saukkonen@helsinki.fi)  
Molekyyli- ja syöpäbiologian tutkimusohjelma  
Biomedicum Helsinki  
Haartmaninkatu 8  
00014 Helsingin yliopisto  
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/haart/vk/saukkonen/>

# Atrofinen gastriitti – sairaus, joka jää usein vähälle huomiolle

*Frank Laxén, Pentti Sipponen ja Reijo Tilvis*

Mahalaukun atrofinen gastriitti on yleinen sairaus varsinkin vanhemmissa ikäluokissa. Suomessa tälläkin hetkellä 5-10 % yli 50-vuotiaista ihmisistä sairastaa vaikea-asteista, pitkälle edennyttä atrofista gastriittia vaikka sairaus onkin nopeasti vähenemässä. Valtaosa tapauksista aiheutuu edeltävästä ja samanaikaisesta *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infektiosta. Noin 70-80%:lla pitkälle edennyttä atrofista gastriittia sairastavista potilaista on *H.pylori* vasta-aineita verenkierrossa vaikka *H.pylori*-hengitystesti tai ulosteen antigeenitesti ovatkin negatiiviset (1). On siis väärä luulo, että atrofisen gastriitti olisi yksinomaan harvinainen "autoimmuunisairaus". *H.pylori* infektion häätöhoito johtaa näillä potilailla vasta-ainetasojen laskuun ja, mikä tärkeintä, atrofisen gastriitti voi myös parantua onnistuneen hoidon jälkeen (2).

Helikobakteerigastriitin ja atrofisen gastriitin kliininen merkitys kulminoituu syöpävaaraan, *H.pylori* infektion merkittävään osuuteen peptisten haavatautiin patogeneesissa, ja atrofisesta gastriitista aiheutuvaan B12 -vitamiinin imeytymishäiriöön. B12 -vitamiinin puutteeseen tiedetään liittyvän psyykkisiä ja neurologisia oireita jo paljon ennen kuin vitamiinin puute johtaa anemiaan. Vitamiinin puute lisää myös homokysteiinin pitoisuutta veressä ja kudoksissa. Korkea homokysteiini puolestaan katsotaan itsenäiseksi riskitekijäksi sydän- ja verisuonisairauksissa.

*H.pylori* infektion häätöhoito on suositeltava toimenpide silloin, kun infektiin liittyy atrofisen gastriitti (Maastricht 2000 -konsensuslausuma) (3). Atrofisen gastriitti on kiistatta mahalaukun syövän riskiä merkittävästi lisäävä tila. Näin on varsinkin sellaisten keski-ikäisten ylittäneiden (yli 50 vuotta) henkilöiden kohdalla, joilla atrofisen gastriitti on vaikea-asteinen.

Suomalaisen Setti-tutkimuksen (4) mukaan noin 10 %:lla yli 55-vuotiaista tupakoivista miehistä on pitkälle edennyt mahalaukun korpusosan atrofisen gastriitti seerumin pepsinogeeni I (PGI) määrittämisen mukaan (atrofisen gastriitti voitiin myös varmistaa gastrokopiassa otettujen biopsioiden mikroskooppisessa tutkimuksessa lähes kaikilla miehillä, joilla PGI-taso veressä oli matala, alle 25 mg/l). Näistä miehistä maha-

laukun syöpä tai varma syövän esiaste (dysplasia) löytyi tähystyksessä noin 6%:lla. Vastaavanlaisessa tutkimuksessa Kotka-Vantaan miesväestössä (n. 12.000 "oireetonta" miestä 1990-luvun lopulla, ikä 51-65 vuotta), atrofisen korpusgastriitti löytyi 5%:lla ja mahalaukun syöpä tai esiastemuutos 4%:lla niistä, joilla PGI-testin perusteella oli atrofisen gastriitti (5).

Kahdessa edellämainitussa tutkimuksessa seulonta perustui yksinomaan PGI-mittaukseen seerumista. PGI-mittauksen avulla löytyvät varsin luotettavasti ne, joilla atrofisen gastriitti on mahalaukun korpusosassa. Mahalaukun korpusosan syöpä käsittää 30-50% kaikista mahalaukun syövästä Suomessa, loput ovat limakalvojen vaihtorajalla (anguluksessa) tai antrumissa. Jos seulonta olisi ollut mahdollista liittää myös seerumin tai plasman gastriini-17 (G17) -tasoa mittaava testi, olisi nykytiedon valossa ollut mahdollista löytää myös ne tapaukset (50-70 % syövästä), joissa atrofisen gastriitti ja kasvaimet ovat mahalaukun antrumiosassa.

## Matalan B12-vitamiinin ongelma

Vanhenevassa väestössä diagnosoimaton B12-vitamiinin puutos on yllättävän yleinen löydös. Yllämainitussa Kotkan ja Vantaan kaupunkien miesväestössä 6%:lla 51-65-vuotiaista seerumin B12-vitamiinin taso oli alle 170 pmol/l ja noin neljänneksellä taso oli alle 220 pmol/l (5).

Valtaosa B12-vitamiinin puutoksesta aiheutuu puutteellisesta dieetistä. Mahalaukun korpuksen atrofisen gastriitin aiheuttama parietaalisolujen kato ja siitä johtuva sisäisen tekijän (intrinsic factor) puute on toinen merkittävä B12-vitamiinipuutoksen syy, tai huono dieetti ja atrofisen korpuslimakalvo vaikuttavat samanaikaisesti. Sisäisen tekijän puute johtaa B12-vitamiinin imeytymishäiriöön, malabsorptioon. Muu B12-vitamiinin imeytymishäiriöön johtava tärkeä syy on hoitamaton keliakia, joka on tosin harvinainen sairaus vanhemmissa ikäryhmissä ja on helposti diagnosoitavissa mittamalla seerumista kudostransglutaminaasin ja endomy-siumin vasta-ainetaso.

B12-vitamiinin puutos johtaa seerumin (plasman)

homokysteiniinatasojen nousuun siitä syystä, että homokysteini-metioniini- aineenvaihdunta häiriintyy. Tämä seerumin homokysteiniinatasojen nousu oli Kotka-Vantaan aineistossa nähtävissä jo silloin kun B12-vitamiinitaso laski alle 220 pmol/l atrofista korpusgastriiattia sairastavilla miehillä. Tällaisia oireettomia miehiä oli Kotka-Vantaan väestössä 2.5% (kuva 1). Keskimääräiset homokysteiniinatasot näyttävät nousevan huonosta dietistä aiheutuvassa hypovitaminoosissa vasta silloin kun seerumin B12-taso laskee alle 170 pmol/l. Tämä havainto viittaa siihen, että atrofinen gastriitti (imeytymishäiriö) yksin tai yhdistyneenä puutteelliseen dieettiin johtaa B12-vitamiinin puutokseen (ja homokysteiniinatasojen nousuun) nopeammin ja helpommin kuin sellaisilla, joiden kohdalla on kyseessä puhdas diettiongelma. Tämä merkitsee myös sitä, että jo alle 220 pmol/l olevien B12-vitamiinatasojen kyseessä ollen atrofisen gastriitin mahdollisuus on syytä ottaa huomioon, jotta oikeisiin jatkotoimenpiteisiin voidaan ryhtyä.

### Miten atrofisen gastriitin diagnoosi pitäisi tehdä?

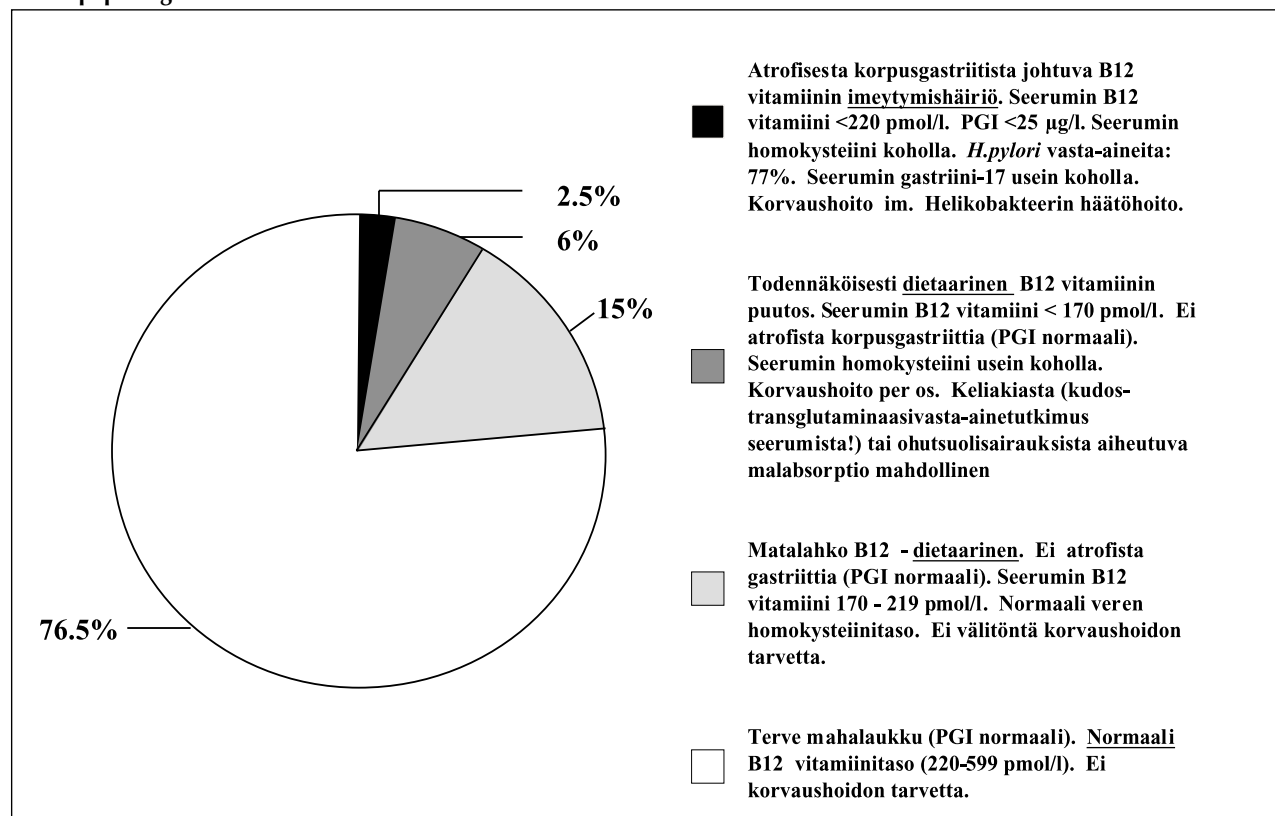
Mahalaukun tähystys ja siihen liitetty biopsianäytteiden (duodenumista, mahalaukun antrumista ja korpuksesta) mikroskooppinen tutkimus löytää atrofisen gastriitin ja keliakian luotettavasti. On kuitenkin selvä, että tähystys-

tutkimusta ei voida välittömästi suorittaa kaikille potilaille, varsinkaan perusterveydenhuollossa, tai esimerkiksi silloin kun ongelmana on vain epäily B12-vitamiinin puutoksesta.

Nykyisin käytettävissä olevat laboratoriotutkimukset antavat toisen huomionarvoisen diagnostisen tutkimusmahdollisuuden. Verikokeet antavat vastauksen luotettavasti ja nopeasti muun muassa siihen kysymykseen onko B12-vitamiinin puutoksen takana mahalaukun atrofisen gastriitti ja siitä aiheutuva vitamiinin imeytymishäiriö vai ei. On todennäköistä, että valtaosassa tapauksia tähän ongelmaan saadaan vastaus pelkkien verikokeiden ("biokemiallinen biopsia") avulla, ilman tähystystutkimusta (6). Aikaisemmin B12-vitamiinin imeytymishäiriön diagnostiikassa käytetty Schilling'in testi ei ole enää käytössä. Samoihin diagnostisiin johtopäätöksiin on nykyisin mahdollista päästä yksinkertaisilla veritestillä.

Oheisessa kaaviossa (kuva 1) on esitetty kuinka yleinen B12-vitamiinin puutos on suomalaisessa oireettomassa väestössä perustuen Kotkan ja Vantaan kaupungeista tehtyyn tutkimukseen (5). Kaavio esittää arviot siitä kuinka usein matala B12-vitamiinitaso liittyy suomalaisessa keski-ikäen ylittäneessä väestössä (51-65 vuotta) atrofiseen gastriittiin tai dietaariseen vitamiinipuutokseen (keliakian, osuutta ei ole otettu huomioon).

**Kuvio siitä kuinka yleisiä B12 -vitamiinin puutos ja matala B12 -vitamiinin seerumitaso ovat suomalaisessa keski-ikäen ylittäneessä (51-65 vuotta) väestössä. Arviot perustuvat Kotkan ja Vantaan kaupungeista kerättyyn aineistoon (n 12.000 oireetonta miestä) 1990-luvun lopulla. Kuviossa on myös esitetty minkälaisia johtopäätöksiä voidaan eri tilanteissa tehdä ja minkälaisiin laboratoriokeksiin johtopäätöksen perustuvat. PGI = pepsinogeeni I.**



## Miten laboratoriotulokset on tulkittava?

Verikokeella tehtävä tutkimus perustuu kolmeen verestä mitattavan suureen määrittämiseen (6). Nämä suureet ovat: 1) *H. pylori* vasta-ainetase (serologinen testi on luotettavin menetelmä atrofista gastriittia sairastavien potilaiden kohdalla todeta *H. pylori* -infektio (1), hengitystesti, ulosteen antigeenitesti ja mikroskooppinen *H. pylori*-tutkimus antaa usein väärän negatiivisen tuloksen, 2) seerumin PGI ja 3) G17 -mittaus. Viimeksi mainittu testi suositellaan tehtäväksi niin, että koehenkilö juo lasillisen proteiininrikasta juomaa ja verinäyte otetaan 20 minuutin kuluttua (kaikki em. suureet mitataan tästä näytteestä).

Testijärjestelmä perustuu suomalaisen gastriittitutkimuksen pitkään perinteeseen (7-9). Testin on kehittänyt kaupalliseksi paneeliksi (GastroPanel) suomalainen Biohit Oyj yhtiö. Testit ovat saatavissa useasta laboratorion (esimerkiksi Yhtyneet Laboratoriot). Paneeliin on yhdistetty tietokonepohjainen ohjelma (GastroSoft), joka auttaa tulosten tulkinnassa (kts "GastroSoft" internet-sivulta [www.biohit.com](http://www.biohit.com)). Laboratoriot toimittavat vastausten yhteydessä GastroSoft ohjelman antaman tulosteen ja suositukset.

### Kaikki testipaneelin tulokset ovat normaalit.

Tämä testitulokset merkitsee sitä, että *H. pylori* gastriitti ja atrofisen gastriitti ovat erittäin epätodennäköiset. Negatiivisen testituloksen oikea ennustearvo on korkea, 97-98% (6). Normaali testitulokset merkitsee sitä, että tutkittavalla potilaalla mahalaukun limakalvo on normaali ja terve ja kaikki mahalaukun sairaudet ylipäättensä (peptinen haavatauti, mahalaukun kasvaimet, jne) ovat erittäin epätodennäköiset, edellyttäen kuitenkin, että potilas ei käytä tulehduskipulääkkeitä tai hän ei kuulu syöpäsukuun (perityt geenivirheet).

Mahalaukun osalta terveillä henkilöillä B12-vitamiinin puutos (B12-taso alle 150-170 pmol/l) aiheutuu luonnollisesti ja todennäköisimmin puutteellisesta dieetistä (varsinkin jos myös kudostransglutamiinasiin ja endomysiumin vasta-ainetaso ovat normaalit). Vastaavasti B12-vitamiinin imeytymishäiriö on epätodennäköinen ja vitamiinin puutoksen korjaus voitaneen tehdä parantamalla dieettiä tai antamalla substitutiota tablettimuodossa normaaleina annoksina.

### Vain *H. pylori* -vasta-aineet koholla.

Potilaalla on *H. pylori* -infektio. Löydös viittaa myös siihen, että peptisten haavatautien riski on kohonnut. Häätöhoitoa kannattaa harkita, samoin gastroskopiatutkimusta hoidon jälkeen mikäli oireet sitä edellyttävät. B12-vitamiinipuutoksen suhteen, kaikki edellisessä kohdassa mainitut johtopäätökset koskevat myös tätä potilasryhmää.

### Todetaan atrofisen gastriitti

Atrofisen gastriitti on useimmiten *H. pylori*-infektiosta aiheutunut ja infektio kannattaa aina hoitaa (3). Mikäli PGI on matala (alle 25 mg/l) ja G17 on normaalia korkeampi, kyseessä on mahalaukun korpukseen rajoittunut atrofisen gastriitti. Matala G17 -taso puolestaan

merkitsee sitä että atrofisen gastriitti on mahalaukun antrumissa, tai sekä antrumissa ja korpuksessa mikäli PGI on samanaikaisesti matala (6).

Matala B12 -vitamiinitaso (alle 220 pmol/l) atrofista korpusten gastriittia sairastavalla (GastroPanel tulos viittaa atrofiseen korpugastriittiin ja seerumin B12 on matala) on vahva objektiivinen näyttö siitä, että potilaalla on sisäisen tekijän puutoksesta aiheutuva B12 -vitamiinin malabsorptio. Silloin kun atrofisen gastriitti on yksinomaan antrumissa, matala seerumin B12-taso johtuu todennäköisimmin puutteellisesta dieetistä. Sisäisen tekijän erityis korpulimalkalvosta on normaali ja siksi myös vitamiinin imeytyminen on normaali. Imeytymishäiriön kyseessä ollen B12 -vitamiinin puutoksen hoito on korvaushoito injektio muodossa, dieettipohjaisessa puutoksessa tablettimuodossa oraalisesti. On esitetty, että riittävä B12 -vitamiinin substitutiota voidaan aikaansaada myös imeytymishäiriöpotilailla oraalisesti antamalla B12 -vitamiinia jättiannoksina (10).

Vaikea-asteista atrofista gastriittia sairastava potilas on ohjattava diagnostiseen tähytystutkimukseen syöpävaaran vuoksi. Mikäli maligni tai premaligni muutos todetaan ovat edessä leikkaus tai tähytysseuranta. Mikäli premalignia muutosta ei skopiassa todeta ei oireetonta potilasta tarvitse seurata toistuvilla gastroskopioilla. (Suomen Gastroenterologia-yhdistyksen Käypä hoito-suositus työryhmä vuonna 1999). Sen sijaan B12 -vitamiinin seerumitasojen seuranta atrofista gastriittia sairastavien kohdalla voi olla viisasta.

Yhteenvedona toteamme, että yli 50-vuotiaalla henkilöllä todettu helicobakteeri-infektio voi merkitä atrofista gastriittia, syöpäriskiä, B12 -vitamiininpuutetta ja korkeata homokysteiinitasoa veressä. Atrofisen gastriitti on ainakin joissakin tapauksissa reversiibeli premaligni tila ja voi parantua onnistuneen helicobakteerin häätöhoiton jälkeen. B12 -vitamiinin puutos on yleinen suomalaisessa väestössä. Atrofisesta korpugastriitista johtuva B12 -vitamiinin imeytymishäiriö on merkittävä B12 -puutoksen alaryhmä. Sen erottaminen dieetarisesta puutoksesta on oikean hoidon järjestämisen kannalta tärkeä ja kliinisesti merkityksellinen asia. Tämä erottelu onnistuu helposti verestä tehtävillä yksinkertaisilla laboratoriotutkimuksilla. Kirjallisuutta

### Kirjallisuutta

1. Kokkola A, Rautelin H, Puolakkainen Pym. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with atrophic gastritis: comparison of histology, 13C-urea, breath test, and serology. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:138-41.
2. Kokkola A, Sipponen P, Rautelin H, ym. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on the natural course of atrophic gastritis with dysplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:515-20.
3. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, ym. Current concept in the management of *Helicobacter pylori* – The Maastricht 2 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:167-80.
4. Varis K, Sipponen P, Laxén F, ym. Implications of serum pepsinogen I in early endoscopic diagnosis of

gastric cancer and dysplasia. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:950-6.

5. Sipponen P, Laxén F, Huotari K, Härkönen M. Low vitamin B12 and high homocysteine in serum in an elderly male population. Association with atrophic gastritis and *H.pylori* infection. Artikkelin lähetyksen julkaisutavaksi.

6. Sipponen P, Ranta P, Helske T, ym. Serum levels of amidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis. An observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:785-91.

7. Kekki M, Samloff IM, Varis K, Ihamäki T. Serum pepsinogen I and gastrin in screening of severe atrophic corpus gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1991;186:109-16.

8. Kekki M, Samloff IM, Varis K, Ihamäki T. Serum pepsinogen I and gastrin in screening of severe atrophic corpus gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1991;186:109-16.

9. Varis K, Samloff IM, Ihamäki T, Siurala M. An appraisal of tests for severe atrophic gastritis in relatives

of pernicious anemia. *Dig Dis Sci* 1979;24:187-91.  
10. Pitkänen J, Vilpo J. Voidaanko imeytymishäiriöstä johtuvaa B12-vitamiinin puutosta hoitaa oraalisella valmisteella? *Suom Lääkäril* 2001;56:1131-3.

**FRANK LAXÉN**

*LKT, gastroenterologian erikoislääkäri  
Sisätautien klinikka, TYKS,  
Turku*

**PENTTI SIPPONEN**

*Ylilääkäri, professori  
Patologian yksikkö,  
HYKS, Jorvin sairaala, Espoo*

**REIJO TILVIS**

*Ylilääkäri, geriatrian professori  
HYKS, Geriatrian klinikka, Helsinki*



copyright H. Alifhan

# Over-expression of human prostate-specific glandular kallikrein 2 in malignant prostate tissue

*Pirkko Vibko and Annakaisa Herrala*

## Introduction

Prostate cancer is the most frequently diagnosed malignancy in men. Human prostate-specific antigen (hPSA) has been a cornerstone of prostate cancer diagnosis and follow-up for more than two decades and human prostate-specific glandular kallikrein 2 (hK2) is a new potential candidate to improve the diagnosis of the disease. There is a high homology between these serine proteases (1-3). Both of them are mainly expressed in epithelial cells of the prostate gland, and mRNA levels of hK2 have been reported to be 10-50% of that of hPSA (4). It has been shown by immunohistochemistry that hK2 is expressed more in prostate cancer than does hPSA (5-6). To study this phenomenon further, we compared the hK2 and hPSA expression levels in both benign and malignant prostate tissue from the same patient sample at mRNA level using *in situ* hybridization and at protein level by immunohistochemistry (7) using specific monoclonal antibodies generated against hPSA (8) and hK2 (9).

## Recombinant hK2 and hPSA

We have developed a mass-scale production method for recombinant proteins in insect cells (10). We have produced for the first time the recombinant mature hPSA and hK2 and characterized them as individual proteins (11-12). Applying the knowledge gained from the studies and with specific tools, such as monoclonal antibodies, created for the recombinants, it was possible to study their connection to prostatic diseases.

## Expression at mRNA and protein levels

hK2 and hPSA mRNAs were detected in the epithelium of both normal and BPH tissue as well as in prostate cancer tissue. This was also confirmed in protein level with immunohistochemistry. The counting of silver grains per mm<sup>2</sup> in the *in situ* hybridization analyses showed hPSA expression to be higher in benign tissues than in cancer tissues. The average expression levels ( $\pm$ SD) were  $0.188 \pm 0.95$  and  $0.168 \pm 0.06$  for benign and cancer tissue, respectively ( $P=0.06$ ). The hK2

mRNA level, on the other hand, was significantly increased in cancer tissue compared to benign prostate tissue, the respective expression values being  $0.203 \pm 0.09$  and  $0.146 \pm 0.06$  ( $P<0.0005$ ).

The number of hPSA transcripts was higher than that of hK2 in 77.3% of benign tissues, whereas the respective value in cancer tissues was only 33.3%. In BPH tissue, the mean amount of hK2 mRNA was 82% of the respective value of hPSA ( $P<0.003$ ), while in cancer tissue the mean hK2 expression level was 21% higher than that of hPSA ( $P<0.01$ ). There was a correlation between the hPSA and hK2 mRNA levels in both benign ( $r = 0.735$ ,  $p<0.01$ ) and malignant ( $r = 0.767$ ,  $p<0.01$ ) tissues, indicating a possibility for coordinated expression of the genes in both normal and abnormal prostate gland.

The results on protein level support the findings at the mRNA level: most of the specimens showed a decrease in the hPSA protein content compared to that in benign tissue. Furthermore, an increase of hK2 protein in cancer areas compared to benign areas of the same tissue sections was detected in a majority of the specimens. However, the consistency between transcript and protein levels in some of the samples was not clear.

To find the possible reason for the over-expression of hK2 in malignant prostate, we analyzed whether there were changes in hK2 gene copy number with competitively differential PCR (13) and found out that hK2 gene was amplified 2 to 3 times in malignant prostate tissue, whereas no amplification of hK2 gene was detected from the same specimens.

## Summary

We showed by *in situ* hybridization technique that hK2 is expressed in higher, even double, amounts in prostate cancer tissue, when compared with benign prostate tissue specimens from the same patient. The results with hPSA were reversed. Immunohistochemistry results at protein level supported the mRNA results. Previously, it has been shown that hK2 is more related to malignant prostate tumors than hPSA (4-6). The immunoassays developed for hK2 show that hK2 concentrations in

serum are only about 1-3 % of that of hPSA in healthy males (14-15). The physiological role of hK2 is unknown. It has been speculated that hK2 is involved in the regulation of hPSA, as it is shown that hK2 can activate the zymogen form of hPSA *in vitro* (16). The report demonstrating the antiangiogenic activity of hPSA (17) empowers one to evaluate the results in the view that hK2 is overproduced in prostate cancer tissue in order to prevent disease progression by activating hPSA.

Gene copy numbers of KLK2 and KLK3 were analyzed using a competitively differential PCR-based system in benign and malignant prostate tissue. In the prostate cancer tissues studied, the KLK2 gene was amplified 2 or 3 times, while KLK3 gene was not amplified in the same specimens. Gene amplification is often the reason of over-expression of genes in malignant tissue.

We conclude that the correlation between hK2 and hPSA expression levels indicates coordinated expression of the genes in normal and malignant prostate gland. Our results show that hPSA and hK2 give diverse information of prostate cancer development and progression, and that hK2 analysis of the tissue mRNA levels and protein levels could be useful for the detection of prostate cancer, since the increase of hK2 is cancer-specific.

## References:

1. Henttu P, Vihko P. cDNA coding for the entire human prostate specific antigen shows high homologies to the human tissue kallikrein genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:903-10.
2. Lundwall A. Characterization of the gene for prostate-specific antigen, a human glandular kallikrein. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;155:1151-9.
3. Henttu P, Vihko P. Prostate-specific antigen and human glandular kallikrein: two kallikreins of the human prostate. *Ann Med* 1994;26:157-64.
4. Henttu P, Lukkarinen O, Vihko P. Expression of the gene coding for human prostate-specific antigen and related hGK-1 in benign and malignant tumors of the human prostate. *Int J Cancer* 1990;45:654-60.
5. Darson M, Pacelli A, Roche P ym. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasm and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urology* 1997;49:857-62.
6. Darson MF, Pacelli A, Roche P ym. Human kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology* 1999;53:939-44.
7. Herrala A., Porvari K., Kyllönen A., Vihko P. Comparison of human prostate specific glandular kallikrein 2 and human prostate specific antigen gene expression in prostate with gene amplification and over-expression of prostate specific glandular kallikrein 2 in tumor tissue. *Cancer* 2001;92:2975-84.
8. Vihko P, Kurkela R, Ramberg J, Pelkonen I, Vihko R. Time-resolved immunofluorometric assay of human prostate-specific antigen. *Clin. Chem.* 1990; 36:92-5.
9. Herrala A, Kurkela R, Porvari K, Isomäki R, Henttu P, Vihko P. Human prostate-specific glandular kallikrein is expressed as an active and inactive protein. *Clin Chem* 1997;43:279-84.
10. Vihko P, Kurkela R, Porvari K, ym. Rat acid phosphatase: over-expression of active, secreted enzyme by recombinant baculovirus infected insect cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:799-803.
11. Kurkela R, Herrala A, Henttu P, Nal H, Vihko P. Expression of active, secreted human prostate-specific antigen by recombinant baculovirus-infected insect cells on a pilot-scale. *Bio/Technology* 1995;13:1230-34.
12. Herrala A, Kurkela R, Porvari K, Isomäki R, Henttu P, Vihko P. Human prostate-specific glandular kallikrein is expressed as an active and inactive protein. *Clin Chem* 1997;43:279-84.
13. Deng G, Kim Y. Quantitation of erb-2 gene copy number in breast cancer by an improved polymerase chain reaction (PCR) technique, competitively differential PCR. *Breast Cancer and Treat* 1999;58:213-7.
14. Kwiatkowski M, Recker F, Piironen T, ym. In prostatism patients the ratio of human glandular kallikrein to free PSA improves the discrimination between prostate cancer and benign hyperplasia within the diagnostic "gray zone" of total PSA 4 to 10 ng/ml. *Urology* 1998; 52:360-5.
15. Klee G, Goodmanson M, Jacobsen S, ym. A highly sensitive automated chemiluminometric assay for measuring free human glandular kallikrein. *Clin Chem* 1999;45:800-6.
16. Lovgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:549-55.
17. Fortier A, Nelson B, Grella D, Holaday J. Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1635-40.

### **PIRKKO VIHKO ANNAKAISA HERRALA**

*Biocenter Oulu and Research Center for Molecular Endocrinology, Oulu University  
P.O. Box 5000,  
FIN-90014 University of Oulu  
FINLAND*

*Phone: +358-04-5431734*

*Fax: +358-8-3155631*

*Email: pviikko@whoccr.oulu.fi*

# Sirkka-Liisa Karonen

## 30 vuotta radiokemiaa sairaalalaboratoriossa

Radiokemian "Grand Old Lady", sairaalakemisti, dosentti Sirkka-Liisa Karonen jää eläkkeelle 31.8.2003 HYKS-Laboratoriodiagnostiikasta radiokemistin virasta. Hän on tehnyt mittavan elämäntyön kliinisen biokemian, radiokemian ja radiofarmasian opettajana ja tutkijana.

Sirkka-Liisa piti 26.2.2003 kliinisen kemian seminaarissa Meilahden sairaalassa jäähyväisluennon, jossa hän valotti kuulijoilleen 1960-luvulla alkaneen uransa vaiheita ja runsasta alan kirjallista tuotantoaan.

Sirkka-Liisa suoritti laudaturtyönsä immunokemian alalta kliinisen kemian laitoksella Meilahden sairaalassa ylikemisti Nils-Erik Sariksen johdolla v.1968. Sariksen opastamana hän myös perehtyi kiinteäfaasitekniikoihin, joista tuli keskeinen alue hänen urallaan. Vuosikymmenen lopulla syntyi ensimmäinen, sulfalääkkeisiin liittyvä julkaisu yhdessä tulevan sairaalakeemistin Aira Sorron kanssa.

1970-luvulla Sirkka-Liisa toimi ensin apulaiskemistinä ja myöhemmin hormoniosaston kemistinä Meilahden sairaalassa. Tänä aikana syntyi tiivis yhteistyö kliinisen kemian laitoksella professori Herman Adlercreutzin ja hänen tutkimusryhmänsä kanssa. Vuosikymmenen aikana syntyi 36 julkaisua, joissa Sirkka-Liisa oli mukana yhteistyössä useiden kliinisen kemian huippututkijoiden kanssa. Herman Adlercreutzin ohella heistä mainittakoon mm. Kristian Liewendahl, Matti Härkönen ja Bror-Axel Lamberg. Julkaisuissa mukana oli myös apulaiskemistejä, tulevia sairaalakemistejä: Ulla Seuderling (nyk.

Hohenthal), Pertti Mörsky, Tuula Helenius ja Helena Holmberg.

1980-luvulla julkaisuja, joissa Sirkka-Liisa oli mukana ehti kertyä jo 102 kpl useissa alan arvostetuissa lehdistä. Mukana oli jälleen joukko tunnettuja tutkijoita sekä kolme tulevaa sairaalakemistiä: Paula Järvenpää, Paula Pohja (-Nylander) ja Gunnel Sievers.

Seuraavan vuosikymmenen julkaisujen määrä kohosi jo 124:ään. Sirkka-Liisa on uransa aikana osallistunut siis varsin laajasti sairaalakemistien koulutukseen, sillä 1990-luvulla julkaistuissa tutkimuksissa oli mukana peräti 11 apulaiskemistiä: Helinä Korpela, Lena Lindroth, Riitta Tunninen, Riitta Tähtelä, Liisa Melamies, Eila Alitupa, Eeva-Liisa Kämäräinen, Minna Loikkanen, Leena Tervo, ja Arto Orpana.

Kuluvalle 2000-luvullakin on ehtinyt jo kertyä 7 julkaistua työtä, joissa Sirkka-Liisa on mukana.

Sirkka-Liisalla on ollut uransa aikana kaiken kaikkiaan 275 kanssa julkaisijaa 77:ssä eri lehdessä.

Monet henkilöt ovat olleet tärkeitä tukijoita ja innostajia, mutta suurimmat vaikuttajat hänen mielestään ovat olleet Nils-Erik Saris, Herman Adlercreutz, Risto Pelkonen, Kristian Liewendahl, Matti Härkönen ja Jorma K. Miettinen. Saris opetti "tieteen paloa ja in-nostusta". Sirkka-Liisa sanoo olevansa syvästi kiitollinen myös Herman Adlercreutzille, joka ei ollut mikään "kovan linjan johtaja" kliinisen kemian laitoksella vaan kannusti ja antoi nuorelle tutkijalle vapaat kädet tehdä työtä. Risto Pelkonen avasi kemistille tiet klinikkaan rohkaisemalla: tule klinikkaan katsomaan kuinka työtä tehdään! Radiokemian osastolla

Liewendahl oli kannustava esimies, joka myös antoi vapaat kädet tutkimustyöhön. Matti Härkönen oli "aina innostava ja tuli kuin tuulispää". Professori Jorma K. Miettinen puolestaan houkutteli Sirkka-Liisan 1980-luvulla radiokemian dosentiksi.

Sirkka-Liisa muisteli hilpeänä, kuinka hänen uransa alkuaikoina laboratoriotyössä ei vielä puhuttu laatujärjestelmästä. Hän esittelikin kuulijoille tyypilliset 70-luvun "SOP-ohjeet": käsinkirjoitetut ja moneen kertaan korjailut työohjeet, varsinaiset laatuuhmisten kauhistukset!

1960- ja 1970-luvulla käytettiin steroidi- ja peptidihormonien määrittämisessä pääasiassa RIA-menettelmiä. Koska valmiita menetelmiä ei juurikaan ollut, ne tehtiin itse. Hormonimäärittämisissä käytettiin pääasiassa tritioituja ja 125-Jodilla leimat- tuja merkkiaineita.

Radioimmunologisten menetelmien kehittäminen oli haastavaa työtä. Hyvän menetelmän edellytykset olivat: spesifinen antisereerumi, puhdas antigeeni ja merkkiaine sekä hyvä erotusmenetelmä.

1970-luvulla tulivat RIA-menettelmien rinnalle erilaiset kiinteäfaasi-entsyymimäärittäykset.

Uransa tärkeäksi julkaisuksi, eräänlaiseksi tukipilariksi, Sirkka-Liisa mainitsee kiinteäfaasilaktopero- oksidaasijoditusta käsittelevän julkaisun:

*Karonen S-L, Mörsky Pertti, Siren Markku, Seuderling Ulla. An enzymatic solidphase method for trace iodination of proteins and peptides with <sup>125</sup>-iodine. Analytical Biochemistry 1975; 67:1-10.*

Sirkka-Liisan väitöskirja vuonna

1981: "Iodination with solid lactoperoxidase" on ollut pohjana lukuisille myöhemmille töille, joissa on käytetty kiinteäfaasilaktoperoksidasi-joditusta.

Myöhemmin Sirkka-Liisa laajensi tutkimustyötään radiofarmasian alueelle. Meilahden sairaalan radiokeemian osastolla tehtiin haastavaa tutkimustyötä, joista syntyi lukuisia julkaisuja. Yhtenä merkittävimmistä Sirkka-Liisa mainitsee julkaisun: *Karonen S-L, Aronen Hannu, Liewendahl Kristian, Nikkinen Päivi, Mäntylä Matti, Lindgren Jan.*

*Localization of human malignant tumors with radioiodinated recombinant tissue plasminogen activator.*

Monia tuumoreita onkin myöhemmin paikannettu jodikertymien avulla.

Sirkka-Liisalle työskentely radioaktiivisten aineiden parissa on aina ollut osa elämää. Hän huomauttaakin esityksensä loppuksi, että kaikkialla ympärillämme on luonnollisesti radioaktiivisia aineita, luonnossa n. 70 radioaktiivista nuklidia. Nämä eivät ole ihmisten aikaansaannoksia vaan osa ympäröivää luontoamme.

Sirkka-Liisa Karosen  
pitkäaikainen työtoveri

#### **TESSA LEHTINEN**

*Sairaalakemisti*

*HYKS-Laboratoriodiagnostiikka*

*Meilahti*

## **SIHTEERIN PALSTA**

### **Laivakokous**

SKKY:n perinteinen laivakokous-risteily Tukholmaan Rikstämmaan järjestetään 26. - 28.11.2003. Laiva on Viking Line Gabriella ja matkan aikataulu on seuraava:

keskiviikko 26.11.

klo 17.30 lähtö Helsingistä

torstai 27.11. klo 9.30+1

tulo Tukholmaan

torstai 27.11. klo 16.50

lähtö Tukholmasta

perjantai 28.11. klo 9.55+1

tulo Helsinkiin

Koulutuspäivien ohjelmassa on ensimmäisenä päivänä **Tulehdusreaktioiden kliiniskemiallista laborato-**

**riiodiagnostiikkaa** ja toisena päivänä **Ajankohtaista kliinistä kemiaa**. Alustava ohjelma seuraavalla sivulla.

Matkan hinta A-luokan kahden hengen hytissä 252 €, A-luokan yhden hengen hytissä 303 €. Hintaan sisältyy meriaamiainen, a la carte illallinen ja kokouskahvit menettellen.

Ilmoittautuminen Kuopion matkatoimistoon, Marke Ruonakangas, puh 010 826 6301 tai email [marke.ruonakangas@smt.fi](mailto:marke.ruonakangas@smt.fi) loka-kuun 17. päivään mennessä.

### **Sääntömääräinen syyskokous**

SKKY:n syyskokous pidetään keskiviikkona 26.11.2003 klo 15.00-15.30 Viking Linen Gabriella-lai-  
valla.

**JAANA IKONEN-TOIVANEN**  
*sihteeri*

## **Artikkeleista maksettavat kulukorvaukset**

KliinLab-lehti ei maksa varsinaisia kirjoituspalkkioita. Sen sijaan lehti korvaa kaikista täyspitkistä ja pyydettyistä artikkeleista kirjoittajien ammatinharjoittamiseen liittyviä kuluja 150 EUR:n edestä per kirjoitus. Tällaisia kuluja ovat:

- kongresseihin ja koulutustilaisuuksiin liittyvät maksut (osallistuminen, matkakustannukset, postereiden teko)
- ammattikirjallisuus

Jos kirjoittajia on useampi kuin yksi, niin kirjoittajat sopivat keske-

nään, miten kulut tasataan. Kulukorvaukset maksetaan kirjoittajille takautuvasti artikkeleista, jotka on julkaistu numerosta 1/03 lähtien. Alkuperäiset tositteet ja maksuyhteystiedot osoitetaan sairaalakemisti Aimo Harmoriselle osoitteeseen

Laboratoriokeskus  
Tampereen Yliopistollinen sairaala  
PL 2000  
33521 Tampere

Päätoimittajat

## SKKY:n laivakokousristeily OHJELMA

### Keskiviikko 26.11.2003

#### Tulehdusreaktioiden kliiniskemiallista laboratoriodiagnostiikkaa

15.40-15.50	Avaus
15.50-16.20	Tulehdusreaktioiden systeemibiologiaa Dosentti Risto Renkonen, Biomedicum ja Haartman Instituutti, HY
16.20-16.50	Prokalsitoniini Luennoitsija avoin
16.50-17.10	Fagosyyttiaktivaatiotutkimukset Professori Heikki Repo, HYKS-Sisätaudit
17.10-17.50	Tauko
17.50-18.20	Kaupallisia puheenvuoroja
18.20-18.50	Tulehdusreaktion diagnostiikasta laboratorion näkökulmasta Dosentti Kari Pulkki, HYKS-Laboratoriodiagnostiikka
18.50-19.20	Herkkä CRP Dosentti Aimo Harmoinen, TAYS, Laboratoriokeskus
21.00-	Illallinen

### Torstai 27.11.2003

#### Ajankohtaista kliinistä kemiaa

16.30-17.00	Miten voimme todeta nivelreuman ja seurata sen kulkua laboratoriotutkimuksilla Professori Juha Risteli, Oulun yliopisto
17.00-17.30	IVD-direktiivi Ylilääkäri Kimmo Linnavuori, Lääkelaitos
17.30-18.10	Tauko
18.10-18.40	Kaupallisia puheenvuoroja
18.40-19.10	Käytökokemuksia POC-glukoosimittareiden kytkemisestä sairaalan tietojärjestelmään Sairaalakemisti Erkki Halonen, Satakunnan keskussairaala
19.10-19.30	Viimehetken uutisia viitearvoprojektista Lääketieteellinen johtaja Jarkko Ihalainen, Medix Laboratoriot
21.00-	Illallinen

## Nimityksiä

### Ordiorin kliinisten laboratoriodien palveluista ovat päävastuissa:

Mika Koskinen, Beckman tuotteet  
Kirsi Mäkinen, Coulter tuotteet  
Hanna Vuorio, Coulter tuotteet  
Ari Aaltonen, Coulter huolto  
Erkki Karkkonen, Coulter huolto  
Jouni Majaniemi, Beckman huolto  
Harri Taavila, Beckman huolto  
Eila Silvennoinen, Beckman/Coulter huolto  
Muut 8 myyjää ja 5 huoltomiestä ovat myös vastuussa Beckman Coulterin tuotteista joko tuotteittain tai päivystyksen apuna.  
<http://www.F-Secure.com/>

### Oulun Yliopisto

Filosofian tohtori, terveystieteiden maisteri Päivi Laitinen on nimitetty Oulun yliopiston kliinisen biokemian dosentiksi 1.4.2003 alkaen. Laitinen työskentelee sairaalakemistinä Oulun yliopistollisen sairaalan laboratoriossa.

### Roche Diagnostics

Patient Care -myyntiyksikössä on THM Merja Lahdenperä nimitetty tuotepäälliköksi (Product Manager) sekä yo-merkonomi Maarit Ritosalo myyntisihteeriksi (Customer Support Specialist).

Molecular-myyntiyksikössä on FM Hanna Tolonen nimitetty aluepäällikön (Account Manager) äitiysloman sijaiseksi.

### Yhtyneet Laboratoriot Oy

Dosentti, sairaalakemisti Marjaana Ellfolk on nimitetty toimitusjohtajaksi ja FK Leena Savonen laboratorionjohtajaksi 1.4.2003 lukien.

# KONGRESSI-KALENTERI

## Kongressikalenteri

Koulutus- ja kongressikalenterin ylläpidosta vastaa dosentti Kari Savolainen (Kuopion yliopistollinen sairaala, Kliinisen kemian osasto, FIN-70211 Kuopio, puh. 017-173176, fax 017 173179, e-mail: kari.savolainen@kuh.fi). Tiedot uusista kongresseista ja koulutustilaisuuksista ovat tervetulleita. Kongressitiedon yhteydessä on maininta, jos ryhmämatka on järjestetty. Kalenteriin viety uusi kongressitieto on varustettu merkinnällä \*. Kalenteri on saatavana myös elektronisessa muodossa www-dokumenttina osoitteessa: <http://personal.inet.fi/private/ilkka.penttila>.

## 2003

### 7.9.-11.9.

8th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, Basel, Switzerland, <http://www.ictdmct2003.ch/>

### 8.9.-11.9.\*

The 26<sup>th</sup> European Lipoprotein Club (ECL) Meeting, Tutzing, Germany; [www.elc-tutzing.org](http://www.elc-tutzing.org)

### 7.9.-11.9.

226th Meeting of the American Chemical Society, New York, USA; information: Email: [natlmtgs@acs.org](mailto:natlmtgs@acs.org), [www.acs.org/meetings/](http://www.acs.org/meetings/)

### 5.9.-6.9.

Pre-congress Symposium: Transplantation Immunotherapy, where do we go here?/8<sup>th</sup> International Congress on Therapeutic Drug and Clinical Toxicology, Basel, Switzerland; [http://www.ictdmct2003.ch/meeting\\_information.htm](http://www.ictdmct2003.ch/meeting_information.htm)

### 7.9.-11.9.

8<sup>th</sup> International Congress on Therapeutic Drug and Clinical Toxicology, Basel, Switzerland; [http://www.ictdmct2003.ch/meeting\\_information.htm](http://www.ictdmct2003.ch/meeting_information.htm)

### 9.9.-12.9.

IXth International Congress on Pediatric Laboratory Medicine, Bucharest, Romania; information: Email: [ralcom@fx.ro](mailto:ralcom@fx.ro)

### 12.9.-13.9.

A Satellite Workshop: New Advances in Model-Based Individualized Drug Therapy/8<sup>th</sup> International Congress on Therapeutic Drug and Clinical Toxicology, Basel, Switzerland; [http://www.ictdmct2003.ch/meeting\\_information.htm](http://www.ictdmct2003.ch/meeting_information.htm)

### 14.9.-19.9.\*

8<sup>th</sup> International Conference on the Medical Aspects of Telemedicine, Tromsø, Norway; [www.telemed.no](http://www.telemed.no)

### 24.9.-27.9.\*

11<sup>th</sup> Meeting of the Balkan Clinical Laboratory Federation, Belgrade, Yugoslavia; [www.dmbj.org.yu](http://www.dmbj.org.yu)

### 24.9.-28.9.

4<sup>th</sup> Croatian congress of medical biochemists, Zadar, Croatia; <http://www.ifcc.org/products/IFFCawards/congresses%202002-2003.html#hdmg>

### 28.9.-31.9.

EUROTOX 2002 Congress, Florence, Italy; e-mail: [marina.marinovich@unimi.it](mailto:marina.marinovich@unimi.it), <http://www.eurotox.com>

### 28.9.-2.10.

XIIIth International Symposium on Atherosclerosis, Kyoto, Japan; ; IAS, tel: +39,02,29061879, fax: +39,02,29063581, e-mail: [isa@congre.co.jp](mailto:isa@congre.co.jp)

### 29.9.-1.10.

11<sup>th</sup> EFES Postgraduate Course in Clinical Endocrinology, St. Catherin's College, Oxford, UK; [www.euro.endo.org](http://www.euro.endo.org)

### 6.10.-10.10.

PhD-course of Preventive Cardiovascular Medicine, the Department for Preventive Cardiovascular Medicine, University of Southern Denmark, Esbjerg, Denmark; information: [hhrasmussen@health.sdu.dk](mailto:hhrasmussen@health.sdu.dk)

### 9.10.-10.10.

ENDO-päivät, Espoo; [johanna.t.arola@helsinki.fi](mailto:johanna.t.arola@helsinki.fi)

### 9.10.-10.10.

Laboratoriolääketiede 2003, Helsinki; tied. paivi.heino@bioanalytikkoliitto.fi

### 11.10.-14.10.

PhysPharm 2002, Scandinavian Congress of Physiology and Pharmacology, Odense, Denmark; <http://www.physpharm.sdu.dk>

### 23.10.-25.10

6. Danske kongres i Klinisk Biokemi 2003, Holmen, Kobenhagen, Denmark; [sorenl@biobase.dk](mailto:sorenl@biobase.dk), [www.dskbkongres2003.dk](http://www.dskbkongres2003.dk)

### 30.10.-1.11.\*

San Diego Conference 2003, Cool Tools III: New Technologies for Molecular Diagnostics, Baltimore, MD, USA; [www.aacc.org/meetings](http://www.aacc.org/meetings)

### 11.11.-13.11.\*

KEMIA 2003 KEMIAN PÄIVÄT, Kliinisen Kemian ohjelmassa laboratoriohenkilökunta ja organisaatiot, munuaistutkimukset ja verenohennuslääkkeisiin liittyvät tutkimukset; toimisto@kemianseura.fi

### 19.11.-22.11.

MEDICA 2003, Düsseldorf, Germany; <http://www.medica.de>

### 20.11.-22.11.\*

LabMed 2003, Providence, Rhode Island; [www.aacc.org/meetings](http://www.aacc.org/meetings)

### 27.11.-28.11.

SKKY:n laivakokous ja Rikstämman näyttely, Helsinki – Tukholma; tiedustelut Jaana Ikonen-Toivanen, e-mail: [jaana.toivanen@lpsph.fi](mailto:jaana.toivanen@lpsph.fi)

## 2004

### 1.9.-4.9.

International Society of Endocrinology Congress 2004, Lisbon, Portugal; ISE, tel: +44,20,76064012, fax: +44,20,77964676

### 21.4.-24.4.

5<sup>th</sup> International Symposium on Women's Health and Menopause – New Strategies-Improved Quality of Life, Florence, Italy; e-mail: [info@lorenzinfoundation.org](mailto:info@lorenzinfoundation.org)

### 24.4.-27.4.

The XXIX Nordic Congress in Clinical Chemistry – The Diagnostic Perspective, Malmö, Sweden; [per.simonsson@klkemi.mas.lu.se](mailto:per.simonsson@klkemi.mas.lu.se), <http://www.nfkk2004.org>

### 4.9.-8.9.

European Association Nuclear Medicine Congress, Helsinki, Finland; <http://www.eanm2004.com/general.html>

## 2005

16<sup>th</sup> IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Glasgow, UK; [www.glasgow2005.org](http://www.glasgow2005.org)