

**Eturauhassyövän nopea ja kajoamaton tunnistaminen virtsanäytteestä kannettavaa  
ionimobiliteetispektrometriaa käyttäen**

Mikko Malkamäki ja Taru Poikonen  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Dosentti Oksalan tutkimusryhmä  
Kesäkuu 2014

---

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Dosentti Oksalan tutkimusryhmä

MIKKO MALKAMÄKI JA TARU POIKONEN: ETURAUHASSYÖVÄN NOPEA JA  
KAJOAMATON TUNNISTAMINEN VIRTSANÄYTTEESTÄ KANNETTAVAA  
IONIMOBILITEETTISPEKTROMETRIAA KÄYTTÄEN

Kirjallinen työ, 17 s.

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

Elokuu 2014

Avainsanat: Elektroninen nenä, biologiset merkkiaineet, eturauhassyöpä

---

Tämä syventäväksi opinnoiksi tarkoitettu työ on kolmas osa laajempaa tutkimushanketta, jonka tavoitteena on kehittää syöpädiagnostiikkaa. Hankkeen aiemmissa osissa on todettu ionimobilitateettispektrometriaa (IMS) käyttävän kannettavan analysointijärjestelmämme kyky tunnistaa polyamiineja kaasufaasissa. Polyamiinit ovat joukko orgaanisia haihtuvia, voimakkaasti tuoksuvia yhdisteitä, jotka osallistuvat solujen normaaliin proliferaatioon ja erilaistumiseen. Polyamiinien on todettu lisääntyvän syöpäkudoksessa, jossa ne kiihdyttävät solujen proliferaatiota ja metastoittamista potentiaalia. Tämä välittyy myös virtsanäytteisiin kohonneina pitoisuuksina. On mahdollista, että ne osin selittävät syöpiin liittyvän ominaishajun.

Seerumin PSA-arvoa on käytetty laajalti eturauhassyövän seulonnassa ja eturauhassyövän riskin arvioinnissa. PSA ei ole kuitenkaan ideaalinen merkkiaine sillä sen määrittäminen edellyttää kajoavaa näytteenottoa, tuloksen saaminen vie aikaa ja menetelmä on suhteellisen kallis. PSA ei myöskään ole riittävän syöpäspesifinen. Katsauksessamme keskitymme vertailemaan IMS:n suorituskykyä eturauhassyövän diagnostiikassa verrattuna PSA:han ja muihin tutkittuihin merkkiaineisiin.

Tutkimme IMS:n kykyä tunnistaa eturauhassyöpä virtsanäytteen hajuprofiilista käyttäen eturauhasen hyvänlaatuista liikakasvua sairastavien ja terveiden yksilöiden näytteitä kontrolleina. Lisäksi tutkimme, kykeneekö IMS havaitsemaan suotuisan hoitovasteen verraten eturauhassyöpäpotilaiden pre- ja postoperatiivisia näytteitä.

Tutkimuksemme tärkein tulos on, että IMS kykenee erottamaan eturauhassyövän siedettävällä virhemarginaalilla. IMS saavuttaa PSA:n suorituskyvyn ja on herkkyydeltään muita tutkittuja merkkiaineita parempi. Jo näin pienellä otoskoolla saavutetut tulokset ovat lupaavia ja ne tuleekin varmistaa laajemmalla aineistolla. Lisäksi tulokset antavat aiheen tutkia IMS:n suorituskykyä myös muiden syöpien osalta.

<b>1 JOHDANTO.....</b>	<b>1</b>
1.1 ETURAUHASSYÖPÄ.....	1
1.2 SYÖPÄSEULONTA.....	1
1.2.1. <i>Pro PSA/Prostata Health Index, kun PSA&lt;10 µg/l.....</i>	<i>2</i>
1.2.2. <i>Prostata Cancer gene 3, PCA3.....</i>	<i>3</i>
1.2.3. <i>Geenifuusio/translokaatio merkkiaineet.....</i>	<i>4</i>
1.2.4. <i>Proteomiikka.....</i>	<i>4</i>
1.2.5. <i>GSTP-1.....</i>	<i>4</i>
1.2.6. <i>Yhteenveto merkkiaineista.....</i>	<i>5</i>
1.3 POLYAMIINIT.....	5
1.4 MITTAUSTEKNIIKAT JA ONGELMAT NIISSÄ.....	6
1.5 KOIRA JA HAIHTUVAT ORGAANISET YHDISTEET.....	6
1.6 ELEKTRONINEN NENÄ JA HAIHTUVAT ORGAANISET YHDISTEET.....	8
1.7 TUTKIMUSHYPOTEEESIT.....	10
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>10</b>
2.1 CHEMPRO 100.....	10
2.2 AINEISTO.....	11
2.3 MITTAUKSET.....	11
2.4 ANALYYSIMENETELMÄT.....	12
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>13</b>
<b>4 POHDINTA.....</b>	<b>14</b>
4.1 EDUT VERRATTUNA MUIHIN MENETELMIIN.....	14
4.2 RAJOITUKSET.....	16
4.3 TULEVAISUUDEN NÄKYMÄT.....	17
4.4 YHTEENVETO.....	17
<b>LÄHTEET .....</b>	<b>18</b>



# 1 Johdanto

## 1.1 Eturauhassyöpä

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä. Vuonna 2012 todettiin 1.1 miljoonaa uutta eturauhassyöpätapausta maailmanlaajuisesti. Suomessa ilmaantuvuus oli 96.6 tapausta 100.000 miestä kohden. Eturauhassyövän ilmaantuvuus on ollut jatkuvasti kasvussa. (Ferlay et al. 2012). Diagnostiikka perustuu peräsuolen kautta kajoavasti otettuun biopsiaan, johon päädytään nykyään seerumin prostataspesifisen antigeenin (PSA) pitoisuuden ja eturauhasen tunnustelun (tuseeraus) avulla. Eturauhassyöpä voidaan luokitella histologisesti Gleasonin luokituksen mukaan. Luokituksessa otetaan huomioon eturauhassyövän heterogeenisyys ja multifokaalisuus. Patologi ei näin ollen arvioi pahanlaatuisuutta vain solujen erilaistumisasteen mukaan, vaan ottaa huomioon myös muita histologisia kriteerejä, joiden perusteella syöpäfokus pisteytetään. Gleasonin pisteytys annetaan asteikolla 1-5, jolloin 1 tarkoittaa hyvin erilaistunutta ja 5 huonosti erilaistunutta kudosta. Tämän jälkeen lasketaan yhteen kahden yleisimmän kasvutavan pisteet, jolloin saadaan Gleasonin summa eli Gleason score. Tämä on nykyisin eturauhassyövän paras ennustekijä. Gleason score on sitä korkeampi, mitä aggressiivisempi tauti on kyseessä.

## 1.2 Syöpäseulonta

Urologiset syövät edustavat lähes neljännestä kaikista ihmiskehon syöivistä ja niille on ominaista merkittävä sairastavuus ja lisääntynyt kuolleisuus. Väestön keski-ian lisääntyessä urologisten syöpien vallitsevuus on lisääntynyt ja samalla vaatimukset syöpien seulontamenetelmille ovat tiukentuneet. Nykyisin käytössä olevien testien kyky erottaa syöpä hyvänlaatuisista kasvaimista on vaatimaton. Hyvälle seulontaohjelmalle on olemassa useita kriteerejä. Ensinnäkin seulottavan syövän esiintyvyyden tulee olla korkea. Lisäksi kullekin syövälle tulisi olla saatavilla herkkä ja tarkka virtsasta tai seerumista mitattava seulontatesti, jolla tulisi havaita kliinisesti merkittävä syöpä riittävän varhaisessa vaiheessa. Ohjelman tulee olla myös taloudellisesti kannattava. Valitettavasti useimmat seulonnat eivät täytä näitä kriteereitä seulottavan sairauden ja käytetyn menetelmän osalta.

Seerumin PSA-arvoa on käytetty laajalti eturauhassyövän seulonnassa ja eturauhassyövän riskin arvioinnissa. PSA ei ole kuitenkaan ideaalinen merkkiaine

eturauhassyövälle, sillä sen pitoisuus nousee useissa muissakin tilanteissa, kuten eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun yhteydessä. Lisäksi PSA:lle ei voida määrittää pienintä arvoa, jonka alapuolella eturauhassyövän riski olisi niin pieni, ettei sitä tarvitsisi ottaa huomioon päätettäessä jatkotutkimuksista. (Thompson et al. 2004). Roobol ja Carlsson laskivat tuoreessa katsauksessaan Thompsonin (2004) ja Schroderin (2008) tutkimuksista saadun datan avulla herkkyksiä ja tarkkuuksia PSA:lle sen arvojen ollessa välillä 1.1-10.1 µg/l. Ero skaalan ääripäiden välillä oli suuri. PSA:n kasvaessa herkkyys pieneni 83.4%:sta 0.9%:iin ja tarkkuus vastaavasti kasvoi 38.9%:sta 99.7%:iin.

Parhaimmillaankin herkkyiden ollessa mahdollisimman suuri tarkkuuden tästä kuitenkin liikaa kärsimättä (määritettiin laskemalla korkein herkkyiden ja tarkkuuden summa, niin ettei kumpikaan luvuista ole alle 50%), luvuiksi saatiin PSA:n arvolla 2.1 µg/l 52.6% ja 72.5%. PSA:n kynnysarvoa jatkotutkimuksille ei näin ollen voi yksiselitteisesti määrittää, vaan päätöksessä on otettava huomioon muut riskitekijät kuten PSA:n perustaso, potilaan ikä ja komorbiditeetit. (Roobol ja Carlsson 2013). Lisäksi Suomessa otetaan huomioon tuseerauslöydökset sekä PSA:n käyttäytyminen edelliseen mittaukseen verrattuna. PSA:n suureneminen viittaa pahempilaatuisen tautiin. (Jousimaa 2011).

PSA-testi on siis epätarkka ja tuottaa paljon vääriä positiivisia ja vääriä negatiivisia tuloksia. PSA testauksen yleistyminen onkin johtanut yli diagnostiikkaan, sillä seulonnassa löydetään myös pieniä ja paikallisia syöpäkasvaimia, joita ei muuten löydetäisi ennen kuin potilas kuolee muista syistä johtuen. (Etzioni et al. 2002). Näiden kasvainten hoidosta seuraa myös haitallisia sivuvaikutuksia kuten virtsanpidätyskyvyttömyyttä ja erektiohäiriöitä. (Carlsson et al. 2011). PSA vaatii lisäksi kajoavaa verinäytteen ottoa, ihmisen suorittamaa työtä, tulosten saamiseen kuluu paljon aikaa ja testi on suhteellisen kallis. Tämän perusteella on olemassa selkeä tarve uusille kajoamattomille, edullisille ja nopeasti määritettäville merkkiaineille ja tutkimusmenetelmille, joiden tulisi myös täyttää em. seulontamenetelmien kriteerit. Uusia merkkiaineita eturauhassyövän toteamiseen onkin viimeisten vuosien aikana löydetty ja tutkittu useissa tutkimuksissa.

### **1.2.1. Pro-PSA/Prostata Health Index, kun PSA<10 µg/l**

PSA:sta 5–40% on seerumissa vapaana. Jos kokonais-PSA:n pitoisuus on 2.5–10 µg/l ja tuseerauslöydös normaali, on vapaan PSA:n pitoisuuden määrittäminen todennäköisesti hyötyä arvioitaessa eturauhasbiopsian tarpeellisuutta. Jos kokonais-PSA:n pitoisuus on 4–10 µg/l ja vapaan PSA:n osuus yli 25%, on eturauhassyövän vaara varsin pieni eikä

jatkotutkimuksia tarvita. Jos vapaan PSA:n osuus on 10–20% ja kokonais-PSA:n pitoisuus 4–10 µg/l, hoitava lääkäri tekee ratkaisun jatkotoimenpiteistä tuseerauslöydöksen ja oireiden perusteella. Potilas otetaan seurantaan tai lähetetään urologille mahdollista eturauhasbiopsiaa varten. (Bill-Axelson et al. 2011).

PSA:n riittämättömän tarkkuus sen arvon ollessa alle 10 µg/l on luonut diagnostisen harmaan alueen, jossa eturauhassyöpä löydetään biopsialla vain 25%:ssa tapauksista. Tämä johtaa tarpeettomiin biopsioihin ja edelleen hyvänlaatuisten, potilaalle harmittomien kasvainten löytämiseen ja hoitamiseen. Tämä on huomionarvoista, sillä suurin osa syövästä on parannettavissa PSA:n ollessa alle 10 µg/l. PSA-arvot yli 10 µg/l sen sijaan viittaavat edenneeseen ja vaikeammin hoidettavissa olevaan tautimuotoon. Catalonia et al. selvittivät, että pro-PSA ja siitä johdettu Prostate Health Index (PHI) parantavat tarkkuutta PSA-arvon ollessa alle 10 µg/l ilman herkkyden laskua. Osassa tutkimuksista ilmeni myös yhteys pro-PSA:n ja eturauhassyövän aggressiivisuuden välillä.

Pro-PSA on vapaan PSA:n (fPSA) isomuoto ja sen primaarimuotoa p2PSA:ta muodostuu eturauhassyöpäkudoksessa. PHI lasketaan kaavasta  $p2PSA / fPSA \times PSA^{1/2}$ . Herkkydellä 80%-95% PHI:n tarkkuus ylitti PSA:n ja fPSA:n sekä fPSA-PSA-suhteen tarkkuuden. Kasvava PHI oli yhteydessä 4.7-kertaiseen eturauhassyöpäriskiin sekä 1.6-kertaiseen pahanlaatuisuuden (Gleason score suurempi tai yhtä suuri kuin 4+3=7) riskiin biopsiassa. Näin ollen voidaan todeta, että p2PSA ja PHI voivat olla hyödyllisiä vähennettäessä turhia biopsioita eturauhassyövän seulonnassa yli 50-vuotiailla miehillä, joilla PSA on välillä 2-10 µg/l ja tuseerauslöydös normaali. (Catalonia et al. 2011).

### **1.2.2. Prostata Cancer gene 3, PCA3**

PCA3-geeni koodaa prostataspesifistä lähetti-RNA:ta, ja sen ilmentymisen on todettu lisääntyvän huomattavasti eturauhassyövän yhteydessä. Normaalin eturauhasen ja sen hyvänlaatuisen liikakasvun yhteydessä PCA3:n ilmentymisen ei ole huomattu lisääntyvän. On todettu, että PCA3:n lähetti-RNA:n havaitseminen kudostestillä ennustaa syöpää paremmin kuin PSA-arvo. Lisäksi PCA3-geeniin pohjautuvaa virtsa-analyysia voidaan käyttää apuna eturauhassyöpä diagnostiikassa tuseerauksen jälkeen, sillä sen avulla voidaan löytää virtsasta syöpäsoluja. PCA3:n tarkkuudeksi on saatu 90.6% ja herkkydeksi 62.9%. Lisäksi kun PCA3-testin positiivinen (PPV) ja negatiivinen (NPV) ennustearvo määritettiin, PPV oli 78.6% ja NPV 81.7%. Näin ollen PCA3:n ja PSA:n

negatiiviset ennustearvot ovat samaa luokkaa, mutta johtuen PCA3:n korkeammasta positiivisesta ennustearvosta (PSA:n PPV 46.4%), sen diagnostinen tarkkuus on korkeampi (80.8%) verrattuna PSA:han (59.6%). Niinpä vaikka PCA3:n herkkyys on pienempi kuin PSA:n vastaava, sen tarkkuus ja diagnostinen tarkkuus näyttäisivät olevan huomattavasti paremmat kuin PSA:n. PCA3-geeniin perustuvat diagnostiset menetelmät vaativat kuitenkin lisätutkimuksia ennen kuin niiden kliinistä käyttökelpoisuutta voidaan arvioida. (Shen et al. 2011). Testin ongelmina ovat edelleen hitaus ja suhteellisen kallis hinta.

### **1.2.3. Geenifuusio/translokaatio merkkiaineet**

Eturauhassyöpäkudoksessa yli-ilmentyy useita geenejä. ERG ja ETV1 ovat tällaisia geenejä ja niiden on todettu fuusioituvan TMPRSS2-geenin alueelle. Tomlins et al. osoittivat, että 80% eturauhassyöpätapauksista (23/29 näytettä) on löydettävissä jokin geenifuusio. Hyvänlaatuisista eturauhaskudoksista fuusioita ei löydetty. (Tomlins et al. 2005). TMPRSS2:ERG-geenifuusio tapahtuu kromosomi 21:ssä, jossa osa TMPRSS2-geeniä deletoituu. Geenin jäljelle jäävä osa liittyy ERG-geeniin ja TMPRSS2:ERG-fuusio syntyy. Tämä geenifuusio löytyy 50%:lta eturauhassyöpäpotilaista. Nguyen et al. saivat tutkimuksessaan TMPRSS2:ERG-fuusiomarkkereiden tarkkuudeksi 100% ja herkkyudeksi 45.4%. Fuusiomarkkereiden tutkimiseksi käytettiin kvantitatiivista polymeerasiketjureaktiota (PCR). TMPRSS2:ERG-geenifuusio todettiin eturauhassyöpäspesifiseksi. Lisäksi TMPRSS2:ERG-fuusio näyttäisi olevan hyvä merkkiaine eturauhassyövän diagnosoimiseen potilailla, joilta on otettu väärä negatiivinen biopsia. (Nguyen et al. 2011). Näidenkin testien ongelmana on hitaus ja suhteellisen kallis hinta. Lisäksi ne edellyttävät kajoavaa näytteenottoa.

### **1.2.4. Proteomiikka**

Proteomiikka on laaja-alaista proteiinien tutkimista, jossa keskitytään erityisesti niiden rakenteeseen ja toimintaan. Proteomiikan avulla voidaan analysoida proteiinien ilmentymistä näytteessä ja tämä onkin yleisin proteomikan sovellus. Viime aikoina sen avulla on pyritty löytämään uusia proteiineja ja proteiinien yhdistelmiä, jotka voisivat toimia eturauhassyövän biologisina merkkiaineina. Yleisimmät menetelmät alalla ovat SELDI-TOF (Surface enhanced laser desorption and ionization time-of-flight) ja MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization-TOF). Adam et al. raportoivat 83% herkkyuden ja 93% tarkkuuden erottaessaan eturauhassyöpäpotilaiden seeruminäytteitä



hyvänlaatuisista näytteistä SELDI-TOF:n avulla. (Adam et al. 2002). Menetelmät edellyttävät kajoavaa näytteenottoa ja ovat hitaita ja kalliita

### 1.2.5. GSTP-1

GSTP-1-geeni kuuluu entsyymiperheeseen, jonka pääasiallinen tehtävä on suojata DNA:ta vapaiden radikaalien aiheuttamilta vaurioilta. Tämän geenin promoottorin hypermetylaation johdosta sen ilmentyminen lakkaa. Tämä on yleisin raportoitu somaattinen genomimuutos eturauhassyövässä. GSTP-1 voi osoittautua merkittäväksi biologiseksi merkkiaineeksi sen hyvän eturauhassyöpäspesifisyyden ansiosta. GSTP-1:tä voidaan mitata syöpäkudoksesta, virtsasta ja siemennesteestä, mutta nykyisellään sen havaitsemismetodi virtsasta ei täytä vaatimuksia. (Gonzalgo et al. 2004). Vaikka se kyettäisiin mittaamaan kajoamattomasti saadusta näytteestä, sen ongelmana on edelleen hitaus ja kalleus.

### 1.2.6. Yhteenveto merkkiaineista

Eturauhassyövän uusien merkkiaineiden diagnostinen tarkkuus näyttää olevan parempi kuin PSA:n, mutta monia kysymyksiä täytyy ratkaista ennen kuin mikään niistä voi siirtyä laajaan käyttöön. Kaikkien uusien merkkiaineiden ongelmana voi myös olla määrittämisen hitaus, työlääät määrittämenetelmät, kajoava näytteenotto ja suhteellinen kalleus. Suurin ongelma eturauhassyövän diagnostiikassa on sen ilmenemismuotojen suuri heterogeenisuus. Tämän vuoksi yhteen merkkiaineeseen perustuvalta lupaavaltakin testiltä jää useita syöpätapauksia havaitsematta. (Laxman et al. 2011). Taulukkoon 1 on koottu em. merkkiaineiden herkkyksiä ja tarkkuuksia.

**Taulukko 1: Diagnostisten menetelmien herkkydet ja tarkkuudet. PSA:n kohdalla käytetty pitoisuutta 2,1 µg/l, jolla saavutettu suurin herkkyys-tarkkuus-yhdistelmä.**

<b>Merkkiaine/menetelmä</b>	<b>Herkkyys</b>	<b>Tarkkuus</b>
PSA	52.6%	72.5%
Pro-Psa/PHI	95%	16%
PCA-3	62.9%	90.6%
Geenifuusio/translokaatio	45.4%	100%
Proteomiikka	83.0%	93.0%
GSTP1	54-76%	44-86%

### **1.3 Polyamiinit**

Polyamiinit ovat joukko orgaanisia haihtuvia yhdisteitä (volatile organic compounds, VOC), jotka osallistuvat solujen normaaliin proliferaatioon ja erilaistumiseen. Elimistön polyamiinien lähtöaineena toimii ornitiini, josta muodostuu putreskiinia ornitiini dekarboksylaasi (ODC) entsyymien avulla. Putreskiinista muodostetaan edelleen spermiidiiniä ja spermiiniä spermiidiini/spermiinisyntaasin avulla.

ODC on polyamiinisynteesin nopeutta rajoittava tekijä. Hyvänlaatuisissa soluissa sen aktiivisuus on matala (Casero et Martin 2007). Syövässä ODC:n aktiivisuus ja polyamiinien määrät lisääntyvät geenimutaatioiden vaikutuksesta. Myös muut tekijät kuten hormonit ja kasvutekijät lisäävät ODC:n aktiivisuutta. ODC:n inhibiittorien ja polyamiinianalogien tehoa kemoterapiassa on tutkittu ja tulokset vaikuttavat lupaavilta. (Gerner et Meyskens 2004).

Polyamiinien katabolia tapahtuu asetylaation ja oksidaation kautta; asetylaatio tapahtuu spermiidiini/spermiini N1-asetyylitransferaasi (SSAT) entsyymien avulla, oksidaatiota katalysoi N1-asetyylipolyamiini oksidaasi entsyymi. Kataboliatuotteina syntyy myös diasetyloitua polyamiineja (Morgan 1999).

Diasetyloitujen polyamiinien pitoisuus nousee syövässä, ja tämä välittyy myös virtsanäytteisiin kohonneina pitoisuuksina. Tästä syystä on tutkittu, voisivatko diasetyloidut polyamiinit toimia syövän merkkiaineina. Tutkimuksissa on todettu, että N1, N12-diasetyylispermiinin (DiacSpm) pitoisuus virtsassa on aiempia menetelmiä herkempi ja tarkempi syövän toteamisessa, ja sen avulla pahanlaatuinen muutos kyetään löytämään aiemmin. Myös muun muassa eturauhas-, munuais- ja kivessyövässä DiacSpm-pitoisuuksien on todettu olevan selvästi koholla virtsassa ja hoidon jälkeen pitoisuudet ovat laskeneet (Hiramatsu et al. 2005).

Polyamiinit ja muut haihtuvat orgaaniset yhdisteet ovat lupaava kohde kajoamattoman syöpädiagnostiikan saralla ja erityisen mielenkiintoista on, että ne ovat voimakkaasti tuoksuvia aineita, mikä mahdollistaa niiden tunnistamisen kaasufaasissa.

## **1.4 Haihtuvien orgaanisten yhdisteiden mittaustekniikat ja ongelmat niissä**

Haihtuvia orgaanisia yhdisteitä on aikaisemmin analysoitu kaasukromatografialla ja massaspektrometrialla. Nämä tavanomaiset menetelmät ovat kalliita, hitaita ja monimutkaisia sekä niiden käyttämiseen tarvitaan erityisosaamista. Koirien on todettu pystyvän haistamaan erilaisia syöpätyyppejä esimerkiksi uloshengitysilmaasta ja virtsasta. (McCulloch et al. 2006, Cornu et al. 2011). Viimeisten vuosien aikana on tutkittu myös elektronisen nenän käyttökelpoisuutta haihtuvien molekyylien havaitsemisessa. Elektronisella nenällä on kyetty erottamaan toisistaan useita aerobisia ja anaerobisia bakteerilajeja. Tämän lisäksi sillä on pystytty tunnistamaan munuaisen vajaatoiminnassa ja keuhkosyövässä muodostuvia haihtuvia yhdisteitä. Sitä on käytetty myös elintarviketeollisuudessa pilaantuneiden tuotteiden tunnistamiseen. (Turner et Magan 2004).

## **1.5 Koira ja haihtuvat orgaaniset yhdisteet**

Koirien kykyä tunnistaa ihmisen syöpä hajun perusteella on tutkittu 2000-luvulla. Mielenkiinto aihetta kohtaan heräsi vuonna 1989 julkaistun tapauskertomuksen myötä. The Lancetissa julkaistussa kuvauksessa kerrottiin koirasta, joka oli alkanut osoittaa mielenkiintoa omistajansa ihomuutosta kohtaan. Muutos osoittautui melanoomaksi. (Williams et Pembroke 1989). Tämän jälkeen esiin nousi useita muitakin samankaltaisia tapauskertomuksia, joiden pohjalta Willis et al. alkoivat tutkia koirien kykyä tunnistaa rakkosyöpäpotilaiden virtsanäytteet kontrollinäytteistä. Koulutetut koirat erottivat syöpäpotilaiden virtsan kontroleista paremmin kuin olisi odotettu pelkän sattuman perusteella. (Willis et al. 2004). Koirien käyttökelpoisuutta syövän tunnistamisessa hajun perusteella on tämän jälkeen tutkittu edelleen, ja niiden on todettu kykenevän erottamaan ainakin keuhko- ja rintasyöpä uloshengitysilmaasta. (McGulloch et al. 2006) Lisäksi koiran on todettu tunnistavan munasarjasyöpä kudoksenäytteistä. Tässä tutkimuksessa todettiin syöväällä olevan oma hajunsa, joka eroaa eri syöpätyyppien välillä. Aiemmin oli epäilty, että koira saattaa tunnistaa syövän siihen liittyvien liitännäisilmiöiden, kuten tulehduksen tai nekroosin, perusteella. (Horvath et al. 2008). Viimeisimmän tutkimukset alueella ovat keskittyneet eturauhassyöpään ja paksusuolisyöpään.

Sonoda et al. (2011) tutkivat voiko koira erottaa paksusuolisyöpäpotilaat kontroleista uloshengitysilman ja ulostenäytteiden avulla. Tutkimuksessa käytettiin 48 näyttettä

paksusuolisyöpäpotilailta ja 203 näytettä terveiltä kontrolleilta sekä 55 näytettä henkilöiltä, jotka olivat aiemmin sairastaneet syövän, mutta jotka olivat näytteen keräyshetkellä terveitä. Koira tunnisti paksusuolisyöpäpotilaat hengitysilmanäytteistä 91%:n herkkyydellä ja ulostenäytteiden perusteella 97%:n herkkyydellä. Molempien näytetyyppien kohdalla tarkkuus oli 99%. Huomattavaa oli myös, että tekijät kuten tupakointi, infektiot, hyvänlaatuiset paksusuolen polyypit tai inflammaatio eivät häirinneet koiran kykyä tunnistaa tapaukset kontrolleista. (Sonoda et al. 2011)

Cornu et al. (2011) tutkivat koirien kykyä tunnistaa eturauhassyöpä virtsanäytteistä. Tutkimuksessa käytettiin 33 eturauhassyöpäpotilaan virtsanäytettä ja 33 kontrollinäytettä. Kaikilla tutkimukseen osallistuneilla henkilöillä oli kohonnut PSA-arvo, ja heiltä kaikilta otettiin biopsia, jonka perusteella heidän antamansa näytteet luokiteltiin oikeiksi näytteiksi ja kontrolleiksi. Koira tunnisti oikein eturauhassyöväksi 30/33 näytettä. Kontrollinäytteistä koira tunnisti vääriksi positiivisiksi 3 näytettä. Näiden kolmen näytteen antaneilta henkilöiltä otettiin uusi biopsia, ja yhdeltä heistä löytyi eturauhassyöpä. Koira tunnisti siis kaikkiaan oikein 60 näytettä 66:sta mahdollisesta näytteestä, eli koira havaitsi syövän yli 90%:ssa tapauksista. (Cornu et al. 2011).

Näiden tutkimusten perusteella on voitu todeta, että syövällä on oma hajuprofiilinsa, jonka ainakin koirat kykenevät erottamaan. Tiedetään, että kasvaimet tuottavat haihtuvia molekyylejä, joita vapautuu mm. hengitysilmaan, hikeen ja virtsaan. Oletettavaa on, että joillain näistä haihtuvista orgaanisista yhdisteistä on oma hajunsa, jonka koirat oppivat yhdistämään syöpään. Koirien käyttö diagnostiikassa ei kuitenkaan ole järkevää, sillä koirien kouluttaminen on vaikea ja aikaavievä projekti. Lisäksi eri koirarotujen soveltuvuus tehtävään voi vaihdella ja samakin koira voi suoriutua tehtävästä erilailla päivystä riippuen. Samaa koira ei voi myöskään käyttää tunnistuksessa 10 vuotta kauempaa. Tästä syystä olisikin parempi tunnistaa spesifiset molekyylit, joita koira käyttää hajuntunnistuksessa ja kehittää standardoitu diagnostinen menetelmä näiden perusteella.

### ***1.6 Elektroninen nenä ja haihtuvat orgaaniset yhdisteet***

Elektroniset nenät ovat laitteita, jotka jäljittelevät biologisen nenän toimintaa. Laitteissa hajun tuottavat molekyylit aiheuttavat muutoksen kemiallisissa sensoreissa ja nämä muutokset tulkitaan hajun lähteen ominaiseksi hajuprofiiliksi pattern recognition – ohjelmiston avulla. Ihmisen nenästä eroten elektroninen nenä kuitenkin ”haistaa” myös

haihtuvia orgaanisia yhdisteitä, jotka ihmisen nenässä eivät saa aikaan hajuaistimusta. Tämän johdosta sitä voidaan periaatteessa käyttää minkä tahansa haihtuvia molekyylejä vapauttavan tuotteen tutkimisessa. (Haugen et Kvaal 1998).

Laitetta on käytetty runsaasti esimerkiksi elintarviketeollisuudessa laadun tarkkailun välineenä. Jo pitkään on tiedetty bakteerilajien tuottavan suuria määriä haihtuvia orgaanisia yhdisteitä lisääntyessään. Näitä yhdisteitä havaitsemalla pystytään elektronisen nenän avulla löytämään kontaminoituneet elintarvikkeet. (Turner et Magan 2004).

Bakteerien tuottamien haihtuvien orgaanisten yhdisteiden tunnistamista on käytetty myös esimerkiksi virtsatieinfektioiden aiheuttajan selvittämisessä (Pavlou et al. 2002) ja tuberkuloosin diagnostiikassa (Pavlou et al. 2004, Fend et al. 2006, Kolk et al. 2010).

Tutkimuksia elektronisen nenän käyttömahdollisuuksista syöpädiagnostiikassa on tehty 2000-luvun edetessä. Tutkimukset ovat keskittyneet lähinnä keuhkosityövän havaitsemiseen potilaiden uloshengitysilmanäytteistä. Keuhkosityöpäpotilaiden uloshengitysilmaa oli analysoitu jo aiemmin lähinnä kaasukromatografian ja massaspektrometrian avulla ja löydetty useita keuhkosityöväälle ominaisia haihtuvia orgaanisia yhdisteitä. (Phillips et al. 1999). Tämän jälkeen useat tutkimusryhmät ovat pyrkineet kehittämään keuhkosityöpädiagnostiikkaa elektronisen nenän avulla. Di Natale et al. erottivat tutkimuksessaan vuonna 2003 keuhkosityöpäpotilaat terveistä kontrolleista 94% herkkyydellä ja 100% tarkkuudella elektronista nenää käyttäen. Vielä ei kuitenkaan tiedetty voiko elektroninen nenä erottaa keuhkosityövän myös muista keuhkosairauksista. Spekuloitiin, että esimerkiksi keuhkohtaumatauti (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), joka usein edeltää keuhkosityövän syntyä saattaisi olla vastuussa keuhkosityöpäpotilaiden erilaisesta hajuprofiilista. Dragonieri et al. osoittivat vuonna 2009 tutkimuksessaan, että elektroninen nenä erottaa keuhkosityöpäpotilaat sekä COPD-potilaista että terveistä kontrolleista. Heidän tuloksensa viittasi myös siihen, että tekijät kuten tupakointi, ruokavalio tai hengitysteiden tulehdustilat eivät heikennä elektronisen nenän kykyä tunnistaa keuhkosityöpäpotilaat kontrolleista. (Dragonieri et al.). D'Amico et al. taas osoittivat, että elektroninen nenä pystyy erottamaan keuhkosityövän COPD:n lisäksi muistakin sairauksista, esimerkiksi keuhkoputken- ja keuhkopussintulehduksesta. (D'Amico et al. 2010).

Myös muita syöpiä on tutkittu jonkin verran elektronisen nenän avulla. Gendron et al. osoittivat, että elektroninen nenä pystyy erottamaan keuhkosityöpä ja

mesotelioomasolulinjat toisistaan sekä normaaleista fibroblasteista ja sileälihassoluista. (Gendron et al. 2007). Kateb et al. taas osoittivat, että glioblastooma ja melanoomasolulinjojen hajuprofiilien välillä on huomattavaa eroavaisuutta. (Kateb et al. 2009).

Bernabei et al. käyttivät elektronista nenää tutkiessaan erilaisten urologisten sairauksien diagnostiikkaa. He keräsivät virtsanäytteitä eturauhas- ja virtsarakkosyöpäpotilailta, eturauhasen hyvänlaatuista liikakasvua sairastavilta potilailta sekä muita urologisia sairauksia sairastavilta potilailta ja terveiltä kontrolleilta. Lisäksi osalta syöpäpotilaista tutkittiin myös postoperatiivisia virtsanäytteitä. Elektroninen nenä luokitteli kaikki potilaat oikein sairaksi ja kaikki kontrollit oikein terveiksi. Lisäksi huomattavaa oli, että kaikki postoperatiiviset näytteet luokiteltiin terveiksi. Elektroninen nenä ei kuitenkaan pystynyt täydellisesti erottamaan eri syöpätyyppejä toisistaan. Tulokset antavat kuitenkin alustavia viitteitä siitä, että elektronisen nenän avulla pystytään löytämään urologisia syöpiä aikaisessa vaiheessa. (Bernabei et al. 2008).

## **1.7 Tutkimushypoteesit**

Tutkimuksemme on kolmas osa laajempaa tutkimushanketta, jonka tarkoituksena on kehittää syöpien diagnostiikkaa. Kolmas vaihe keskittyy humaninäytteiden tutkimiseen. Aiemmin tehdyt mittaukset ovat koostuneet pilottisarjasta, joka sisälsi kuuden syöpäpotilaan ja kahden terveen henkilön virtsanäytteet. Tutkimustulosten perusteella havaittiin, että virtsanäyte on lupaava keino erottaa syöpä hyvänlaatuisesta kasvaimesta.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää pystyykö IMS-pohjainen elektroninen nenä tunnistamaan eturauhassyöpää sairastavat potilaat virtsanäytteen hajuprofiilin perusteella.

## **2 Aineisto ja menetelmät**

### **2.1 ChemPro 100**

Mittauksissa käytimme sensorina ChemPro 100 –kaasuanalysaattoria (Environics Oy, Mikkeli, Suomi), joka yhdistettiin kannettavaan tietokoneeseen näytteiden kemiallisen spektrin reaaliaikaisen tallentamisen mahdollistamiseksi. Lisäksi järjestelmään kuuluu näytteenottokammio. ChemPro100 on kannettava kaasumaisten aineiden ilmaisemiseen ja luokitteluun tarkoitettu laite, joka kehitettiin alun perin kemiallisten taisteluaineiden ja teollisuuskaasujen ilmaisuun. Laite perustuu avoimeen open loop

ioniliikkuvuuspektrometri (IMS) – tekniikkaan, jossa ilmaa pumpataan IMS-kennon läpi ja samalla se ionisoidaan. Ilman virtausnopeus on noin 1l/min. Ionisaatioon käytettävä tekijä on radioaktiivinen beetasäteilijä  $Am^{241}$ . Tämä on energeettisesti riittävä ionisoimaan ympäröivän ilman happi-, typpi- ja vesimolekyylit, joista muodostuu reaktantti-ioneja. Ilman hajumolekyylit ionisoituvat reagoimalla reaktantti-ionien kanssa protoninsiirto-, negatiivisen ioninsiirto-, varauksensiirto- tai dissosiativisen varauksensiirtoreaktion kautta. Ionit johdetaan kennoon, jossa on kahdeksan paria elektrodeja. Näiden välillä on erisuuruiset, voimakkuudeltaan 5-8 kV/m sähkökentät. Sähkökentät erottelevat ionit liikkuvuuksien perusteella, jolloin niistä voidaan tehdä spektrometrinen tunnistus elektrodeista lähtevien erisuuruisten sähkövirtasignaalien perusteella. Ionin liikkuvuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat sen koko, muoto, massa ja varaus. Laitte sisältää kuumennusosan, jotta virtaavan ilman lämpötila pysyy vakiona ja kosteusensorin, joka mahdollistaa ilmakehän kosteuden vaikutuksen arvioimisen tuloksia tulkittaessa. (Röck et al. 2008, Utrainen et al. 2003) Laitteen peruserä on matkia biologisen nenän toimintaa. Hajua ensin ”aistitaan” ja filtteroidaan ilmasta biokemiallisilla sensoreilla. Normaalisti tämän jälkeen sensoreiden signaalivaste hajulle vahvistetaan ja käsitellään käyttäen hermoverkkoanalyysiä. (Turner et Magan 2004). Tutkimuksessamme käytimme kuitenkin tämän sijasta Multidimensional scaling (MDS) –analyysimenetelmää. Prosessi johtaa hajun tunnistamiseen sille ominaisen kemiallisen hahmon perusteella.

## **2.2 Aineisto**

Aineistona käytimme Tampereen yliopistollisessa keskussairaalassa vuoden 2011 aikana kerättyjä virtsanäytteitä. Näytteet ovat pre- ja postoperatiivisia virtsanäytteitä, jotka otettiin lähes yksinomaan leikkausta edeltävänä aamuna. Virtsanäytteet kerättiin potilailta, jotka kärsivät eturauhasen hyvänlaatuisesta liikakasvusta ja tulivat sen vuoksi eturauhasen höyläysleikkaukseen (transurethral resection of the prostate, TURP), sekä syöpäpotilailta, jotka tulivat eturauhasen poistoon. Näytteitä kerättiin seitsemältä eturauhasen liikakasvupotilaalta, 24 eturauhassyöpäpotilaalta sekä kuudelta terveeltä kontrollilta. Lisäksi 11 eturauhassyöpäpotilaalta tutkittiin myös kolme kuukautta eturauhasen poiston jälkeen kerätty virtsanäyte. Näytteet säilytettiin pakastettuina ja mittauksia varten ne sulatettiin.

## **2.3 Mittaukset**

Mittausta varten pipetoimme näytettä (5 ml) petrimaljalle, jonka reunat tiivistimme parafilmikalvolla. Sijoitimme sen 37° vesihautteeseen hieman ennen mittauksen aloitusta, jotta

näytteestä mitattavat haihtuvat yhdisteet höyrystyisivät. Petrimaljan kanssa oli kiinnitettynä kanyyli, johon yhdistimme ilma-analysaattorin mittauksen alussa. Kannessa oli kaksi reikää korvausilman saamiseksi. Suoritimme mittaukset kannettavaan tietokoneeseen yhdistetyllä ChemPro 100 –kaasuanalysaattorilla. Aiempien pilottitutkimusten perusteella mittauksen kestoksi valikoitui 15 minuuttia, joka vaaditaan maksimaalisen signaalin kehittymiseksi. Tänä aikana laite mittasi näytteestä haihtuvia molekyylejä ja tallensi niiden kemiallisen spektrin tietokoneeseen reaaliajassa. Laitteen toipumisaika mittausten välillä oli 10 minuuttia. Tänä aikana laite puhdistui edellisen näytteen molekyyleista.

## **2.4 Analyysimenetelmät**

Mittaustulokset analysoitiin kolmea eri menetelmää käyttäen. Principal component analysis (PCA) ja multidimensional scaling (MDS) ovat molemmat matemaattisia menetelmiä, joiden avulla moniulotteista dataa pyritään saattamaan yksinkertaisempaan muotoon. Näin datan visuaalinen esittäminen ja sen sisältämien muuttujien eroavuuksien ja samankaltaisuuksien vertailu helpottuu.

PCA-menetelmässä matemaattisen algoritmin avulla vähennetään datan avaruudellisia ulottuvuuksia siten, että suurin osa datan sisältämisestä muuttujista kuitenkin säilyy. Tämä tapahtuu tunnistamalla suuntia, joissa datan sisältämä hajonta on suurimmillaan. PCA:lla siis luodaan vektoreita, jotka näyttävät lineaarisen korrelaation näytteiden sisältämien muuttujien erojen välillä. Tämän jälkeen data voidaan esittää graafisesti muodossa, josta näytteiden ryhmitteleminen onnistuu.

MDS eroaa PCA:sta siinä, että se ei ole lineaarinen menetelmä. MDS:llä luotujen vektoreiden avulla alkuperäisen datan geometrinen rakenne säilytetään samalla kun datan sisältämät muuttujat siirretään moniulotteisesta avaruudesta yksinkertaisempaan. Datan topografia siis säilyy, mutta etäisyydet origosta vääristyvät. Tämä onkin keskeinen ero menetelmien välillä. PCA menetelmänä säilyttää alkuperäisen datan etäisyydet muuttumattomina, mutta kadottaa monimutkaiset rakenteet. MDS-menetelmästä on monia hieman toisistaan eroavia muotoja. Tässä tutkimuksessa käytetty Sammon-mapping on niistä yksinkertaisin.



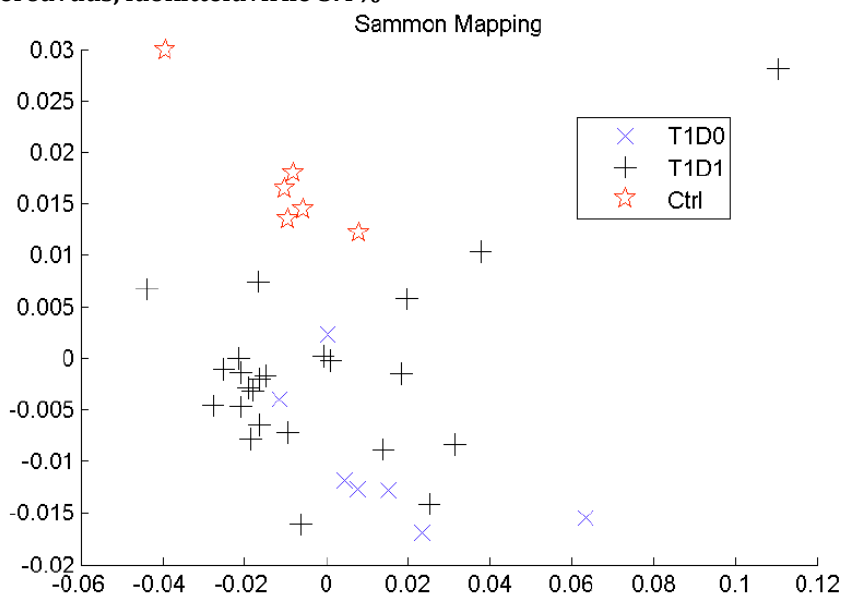
Näiden kahden menetelmän lisäksi tulokset analysoitiin sellaisenaan käyttämättä mitään yksinkertaistusta. Tulokset käsiteltiin kahdella eri menetelmällä sen vuoksi, että tässä vaiheessa emme tiedä mikä analyysimenetelmä soveltuu parhaiten tutkimusaineistollemme. Lisäksi koko datan analysointi oli tarpeen, sillä aina käytettäessä yksinkertaistusmenetelmiä osa aineiston sisältämästä datasta menetetään.

### 3 Tulokset

IMS erotti tutkitut näytteet puhtaasta vedestä luokitteluvirheellä 4.8%-19.2%. Tämän kysymyksen kohdalla parhaaseen tulokseen päästiin suoraan datasta analysoimalla. Suurin luokitteluvirhe oli MDS-menetelmää käytettäessä.

Terveiden kontrollien näytteet eturauhassyöpää ja eturauhasen hyvänlaatuista liikakasvua sairastavien näytteistä IMS erotti luokitteluvirheellä 5.4% (kuva 1).

**Kuva 2: Terveiden kontrollien (tähti), hyvänlaatuisen liikakasvun (rasti) ja syövän (plusmerkki) eroavuus, luokitteluvirhe 5.4%**



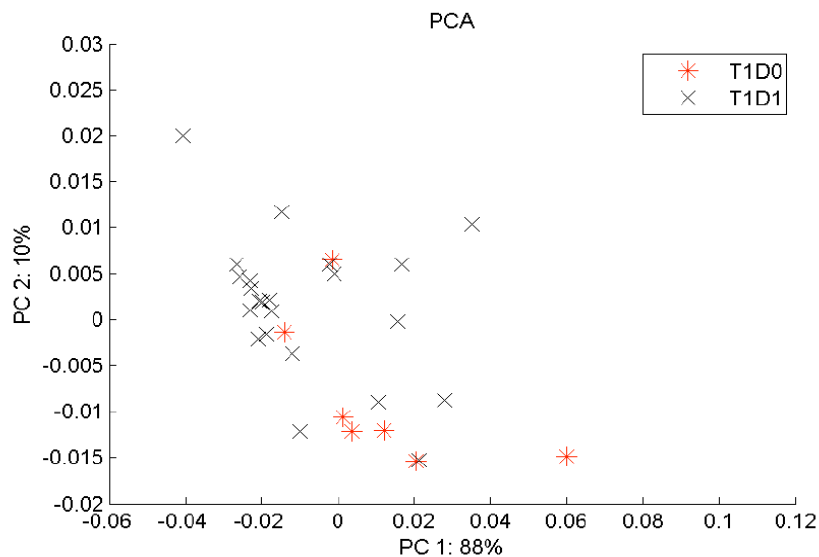
Kolmeluokkaista luokittelua käyttäen, siis erotettaessa terveet, hyvänlaatuista liikakasvua sairastavat ja syöpää sairastavat omiksi ryhmikseen, oli IMS:n luokitteluvirhe välillä 18.9%-29.7%.

Tutkittaessa hyvänlaatuisen liikakasvun eroavuutta syövästä, oli luokitteluvirhe suoraan datasta analysoimalla 22.6%, MDS-menetelmällä 22.6% ja PCA-menetelmällä 19.4% (kuva 2). Tarkkuus oli suoraan datasta laskemalla 71.4%, MDS-menetelmällä 42.9% ja

PCA-menetelmällä 28.6%. ChemPron herkkyys suoraan datasta laskemalla oli 79.1%, MDS-menetelmää käyttäen 87.5% ja PCA-menetelmää käyttäen 95.8%. Syöpädiagnoosin positiivinen ennustearvo on suoraan datasta laskien 90.5%, MDS-menetelmän avulla 84.0% ja PCA-menetelmällä 82.1%. Vastaavasti negatiivinen ennustearvo eri menetelmillä oli sekä suoraan datasta laskien että MDS-menetelmällä 50.0% ja PCA-menetelmällä 66.7%.

Eturauhassyöpöpotilaiden pre- ja postoperatiivisia näytteitä vertailtaessa ChemPro erotti nämä kaksi näytetyypä toisistaan luokitteluvirheellä 25.7%-37.1%.

**Kuva 3: Hyvänlaatuisen liikakasvun (tähti) ja syövän erottelu, luokitteluvirhe 19.4%**



## 4 Pohdinta

### 4.1 Edut verrattuna muihin menetelmiin

Elektronisen nenän erotuskykyä eturauhassyövän ja eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvun välillä voidaan nyt verrata johdannossa mainittuihin merkkiaineisiin (taulukko 1). Käyttämällä analyysimenetelmistämme herkintä, PCA:ta, saadaan elektroniselle nenälle herkkyudeksi 95.8%. Tällä menetelmällä saadaan eroteltua lähes kaikki eturauhassyöpää sairastavat potilasjoukosta ja se soveltuukin parhaiten seulontakäyttöön. Menetelmän tarkkuus kuitenkin kärsii ollen 28.6%. Analyysimenetelmistämme paras tarkkuus 71.4% saatiin suoraan datasta laskemalla. Herkkyys kuitenkin kärsii tässä menetelmässä, minkä vuoksi se soveltuu parhaiten diagnoosin varmistamiseen. Kolmannella menetelmällämme MDS:lla saatiin kohtuullinen herkkyys 87.5%, mutta huono

tarkkuus 42.9%. Eturauhassyövän seulonnassa nykyisin käytetyn merkkiaineen, PSA:n, herkkyys on parhaimmillaankin vain 83.4%, mikä jää selvästi IMS:n saavuttamasta herkkyydestä. PSA-arvolla 2.1 µg/l saatu korkein herkkyys-tarkkuus yhdistelmä (52.6% ja 72.5%) vastaa tarkkuudeltaan, mutta jää jälkeen herkkyydessä tässä tutkimuksessa käytetyistä analyyseistä korkeimman yhdistelmän (79.1% ja 71.4%) omaavalle menetelmälle.

Johdannossa esitellyistä menetelmistä kilpailukykyisin on proteomiikka, jonka käyttämä SELDI-TOF saavuttaa erinomaisen erotuskyvyn. Herkkyys 83% on niin ikään olemassa oleviin testeihin nähden varsin korkea. Seulontakäyttö edellyttäisi n. 95% herkkyyttä, mihin SELDI-TOF ei aivan yllä, joten se soveltuu ensisijaisesti diagnoosin varmistamiseen. Lisäksi SELDI-TOF on menetelmänä huomattavasti monimutkaisempi ja kalliimpi kuin IMS. PSA:n korkeammilla arvoilla (2.6-10.1 µg/l) saavutetaan menetelmäämme parempia tarkkuuksia herkkyyksien jäädessä kuitenkin pienemmiksi. Kehitettäessä menetelmää eturauhassyövän seulontaan, tulee kuitenkin loppujen lopuksi painottaa herkkyyttä tinkimällä hieman tarkkuudesta. Erityisen tärkeää on myös pyrkiä kehittämään testiä niin, että se erottaisi aggressiiviset kuolemaan johtavat ja elämänlaatua alentavat tautimuodot syövästä, jotka eivät potilaan elinaikana aiheuta lainkaan merkittäviä oireita. Saamme siis jo pilottisarjallamme elektronisella nenällä nykystandardina olevaa PSA:ta sekä tutkimuskentän lupaavinta menetelmää, proteomiikkaa, parempia arvoja testin herkkyydelle. Näin ollen lisätutkimukset laitteemme käyttökelpoisuudesta ovat perusteltuja.

Muiden merkkiaineiden herkkyydet ovat niin pieniä, ettei niillä ainakaan sellaisinaan ole käyttöä seulontamenetelmänä. Esitellyt merkkiaineet laskukaavoineen ovat lisäksi monimutkaisia ja IMS olisikin työkaluna yksinkertaisempi ja suoraviivaisempi. Menetelmämme olisi myös muihin merkkiaineisiin verrattuna vähemmän kajoava, nopeampi ja edullisempi. Siinä tarvitaan vain virtsanäyte kun muissa menetelmissä joudutaan käyttämään kajoavia näytteenottokeinoja (verinäyte, biopsia). Analysointikustannukset ovat lisäksi lähes olemattomat. Lisähuomiona voidaan mainita, että tässä tutkimuksessa käyttämämme populaatio eroaa PSA-tutkimuksissa terveyskeskuksista kerätystä populaatiosta. Aineistossamme eturauhasen hyvänlaatuista liikakasvua edustavat näytteet olivat peräisin leikkaushoitoon päätyneiltä potilailta eli ne edustavat kaikista liikakasvutapauksista taudin vaikeinta muotoa. Asetelma on näin haastavampi ja olisimme todennäköisesti saaneet IMS:llä vielä parempi tuloksia jos

potilasjoukot olisivat lähtökohtaisesti eronneet toisistaan enemmän (esim. levinnyttä eturauhassyöpää ja lievää eturauhasen liikakasvua sairastavat potilaat). Jatkossa on tarpeen laskea PSA:n herkkyys ja tarkkuus meidän valikoituneessa populaatiossamme ja verrata sitä IMS:llä saatuihin arvoihin.

Tutkimuksemme tulokset viittaavat myös siihen, että ChemPro:lla voidaan erottaa pre- ja post-operatiiviset eturauhassyöpäpotilaat. Tämä tulos vaatii kuitenkin varmennusta suuremmalla aineistolla.

## **4.2 Rajoitukset**

Tutkimuksessamme mahdollisina sekoittavina ja tuloksia vääristävinä tekijöinä voidaan mainita potilaiden ikä ja liitännäissairaudet. Lisäksi munuaistoiminnan heikkeneminen voi vääristää tuloksia. Voss et al. tutkivat elektronisen nenän kykyä erottaa munuaisten vajaatoimintaa sairastavat potilaat terveistä kontroleista ihmisruumiin hajun perusteella. Laite pystyi erottamaan kaikki terveet kontrollit vajaatoimintapotilaista. Kroonista munuaisten vajaatoimintaa sairastavien ja loppuvaiheen akuuttia munuaisten vajaatoimintaa sairastavien välillä elektroninen nenä saavutti 95.2% erotuskyvyn. Ihmisruumiin haju siis muuttuu munuaistoiminnan heikentyessä, kun munuaiset eivät kykene poistamaan haihtuvia molekyylejä entiseen tapaan. (Voss et al. 2004) Tämän perusteella voidaan ajatella, että myös virtsan hajuprofiili muuttuu munuaisten vajaatoiminnassa ja näin ollen vääristää mittaustuloksia.

Teknisenä rajoituksena tutkimuksessa oli mittauksia tehdessä ympäröivän ilman kosteus. Kosteuden on todettu häiritsevän laitteemme kaasuanalysaattorin IMCell -sensoria ja näin heikentävän sen herkkyyttä. Tämä häiriö on riippuvainen mitattavasta kemikaalista. Kosteuden vaikutuksen vähentämiseksi laite käyttää yhdessä IMCell -sensorin kanssa SCCell -sensoria, joka kompensoi tätä heikkoutta. SCCell -sensoriin kosteudella ei ole todettu olevan merkittävää vaikutusta. (Utriainen et al. 2003) Kosteuden vaikutusta vähentävänä menetelmänä on tutkittu huuhtelukaasun käyttöä puoliläpäisevän kalvon läpi johdettuna. Tässä analysoitavasta kaasusta pyritään poistamaan kosteus johtamalla sen sekaan kuivaa typpeä puoliläpäisevän kalvon läpi. Kuiva typpi sitoo kosteuden itseensä ja kulkeutuu takaisin kalvon läpi. Puoliläpäisevän kalvon tehtävä on estää muita molekyylejä poistumasta kaasuseoksesta typen mukana. (Bartolazzi et al. 2010, Pennazza et al. 2011) Menetelmän ongelmana on, ettei tiedetä poistuuko kalvon läpi myös tautiprosessin

havaitsemisen kannalta tärkeitä molekyylejä. Lisäksi kaasujärjestelmä monimutkaistaa systeemiä ja vaatii kaasuhanat, jolloin laite ei olisi enää niin kätevä.

Tutkimuksemme otoskoko oli vielä suhteellisen pieni. Tulevaisuudessa onkin tutkittava IMS:n käyttökelpoisuutta suuremmalla otoksella ja erilaisissa populaatioissa terveydenhuollon eri tasoilla, jotta saamistamme tuloksista voidaan varmistua.

### **4.3 Tulevaisuuden näkymät**

Otoskoon kasvattamisen lisäksi tutkimusta kannattaa laajentaa kattamaan myös muita urologisia syöpiä, esimerkiksi tutkimalla myös virtsarakko- ja munuaissyöpää sairastavien potilaiden virtsanäytteitä. Potilasjoukkoa tulisi tulevaisuudessa tutkimuksissa normalisoida sekoittavien tekijöiden kuten iän ja oheissairauksien, erityisesti munuaisten vajaatoiminnan, suhteen. Tulevaisuudessa mittauksissa kosteuden vaikutusta tulisi edelleen minimoida säännöllisesti kuivattamalla ja poistamalla laitteet mittausten välillä mittauskammioista. Myös kosteuden määrää mittauskammiossa tulisi pyrkiä vähentämään. Myöhemmin voidaan lisäksi arvioida elektronisen nenän ennusteellista arvoa leikkaustulosten, eturauhassyövän seurannan ja mahdollisen uusiutumisen suhteen. Etenkin eturauhassyövän osalta on tärkeää tutkia, onko mahdollista erottaa aggressiiviset tautimuodot lievistä, jotka eivät potilaan elinaikana johda oireisiin. Tähän mennessä kerätyn tutkimusdatan ja omien tutkimustemme perusteella eturauhassyövällä näyttäisi olevan sille ominainen haju. Tämän takia tutkimuksen laajentaminen myös muihin syöpiin tulee kyseeseen.

### **4.4 Yhteenveto**

Elektroninen nenä erottaa eturauhassyövän hyvänlaatuisesta liikakasvusta ja terveistä kontrolleista. Lupaava tulos tulee varmistaa laajemmalla aineistolla.

## Lähteet

- Adam** BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002;62:3609-14.
- Bernabei** M, Pennazza A, Santonico M, Corsi C, Roscioni C, Paolesse R, Di Natale C, D'Amico A. A preliminary study on the possibility to diagnose urinary tract cancers by an electronic nose. *Sensors and Actuators* 2008;B131:1-4
- Bill-Axelson** A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, Nordling S, Häggman M, Andersson SO, Bratell S, Spångberg A, Palmgren J, Steineck G, Adami HO, Johansson JE. SPCG-4 Investigators. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* 2011 May 5;364(18):1708-17.
- Blackburn** EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;350:569-73.
- Carlsson** S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P, Stranne J, Hugosson J. The excess burden of side-effects from treatment in men allocated to screening for prostate cancer. The Göteborg randomised population-based prostate cancer screening trial. *European Journal of Cancer*. 2011;47:545-53.
- Casero** RA, Jr., Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6(5):373-90.
- Catalona** WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, Slawin KM, Marks LS, Loeb S, Broyles DL, Shin SS, Cruz AB, Chan DW, Sokoll LJ, Roberts WL, van Schaik RHN, Mizrahi IA. A Multicenter Study of [-2]Pro-Prostate Specific Antigen Combined With Prostate Specific Antigen and Free Prostate Specific Antigen for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml Prostate Specific Antigen Range. *J Urol*. 2011 May;185:1650-5.
- Cornu** JN, Cancel-Tassin G, Ondet V, Girardet C, Cussenot O. Olfactory Detection of Prostate Cancer by Dogs Sniffing Urine: A Step Forward in Early Diagnosis. *European urology*. 2011;59:197-201.
- D'Amico** A, Pennazza G, Santonico M, Martinelli E, Roscioni C, Galluccio G, Paolesse R, Di Natale C. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer. *Lung Cancer*. 2010 May;68(2):170-6.
- Di Natale** C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agrò A, D'Amico A. Lung cancer identification by analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron* 2003;18:1209–18.
- Dragonieri** S, Annema JT, Schot R, van der Schee MPC, Spavanello P, Carratù P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer* 2009 May;64(2):166–70.
- Etzioni** R, Penson DF, Legler JM, di Tommaso D, Boer R, Gann PH, Feuer EJ. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst* 2002 Jul 3;94(13):981-90.
- Fend**, R., A. H. J. Kolk, C. Bessant, P. Buijtel, P. R. Klatser, A. C. Woodman. Prospects for clinical application of electronic-nose technology to early detection of Mycobacterium tuberculosis in culture and sputum. *J. Clin. Microbiol*. 2006 Jun;44:2039–45.
- Ferlay** J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
- Gerner** EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):781-92.
- Gendron** KB, Hockstein NG, Thaler ER, Vachani A, Hanson CW. In vitro discrimination of tumor cell lines with an electronic nose. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 Aug;137(2):269-73.
- Gonzalogo** ML, Nakayama M, Lee SM, De Marzo AM, Nelson WG. Detection of GSTP1 methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis. *Urology* 2004;63:414-8.
- Haugen** JE, Kvaal K. Electronic Nose and Artificial Neural Network. *Meat Science*. 1998;49(1):273-86.
- Hiramatsu** K, Takahashi K, Yamaguchi T, Matsumoto H, Miyamoto H, Tanaka S, Tanaka C, Tamamori Y, Imajo M, Kawaguchi M, Toi M, Mori T, Kawakita M. N(1),N(12)-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr;11(8):2986-90.
- Horvath** G, Järverud GA, Järverud S, Horváth I. Human ovarian carcinomas detected by specific odor. *Integr Cancer Ther*. 2008 Jun; 7(2):76-80.
- Jousimaa**, Alenius, Atula. Lääkärin käsikirja. Duodecim, 2011.
- Kateb** B, Ryan MA, Homer ML, Lara LM, Yin Y, Higa K, Chen MY. Sniffing out cancer using the JPL electronic nose: a pilot study of a novel approach to detection and differentiation of brain cancer. *Neuroimage*. 2009 Aug;47 Suppl 2:T5-9.

**Kolk** A, Hoelscher M, Maboko L, Jung J, Kuijper S, Cauchi M, Bessant C, van Beers S, Dutta R, Gibson T, Reither K. Electronic-Nose Technology Using Sputum Samples in Diagnosis of Patients with Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2010 Nov;48:4235–38.

**Laxman** B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, Lonigro RJ, Tsodikov A, Wei JT, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. A First-Generation Multiplex Biomarker Analysis of Urine for the Early Detection of Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb;68(3):645-49.

**McCulloch** M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integr Cancer Ther.* 2006; 5(1):30-39.

**Morgan** DML. Polyamines an overview. *Molecular Biotechnology.* 1999;11:229-50.

**Nguyen** PN, Violette P, Chan S, Tanguay S, Kassouf W, Aprikian A, Chen JZ. A Panel of TMPRSS2:ERG Fusion Transcript Markers for Urine-Based Prostate Cancer Detection with High Specificity and Sensitivity. *Eur Urology.* 2001;59:407-14.

**Pavlou** AK, Magan N, McNulty C, Meecham Jones J, Sharp D, Brown J, Turner AP. Use of an electronic nose system for diagnoses of urinary tract infections. *Biosensors and Bioelectronics.* 2002;17:893-99.

**Pavlou** AK, Magan N, Meecham Jones J, Brown J, Klatser P, Turner AP. Detection of Mycobacterium tuberculosis (TB) in vitro and in situ using an electronic nose in combination with a neural network system. *Biosensors and Bioelectronics.* 2004 Apr;20:538-44.

**Phillips** M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, McVay WP. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet.* 1999 Jun 5;353(9168):1930-3.

**Roobol** J, Carlsson S. Risk stratification in prostate cancer screening. *Nat. Rev. Urol.* 2013;10:38–48.

**Röck** F, Barsan N, Weimar U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem Rev.* 2008 Feb;108(2):705-25.

**Schroder** F, Bangma C, Roobol M. Is it necessary to detect all prostate cancers in men with serum PSA levels <3.0 ng/ml? A comparison of biopsy results of PCPT and outcome-related information from ERSPC. *Eur. Urol.* 2008;53:901–908.

**Shen** M, Chen W, Yu K, Chen Z, Zhou W, Lin X, Weng Z, Li C, Wu X, Tao Z. The diagnostic value of PCA3 gene-based analysis of urine sediments after digital rectal examination for prostate cancer in a Chinese population. *Experimental and Molecular Pathology.* 2011;90:97-100.

**Sonoda** H, Kohnoe S, Yamazato T, Satoh Y, Morizono G, Shikata K, Morita M, Watanabe A, Morita M, Kakeji Y, Inoue F, Maehara Y. Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. *Gut* 2011;60:814-19.

**Stephenson** AJ, Kuritzky L, Campbell SC. Screening for urologic malignancies in primary care: Pros, cons, and recommendations. *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* 2007 May;74(3):S6-14.

**Thompson** IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004 May;350:2239-46.

**Tomlins** SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310:644-8.

**Turner** AP, Magan N. Electronic noses and disease diagnostics. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Feb;2(2):161-6.

**Utriainen** M, Kärpänoja E, Paakkanen H. Combining miniaturized ion mobility spectrometer and metal oxide gas sensor for the fast detection of toxic chemical vapors. *Sensors and Actuators.* 2003;B 93:17-24.

**Williams** H, Pembroke A. Sniffer dogs in the melanoma clinic? *Lancet.* 1989 Apr;333(8640):734.

**Willis** CM, Church SM, Guest CM, Cook WA, McCarthy N, Bransbury AJ, Church MR, Church JC. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *BMJ.* 2004 Sep;329(7468):712-16.