

Opinnäytetyö AMK

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2022

Jenni Harju

SUKKULAMATOPOHJAISEN SYÖPÄSEULONTA- MENETELMÄN TESTAUS


TURKU AMK
TURKU UNIVERSITY OF
APPLIED SCIENCES

Opinnäytetyö AMK | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja elintarviketekniikan koulutushjelma | Biotekniikka

2022 | 39 sivua

Jenni Harju

SUKKULAMATOPOHJAISEN SYÖPÄSEULONTA- MENETELMÄN TESTAUS

Syöpä on väestön ikääntyessä jatkuvasti yleistynyt joukko erilaisia sairauksia, joiden aikainen havaitseminen ja hoito on tärkeää. Tämän Turun yliopiston biologian laitoksella toteutetun opinnäytetyön tarkoituksena oli testata ja optimoida japanilaisten tutkijoiden kehittämää sukkulamato pohjaista syöpäseulontamenetelmää. Tavoitteena oli selvittää, havaitsevatko *C. elegans* -sukkulamadot syövän ihmisen virtsanäytteistä, koska näillä sukkulamadoilla on erittäin kehittynyt kemosensoirinen järjestelmä, jonka avulla ne havaitsevat kemiallisia ärsykeitä.

Työssä tutkittiin kemotaktisten kokeiden avulla, houkuttelivatko vai karkottivatko virtsanäytteiden kemialliset aineet sukkulamatoja. Kokeissa käytettiin kasvatusnestenäytteitä sekä virtsanäytteitä, jotka olivat työn päätutkimuskohde. Koetulosten pohjalta määritettiin kemotaksiaindeksi, joka oli sitä positiivisempi mitä enemmän näyte houkutteli sukkulamatoja puoleensa.

Tuloksissa esiintyi huomattavaa vaihtelua, ja menetelmän tarkkuudeksi saatiin 50-75 %. Opinnäytetyön perusteella voitiin todeta, että menetelmä on lupaava, mutta että lisätutkimuksia vielä tarvitaan menetelmän tarkkuuden ja luotettavuuden lisäämiseksi.

Asiasanat:

kemotaksia, sukkulamato, syöpä, syöpädiagnoosiikka

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2022 | 39 pages

Jenni Harju

TESTING OF NEMATODE-BASED CANCER SCREENING METHOD

As the population ages, there are increasing numbers of cancer cases whose early detection and treatment is important. The aim of this thesis conducted at the Department of Biology of the University of Turku was to test and optimize a nematode-based cancer screening method developed by Japanese researchers. The goal was to determine if the *C. elegans* nematodes can detect cancer in human urine samples, because these nematodes have an advanced chemosensory system that allows them to detect chemical stimuli.

In this study, chemotactic experiments were used to examine whether chemical agents in urine samples attracted or expelled nematodes. Growth medium samples were used in the experiments, as well as actual urine samples. Based on the test results, the chemotaxis index was determined and found to be more positive, the more the sample attracted nematodes. There was considerable variation in the results, and the accuracy of the method was calculated to be 50-75%. Based on the thesis, it could be stated that the method is promising, but that further research is still needed to increase the accuracy and reliability of the method.

Keywords:

chemotaxis, nematode, cancer, cancer diagnostics

Sisältö

Käytetyt lyhenteet ja sanasto	6
1 Johdanto	7
2 Syöpä	9
2.1 Syöpä Suomessa	9
2.2 Syövän synty	10
2.3 Syövän levinneisyys ja vaiheet	11
2.4 Syöpäseulonta	12
3 <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
3.1 Anatomia ja elinkaari	14
3.2 N-NOSE syöpäseulontamenetelmä	16
3.3 <i>C. elegans</i> tutkimustyössä	17
4 Materiaalit ja menetelmät	18
4.1 NGM-maljojen valmistusohje	18
4.2 Sukkulamatokannan ylläpito ja viljely	19
4.3 Sukkulamatojen synkronointi	20
4.4 Kemataktiset kokeet	21
5 Tulokset ja tulosten analysointi	25
6 Loppupäätelmät	32
Lähteet	34

Liitteet

Liite 1. Liitteen otsikko.

Liite 2. Ohje kaavojen, kuvien, kuvioiden ja taulukoiden käyttämiseen.

Kuvat

Kuva 1. <i>C. elegans</i> -sukkulamadon anatomia.	15
Kuva 2. <i>C. elegans</i> -sukkulamatojen elinkaari.	16
Kuva 3. Kemotaksiakokeiden asettelu.	23
Kuva 4. Sukkulamatojen kulkeutuminen kemotaktisissa kokeissa.	24

Kuviot

Kuvio 1. Kemotaktiset kokeet kasvatusnestenäytteillä kokeen toimivuuden toteamiseen.	26
Kuvio 2. Kemotaktiset kokeet eturauhassoluilla.	27
Kuvio 3. Ensimmäiset sokkotestit virtsanäytteillä.	28
Kuvio 4. Ensimmäiset kemotaktiset kokeet kymmenellä rinnakkaisella näytteellä.	29
Kuvio 5. Kemotaktiset kokeet kakista näytteistä kymmenellä rinnakkaisella kokeella.	30
Kuvio 6.	31

Taulukot

Taulukko 1. TNM-luokitus yleisesti.	11
Taulukko 2. Solulinjat, joista oli kerätty kasvatusliuosnäytteitä.	18
Taulukko 3. Käytetyt reagenssit ennen autoklavointia.	19
Taulukko 4. Autoklavoinnin jälkeen lisätyt reagenssit.	19

Käytetyt lyhenteet ja sanasto

Carcinoma in situ	Pintasolukon alkava oireeton syöpä, joka ei ole tunkeutunut alla olevaan kudokseen vaan rajoittunut tiettyyn kohtaan.
ddH ₂ O	Kaksoistislattu vesi
Hermafrodiitti	Kaksineuvoinen; pystyy tuottamaan sekä naaras- että koiraspuolisia sukusoluja
In vitro	Koeolosuhteissa eli elimistön, eliöiden tai oman ympäristönsä ulkopuolella, ”koeputkessa”
Karsinogeeni	Syöpää aiheuttava aine
Karsinogeneesi	Tapahtuma, jossa solu muuttuu pahanlaatuiseksi
Kemosensorinen	Kemiallisia yhdisteitä aistivia
Metabolia	Aineenvaihdunta
NaN ₃	Natriumatsidi
NGM	Nematode Growth Medium, sukkulamatojen kasvatusneste
OP-50-1	Streptomysiinille resistentti OP-50 bakteerikanta
Progressiovaihe	Syövän kehitysvaihe, jossa pahanlaatuisuuden aste lisääntyy.
Solulinja	Solupopulaatio, jota voidaan kasvattaa loputtomasti
Immortalisoitu solulinja	Kuolemattomaksi tehty solulinja, joka jakautuu rajattomasti.

Esipuhe

Kiitokset Janne Leivolle (Turun yliopiston Bioteknologian laitos) eturauhassyöpäsolujen kasvatusnestenäytteistä sekä Tarja Lammiselle ja Pauliina Toivoselle (Turku Prostate Cancer Consortium, Turun yliopistollinen keskussairaala) potilasnäytteistä.

Johdanto

Opinnäytetyö toteutettiin Turun yliopiston biologian laitoksella Dos. Päivi Koskisen tutkimusryhmässä. Työn tavoitteena oli optimoida ja testata Japanissa kehitettyä N-NOSE -syöpäseulontamenetelmää, jossa käytetään hyväksi *C. elegans* -sukkulamatojen hajuaistia. N-NOSE syöpäseulontatestin tarkoituksena on havaita mahdollinen syöpä jo hyvin varhaisessa vaiheessa potilaiden virtsanäytteistä helposti, nopeasti ja kivuttomasti.

Syöpä on yksi johtavista kuolinsyistä koko maailmassa ja se yleistyy koko ajan väestön ikääntyessä. Suuri osa syöpätaudeista on parannettavissa, jos ne havaitaan ja hoidetaan ajoissa. Hyvällä ja oikea-aikaisella diagnostiikalla saadaan parempaa hoitoa nopeammin sekä säästöjä, joten siitä hyötyvät niin potilaat kuin yhteiskunta. Potilaiden psyykinen ja fyysinen terveys ovat ensiarvoisen tärkeitä. Syöpähoidot ovat rankkoja ja niihin tarkoitetut lääkkeet kalliita, minkä vuoksi onkin tärkeää tutkia ja kehittää syöpädiagnostiikkaa tutkittavalle mielekkäämmäksi. (Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2022; Joensuu *et al.* 2013.)

Opinnäytetyön tutkimus toteutettiin kemotaktisilla kokeilla, joissa näytteinä käytettiin sekä kasvatusneste- että virtsanäytteitä. Opinnäytetyön päättämiskohteena olivat virtsanäytteet, jotka olivat eturauhasen höyläysnäytteitä. Osalla potilaista oli todettu pahanlaatuinen eturauhassyöpä ja osalla hyvänlaatuista eturauhasen liikakasvua. Syöpäsolujen kasvatusnestenäytteitä käytettiin menetelmän harjoitteluun ja sukkulamatojen käyttäytymisen havainnointiin. Kemotaktisilla kokeilla oli tarkoitus selvittää, houkutteliko vai karkottiko tutkittava näyte *C. elegans* -sukkulamatoja.

1 Syöpä

Syöpä mielletään yleensä yhdeksi sairaudeksi, mutta todellisuudessa se käsittää yli 200 erilaista sairautta. Ne voivat ilmetä ympäri kehoa ja niiden syyt ja luonne voivat olla hyvin erilaisia. Yksi syövän piirre on epänormaalien solujen nopea jakautuminen hallitsemattomalla tavalla. Lisäksi pahanlaatuisen kasvaimen solukon järjestäytyminen on usein epätyypillistä ja sen koko ja muoto vaihtelee huomattavasti. Pahanlaatuinen kasvain tunkeutuu ympäristöön sekä viereisiin elimiin ja lähettää usein etäpesäkkeitä, Solujen levitessä syntyneet etäpesäkkeet ovat ensisijainen syy syöpäkuolemiin. (Joensuu *et al.* 2013; Eggert 2017)

Syöpä on yksi johtavista kuolinsyistä maailmassa. Maailman terveysjärjestö WHO:n mukaan vuonna 2020 lähes 10 miljoonaa kuolemaa aiheutui syövästä, mikä tarkoittaa lähes yhtä kuolemaa kuudesta. Yleisimpiä syöpiä koko maailmassa ovat rinta-, keuhko-, paksusuoli- ja peräsuoli- ja eturauhassyövät. Monet syövät ovat parannettavissa, jos ne havaitaan riittävän aikaisin ja hoidetaan tehokkaasti. (World Health Organization 2022.)

1.1 Syöpä Suomessa

Joka kolmas suomalainen sairastuu syöpään elämänsä aikana. Suomen Syöpärekisterin tilastoraportin mukaan vuonna 2019 Suomessa todettiin yhteensä 35 327 uutta syöpätapausta ja 13 085 syöpäkuolemaa. Syöpätapaukset ovat lisääntyneet räjähdysmäisesti, sillä 1950-luvulla uusia syöpätapauksia oli vain noin 8000. Syöpäriski kuitenkin lisääntyy iän kasvaessa. Alle 40-vuotiaalla syöpä on vielä harvinainen, mutta jo noin joka kolmannella 85-vuotiaalla on todettu jokin syöpätauti. Uusien syöpätapausten määrä onkin lisääntynyt tasaisesti viimeisen 30 vuoden aikana väestön ikääntyessä, mutta syöpäkuolemien määrä on selvästi vähentynyt suhteutettuna väestön ikärakenteeseen sekä määrään. Syöpäkuolleisuudessa on suuria eroja eri syöpätyyppien välillä. Parantumisenuste on koko ajan parempi, mutta syöpä on Suomessa silti edelleen toiseksi yleisin kuolinsyy. Suuri osa syöpäpotilaista

parantuu kuitenkin kokonaan. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2021; Syöpäjärjestöt 2021; Joensuu *et al.* 2013)

Suomen yleisimmät syövät olivat vuonna 2019 eturauhassyöpä ja rintasyöpä. Miehillä eturauhassyöpä, suolistosyövät, virtsarakon syöpä, munuaissyöpä ja melanooma ovat lisääntyneet. Miehillä keuhkossyöpä lisääntyi 1970-luvulle asti. Se on kuitenkin edelleen yksi yleisimmistä syöivistä, vaikka se on vähentynyt 1970-luvusta lähtien. Naisilla yleisin syöpä Suomessa on rintasyöpä ja muita lisääntyneitä syöpiä ovat esimerkiksi suolistosyövät, keuhkossyöpä ja ihomelanooma. Lapsilla yleisimpiä syöpiä ovat leukemia, imusolmukesyövät sekä pahanlaatuiset aivokasvaimet. (Syöpäjärjestöt 2021; Tuomisto 2020)

1.2 Syövän synty

Syövän synty eli karsinogeneesi on monimutkainen vaiheittainen prosessi, jonka etenemistä koskevat käsitykset perustuvat kliinisiin ja epidemiologisiin havaintoihin, koe-eläinmalleihin, sekä solu- ja molekyylibiologisiin tutkimuksiin. Näistä erityisesti kliiniset havainnot ovat olleet tärkeitä. Kliinisiä havaintoja voidaan kuitenkin yleensä tehdä vasta progressiovaiheessa olevasta syöpäsolukosta, jolloin syöpäsolut ovat ehtineet jakautua jo 25–30 kertaa ja niitä on tällöin noin miljardi. Löytyy kuitenkin syöpätyyppejä, kuten kohdunkaulan ja paksusuolen syövät, joissa syövän esiasteita voidaan tunnistaa mikroskooppisesti. Esiasteiden kehittyminen syöväksi voi kestää vuosia. (Joensuu *et al.* 2013)

Yksinkertaistettuna syöpä alkaa, kun solun perimäaineksen vaurioitumisen seurauksena yksi tai useampi solu alkaa kasvaa ja lisääntyä liikaa. Geeneissä voi tapahtua muutoksia eli mutaatioita, jos solun jakautumisessa tapahtuu virhe tai jos solu altistuu karsinogeenisille eli syöpää aiheuttaville ympäristötekijöille. Yksi geenivirhe ei kuitenkaan yleensä riitä aiheuttamaan syöpää. Syöpä syntyy vasta, jos mutaatioita sattuu useissa solujen kasvua ja erilaistumista säätelevissä geeneissä, ja jos elimistön vaurioita korjaava puolustusjärjestelmä pettää, jolloin

vaurioituneet solut voivat alkaa jakautua hallitsemattomasti. (Joensuu *et al.* 2013; Cancer Research UK 2021)

1.3 Syövän levinneisyys ja vaiheet

Syövän levinneisyysastetta mitataan TNM-luokituksella, jolla saadaan selville minkä laatuinen syöpä on kyseessä ja onko se levinnyt muualle kehoon. TNM-luokitus on kansainvälinen pahanlaatuisten kasvainten levinneisyyttä kuvaava järjestelmä, joka perustuu kasvaimen kokoon (T=tuumori), syöpäsolujen ilmenemiseen alkuperäisen kasvaimen läheisissä imusolmukkeissa (N=nodus, solmuke) ja metastaaseihin eli muualla kehossa ilmeneviin etäpesäkkeisiin (M=metastaasi). TNM-luokituksessa jokainen edellä mainittu osa-alue arvioidaan erikseen taulukon 1 mukaan. (Edge *et al.* 2010)

Taulukko 1. TNM-luokitus yleisesti. (Edge *et al.* 2010)

T	Primaarikasvain
T0	Ei todettavissa olevaa kasvainta
Tis	Carsinoma in situ
T1-T4	Kasvaimen koko ja paikallinen levinneisyys
TX	Kasvain ei arvioitavissa
N	Paikalliset imusolmukkeet
N0	Ei paikallisia etäpesäkkeitä imusolmukkeissa
N1-N3	Paikallisissa imusolmukkeissa ilmenevien etäpesäkkeiden koko
NX	Paikallisten imusolmukkeiden etäpesäkkeet ei arvioitavissa
M	Etäpesäkkeet muualla kehossa
M0	Ei etäpesäkkeitä
M1	Etäpesäkkeitä havaittavissa

TNM-luokituksen perusteella syöpä jaetaan numeerisesti eri vaiheisiin (0, I, II, III, IV) seuraavasti:

Vaihe 0: Oireeton alkava pintasolukon syöpä (carcinoma in situ), joka on rajoittunut tiettyyn kohtaan eikä ole levittäytynyt alla oleviin kudoksiin.

Vaihe I: Syöpäkasvain on pieni ja rajoittunut elimeen, jossa se alun perin on muodostunut.

Vaihe II: Syöpäkasvain on isompi kuin vaiheen I, mutta ei ole levinnyt ympäröiviin soluihin. Voi olla myös levinnyt läheisiin imusolmukkeisiin.

Vaihe III: Kasvain on suurempi ja on saattanut levitä ympäröiviin kudoksiin. Lisäksi läheisissä imusolmukkeissa esiintyy etäpesäkkeitä.

Vaihe IV: Syöpä on levinnyt muihin elimiin ja kehon osiin muodostaen etäpesäkkeitä.

Vaiheiden määritelmät riippuvat siis TNM-luokituksesta ja syövän tyypistä. (Cancer Research UK 2021)

1.4 Syöpäseulonta

Syöpäseulonnoilla voidaan havaita varhaisvaiheinen syöpä tai sen esiaste. Syöpäseulontojen päätavoitteena on pienentää syövän aiheuttamaa kuolleisuutta. Syöpäseulontaohjelmat myös lisäävät kansalaisten tasa-arvoa ja vähentävät alueellista eriarvoisuutta. Seulontojen avulla pystytään parantamaan potilaiden elämänlaatua, kun hoidot voidaan aloittaa aiemmin. Syöpien hoitaminen varhaisessa vaiheessa lyhentää hoitoaikaa ja hoito on myös kevyempää kuin pidemmälle edenneen syövän hoito. Samalla yhteiskunnan kustannukset pienenevät ja resurssit voidaan kohdentaa nopeammin muihin potilaisiin. (Terveystieteiden tutkimuskeskus 2021)

Seulonnoista voi kuitenkin aiheutua haittoja, esimerkiksi komplikaatioita, psykososiaalista kuormitusta sekä pitkäaikaisia terveyshaittoja. Ylidiagnostiikan takia seulonnoissa voidaan löytää syöpiä tai niiden esiasteita, jotka eivät välttämättä aiheuttaisi ihmisen elinaikana oireita eivätkä potilaan kuolemaa. Väärät negatiiviset ja positiiviset tulokset voivat aiheuttaa turhaa huolta. Väärän negatiivisen tuloksen saaminen voi myöhästyttää diagnoosia ja näin ollen hoitojen aloitus viivästyy. Väärä positiivinen tulos taas aiheuttaa turhaa huolta ja ahdistusta potilaissa sekä tuo lisäkustannuksia terveydenhuollolle sekä tarpeettomia hoitoja ja lisätutkimuksia. Syövän varhaisen toteamisen tavoittelu on kuitenkin yleensä tarkoituksenmukaista. (Terveiden ja hyvinvoinnin laitos 2021; Joensuu *et al.* 2013)

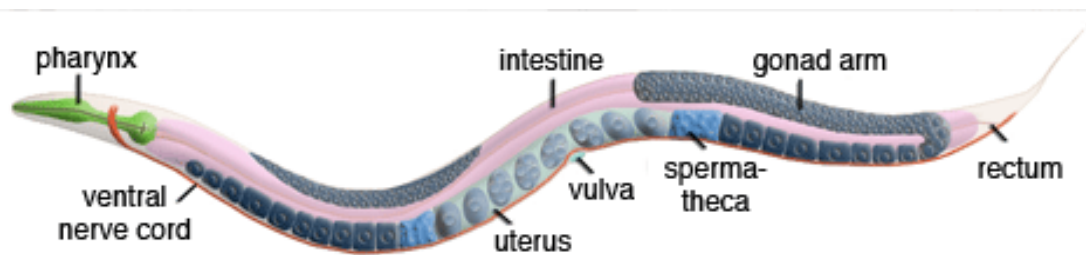
2 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans on pääasiassa kosteilla lauhkeilla alueilla elävä sukkulamato, joka on merkittävä malliorganismi mm. kehitysbiologiassa ja genetiikassa. *C. elegans* -sukkulamato on yksi yksinkertaisimmista ja helpoimmista organismeista laboratorioeläinten joukossa ja sen ylläpitokustannukset ovat alhaiset sekä sitä voidaan käsitellä tavallisilla in vitro -tekniikoilla. (Frézal & Félix 2015)

2.1 Anatomia ja elinkaari

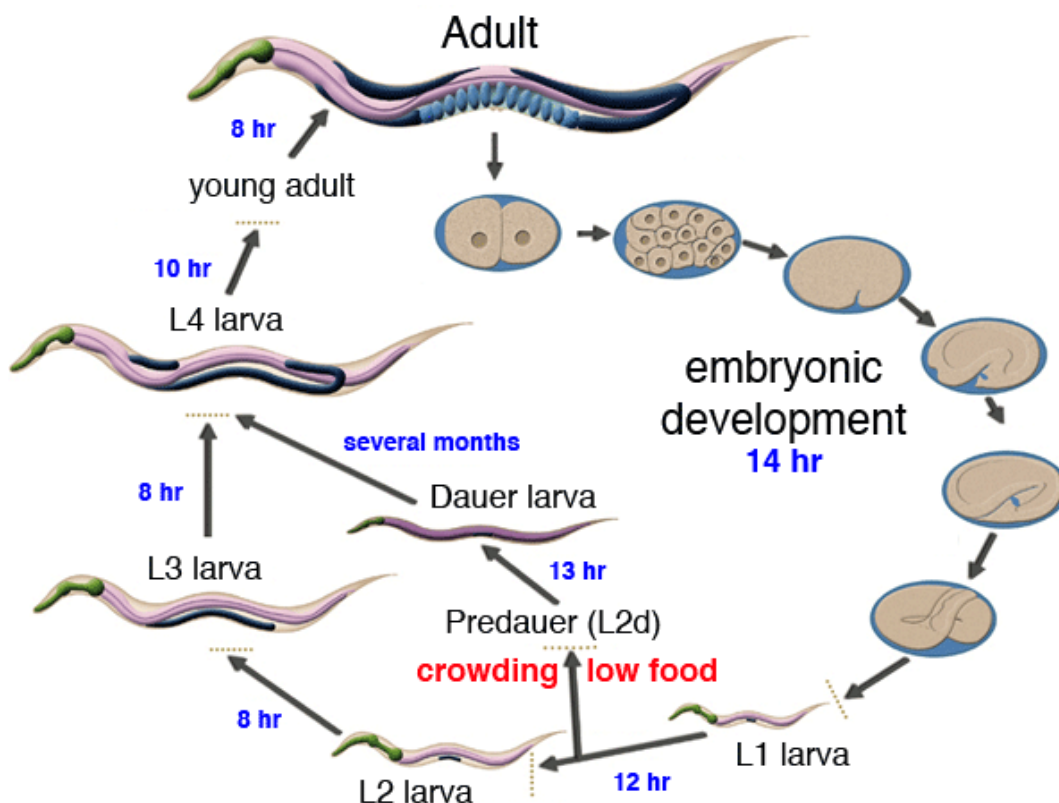
Aikuinen *C. elegans* -sukkulamato on läpinäkyvä noin 1 mm pituinen noin tuhannesta solusta koostuva sukkulamato, jolla on ruoansulatusjärjestelmä, hermosto, lihaksisto ja lisääntymisjärjestelmä. *C. elegans* voi olla kaksineuvoinen hermafrodiitti tai uros. Se voi siis hedelmöittää munasolunsa itse, jolloin yksi sukkulamato voi elinaikanaan hedelmöittää noin 300 munasolua. Uroksen läsnä ollessa hedelmöittyneiden munasolujen lukumäärä voi kasvaa jopa tuhanteen. Ristihedelmöitys tuottaa sekä uroksia että hermafrodiitteja, kun taas hermafrodiittien itsehedelmöityksen myötä syntyy geneettisesti identtisiä jälkeläisiä, jotka ovat kaikki hermafrodiitteja. (Apfeld & Alper 2019)

Molempien sukupuolien yleinen rakenne on samanlainen. Eläin koostuu kahdesta putkesta, jotka on erotettu nesteellä täytetyllä tilalla. Eläimen muotoa ylläpidetään sisäisellä hydrostaattisella paineella. Urossukkulamato on kuitenkin hieman ohuempi ja lyhyempi. (Barstead *et al.* 1999) *C. elegans* -sukkulamadon rakenne on havainnollistettu kuvassa 1.



Kuva 1. *C. elegans* -sukkulamadon anatomia. Pharynx=nielu, ventral nerve cord=vatsan puoleinen hermojuuri, uterus=kohtu, intestine=suolisto, vulva=synnytysaukko, spermatheca=siittiösäiliö, gonad arm=sukupuolirauhasen haara, rectum=peräsuoli. (Simon Fraser University 2008)

Sukkulamatojen elinikä on 2–3 viikkoa, mutta ne voivat kuitenkin selviytyä useita kuukausia niin kutsutussa dauer-vaiheessa epätavallisissa olosuhteissa. Sukkulamatojen elinkaari on havainnollistettu kuvassa 2. Normaalisti *C. elegans* -sukkulamadot käyvät läpi kolme päävaihetta – muna, toukka ja aikuinen. Munavaihe on nopea, munat kuoriutuvat 14 tunnissa, minkä jälkeen alkaa nelivaiheinen toukkavaihe (L1, L2, L3 ja L4). Ensimmäisen toukkavaiheen (L1) jälkeen sukkulamadot voivat huonoissa olosuhteissa, esimerkiksi liiassa tungoksessa tai ravinnon puutteessa, valita erilaisen kehitysreitit, jossa ne päätyvät dauer-toukiksi (L2d). Tässä kehitysvaiheessa sukkulamadot eivät tarvitse ravintoa ja voivat selviytyä horrostaen useita kuukausia. Olosuhteiden muuttuessa suotuisiksi sukkulamadot kehittyvät loppuun aikuisiksi. (Frézal & Félix 2015)



Kuva 2. *C. elegans* -sukkulamatojen elinkaari. (Simon Fraser University 2008)

2.2 N-NOSE syöpäseulontamenetelmä

"N-NOSE" on Japanissa kehitetty ja Hirotsu Bio Science Inc. -yhtiön patentoima syöpäseulontatesti, jossa hyödynnetään sukkulamatojen erittäin herkkiä hajuaistinvaraisia toimintoja. Se on yksinkertainen, edullinen, ja erittäin herkkä syövän seulontamenetelmä. N-NOSE on kliinisiin tutkimuksiin perustuva arviointitesti, jonka tarkoituksena on arvioida syöpäriskiä testin suorittamishetkellä. Sen antamia testituloksia ei vielä tule tulkita diagnoosiksi, vaan se tarjoaa alustavaa tietoa tarkempien kliinisten lisätutkimusten tarpeesta.

Sukkulamadot reagoivat tutkitusti syövän erittämiin hajuaineisiin, joita ei voida havaita olemassa olevilla testeillä. Toisin kuin muut tällä hetkellä käytössä olevat testit, N-NOSE pystyi havaitsemaan varhaisenkin vaiheen syöpiä, ja pystyi

muutenkin herkemmin ennustamaan syöpäriskiä. (Inaba et al. 2021; Hirotsu Bio Science Inc. What is N-NOSE 2022)

2.3 *C. elegans* tutkimustyössä

Laboratoriossa *C. elegans* -sukkulamatoja kasvatetaan petrimaljoilla, joilla on kerros *E. coli* -bakteeria ravintona. Yksittäisellä petrimaljalla voidaan ylläpitää tuhansia sukkulamatoja. Ne lisääntyvät nopeasti, minkä vuoksi niiden ylläpito on helppoa ja nopeaa, sillä uusia aikuisia jälkeläisiä voidaan tuottaa satoja vain kolmessa ja puolessa päivässä. Sukkulamatokantoja voidaan myös varastoida pitkäaikaisesti, jopa vuosikymmeniä, pakastamalla sukkulamatoja $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa tai nestemäisessä työssä. (Apfeld & Alper 2019)

C. elegans -sukkulamadoilla on erinomaiset hajureseptorit, joita on jopa suurempi määrä kuin koirilla. Siksi sukkulamadoilla on erittäin kehittynyt kemosensoinen eli kemiallisia yhdisteitä aistiva järjestelmä. Tämän järjestelmän avulla ne pystyvät havaitsemaan monenlaisia haihtuvia ja vesiliukoisia kemiallisia yhdisteitä, kuten haju- ja makuaineita. Organismeissa, joilla ei ole pitkän kantaman aistinvaraisia mekanismeja, kuten näkö- tai kuuloaisteja, kemosensoatio on tärkein aistimismenetelmä. (Bargmann 2006; Lanza et al. 2021)

Läpinäkyvyytensä ansiosta sukkulamatojen yksittäisten solujen visualisointi on helppoa, ja niiden koko genomi sekä jokaisen solun elinkaari on selvitetty. (Ludwig & Levkowitz 2018) *C. elegans* on erityisen hyödyllinen kehitys- ja ikääntymisprosessien sekä metabolian tutkimisessa lyhyen ikänsä ja useiden elämänvaiheidensa takia. *C. elegans* -sukkulamatojen tutkimukset ovat jo edistäneet useiden sairauksien, kuten Alzheimerin taudin, syövän, diabeteksen ja masennuksen taustalla olevien mekanismien ymmärtämistä. (Gomes & Wong 2006; Mullan & Marsh 2019)

3 Materiaalit ja menetelmät

Työn päätarkoituksena oli selvittää, tunnistavatko *C. elegans* -sukkulamadot syövän erittämiä hajuaineita virtsanäytteistä kemotaksisilla kokeilla. Tuloksista seurattiin, vetikö näyte sukkulamatoja puoleensa, karkottivatko näytteen hajuaineet sukkulamadot vai oliko kyseessä neutraali näyte. Tuloksia analysoitiin alusta asti ja toimintaa muutettiin saatujen tulosten mukaan, tarkoituksena optimoida ja testata menetelmää.

Työ aloitettiin valmistelemalla tarvittavat ravintomaljat ja sukkulamatokanta sekä harjoittelemalla kemotaktisten kokeiden tekemistä jo olemassa olevilla näytteillä, kunnes koe pystyttiin tekemään rutiinilla. Tämän jälkeen siirryttiin tutkimaan Dos. Päivi Koskisen yhteistyökumppaneilta Turun yliopistollisesta keskussairaalaasta saatuja normaalien ja syöpäsolujen kasvatusliuosnäytteitä (taulukko 2) sekä potilasnäytteitä, joita käsiteltiin ilman henkilötietoja.

Taulukko 2 Solulinjat, joista oli kerätty kasvatusliuosnäytteitä.

Solulinja	Selite
PC-3	Eturauhassyövän solulinja
MCF-7	Rintasyövän solulinja
Huvec	Ihmisen napanuoran endoteelisoluja
CWR-R1	Eturauhassyövän solulinja
DU145	Eturauhassyövän solulinja
LNCap	Eturauhassyövän solulinja
PNT1a	Normaali immortalisoitu eturauhasen solulinja

3.1 NGM-maljojen valmistusohje

Kokonaistilavuus: 1 L

Reagenssit punnittiin (Taulukko 3) ja liotettiin veteen, minkä jälkeen liuos autoklavoitiin. Liuoksen annettiin jäähtyä noin 55 asteeseen.

Taulukko 3. Käytetyt reagenssit ennen autoklavointia.

Reagenssi	Tarvittava määrä
NaCl	3,0 g
Agar	17,0 g
Peptoni/Tryptoni	2,5 g
ddH ₂ O	975 ml

Liuoksen jäähtyttyä lisättiin taulukon 4 aineet.

Taulukko 4. Autoklavoinnin jälkeen lisätyt reagenssit.

Reagenssi	Tarvittava määrä
1M CaCl ₂	1 ml
Kolesteroli (5 mg/ml etanolissa)	1 ml
1M MgSO ₄	1 ml
1M KPO ₄ , pH 6,0	25 ml

Liuosta sekoitettiin kääntämällä säilöpulloa varoen ylösalaisin, jotta ilmakuplia ei muodostuisi. Liuosta kaadettiin 20-25 ml maljaa kohden ja annettiin kuivua 2-3 päivää huoneenlämmössä, minkä jälkeen maljat siirrettiin säilytettäväksi +4 asteeseen.

3.2 Sukkulamatokannan ylläpito ja viljely

Ensimmäisenä kasvatettiin *E. coli* OP-50-1 kannan bakteereita tuoreita ravintomaljoja varten. OP-50-1 bakteerikanta on resistentti streptomysiinantibiootille, joten kasvatuksessa voitiin käyttää antibioottia ehkäisemään kontaminaatiota. Bakteerit kasvatettiin liitteen 1 ohjeen mukaan.

Tämän jälkeen otettiin pakastettu Sod-4::GFP sukkulamatoerä sulamaan. Käytetty Sod-4::GFP-kanta on siirtogeeninen ja ilmentää vihreää fluoresoivaa proteiinia altistuttuaan stressitekijöille. Tätä kantaa käytettiin myös muihin ryhmän tutkimuksiin, mutta muutoin tässä tutkimuksessa olisi voinut käyttää peruskantaa N2.

Kolmelle bakteeria sisältävälle ravintomaljalle pipetoitiin kullekin 300 µl sulatettua matoerää ja siirrettiin lämpökaappiin 20 asteeseen. Sukkulamatojen liikkeelle lähtöä seurattiin muutamia päiviä, kunnes liikkuminen oli selkeää. Tämän jälkeen sukkulamatokantaa kasvatettiin kahden viikon ajan siirtämällä sukkulamatoja sisältäviä agarpaloja vanhalta maljalta steriilillä skalpellilla tuoreille ravintomajloille. Palat asetettiin uusille maljoille sukkulamatoja sisältävä puoli alaspäin. Sukkulamatokantaa kasvatettiin työn aikana edellä mainitulla tavalla. Lisäksi bakteereita kasvatettiin sekä NGM-maljoja valettiin monesti opinnäytetyön aikana liitteen 1 ohjeen mukaan.

3.3 Sukkulamatojen synkronointi

Kemotaktisia kokeita varten sukkulamato populaatio synkronoitiin, jotta kokeissa käytetyt sukkulamadot olisivat samassa elämänvaiheessa kokeiden aikana. Samoja synkronoituja sukkulamatoja käytettiin muutamia päiviä. Synkronointi aloitettiin valmistamalla 5 ml natriumhypokloriittiliuosta eli valkaisuliuosta (ohje liitteessä 3) kutakin synkronoitavia matoja sisältävää agarmaljaa kohden. Valkaisuliuos tuhoaa sukkulamadot jättäen raskaana olevien aikuisten sukkulamatojen munat vaurioitumattomiksi. Näin saadaan synkronoitu sukkulamato populaatio.

Valkaisuaineen valmistuksen jälkeen eläimet pestiin maljoilta pipetoimalla maljoille kaksi kertaa 2 ml M9 puskuriliuosta ja keräämällä liuos maljoilta 15 ml:n falcon-putkeen. M9 puskuriliuoksen valmistusohje löytyy liitteestä 3. Pipetointien välissä maljoja heiluteltiin varovaisesti edes takaisin, jotta sukkulamadot saatiin liikkeelle. Kun sukkulamadot oli siirretty falcon-putkeen, annettiin liuoksen seistä muutaman minuutin, jotta aikuiset sukkulamadot laskeutuivat pohjaan.

Supernatantti kerättiin bakteerijätteeseen ja sukkulamatojen päälle kaadettiin 10 ml M9 puskuria, jotta enin osa bakteereista saatiin pestyä pois. Tämä vaihe toistettiin kolme kertaa.

Kun sukkulamadot oli pesty ja suurin osa supernatantista oli poistettu, aiemmin valmistettu natriumhypokloriittiliuos kaadettiin sukkulamatoja sisältävään putkeen. Putki peitettiin foliolla ja laitettiin pyörösekoittajaan 5–9 minuutiksi, kunnes aikuisia sukkulamatoja ei melkein enää näkynyt valoa vasten katsottaessa. Tämän jälkeen putki sentrifugoitiin 4000 kierroksessa 1 minuutin ajan. Tarkistettiin, näkyykö munista muodostuva pelletti pohjalla ja kaadettiin supernatantti pois putkesta. Putkeen lisättiin M9 puskuriliuosta 5 ml jokaista synkronoitua maljaa kohden. Pelletti sekoitettiin Vortex-sekoittajalla ja sentrifugoitiin 1 minuutin ajan 3500 kierroksessa. Supernatantti poistettiin ja lisättiin uutta M9 puskuria tilalle. Tämä toistettiin viisi kertaa, jonka jälkeen putki jätettiin foliolla peitettynä pyörösekoittajaan huoneenlämmössä yön yli.

Seuraavana päivänä putkesta otettiin kolme 5 µl näytettä ja laskettiin mikroskoopin avulla putkessa olevien L1-vaiheen sukkulamatojen määrä. Tämän perusteella madot maljattiin tuoreille bakteeria sisältäville ravintomaljoille siten, että kussakin maljassa oli sukkulamatoja 1500–2000 kappaletta. Maljat siirrettiin lämpökaappiin odottamaan käyttöönottoa.

3.4 Kemataktiset kokeet

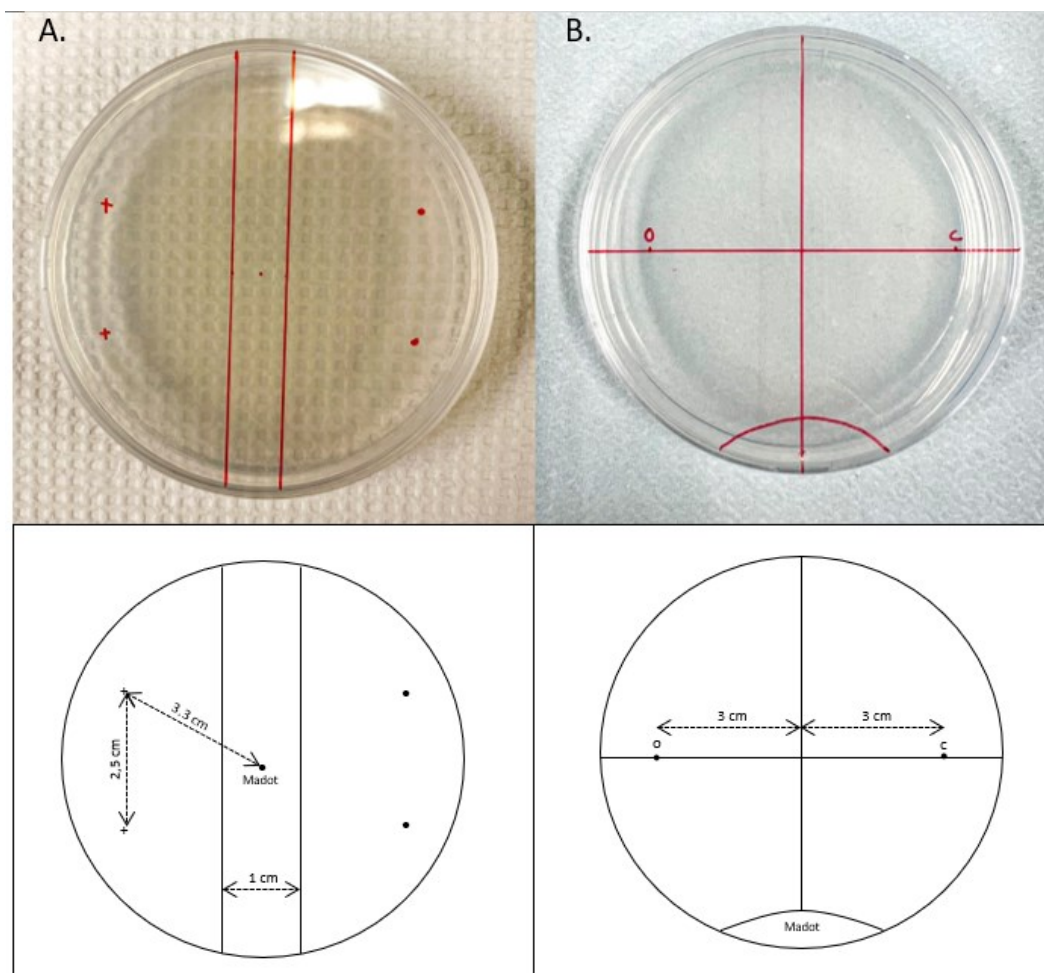
Kemataksialla tarkoitetaan solujen tai organismien järjestäytymistä kemiallisen ärsykkeen perusteella. Se on ilmiö, jonka avulla solut, bakteerit ja muut yksisoluiset tai monisoluiset organismit ohjautuvat kohti ympäristön kemiallisia ärsykeitä, kuten hajuja. Esimerkiksi bakteerit käyttävät kemotaksiaa löytääkseen ravintoa kulkeutumalla kohti korkeaa ravintomolekyyliipitoisuutta sekä välttääkseen myrkkyjä. (Williams 2010)

Kemataktisilla kokeilla oli tarkoitus selvittää, houkutteliko vai karkottiko tutkittava näyte *C. elegans* -sukkulamatoja. Ensimmäiseksi kerättiin tarvittava määrä sukkulamatoja synkronoiduilta maljoilta. Sukkulamatoja tarvittiin 50–100 yksilöä

jokaista koemaljaa varten. Maljoille pipetoitiin kaksi kertaa 2 ml S-basal puskuria (valmistusohje liitteessä 2 ja sukkulamadot kerättiin 15 ml falcon-putkeen. Pipetointien välissä maljoja heiluteltiin varovaisesti, jotta saatiin sukkulamadot liikkeelle. Sukkulamatojen annettiin laskeutua putken pohjalle, jonka jälkeen supernatantti poistettiin ja lisättiin 10 ml uutta S-basal puskuria. Tämä toistettiin kolme kertaa, jotta bakteerit saatiin pestyä pois. Bakteerien poistaminen on ehdottoman tärkeää sukkulamatojen liikkumisen ja kokeen onnistumisen kannalta. Poistettiin suurin osa supernatantista ja siirrettiin sukkulamadot eppendorf-putkeen. Putkeen jätettiin vähän supernatanttia, jotta sukkulamadot eivät kuivuneet ja niitä saatiin pipetoitua koemaljoille.

Työssä käytettiin Dos. Päivi Koskisen yhteistyökumppaneilta Turun yliopistollisesta keskussairaalaasta saatuja potilaiden virtsanäytteitä, joita käsiteltiin ilman henkilötietoja. Osalla heistä oli todettu pahanlaatuinen eturauhassyöpä ja osalla hyvänlaatuista eturauhasen liikakasvua. Alustavissa kokeissa käytettiin myös eturauhassyöpäsolujen kasvatusnesteitä, mutta potilaiden virtsanäytteet olivat pääasiallisena tutkimuskohteena tässä työssä.

Valmisteltiin näytelaimennukset ja NGM-maljat. NGM-maljat valmisteltiin tekemällä kuvan 3 mukaiset merkinnät maljojen pohjiin kemotaktisia kokeita varten.



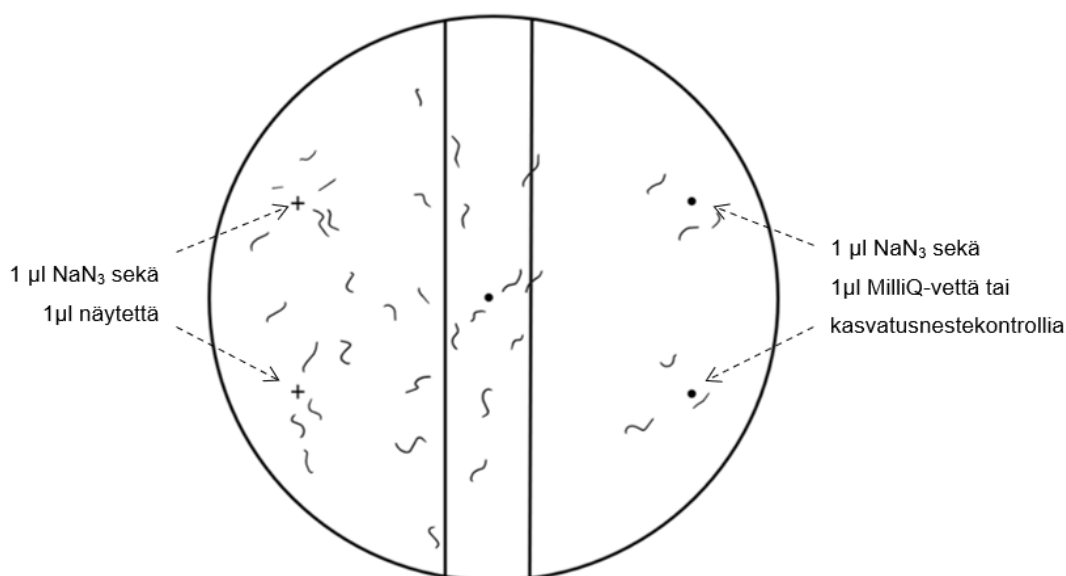
Kuva 3. Kemotaksiakokeiden asettelu.

Työssä kokeiltiin molempia kuvassa 3 esiintyviä asettelutapoja. Virtsanäytteitä analysoitaessa käytettiin tapaa A, jota oli alkuperäisessä tutkimuksessa käytetty (Hirotsu *et al.* 2015). Kasvatusnestenäytteitä analysoitaessa käytettiin tapaa B.

Ensimmäisenä 5 μ l sukkulamatioliuosta pipetoitiin maljan keskelle (tapa A) tai reunaan (tapa B), minkä jälkeen muihin merkittyihin kohtiin pipetoitiin 1 μ l 1M natriumatsidia, NaN_3 . Natriumatsidi on hermomyrkky, jota käytettiin tässä tapauksessa estämään se, että sukkulamadot muuttaisivat liikesuuntaansa saavutettuaan hajun lähteen ja totuttuaan tähän hajuun.

Seuraavaksi pipetoitiin näytteet (+ tai o) ja niiden kontrollit (- tai c), kumpiakin 1 μ l. Virtsanäytteiden kontrolleina käytettiin MilliQ-vettä ja solujen kasvatusnestenäytteiden kontrolleina käytettiin samaa kasvatusnestettä, jossa

soluja oli kasvatettu. Kaikkien käytettyjen materiaalien (maljat, sukkulamadot, näytteet ym.) oli tärkeä olla huoneenlämpöisiä kokeen toimivuuden kannalta. Maljat suljettiin parafilmillä ja niiden annettiin seistä 30–60 minuuttia. Jos maljoja ei pystytty laskemaan tunnin kuluttua, ne siirrettiin jääkaappiin, jotta sukkulamatojen liike loppuisi ja tulokset eivät vääristyisi. Sukkulamadot kulkeutuivat kuvan 4 mukaisesti joko kontrolliin tai näytteeseen päin.



Kuva 4. Sukkulamatojen kulkeutuminen kemotaktisissa kokeissa.

Sukkulamadot laskettiin mikroskooppia käyttäen ja niiden lukumäärä kirjattiin taulukkoon, jonka avulla laskettiin kemotaksiaindeksi CI. Tulokset tulkittiin Microsoft Excel-taulukkolaskentaohjelmalla. Kemotaksiaindeksi laskettiin kaavalla:

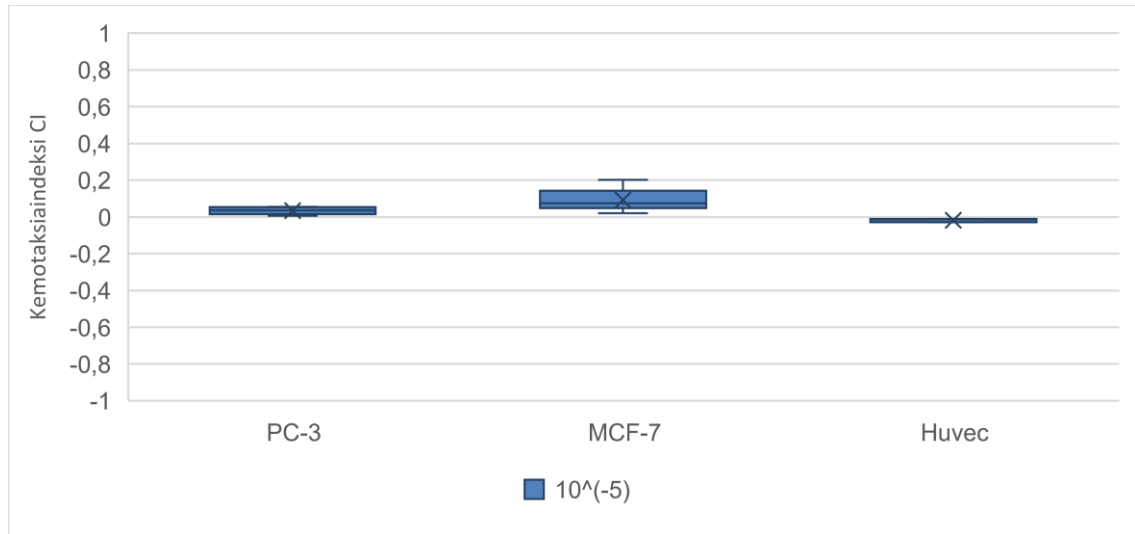
$$CI = \frac{(O - C)}{(O + C)}$$

CI=kemotaksiaindeksi, C=kontrollinäytteeseen päin kulkeutuneiden sukkulamatojen lukumäärä, O=tutkittavaan näytteeseen päin kulkeutuneiden sukkulamatojen lukumäärä.

4 Tulokset ja tulosten analysointi

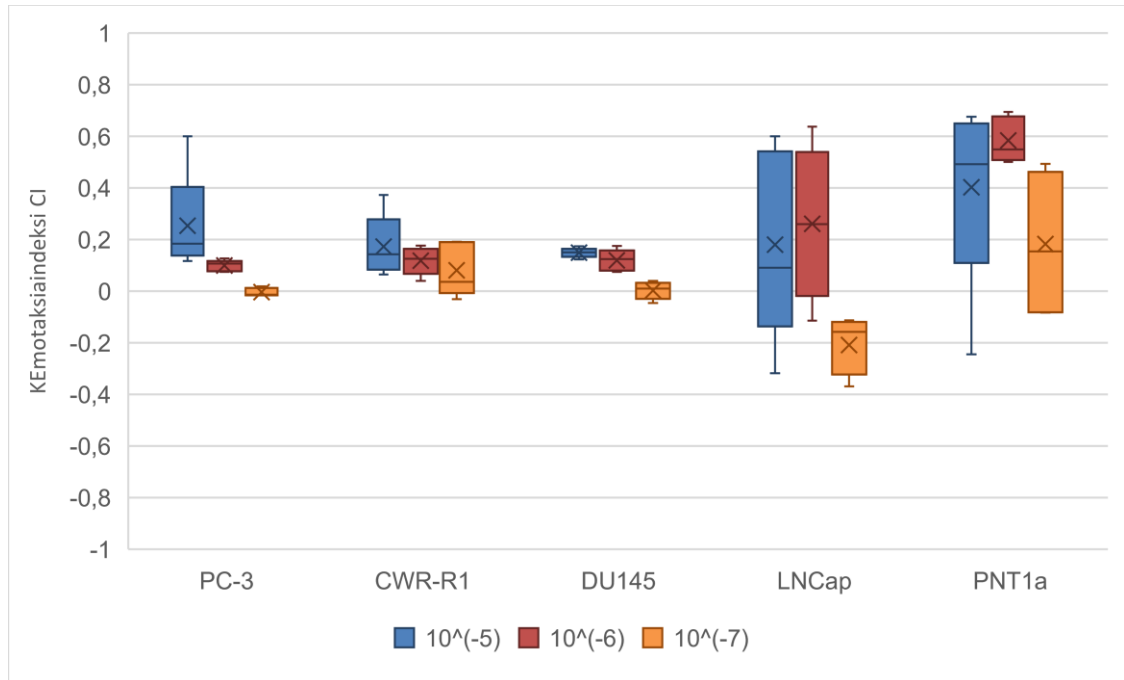
Ennen varsinaisia virtsanäytteitä tutkittiin useamman eturauhassyöpäsolulinjan yhden rintasyöpäsolulinjan sekä yhden normaaleja endoteelisoluja edustavan solulinjan solujen kasvatusnesteeseen erittämien aineiden vaikutuksia. Käytettyjen solulinjojen tiedot on esitetty kappaleen 4 taulukossa 2. Kustakin näytteestä tehtiin viisi rinnakkaista kemotaktista koetta. Tässä kokeessa käytettiin 10^{-5} näytelaimennosta. Tulokset tulkittiin ruutu ja jana -kaaviolla, jossa sininen ruutu näyttää suurimman osan (50 %) tuloksista ja jana näyttää suurimman ja pienimmän arvon eli jana kertoo hieman tulosten hajonnasta. Ruudun keskellä oleva poikittainen viiva kertoo mediaaniarvon ja x-merkki tulosten keskiarvon.

Kuviosta 1 havaitaan PC-3- ja MCF-7-näytteiden antavan positiivisen vasteen, kun taas Huvec antaa hienoisen negatiivisen vasteen. Myös hajonta rinnakkaisten kokeiden välillä osoittautui pieneksi. Tämä oli odotettu tulos, sillä PC-3 ja MCF-7 ovat syöpäsolulinjoja. Huvec-linjan odotettiin antavan negatiivisen vasteen, sillä se toimi kokeissa negatiivisena kontrollina. Mitä positiivisempi tulos on, sitä voimakkaammin sukkulamidot hakeutuvat kohti syöpänäytteitä. Tämän perusteella kuviosta 1 voidaan todeta menetelmän toimivan, joskin erot eri solulinjojen välillä olivat sangen pieniä.



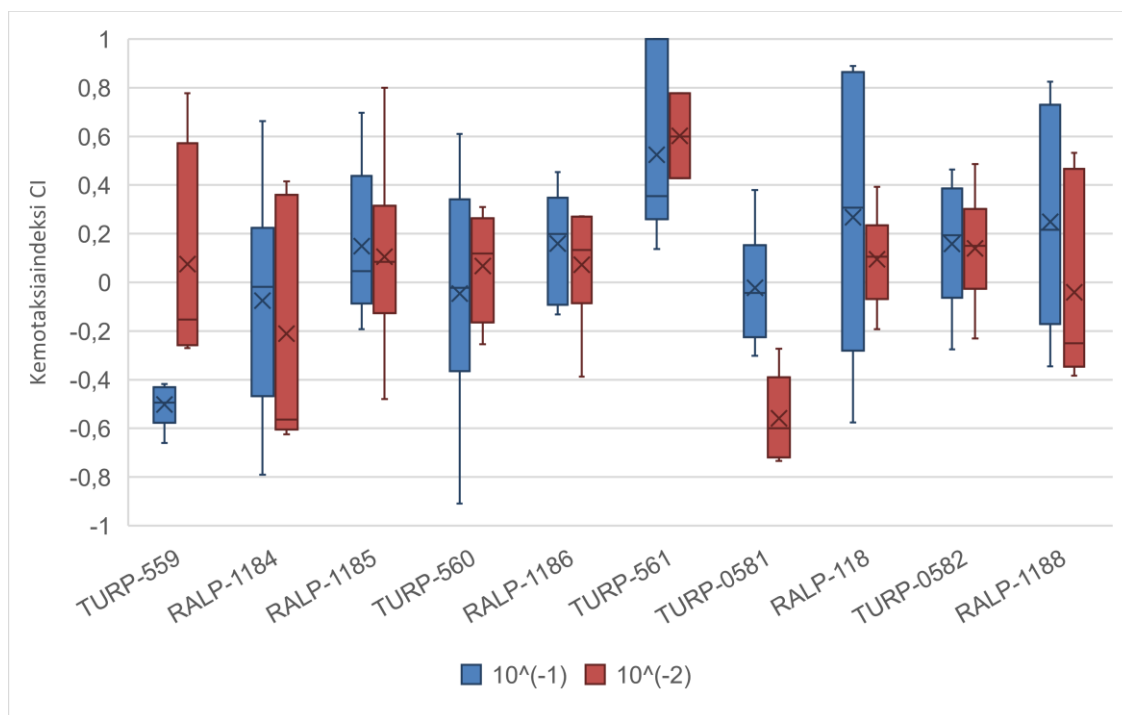
Kuvio 1. Kemotaktiset kokeet kasvatusnesteinäytteillä kokeen toimivuuden toteamiseen.

Toiseksi tutkittiin uusia kasvatusnesteinäytteitä kolmella eri näytelaimennoksella (10^{-5} , 10^{-6} sekä 10^{-7}), jotta saatiin selville, miten laimeita tai vahvoja hajuaaineita sukkulamadot aistivat. Kuvioista 2 havaitaan, että 10^{-7} laimennus on liian laimea aiheuttamaan selkeää kemotaktista vastetta. 10^{-7} laimennoksella tehtyjen kokeiden tulokset eroavat kahdesta muusta laimennoksesta ja tulokset vaihtelevat. Näiden havaintojen perusteella tämä laimennos jätettiin pois lopuista kemotaktisista kokeista. Kuvioista 2 voidaan myös havaita, että laimennoksilla 10^{-5} ja 10^{-6} saadut tulokset ovat enemmän toistensa kaltaisia kuin laimennoksen 10^{-7} , vaikka osassa näytteistä hajonta oli suurta. Kokeessa negatiivisena kontrollina käytetty PNT-1 ei toiminut odotetulla tavalla, vaan antoi voimakkaimman positiivisen vasteen, mikä oli mielenkiintoista, sillä se ei ole pahanlaatuinen solulinja. Kyseinen linja on immortalisoitu ja tällaisten solujen ongelmana on se, ettei niitä voida pitää normaaleina soluina, sillä ne eivät välttämättä toimi normaalien solujen tapaan ja niiden ominaisuudet saattavat erota normaaleiden solujen ominaisuuksista. (Carter & Shieh 2015). Tämä on saattanut aiheuttaa kokeissa tulosten vääristymistä ja on näin antanut positiivisen vasteen negatiivisen sijaan.



Kuvio 2. Kemotaktiset kokeet eturauhassoluilla.

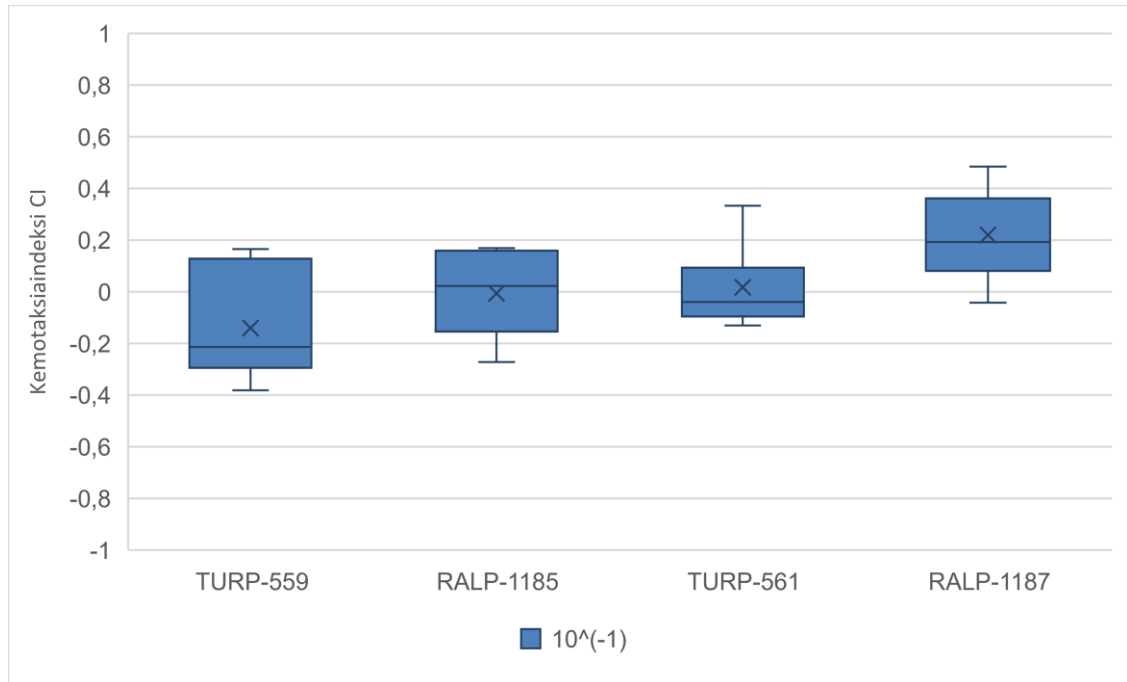
Seuraavaksi tutkittiin varsinaisia virtsanäytteitä sokkotestein käyttäen 10^{-1} ja 10^{-2} laimennoksia, kuten japanilaisten tutkimuksissa. (Inaba *et al.* 2021) (Kuvio 3) Tässä vaiheessa jokaisesta näytteestä tehtiin kuusi rinnakkaista koetta. Kokeissa hajonta rinnakkaisten näytteiden välillä oli suurta eivätkä näytteet, ja niiden antamat vasteet vastanneet täysin toisiaan. Näytteet oli numerokoodattu, eikä koevaiheessa tiedetty, millaiset vasteet näytteiden tulisi antaa. Kun koodit avattiin, havaittiin että 10^{-1} laimennoksista seitsemän kymmenestä eli 70 % antoi oikean suuntaisen vasteen ja 10^{-2} laimennoksella vain 50 %. Laimennosten välillä havaittiin siis myös eroja. Kuuden rinnakkaisen kokeen ajateltiin riittävän antamaan tarpeeksi luotettavan tuloksen, mutta tulosten vaihtelevuuden takia seuraaviin kokeisiin lisättiin rinnakkaisia näytteitä.



Kuvio 3. Ensimmäiset sokkotestit virtsanäytteillä. TURP=benigni (hyvänlaatuinen) ja RALP=maligni (pahanlaatuinen).

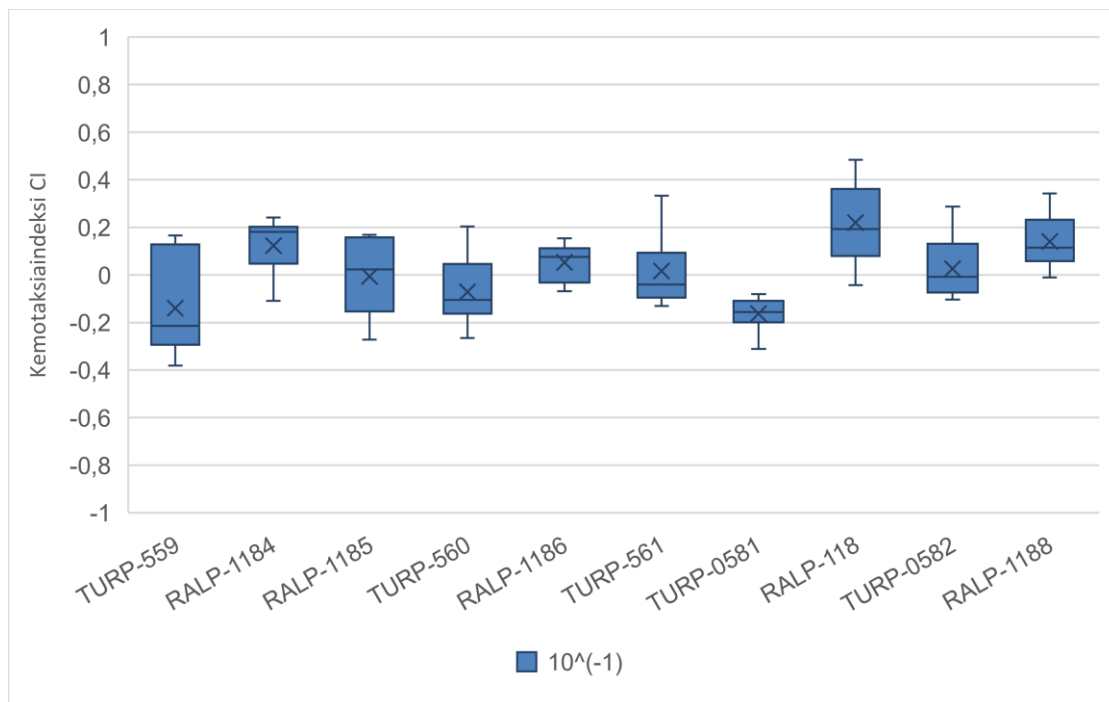
Lisättiin rinnakkaisten kokeiden määrää kymmeneen olettaen tulosten luotettavuuden parantuvan suuremmalla kokeiden määrällä. Seuraaviin kokeisiin valittiin aiemmin käytetyistä näytteistä neljä, joista kaksi oli hyvänlaatuista ja kaksi pahanlaatuista. (Kuvio 4) TURP-559 ja RALP-1187 antoivat selkeästi odotetun vasteen, mutta kahdessa muussa näytteessä ei näkynyt selkeää eroa näytteiden ja kontrollien välillä, joten niiden vaste jäi neutraaliksi. TURP-561-näytteen vaste on hieman enemmän negatiivisella puolella kuin positiivisella, mutta ero on erittäin pieni. Kuvio 4 kuitenkin nähdään, että kaikkien näytteiden mediaaniarvot eli keskimmäiset arvot vastaavat odotettua vastetta. TURP-näytteillä mediaani on negatiivinen ja RALP-näytteillä mediaani on positiivinen. Toisin sanoen 50-75 % näytteistä antoi oikean suuntaisen vasteen ja 25-50 % neutraalin riippuen siitä, lasketaanko TURP-561 mukaan oikean suuntaisen vasteen antaneisiin näytteisiin. Tämän perusteella pääteltiin, että rinnakkaisten kokeiden lisääminen paransi hieman tuloksia. Näistä kokeista eteenpäin

käytettiin kuitenkin vain yhtä 10^{-1} laimennosta, joten ei voida arvioida, miten laimeammat näytteet reagoivat.



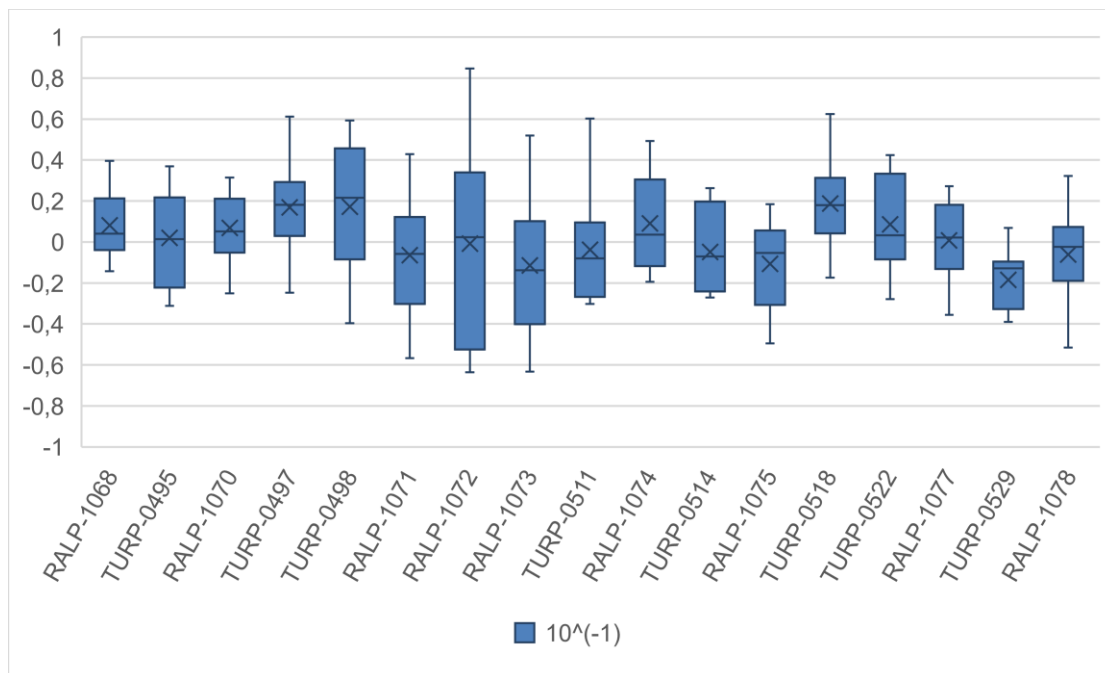
Kuvio 4. Ensimmäiset kemotaktiset kokeet kymmenellä rinnakkaisella näytteellä. TURP=benigni (hyvänlaatuinen) ja RALP=maligni (pahanlaatuinen).

Sama toistettiin kaikille näytteille ja tulosten odotettiin selkiytyvän edellisten kokeiden tulosten perusteella. Kuvio 5 havaitaan, että 70 % näytteistä antoi oikean suuntaisen vasteen, 20 % neutraalin ja 10 % antoi niin sanotusti väärän suuntaisen vasteen. Voidaan myös nähdä, että näytteiden mediaaniarvot vastaavat odotettua vastetta, sillä 90 % mediaaniarvoista on odotetun vasteen puolella. Tämän perusteella voidaan todeta, että rinnakkaisia kokeita oli aiemmin liian vähän.



Kuvio 5. Kemotaktiset kokeet kakista näytteistä kymmenellä rinnakkaisella kokeella. TURP=benigni (hyvänlaatuinen) ja RALP=maligni (pahanlaatuinen).

Kokeita jatkettiin uusilla virtsanäytteillä, joita käsiteltiin jälleen tuntemattomina näytteinä. Näillä näytteillä tehdyt kokeet eivät antaneet odotettuja tuloksia. Kuvioista 6 havaitaan, että näytteistä 41 % antoi oikean suuntaisen vasteen, 6 % neutraalin ja 53 % odotusten vastaisen vasteen. Mediaaniarvot seuraavat tuloksia melko hyvin, sillä 47 % oli odotetun vasteen puolella ja 53 % taas ei vastannut odotuksia. Viimeisten kokeiden tekemisessä tuli kiire, mikä on saattanut vaikuttaa tuloksiin. Kaikki kokeet tehtiin kuitenkin samalla tavalla, joten kiire ei täysin selitä vaihtelevia tuloksia, mutta se takia sukkulamato-oliukseen on esimerkiksi saattanut jäädä enemmän bakteereita pesun jälkeen, mikä vaikuttaa sukkulamatojen liikkumiseen maljoilla. Olosuhteet, kuten lämpötila ja kosteus, ovat voineet myös olla erilaiset ja näin vaikuttaneet lopulliseen tulokseen. Lisäksi kävi ilmi, että näytteet saattoivat sisältää verta, joka voi myös vääristää tuloksia. Potilasnäytteet olivat eturauhasen höyläysnäytteitä, minkä takia näytteet ovat voineet sisältää verta ja muuta kudosta, joiden takia näytteisiin on voinut kulkeutua ylimääräisiä hajuaineita. Tämän takia tulos on saattanut hämärtyä.



Kuvio 6. Toinen sokkotesti uusilla näytteillä. TURP=benigni (hyvänlaatuinen) ja RALP=maligni (pahanlaatuinen).

5 Loppupäätelmät

Opinnäytetyön tulosten perusteella ei voida todeta menetelmää täysin luotettavaksi, mutta tulokset antavat lupaavan pohjan jatkotutkimuksille. Menetelmä vaatii vielä lisää testausta ja optimointia. Hirotsu BioScience Inc. (2022) tutkijoiden mukaan menetelmän tarkkuus olisi 86,3 %, mutta opinnäytetyön tuloksien perusteella tarkkuus vaihtelee 50-75%. Menetelmän tarkoitus ei kuitenkaan ole antaa suoraa syöpädiagnoosia, vaan olla osana syöpädiagnostiikkaa ja havaita syöpä jo varhaisessa vaiheessa. Tässä vaiheessa ei tiedetä, havaitsevatko sukkulamadot houkuttelevia hajuaaineita myös sellaisista näytteistä, jotka tällä hetkellä ovat hyvänlaatuisia, mutta jotka voivat myöhemmin kehittyä pahanlaatuisiksi, mikä olisi voinut vaikuttaa opinnäytetyössä tehtyjen kokeiden tulosten vaihtelevuuteen. Hirotsu BioScience Inc. (2022) tutkijoiden mukaan menetelmä havaitsee mahdollisen syövän jo vaiheissa 0 ja I, joten tämäkin voisi olla mahdollista. Tämä voisi olla mielenkiintoinen ja tärkeä pitkän aikavälin jatkotutkimuskohde. Muita kokeisiin vaikuttavia tekijöitä voisi tulevaisuudessa tutkia lisää, sillä naisilla hormonitoiminnan on todettu vaikuttavan kemotaktisten kokeiden tulokseen. (Lanza *et al.* 2021) Ihmiskehossa voi olla muitakin tuloksiin vaikuttavia mekanismeja, joista ei vielä tiedetä.

Menetelmä on suhteellisen helppo ja halpa toteuttaa, eikä se aiheuta kipua tai muuta kärsimystä tutkittavalle. Tulosten laskeminen on työlästä ja aikaa vievää monien rinnakkaisten kokeiden takia, mutta ajoittamalla kokeet oikein, on monien rinnakkaisten kokeiden toteuttaminen samanaikaisesti mahdollista. Olosuhteiden tulee olla vakaat ja sukkulamatojen olla samassa kasvuvaiheessa kokeiden onnistumiselle. Eri kasvuvaiheissa sukkulamadot nimittäin käyttäytyvät hieman eri tavalla ja esimerkiksi kosteus ja lämpötila vaikuttavat suuresti niiden liikkuvuuteen. Kemotaktisissa kokeissa ei kuitenkaan ajateltu kasvuvaiheen synkronoinnin olevan niin tärkeää, joten synkronointi tehtiin vain kerran viikossa, toisinaan kaksi kertaa. Tämä on saattanut vaikuttaa tuloksiin ja jatkossa tulisi synkronointi tehdä useammin, jotta sukkulamadot ovat varmasti samassa

kasvuvaiheessa. Koemaljojen merkitsemiselle tulisi kehittää jokin helpompi ja nopeampi tapa, esimerkiksi leimasin tai vastaava. Tällä säästäisi paljon aikaa ja testauksesta saataisiin kustannustehokkaampi, sillä maljojen merkitseminen on tehtävä tarkasti ja se vie turhan paljon aikaa itse kokeilta. Lisäksi menetelmästä saataisiin laadukkaampi, sillä maljojen merkitsemisessä pienikin mittausvirhe voi vaikuttaa tuloksiin.

Menetelmä on lupaava, helppo ja edullinen sekä potilasystävällinen, minkä takia se olisi hyvä lisä syövän diagnosoimiseen myös Suomessa. Se kuitenkin vaatii vielä jatkotutkimuksia ja kehittämistä Suomen markkinoille sopivaksi.

Lähteet

Apfeld, J. & Alper, S. 2019. *What Can We Learn About Human Disease from the Nematode C. elegans?*. Published: *Methods Mol Biol.* 2018; 1706: 53–75.

Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6391162/>

Viitattu: 7.4.2022.

Avancès, C., Georget, V., Térouanne, B., Orio, F., Cussenot, O., Mottet, N., Costa, P. & Sultan, C. 2001. *Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens.*

Saatavilla:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720701006694?via%3Dihub>

Viitattu: 28.4.2022.

Bargmann, C. 2006. *Chemosensation in C. elegans.* USA.

Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19746/>

Viitattu: 24.3.2022.

Barstead, R., Blaxter, M., Hodgkin, J., Hope, I., Jin, Y., Johnstone, I., Lockery, S., McGhee, J., Mains, P., Molin, L., Mounsey, A. & Potdevin, M. 1999. *C. elegans: A Practical Approach.* New York: Nova Science Publishers, Incorporated.

Cancer Research UK. 2021. *General cancer information.* [Online]

Saatavilla: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general>

Viitattu: 10.2.2022.

Carter, M. & Shieh, J. 2015. *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (Second Edition). Academic Press.

Edge, S., Byrd, D., Compton, C., Fritz, A., Greene, F. & Trotti, A. 2010. *Cancer Staging Handbook* (Seventh Edition). New York: Springer.

Eggert, J. 2017. *Cancer Basics.* Second Edition. Pittsburgh, Pennsylvania: Oncology Nursing Society.

Flatt, T. & Heyland, A. 2011. *Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-Offs*. United States: Oxford University Press, Incorporated.

Frézal, L. & Félix, M. 2015. *The Natural History of Model Organisms: C. elegans outside the Petri dish*. Ranska: Centre National de la Recherche Scientifique.
Saatavilla: <https://elifesciences.org/articles/05849>
Viitattu: 28.3.2022.

Gomes, A. & Wong, G. 2006. *Ihmistautien sukkulamatomallit ovat tieteellisiä kultakaivoksia - Pieni mato auttaa selvittämään tautimekanismeja*.
Saatavilla: <https://www.duodecimlehti.fi/duo96029>
Viitattu: 12.2.2022.

Hirotsu Bio Science Inc. *What is N-NOSE*.
Saatavilla: <https://hbio.jp/en/srv/nnose1>
Viitattu: 26.4.2022.

Hirotsu Bio Science Inc. *Why nematodes*.
Saatavilla: <https://hbio.jp/en/srv/nnose3>
Viitattu: 26.4.2022.

Hirotsu, T., Sonoda, H., Uozumi, T., Shinden, Y., Mimori, K., Maehara, Y., Ueda, N & Hamakawa, M. 2015. *A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using Caenorhabditis elegans Scent Detection*.
Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356513/>
Viitattu: 14.4.2022.

Hirotsu, T., Sonoda, H., Uozumi, T., Shinden, Y., Mimori, K., Maehara, Y., Ueda, N. & Hamakawa, M. 2015. *A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using Caenorhabditis elegans Scent Detection*.
Saatavilla:
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118699#>
Viitattu: 17.5.2022.

Inaba, S., Shimozonob, N., Yabukia, H., Enomotoa, M. Morishitab, M. Hirotsu, T. & Luccio, E. 2021. *Accuracy evaluation of the C. elegans cancer test (N-NOSE) using a new combined method*. Published: Cancer Treatment and

Research Communications. 2021; Volume 27.

Saatavilla:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S246829422100068X>

Viitattu: 17.5.2022.

Joensuu, H., Roberts, P., Kellokumpu-Lehtinen, P., Jyrkkiö, S.; Kouri, M. & Lyly, T. 2013. *Syöpätaudit*. 5. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Lanza, E., Di Rocco, M., Schwartz, S., Caprini, D., Milanetti, E., Ferrarese, G., Maria Lonardo, M., Pannone, L., Ruocco, G., Martinelli, S. & Folli, V. 2021. *C. elegans-based chemosensation strategy for the early detection of cancer metabolites in urine samples*.

Saatavilla: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-96613-z>

Viitattu: 27.3.2022.

Ludwig, M. & Levkowitz, G. 2018. *Model Animals in Neuroendocrinology: From Worm to Mouse to Man*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Incorporated.

Mullan, A & Marsh, A. 2019. *Advantages of using Caenorhabditis Elegans as a Model Organism*.

Saatavilla: <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/advantages-of-using-caenorhabditis-elegans-as-a-model-organism>

Viitattu: 25.4.2022.

Shellard, A. & Mayor, R. 2015. *Chemotaxis during neural crest migration*.

Saatavilla:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952116300313?via%3Dihub>

Viitattu: 19.3.2022

Simon Fraser University. 2008. *What is C. elegans?*.

Saatavilla:

<https://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Celegans.html>

Viitattu: 24.4.2022

Syöpäjärjestöt. 2021. *Uudet syöpätilastot valmistuivat – Syöpään sairastumisessa huomattavia alueellisia eroja*. [Online]

Saatavilla: <https://www.syopajarjestot.fi/ajankohtaista/tiedotteet/uudet-syopatilastot-valmistuivat-syopaan-sairastumisessa-huomattavia-alueellisia-eroja/>

Viitattu: 5.2.2022.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2021. [Online]

Saatavilla: <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/syopa>

Viitattu: 30.1.2022.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2021. *Syöpäseulonnat*. [Online]

Saatavilla: <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/syopa/syopaseulonnat>

Viitattu: 30.2.2022.

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. 2022. *Syövän kustannukset*.

Saatavilla: <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/syopa/syovan-kustannukset>

Viitattu: 11.5.2022

Tuomisto, J. 2020. *Onko syöpä räjähdysmäisesti lisääntynyt?*. Helsinki:

Kustannus Oy Duodecim.

Saatavilla: <https://www.terveyskirjasto.fi/asy00614>

Viitattu: 2.2.2022.

Vartiainen, E., Karjalainen, S., Pyökkänen, L., Vertio, H., Jalava, K., Järvisalo, J., Koivuranta-Vaara, P., Malila, N., Nurminen, R., Pajari, A., Reijula, K., Remes, K., Rosenberg-Ryhänen, L., Tammela, T. & Virtamo, J. 2014. *Syövän ehkäisy, varhaisen toteamisen ja kuntoutumisen tuen kehittäminen vuosina 2014–2025*.

Kansallisen syöpäsuunnitelman II osa. [Online]

Saatavilla: [URN ISBN 978-952-302-185-3.pdf \(julkari.fi\)](https://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-185-3.pdf)

Viitattu: 3.2.2022.

Williams, T. 2010. *Chemotaxis: Types, Clinical Significance, and Mathematical Models: Types, Clinical Significance, and Mathematical Models*. New York:

Nova Science Publishers, Incorporated.

World Health Organization. *Cancer*. [Online]

Saatavilla: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1

Viitattu: 30.1.2022

OP-50 valmistus ja maljaus

500 ml erlenmayerpulloon lisättiin 200 µl OP-50 bakteerikantaa ja 200 ml LB-mediumia (1:1000, ilman antibioottia). Jos käytettiin OP-50-1 bakteerikantaa, lisättiin myös 200 µl streptomysiiniä (1:1000 50 mg/ml kantaliuosta). Bakteeriviljelmää kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa 14–16 tuntia.

Bakteeriliuos kaadettiin 50 ml falcon-putkiin ja sentrifugoitiin 4000 rpm 10 minuuttia. Bakteerisolut kerääntyivät pohjalle ja 45 ml supernatanttia kaadettiin bakteerijätteeseen. Jäljelle jäänyt 5 ml sekoitettiin bakteerisolumassaan. 250 µl eriä bakteerisuspensiota pipetoitiin tuoreille NGM-maljoille ja levitettiin huolellisesti. Maljojen annettiin kuivua 2-3 päivää, minkä jälkeen ne siirrettiin +4 °C jääkaappiin myöhempää käyttöä varten.

Opinnäytetyössä käytettyjen puskuriliuosten ja valkaisuliuksen valmistusohjeet

M9-puskuriliuos

NaCl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	5,8 g
NH ₄ Cl	1 g
ddH ₂ O	1 L

Reagenssit liuotetaan veteen ja autoklavoidaan.

S-basal puskuriliuos

NaCl	5,85 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	6 g
Kolesteroli	1 ml (5 mg/ml etanolissa)
ddH ₂ O	1 L

Reagenssit liuotetaan veteen ja autoklavoidaan.

Valkaisuliuos

1 M NaOH	1,25 ml
Hypokloriitti	1,0 ml
ddH ₂ O	2,75 ml