



Reelika Kask

Digitaalisen PCR:n menetelmäperiaate ja sen käyttösovellukset leukemioiden kliinisen vaiheen diagnostiikassa

Kuvaileva kirjallisuuskatsaus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalytiikka (AMK)

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

26.11.2023

Tekijä	Reelika Kask
Otsikko	Digitaalisen PCR:n menetelmäperiaate ja sen käyttösovellukset leukemioiden kliinisen vaiheen diagnostiikassa. Kuvaileva kirjallisuuskatsaus
Sivumäärä	23 sivua
Aika	17.11.2023
Tutkinto	Sosiaali-ja terveystieteiden ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Lehtori Heidi Malava
<p>Digitaalinen PCR (polymeraasiketjureaktio) edustaa huippumodernia molekyyliagnostiikan menetelmää, tarjoten ennennäkemättömän tarkkuuden ja herkkyuden geneettisen materiaalin kvantifoinnissa. Tämä edistysellinen menetelmä perustuu yksittäisten DNA-molekyylien eristämiseen ja amplifikaatioon, mahdollistaen yksittäisen molekyylin tason detektion ja ylittäen perinteisen PCR:n rajoitukset.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa kuvaileva kirjallisuuskatsaus, jossa analysoidaan ja yhdistetään olemassa olevaa tutkimustietoa digitaalisesta PCR:stä. Katsauksessa ei keskitytä hypoteesin testaamiseen tai metodologisiin yksityiskohtiin, vaan sen sijaan tarjotaan kattava yleiskatsaus aiheen nykytilasta. Tämä sisältää pääteemat ja avainkäsitteet, kuten digitaalisen PCR:n perusperiaatteet, soveltamisen leukemioiden kliinisen vaiheen diagnostiikassa, sekä vertailun kvantitatiivisen PCR:n kanssa.</p> <p>Opinnäytetyössä hyödynnettiin tieteellisiä tietokantoja, kuten PubMedia ja CINAHLia, varmistaen näin tutkimuksen laadun ja ajankohtaisuuden. Erityistä huomiota kiinnitettiin tarkoituksenmukaisiin hakusanoihin, kuten 'digital PCR', 'dPCR leukemia', 'digital PCR technology', 'dPCR methodical principle', joiden avulla varmistettiin, että katsaukseen valikoitui relevantteja ja ajankohtaisia tutkimuksia. Hakusanojen avulla kartoitettiin digitaalisen PCR:n käyttöä leukemian eri alatyypeissä ja sen merkitystä nykyaikaisessa diagnostiikassa. Lopputuloksena syntyi yhteenveto, joka kuvaa digitaalisen PCR:n periaatteita ja sen soveltamista leukemioiden kliinisen vaiheen diagnostiikassa.</p>	
Avainsanat	Digitaalinen PCR, leukemia

Author	Reelika Kask
Title	The methodical principle of digital PCR and its applications in the clinical phase diagnostics of leukemia
Number of Pages	23 pages
Date	17.11.2023
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Heidi Malava, Principal lecturer
<p>Digital PCR (polymerase chain reaction) represents a state-of-the-art method in molecular diagnostics, offering unprecedented precision and sensitivity in the quantification of genetic material. This advanced method is based on the isolation and amplification of individual DNA molecules, allowing for the detection of single-molecule level and surpassing the limitations of traditional PCR.</p> <p>The aim of this thesis was to produce a descriptive literature review, analyzing and synthesizing existing research information on digital PCR. The review does not focus on hypothesis testing or methodological details, but instead provides a comprehensive overview of the current state of the topic. This includes main themes and key concepts such as the basic principles of digital PCR, its application in the diagnosis of different types of leukemia in their clinical phase, and comparison with quantitative PCR.</p> <p>In this thesis, scientific databases such as PubMed and CINAHL were utilized to ensure the quality and timeliness of the research. Special attention was paid to appropriate keywords, such as 'digital PCR', 'dPCR leukemia', 'digital PCR technology', 'dPCR methodical principle', to ensure that the review included relevant and up-to-date research. These keywords were used to map the use of digital PCR in various subtypes of leukemia and its significance in modern diagnostics. The result is a summary that describes the principles of digital PCR and its application in the diagnosis of leukemia in the clinical phase.</p>	
Keywords	Digital PCR, leukemia

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Polymeraasiketjureaktio (PCR)	1
3	Kirjallisuuskatsaus tutkimusmenetelmänä	2
4	Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset	4
5	Kirjallisuushaun toteutus	4
5.1	Toiminnan eteneminen ja työskentelyn kuvaus	9
6	Tulokset	10
6.1	Digitaalisen PCR:n perusteet	10
6.2	dPCR ja akuutti myeloinen leukemia	12
6.3	dPCR ja krooninen myeloinen leukemia	13
6.4	dPCR ja akuutti lymfaattinen leukemia	14
6.5	Päätelmät	15
7	Eettisyys ja luotettavuus	18
8	Pohdinta	19
	Lähteet	21

1 Johdanto

PCR eli polymeerasiketjureaktio on in vitro tutkimustekniikka, jonka päämääränä on monistaa haluttua DNA-segmenttiä erittäin pienestä näytelmästä (Quan & Sauzade & Brouzes 2018). In vitro tutkimustekniikalla tarkoitetaan koeputkimenetelmää eli tapahtuva reaktio suoritetaan koeputkessa tai esimerkiksi soluviljelmässä (Tieteen termipankki 2022). PCR pohjautuu sekvenssien hybridisaatioon ja sen reaktioherkkyys on riippuvainen reaktioentsyymeistä (Quan ym 2018). Sekvensoinnilla määritetään DNA-segmentin nukleotidien emäsjärjestys (Khan Academy). Tästä vallankumouksellisesta menetelmästä on kehitetty muita menetelmiä, jotka voidaan jakaa reaaliaikaiseen ja digitaaliseen PCR:ään (Zhu ym. 2020).

Hematologiset maligniteetit eli verisyövät ovat määrällisesti ja maailmanlaajuisesti melko merkittävä syöpäryhmä. Verisyövät voidaan luokitella sen mukaan mistä syöpä alun perin löytyy: leukemiat (verestä), lymfoomat (imusuolmukkeista) ja myeloomat (luukudoksesta). (The Haematological Malignancy Research Network, HMRN.) Verisyöpien osalta tämä opinnäytetyö tulee keskittymään leukemiaan. Tarkoituksena on kartoittaa leukemian eri alalajit ja koota niistä teemakokonaisuuksia, joiden avulla valmistuu luettelomainen tiedosto leukemian alalajeista, joissa digitaalinen PCR on osana diagnostista prosessia kliinisessä vaiheessa.

Opinnäytetyö tehtiin kuvailevana kirjallisuuskatsauksena digitaalisen PCR:n menetelmäperiaatteesta ja kartoitettiin millaisten leukemioiden diagnostiikassa sitä on käytetty. Työ tehtiin Metropolia Ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveysalan bioanalytiikan koulutusohjelman opinnäytetyönä. Opinnäytetyön aihe tuli aihe-ehdotuksena Metropolia Ammattikorkeakoulun molekyyli-genetiikan lehtorilta, jonka toiveena oli saada hyvä ja tiivis tietopaketti digitaalisesta PCR:stä, jota pystyisi hyödyntämään opetuksessa.

2 Polymeerasiketjureaktio (PCR)

PCR eli polymeerasiketjureaktio on laajasti käytetty molekyylibiologian tekniikka DNA:n monistamista varten. Se on tehokas väline kohde-DNA-sekvenssin monistamiseen.

PCR jaetaan kolmeen päävaiheeseen: denaturaatiovaiheeseen, alukkeiden liittymisvaiheeseen ja elongaatiovaiheeseen. Denaturaatiovaiheessa lämpötila nostetaan 94–98 °C-asteeseen, jolloin DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan korkean lämpötilan

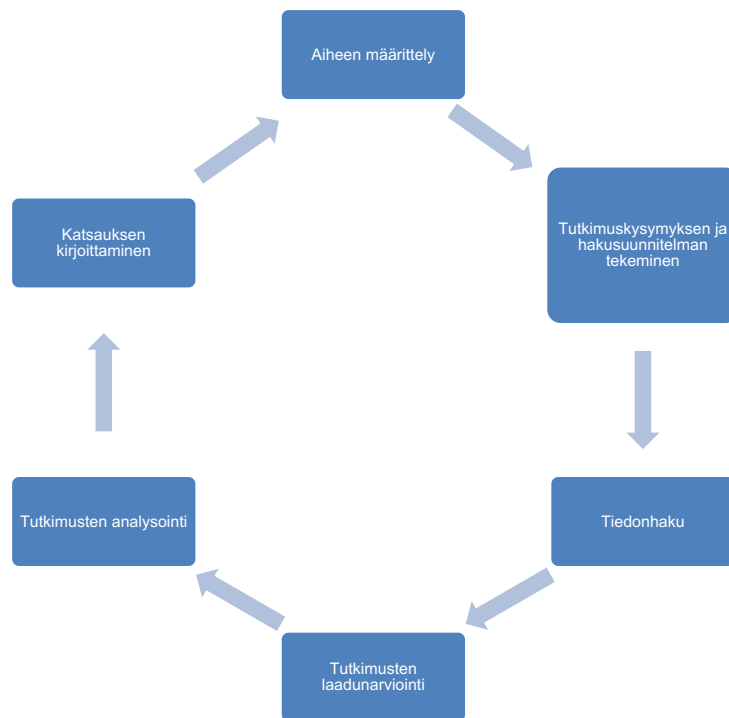
vuoksi. Denaturaatiovaiheen keston ja lämpötilaan vaikuttaa DNA-templaatin laatu ja puskuriliuoksen suolakonsentraatio. Alukkeiden liittymisvaiheessa lämpötila lasketaan 40–70 °C-asteeseen, mikä mahdollistaa vetysidosten uudelleenmuodostumisen. Tässä vaiheessa spesifiset alukkeet kiinnittyvät yksijuosteiseen kohde-DNA:han noudattaen emäsparisääntöä. Elongaatiovaiheessa lämpötila säädetään 72 °C-asteeseen, jolloin polymeerasientsyymi pystyy sitoutumaan alukkeeseen ja aloittamaan replikaation. (Kadri 2019; Thermofisher a; Thermofisher b.)

Tavanomaisessa PCR:ssä tarvitaan DNA-templaatti, alukkeita, deoksinukleotidejä, DNA-polymeerasientsyymiä ja puskuriliuosta. Alukkeet ovat oligonukleotidejä, joilla on spesifinen emäsjärjestys. Alukkeiden tehtävänä on rajata replikoitava alue kiinnittymällä replikoitavan alueen aloituspaikkaan. Deoksinukleotidit ovat emäksiä (A, T, G, G), jotka toimivat DNA:n rakennuspalikkoina. DNA-polymeerasi on entsyymi, joka katalysoi DNA-synteesiä sitoutumalla alukkeeseen ja rakentaa yksisäikeiselle DNA-juosteelle komplementaarisen vastinjuosteen. Puskurin tehtävänä on luoda oikeanlaiset olosuhteet reaktiolle. (Lorenz 2012; YourGenome. 2021.)

3 Kirjallisuuskatsaus tutkimusmenetelmänä

Työ toteutettiin kirjallisuuskatsauksena. Kirjallisuuskatsauksia on eri tyyppisiä: kuvaileva, systemaattinen ja meta-analyysi, joka jaetaan edelleen kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen. Kirjallisuuskatsauksen keskeisimpiä tavoitteita on olemassa olevan teorian kehittäminen ja uuden teorian rakentaminen, toimia teorian arvioinnin tukena, laatia kokonaiskuvaa valitusta asiakokonaisuudesta sekä tunnistaa tutkimuskohteen ongelmia. Kirjallisuuskatsauksella voidaan myös selostaa valitun tutkimuskohteen historiallista kehitystä. (Salminen 2011.)

Yleisesti kirjallisuuskatsauksen kokonaisuus voidaan jakaa pienempiin vaiheisiin. Näitä vaiheita selventää hyvin Arlene Finkin (2014: 3–5) malli. Kirjallisuuskatsauksen ensimmäiseksi vaiheeksi voidaan katsoa tutkimuskysymyksen asettamisen, jonka jälkeen toisessa vaiheessa valitaan tietokannat ja kolmannessa hakutermit. Neljännen vaiheen tehtävänä on asettaa käytännön seula, joka koostuu esim. sisällöstä, ajanjaksosta ja kielestä. Käytännön seulan asettamisen jälkeen viidentenä vaiheena asetetaan metodologinen seula. Metodologinen seula sisältää esim. tutkimussuunnitelman, otannan ja tiedonkeruun. Itse katsauksen teko alkaa kuudennessa vaiheessa ja viimeisenä vaiheena tulokset syntesoidaan.



Kuvio 1. Kirjallisuuskatsauksen prosessi. Prosessi alkaa aiheen määrittelyllä, jonka jälkeen määritetään tutkimuskysymykset ja tehdään tutkimussuunnitelma. Prosessi jatkuu tiedonhauilla ja tutkimusten laadunarvioinnilla, jonka jälkeen kerätty tieto analysoidaan. Sen jälkeen voi kirjoittaa lopullisen katsauksen. (Mukaillen Vilka 2023.)

Kirjallisuuskatsauksista yleisimmin käytetty on kuvaileva kirjallisuuskatsaus. Se toimii hyvänä yleiskatsauksena, koska metodiset säännöt eivät ole rajaamassa aineistojen valintaa. Kuvaileva kirjallisuuskatsaus voidaan jakaa narratiiviseen ja integroivaan katsaukseen. Näiden kahden ratkaisevana erona toimii integroivan kirjallisuuskatsauksen kriittinen tarkastelu. (Salminen 2011.)

Systemaattinen kirjallisuuskatsaus tehdään tiivistelmänä valitun aihepiirin olennaisista tutkimuksista. Systemaattisen kirjallisuuskatsauksen tekijän pitää käydä läpi runsaasti tutkimuksia tiiviissä muodossa. Kyseisellä metodilla pystyy testaamaan tehokkaasti hypoteeseja, esittämään tutkimusten tuloksia tiivistetysti sekä arvioimaan tutkimusten loogisuutta. Se voi nostattaa myös uusia tutkimustarpeita. (Salminen 2011.)

Meta-analyysi voidaan jakaa kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen perussuuntaukseen. Meta-analyysi yhdistää samasta aiheesta tehtyjen tutkimusten tulokset matemaattisesti. (UEF 2020)

4 Opinnäytetyön tarkoitus, tavoitteet ja tutkimuskysymykset

Opinnäytetyöni tarkoituksena oli kuvailevan kirjallisuuskatsauksen keinoin koota tietoa digitaalisesta PCR:stä ja kartoittaa tuoreimman tiedon avulla ne leukemian alalajit, joissa digitaalinen PCR on käytössä. Opinnäytetyön tutkimuskysymykset:

- Mikä on digitaalinen PCR ja mikä on sen menetelmäperiaate?
- Millaisten leukemioiden diagnostiikassa digitaalista PCR:ää on sovellettu kliinissä vaiheessa?

5 Kirjallisuushaun toteutus

Opinnäytetyö toteutetaan kuvailevana kirjallisuuskatsauksena. Lopputuloksen tavoitteena on helppolukuinen yleiskatsaus aiemmin tehdyistä tutkimuksista. Ensin määritettiin tutkimuskysymys, jonka jälkeen muodostettiin hakustrategia, jonka avulla löydettiin sopivat tutkimusartikkelit. Sopivat tutkimusartikkelit seulottiin ensin lukemalla otsikot ja abstraktit, jonka jälkeen valittiin kirjallisuuskatsaukseen relevantit artikkelit. Lopuksi tulokset raportoidaan ja esitetään. (Salminen 2011.)

Aineisto kerättiin käyttäen systemaattisen tiedonhaun kriteerejä. Tutkimustietoa kerättiin käyttäen Pubmedin ja CINAHL:in tietokantoja. Leukemioihin liittyvää tutkimustietoa kerättiin englanninkielisistä vertaisarvioituista alkuperäistutkimuksista ja artikkeleista, jotka ovat julkaistu 1.1.2018-31-12-2022 aikavälillä ja joiden koko teksti on vapaasti saatavilla. Leukemiaan liittyvä aineisto kerättiin käyttäen seuraavia hakusanoja: dPCR leukemia, digital PCR leukemia.

Taulukko 1. Leukemioihin liittyvän tutkimustiedon sisäänotto- ja poissulkukriteerit artikkeleille.

Sisäänottokriteerit	Poissulkukriteerit
Julkaistu 2018-2022	Ei julkaistu vuosina 2018-2022
Englanninkielinen	Muu kuin englanninkielinen
Vertaisarvioitu	Ei vertaisarvioitu

Koko teksti saatavilla	Koko teksti ei ole saatavilla
Vastaa tutkimuskysymykseen <ul style="list-style-type: none"> • Digitaalinen PCR leukemian diagnostiikassa kliinisessä vaiheessa 	Ei vastaa tutkimuskysymykseen <ul style="list-style-type: none"> • Digitaalinen PCR leukemian diagnostiikassa muussa kuin kliinisessä vaiheessa
Alkuperäisartikkeli	Review-artikkeli
Kliinisen vaiheen tutkimus	Ei kliinisen vaiheen tutkimus

Digitaaliseen PCR:n menetelmäperiaatteeseen liittyvä tieto koottiin käyttäen review-artikkeleita. Tutkimuksia ja artikkeleita PCR:stä haettiin seuraavilla hakusanoilla: digital PCR technology, dPCR, dPCR review.

Taulukko 2. Digitaaliseen PCR:ään liittyvän tutkimustiedon sisäänotto- ja poissulkukriteerit artikkeleille.

Sisäänottokriteerit	Poissulkukriteerit
Julkaistu vuosina 2018–2022	Ei julkaistu vuosina 2018–2022
Englanninkielinen	Muu kuin englanninkielinen
Vertaisarvioitu	Ei vertaisarvioitu
Koko teksti saatavilla	Koko teksti ei ole saatavilla
Vastaa tutkimuskysymykseen <ul style="list-style-type: none"> • Artikkelin kuvailee menetelmää ja sen menetelmäperiaatetta laajasti 	Ei vastaa tutkimuskysymykseen <ul style="list-style-type: none"> • Artikkelin ei kuvaile menetelmää ja sen periaatetta tarpeeksi yksityiskohtaisesti

Review-artikkeli	Ei review-artikkeli
------------------	---------------------

Tieteelliset artikkelit haettiin käyttäen Pubmed ja CINAHL tietokantoja. Yhteensä suoritettiin viisi tiedonhakuja. Ensimmäinen tiedonhaku tehtiin Pubmed tietokannassa ja hakusanoina käytettiin: (((digital PCR[Title/Abstract]) OR (dPCR[Title/Abstract])) OR (dPCR review[Title/Abstract])) OR (dPCR methodical principle[Title/Abstract]). Haku tuotti 4059 tulosta. Toinen haku suoritettiin käyttäen samoja hakusanoja, mutta sisäänottokriteereinä käytettiin Taulukko 2. mukaisia rajoituksia. Haku tuotti 103 tulosta, josta otettiin sisään 19 ja jätettiin pois 84. Näistä lopulliseen katsaukseen otettiin 4 artikkelia. Pubmedissa suoritettavassa kolmannessa haussa käytettiin hakusanoina: ((dpcr) OR (digital PCR)) AND (leukemia). Sisäänottokriteereinä käytettiin Taulukko 1. mukaisia rajoituksia. Haku tuotti 114 tulosta, joista otettiin sisään 90 ja jätettiin pois 24. Näistä lopulliseen katsaukseen otettiin 6 artikkelia.

CINAHL:in kautta ensimmäinen haku suoritettiin hakusanoilla: AB digital PCR OR AB dPCR AND AB leukemia. Sisäänottokriteereinä käytettiin Taulukko 1. mukaisia rajoituksia. Haku tuotti 18 tulosta, joista otettiin sisään 2 ja jätettiin pois 16. Näistä lopulliseen katsaukseen ei otettu yhtäkään artikkelia. Toinen CINAHL:in kautta suoritettava tiedonhaku suoritettiin käyttäen hakusanoja: AB digital PCR OR AB dPCR review OR AB dPCR methodical principle. Sisäänottokriteereinä käytettiin taulukko 1. mukaisia rajoituksia. Haku tuotti 57 tulosta, joista otettiin sisään 1 ja jätettiin pois 56. Näistä lopulliseen katsaukseen ei otettu yhtäkään artikkelia. Taulukko 3. havainnollistaa kyseistä tiedonhakuja.

Taulukko 3. Kirjallisuuskatsauksen tiedonhaku. Käytetyt tietokannat, hakusanat, hakutulokset sekä sisään otetut ja poisjätetyt tutkimukset.

Tietokanta	Hakusana	Sisäänottokriteerit	Tulokset (n)	Sisään (n)	Pois (n)
------------	----------	---------------------	--------------	------------	----------

Pubmed 1. haku	((digital PCR[Title/Abstract]) OR (dPCR[Title/Abstract])) OR (dPCR review[Title/Abstract]) OR (dPCR methodical principle[Title/Abstract])	<ul style="list-style-type: none"> Hakusanat otsikossa/abstraktissa 	4059	-	-
Pubmed 2. haku	((digital PCR[Title/Abstract]) OR (dPCR[Title/Abstract])) OR (dPCR review[Title/Abstract]) OR (dPCR methodical principle[Title/Abstract])	<ul style="list-style-type: none"> Hakusanat otsikossa/ abstraktissa Julkaisu vuosi 2018-2022 Englanninkielinen Vertaisarvioitu Koko teksti saatavilla Review-artikkeli 	103	19, joista lopulliseen katsaukseen 4	84
Pubmed 3. haku	((dpcr) OR (digital PCR)) AND (leukemia)	<ul style="list-style-type: none"> Hakusanat otsikossa/ abstraktissa 	114	90, joista lopulliseen katsaukseen 6	24

		<ul style="list-style-type: none"> • Julkaisuvuosi 2018-2022 • Englanninkielinen • Vertaisarvioitu • Koko teksti saatavilla • Review-artikkeli 			
CINAHL 1. haku	AB digital PCR OR AB dPCR AND AB leukemia	<ul style="list-style-type: none"> • Hakusanat otsikossa/ abstraktissa • Julkaisuvuosi 2018-2022 • Englanninkielinen • Vertaisarvioitu • Alkuperäisartikkeli • Koko teksti saatavilla 	18	2, joista lopulliseen katsaukseen 0	16

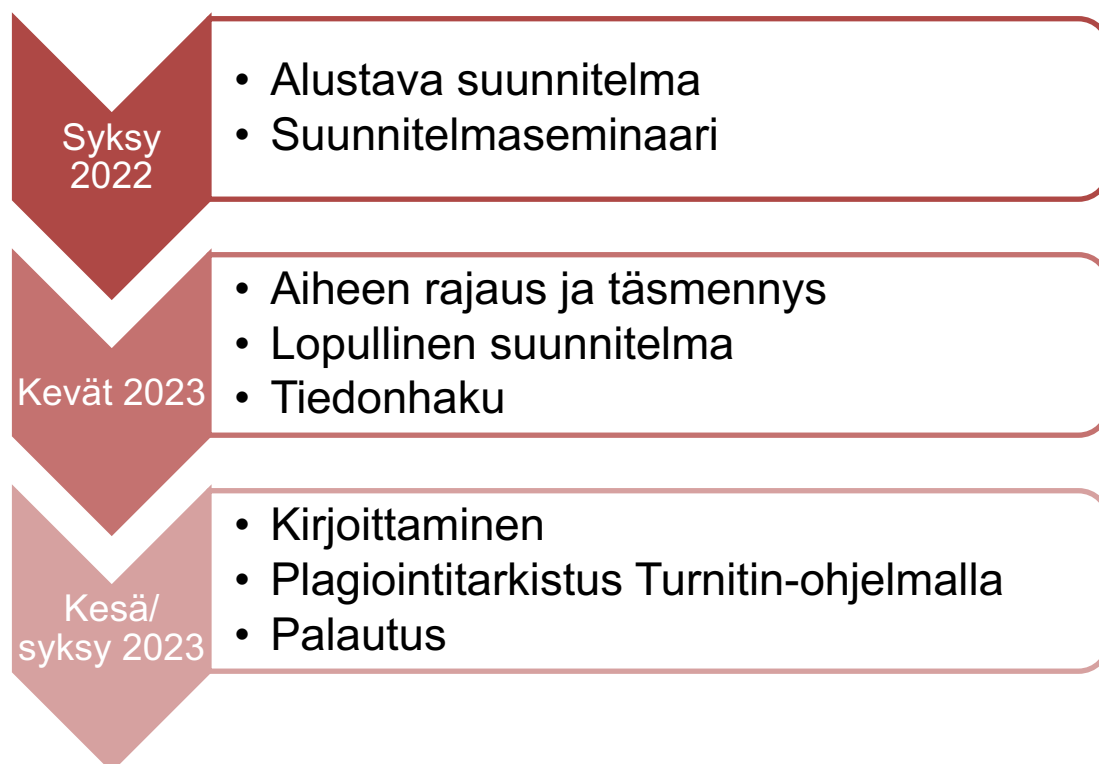
CINAHL 2. haku	AB digital PCR OR AB dPCR review OR AB dPCR methodical principle	<ul style="list-style-type: none"> • Hakusanat otsikossa/ ab- straktissa • Julkaisuvuosi 2018-2022 • Englannink- ielinen • Vertaisarvioitu • Koko teksti saatavilla 	57	1, josta lopulliseen katsaukseen 0	56
-------------------	---	--	----	---	----

5.1 Toiminnan eteneminen ja työskentelyn kuvaus

Prosessi alkoi syksyllä 2022 aiheen valinnalla. Aihe-ehdotus tuli Metropolia Ammatti-
korkeakoulun molekyyli-genetiikan lehtorilta, jonka toiveena oli tiivis tietopaketti dPCR:n
menetelmäperiaatteesta. Prosessi alkoi syksyllä 2022, jolloin keskityin alustavan suun-
nitelman luomiseen. Tämä vaihe oli ensiarvoisen tärkeä, sillä se määritteli opinnäyte-
työni suunnan ja tavoitteet. Käytin tätä aikaa aiheen tutkimiseen, aiheeseen liittyvien
teorioiden kartoittamiseen ja alustavan tutkimuskysymyksen muotoilemiseen. Suunni-
telmaseminaarissa sain arvokasta palautetta ohjaajaltani, mikä auttoi minua hahmotta-
maan projektini laajuuden ja rajaamaan aiheeni tehokkaammin.

Keväällä 2023 tein merkittävää edistystä aiheeni rajauksessa ja täsmennyksessä. Tä-
män vaiheen aikana tarkensin tutkimuskysymyksiäni ja metodologista lähestymistä-
paani. Lopullisen suunnitelman laatiminen auttoi minua hahmottamaan tutkimuksen ko-
konaiskuvan ja varmistamaan, että työni oli johdonmukaista ja tavoitteellista. Tiedon-
haku oli keskeinen osa tätä vaihetta, ja käytin laajasti hyväkseni erilaisia tietolähteitä,
kuten tieteellisiä julkaisuja, kirjoja ja sähköisiä tietokantoja.

Syksyllä 2023 prosessi siirtyi tiedon analysointivaiheeseen. Tässä vaiheessa arvioin keräämäni tietoa kriittisesti, analysoin sen merkitystä tutkimuskysymyksiini nähden ja työstin tulokset jäsennellyksi kokonaisuudeksi. Lopullisen katsauksen kirjoittaminen oli prosessin kulminaatiopiste, jossa yhdistin kaikki aiemmat vaiheet ja esitin tutkimukseni tulokset selkeästi ja ytimekkäästi. Tämä vaihe vaati huolellista editointia ja tarkistusta, jotta varmistin, että työni täytti akateemisen kirjoittamisen vaatimukset ja välitti tutkimukseni keskeiset löydökset tehokkaasti. Kuvio 2. havainnollistaa tätä prosessia.



Kuvio 2. Prosessin eteneminen. Prosessi alkoi 2022 syksyllä alustavan suunnitelman hahmottamisella, jonka jälkeen lopullinen suunnitelma saatiin valmiiksi 2023 keväällä. Kesällä 2023 suoritettiin tiedonhaku, jonka jälkeen koottu tieto analysoitiin ja kirjoitettiin lopullinen kirjallisuuskatsaus.

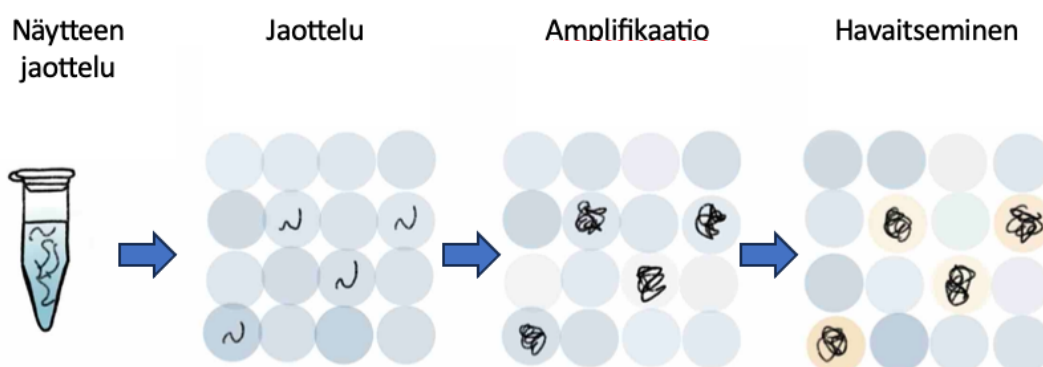
6 Tulokset

6.1 Digitaalisen PCR:n perusteet

Katsauksen mukaan digitaalinen PCR eli digitaalinen polymeerasiketjureaktio (dPCR) on melko uudenlainen tapa monistaa nukleiinihappoja. Se on kolmannen sukupolven PCR- tekniikka, joka mahdollistaa sekvenssien absoluuttisen ja tarkkamääräisen kvantifioinnin. (Coccaro ym. 2020.)

Kyseisessä menetelmässä näyte jaetaan moneen pienempään näytteeseen, niin että jokaisessa näytteessä on maksimissaan muutama toivottu sekvenssi. Sekvenssien suuripiirteistä distribuutiota voidaan estimoida Poissonin jakauman avulla. Jokainen uudelleen jaettu näyte toimii itsenäisenä mikroreaktiona ja jokainen reaktio, joka sisältää monistunutta kohdesekvenssiä havaitaan fluoresenssin avulla. (Quan ym. 2018.)

Digitaalisen PCR:n peruseriaatteena on jakaa monistettava näyte tuhansiin pienempiin mikroreaktioihin, joihin molekyylit jakautuvat satunnaisesti. Mikroreaktiot jakautuvat kammioihin ja jokaisessa kammiossa voi olla nolla, yksi tai useampi kohdemolekyylit. Amplifikaation jälkeen jokaisen kammion fluoresenssin absorptio lasketaan. Jos kammiossa ei ole kohdemolekyylit lasketaan reaktio 0:ksi eli negatiiviseksi. Kammio, jossa on kohdemolekyylit, lasketaan 1:ksi eli positiiviseksi. (Mao & Liu & Tong & Chen & Liu 2019.)



Kuva 1. Digitaalisen PCR:n menetelmäperiaate. Näytteen valmistelun jälkeen se jaotellaan useampaan pienempään mikroreaktioon. Jokaisessa mikroreaktiossa voi olla muutama tai ei ollenkaan kohdesekvenssiä. Jokainen mikroreaktio toimii itsenäisenä PCR:n mikroreaktiona ja jokaisessa mikroreaktiossa, jossa on kohdesekvenssiä, havaitaan fluoresenssilla. (Mukaiillen lähteitä Mao ym. & Zhu ym. 2020.)

Digitaalinen PCR on joko sirupohjainen (cdPCR) tai pisarapohjainen (ddPCR). Pisaraan perustuva digitaalinen PCR eli droplet digital PCR (ddPCR) toimii siten, että näyte kulkee mikrofluidikapiirin kautta, mikä luo segmentoituneen virtauksen. Tämä prosessi jakaa näytteen kymmeniksi tuhansiksi pieniksi pisaroiksi, jotka eristetään mineraaliöljyllä muodostaen emulsion. Kun emulsio on muodostettu, se käy läpi PCR-prosessin. Sen jälkeen pisaroita analysoidaan, yleensä virtausytometrillä tai lämpösyklillä muovikiekolla. ddPCR on erityisen tarkka ja soveltuu hyvin monimutkaisiin sovelluksiin, kuten yksittäisen solun RNA-sekvensointiin (Zhu ym. 2020.) Se on myös kustannustehokas, mutta voi kohdata ongelmia, kuten pisaroiden tilavuuden epä johdonmukaisuutta (Mao ym. 2019).

Siruun perustuvassa digitaalisessa PCR:ssä eli chip-based PCR (cdPCR) näytteet laadataan sirulle, joissa on mikrokoneistettuja kaivoja. Kiekot käyvät läpi lämpösyklin ja sen jälkeen analysoidaan fluoresenssimikroskopiolla (Zhu ym. 2020.) Erilaisia cdPCR-menetelmiä on kehitetty, kuten integroidut fluidikytkennät, lipidikaksikerroskammiojärjestelmä ja nanolitrin itseohjautuva mikrokammiojärjestelmä (Mao ym. 2019). cdPCR:n erottaa sen edistyneet piiritekniikka, joka integroi lämmittimet ja anturit kuhunkin kaivoon, tehostaen prosessia (Zhu ym. 2020).

Digitaalisen ja kvantitatiivisen PCR:n keskeisimpänä erona toimii monistuneen kohdesekvenssin mittaustekniikka. Kvantitatiivisen PCR:n tulos saadaan amplifikaation eksponenttivaiheen fluoresenssisignaalista, joka mitataan jokaisen syklin aikana. Digitaalisessa PCR:ssä sen sijaan fluoresenssisignaali mitataan vasta PCR-ajon lopussa eli tehdään ns. end-point mittaus. Digitaalinen PCR ei myöskään vaadi kalibrointikäyrää. Digitaalista PCR:ää pidetään myös tarkempaan eikä niin herkkänä esimerkiksi PCR-inhibiittoreille. (Zhu ym. 2020; Quan ym. 2018.)

Taulukko 4. dPCR ja qPCR keskeisimmät erot.

Digitaalinen PCR	Kvantitatiivinen PCR
<ul style="list-style-type: none"> • Fluoresenssisignaalin mittaus tapahtuu PCR-ajon lopussa (end-point mittaus) • Ei kalibraatiokäyrää • Tarkka • Alhainen herkkyys esim. PCR-inhibiittoreille 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluoresenssisignaali mitataan jokaisen syklin eksponenttivaiheen aikana • Vaatii kalibraatiokäyrän

6.2 dPCR ja akuutti myeloinen leukemia

Menneisyydessä erilaisia menetelmiä on otettu käyttöön AML:n geneettisten tekijöiden tutkimiseen. Mukautettu AML-siru (aml-array) on yksi näistä työkaluista, ja tutkijat ovat

kääntyneet sen puoleen sen kustannustehokkuuden ja sopeutuvuuden ansiosta. Kuitenkin AML-matriisin rajoitukset, kuten kyvyttömyys tarkkaan erotteluun tietyissä AML-alatyypeissä, ovat asettaneet haasteita tarkan diagnoosin tekemiselle. (Hands Schuh ym. 2018.)

Tässä astuu mukaan ddPCR. Sen ylivoima perustuu erityisesti nukleinihappojen tarkempaan kvantifointiin. Toisin kuin monet perinteiset PCR-tekniikat, ddPCR jakaa näytteen useisiin pisaroihin, joista jokainen läpikäy oman PCR-reaktion. Tämä mahdollistaa nukleinihappojen tarkan absoluuttisen kvantifointiin, mikä johtaa poikkeukselliseen herkkyyteen verrattuna muihin käytössä oleviin menetelmiin. (Hands Schuh ym. 2018.)

Kun tätä verrataan AML-siruum, ddPCR:n edut korostuvat. Esimerkiksi tietyt AML-alatyypit, kuten M1 ja M2, ovat olleet haastavia erottaa toisistaan perinteisillä geeninilmaisuprofiileilla. ddPCR kuitenkin tarjoaa tarkan erottelukyvyn tällaisissa tapauksissa. Tämän menetelmän tarkkuus voi auttaa tunnistamaan uusia diagnostisia merkkiaineita. Geenien, kuten S100A9, ANXA3 ja WT1, differentiaali-ilmaisu korostui tutkimuksessa ddPCR:n avulla, mikä viittaa sen merkittävään potentiaaliin uudistaa AML-diagnostiikka. (Hands Schuh ym. 2018.)

6.3 dPCR ja krooninen myeloinen leukemia

Krooninen myeloinen leukemia (KML) on luuytimen kantasolujen syöpäsairaus, joka vaikuttaa verisolujen tuotantoon. Tämä sairaus ilmenee useimmiten keski-ikäisillä ja vanhemmilla ihmisillä ja usein se löydetään sattumalta, kun tutkitaan poikkeavia veriarvoja. (Koskenvesa 2022.)

KML:n aiheuttaja on geneettinen muutos, joka johtaa kromosomien 9 ja 22 vääränlaiseen yhdistymiseen. Tämä aiheuttaa Philadelphia-kromosomin muodostumisen, joka puolestaan aiheuttaa liiallista valkosolujen tuotantoa ja pidentää niiden elinikää. Tämä sairaus ei ole perinnöllinen eikä sitä voida ennaltaehkäistä. (Koskenvesa 2022)

Ennen tyrosiinikinaasin estäjien (TKI) käyttöönottoa, KML oli usein kohtalokas sairaus. Nykyisin TKIt ovat mullistaneet hoitoa, muuttaen KML:n monille potilaille krooniseksi tilaksi. Pitkäaikainen TKI-hoito tuo kuitenkin mukanaan sekä mahdollisia sivuvaikutuksia että taloudellisia haasteita. Tämä on johtanut tutkimukseen TKI-lääkityksen mahdollisesta turvallisesta lopettamisesta niillä potilailla, jotka ovat saavuttaneet syvän molekyyliivasteen. (Bernardi ym. 2019.) Tässä yhteydessä digitaalisen pisara-PCR:n

(ddPCR) rooli on noussut keskiöön. Vaikka BCR-ABL1-tasojen seuranta on perinteisesti suoritettu reaaliaikaisella kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (RQ-PCR), ddPCR on tarkempi ja herkempi menetelmä, erityisesti kun kyse on minimaalisen jäännössairaudesta. ddPCR:n korkea herkkyys mahdollistaa DMR:n tarkemman tunnistamisen ja potilaiden tarkemman seurannan TKI-lääkityksen lopettamisen jälkeen. (Atallah ym. 2020.)

Tutkimuksessa, joka keskittyi TKI-hoidon lopettamisen jälkeisiin tuloksiin KML-potilailla, ddPCR:n käytön merkitys korostui. Kun sekä RQ-PCR- että ddPCR-menetelmiä käytettiin, havaittiin, että ne potilaat, joiden BCR-ABL1-tasot olivat havaitsemattomissa ddPCR-menetelmällä TKI-lääkityksen lopettamishetkellä, olivat selvästi pienemmässä riskissä sairauden uusiutumiselle. Tämä tieto voi auttaa ehdottamaan vähemmän intensiivistä seurantaa heille ja tarjoaa tarkemman riskiprofiilin. (Bernardi ym. 2019.)

Tämä ei ainoastaan edistä tieteellistä ja lääketieteellistä ymmärrystä vaan vaikuttaa myös potilaiden elämänlaatuun. On todettu, että potilaiden elämänlaatu paranee usein TKI-hoidon lopettamisen myötä, mutta heikkenee, jos hoito aloitetaan uudelleen. (Bernardi ym. 2019)

Yhteenvedona, ddPCR on osoittautunut merkittäväksi työkaluksi CML:n diagnostiikassa ja hoidossa. Sen erinomainen herkkyys ja tarkkuus voivat auttaa tekemään parempia hoitopäätöksiä, jotka perustuvat kunkin potilaan yksilölliseen tarpeeseen. ddPCR:n avulla pyritään parantamaan potilastuloksia ja tasapainottamaan tehokas hoito potilaan elämänlaadun kanssa. (Atallah ym. 2020; Bernardi ym. 2019.)

6.4 dPCR ja akuutti lymfaattinen leukemia

Akuutti lymfaattinen leukemia (ALL) on veren pahanlaatuinen syöpä, jossa lymfoblastit, T- tai B-solujen esiasteet alkavat lisääntyä hallitsemattomasti luuytimessä. Tämä hallitsematon lisääntyminen häiritsee normaalien verisolujen muodostumista luuytimessä. (Terveystukena.fi.)

Historiallisesti minimaalisen residuaalisen taudin (MRD) arviointi on ollut keskeistä pediatrien ALL-potilaiden hoidon suunnittelussa. MRD-tasojen määrittäminen induktiohoidon jälkeen antaa tärkeitä tietoja hoidon tehokkuudesta, mahdollisista relapseista ja tulevista hoitolinjauksista. Pitkään reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RQ-PCR) on ollut tätä tarkoitusta varten käytetty kultainen standardi. (Straza ym. 2021.)

Kuitenkin pizaradigitaalisen PCR:n (ddPCR) tuoma innovaatio on muuttamassa tapaa, jolla ALL:tä diagnosoidaan. Toisin kuin RQ-PCR, joka vaatii kvantifioinnille standardikäyrän, ddPCR analysoi näytteen jakamalla sen tuhansiin pisaroihin ja lukemalla ne erikseen. Tämä menetelmä tarjoaa erinomaista tarkkuutta, erityisesti kun kyse on raja-arvoisista MRD-tasoista, jotka ovat usein haasteellisia perinteiselle RQ-PCR:lle. (Straza ym. 2021.)

ALL:n hoidossa kiinnostuksen kohteena on viime aikoina ollut kimeerinen antigeenireseptori T-solu (CAR-T) -terapia, joka on lupaava hoitomuoto refraktaarisille tai uusiutu-neille CD19+ B-solun maligniteeteille. Tämän hoitomuodon lupausta varjostavat kuitenkin merkittävät sivuvaikutukset, kuten sytokiinin vapautumisoireyhtymä (CRS) ja CAR-T:hen liittyvä enkefalopatia-oireyhtymä (CRES). Tässä yhteydessä digitaalisen PCR:n tarkkuus on osoittautunut korvaamattomaksi. Eräässä tutkimuksessa korostettiin dPCR:n kykyä seurata CAR-T-solujen käyttäytymistä infuusion jälkeen, ja se on tarjonnut syvällisiä oivalluksia, jotka voivat vaikuttaa merkittävästi hoitosuunnitelmiin. Tarkkojen dPCR-mittausten ansiosta on myös saatu uusia tietoja sytokiinien käyttäytymisestä, kuten IL-6:n seerumipitoisuuksien noususta CRS:n kliinisen ilmenemisen aikana. (Pabst ym. 2020.)

Yhdistämällä dPCR:n kyky havaita MRD ja sen rooli CAR-T-solujen toiminnan ymmärtämisessä, saamme kokonaisvaltaisen käsityksen ALL:n diagnostiikasta ja hoidosta. ddPCR ei ainoastaan vastaa RQ-PCR:n herkkyyteen MRD:n havaitsemisessa, mutta tietyissä tilanteissa se myös ylittää sen, erityisesti raja-arvoisten MRD-tasojen osalta. Kun lääketieteellinen yhteisö pyrkii kehittämään tarkempia ja yksilöllisempiä hoitoja, dPCR on nousemassa ratkaisevaan asemaan. Sen kyky tarjota syvällistä tietoa solujen ja sytokiinien toiminnasta voi auttaa terapeuttisten strategioiden hienosäätämässä, komplikaatioiden ennakoinnissa ja potilastulosten parantamisessa. (Pabst ym. 2020; Straza ym. 2021)

6.5 Päätelmät

PCR eli polymeerasiketjureaktio on tekniikka DNA:n monistamiseksi. Prosessi käsittää kolme vaihetta: denaturaation, alukkeiden liittymisen ja elongaation. Tärkeät osat PCR:ssä ovat DNA-templaatti, alukkeet, deoksinukleotidit, DNA-polymeraasi ja puskuriliuos.

Digitaalinen PCR on uudempi tekniikka, joka mahdollistaa sekvenssien tarkan kvantifoinnin. Menetelmässä näyte jaetaan useampaan pieneen osaan, joita analysoidaan

fluoresenssin avulla. Digitaalista PCR:ää on kahta tyyppiä: sirupohjainen (cdPCR) ja pisarapohjainen (ddPCR). ddPCR jakaa näytteen pieniksi pisaroiksi ja se on erityisen tarkka, mutta saattaa kohdata ongelmia kuten pisaroiden tilavuuden epäjohdonmukaisuutta. cdPCR:ssä näytteet ladataan sirulle, joka sisältää mikrokoneistettuja kaivoja, ja se erottuu edistyksellisellä piiriteknikallaan. (Zhu ym. 2020; Mao ym. 2019.)

Digitaalisen ja kvantitatiivisen PCR:n suurin ero on, miten monistunutta kohdesekvenssiä mitataan. Kvantitatiivinen PCR mittaa fluoresenssisignaalia jokaisen syklin aikana, kun taas digitaalinen PCR mittaa signaalin vain syklin lopussa. Digitaalista PCR:ää pidetään myös tarkempuna ja vähemmän herkkänä inhibiittoreille. (Zhu ym. 2020; Quan ym. 2018.)

Digitaalinen PCR (ddPCR) on herkkä ja tarkka menetelmä leukemioiden diagnostiikassa ja on nousemassa keskeiseen rooliin taudin tutkimuksessa ja hoidossa. Akuutissa myelooisessa leukemiassa (AML) ddPCR on osoittanut ylivoimaisuutensa erityisesti tiettyjen AML-alatyypin erottelussa ja uusien diagnostisten merkkiaineiden tunnistamisessa. (Hands Schuh ym. 2018.) Kroonisessa myelooisessa leukemiassa (KML) ddPCR:n käyttö on keskeistä BCR-ABL1-tasojen seurannassa, erityisesti tyrosiini-kinasin estäjien hoidon lopettamisen jälkeen (Atallah ym. 2020; Bernardi ym. 2019). Akuutissa lymfaattisessa leukemiassa (ALL) ddPCR tarjoaa parempaa tarkkuutta minimaalisen residuaalisen taudin (MRD) arvioinnissa verrattuna perinteiseen RQ-PCR-menetelmään. ddPCR:n käyttö on myös korvaamaton CAR-T-solujen toiminnan seurannassa ja hoidon suunnittelussa. (Pabst ym. 2020; Straza ym. 2021)

Yhteenvetona, ddPCR on merkittävä menetelmä leukemian diagnostiikassa ja hoitopäätösten teossa, pyrkien parantamaan potilastuloksia ja elämänlaatua.

Taulukko 5. Yhteenveto digitaalisen PCR:n käytöstä leukemioiden diagnostiikassa kliinisessä vaiheessa

Leukemian alalaji	Miten dPCR on ollut käytössä kyseisen leukemian kliinisen vaiheen diagnostiikassa
Akuutti myeloinen leukemia	ddPCR:n avulla on voitu tarkasti erottaa tietyt AML-alatyypit, kuten M1 ja M2, jotka ovat olleet haastavia erottaa toisistaan perinteisin keinoin. Lisäksi ddPCR on auttanut tunnistamaan uusia diagnostisia merkkiaineita. Geenien, kuten S100A9, ANXA3 ja WT1, differentaali-ilmaisu on korstunut tutkimuksessa ddPCR:n avulla.

<p>Krooninen myeloinen leukemia</p>	<ul style="list-style-type: none"> • BCR-ABL1-tasojen seuranta: Vaikka BCR-ABL1-tasojen seuranta on perinteisesti tehty reaaliaikaisella kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla (RQ-PCR), ddPCR on osoittautunut tarkemmaksi ja herkemäksi menetelmäksi, erityisesti kun on kyse minimaalisesta jäännössairaudesta (MRD). • TKI-lääkityksen lopettamisen seuranta: ddPCR:n korkea herkkyys mahdollistaa DMR:n tarkemman tunnistamisen ja potilaiden tarkemman seurannan TKI-lääkityksen lopettamisen jälkeen. • Riskiprofiilin määrittely: Tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin TKI-hoidon lopettamisen jälkeisiä tuloksia KML-potilailla, korostui ddPCR:n käytön merkitys. Kun sekä RQ-PCR- että ddPCR-menetelmiä käytettiin, havaittiin, että ne potilaat, joiden BCR-ABL1-tasot olivat havaitsemattomissa ddPCR-menetelmällä TKI-lääkityksen lopettamishetkellä, olivat pienemmässä riskissä sairauden uusiutumiseksi. Tämän tiedon perusteella voidaan ehdottaa vähemmän intensiivistä seurantaa näille potilaille ja se tarjoaa tarkemman riskiprofiilin.
<p>Akuutti lymfaattinen leukemia</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Minimaalisen residuaalisen taudin (MRD) arviointi: MRD-tason määrittäminen on keskeistä ALL-potilaiden hoidon suunnittelussa, erityisesti hoidon tehokkuuden, relapsiriskin ja tulevien hoitolinjauksien näkökulmasta. Vaikka reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR (RQ-PCR) on ollut pitkään käytetty standardi, dPCR on tarjonnut erinomaista tarkkuutta, erityisesti haastavissa tapauksissa, kuten raja-arvoisten MRD-tasojen kohdalla. • Kimeeristen antigeenireseptori T-solujen (CAR-T) seuranta: CAR-T-terapia on uusi ja lupaava hoitomuoto ALL-potilaille, erityisesti niille, jotka ovat refraktarisia tai joiden tauti on uusiutunut. dPCR:n tarkkuus on osoittautunut korvaamattomaksi seurattaessa CAR-T-solujen käyttäytymistä infuusion jälkeen. Tämä on antanut syvällisiä oivalluksia, jotka voivat vaikuttaa hoitosuunnitelmiin. Lisäksi dPCR-mittausten avulla on saatu tarkkaa tietoa sytokiinin, kuten IL-6:n,

	<p>käyttäytymisestä, erityisesti CAR-T-hoidon sivuvaikutusten, kuten sytokiinin vapautumisoireyhtymän (CRS), yhteydessä.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Raja-arvoisten MRD-tasojen havaitseminen: dPCR ei ainoastaan vastaa RQ-PCR:n herkkyyttä MRD:n havaitsemisessa, vaan tietyissä tilanteissa se ylittää sen, erityisesti kun kyse on raja-arvoisista MRD-tasoista.
--	---

7 Eettisyys ja luotettavuus

Tutkimuseettisen neuvottelukunnan (TENK) ja suomalaisen tiedeyhteisön yhteistoiminnan tuloksena syntyneen hyvän tieteellisen käytännön ohjeen (HTK-ohje) tarkoituksena on tukea hyvää tieteellistä käytäntöä ja ennaltaehkäistä epärehellisyttä organisaatioissa, jotka harjoittavat tutkimusta. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

HTK-ohjeessa tutkimuseetiikan käsitteellä tarkoitetaan eettisesti oikeiden ja vastuullisten käytäntöjen noudattamista ja edistämistä tutkimustoiminnassa sekä myös epärehellisyyden ja loukkausten tunnistamista, jotka kohdistuvat tieteeseen. TENK pyrkii siten torjumaan vilppiä ja muunlaista epärehellistä toimintaa HTK-ohjeen avulla. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

Työn tekijä sitoutuu noudattamaan hyvää tieteellistä käytäntöä sekä pyrkii toimimaan rehellisesti ja huolellisesti. Prosessin aikana opinnäytetyötä tarkistetaan plagiointitunnistushjelmalla. Opinnäytetyössä tullaan käyttämään monipuolisesti alkuperäisiä ja vertaisarvioituja lähteitä, joka lisää opinnäytetyön luotettavuutta.

Tämä katsaus rakentuu huolellisesti valikoidun ja kattavasti seuloitun aineiston varaan, jossa on pyritty tunnistamaan keskeiset ja ajankohtaiset tutkimukset tämän opinnäytetyön kannalta. Työni luotettavuutta lisää systemaattinen lähestymistapa tiedon keräämisessä ja analysoinnissa, missä jokainen artikkeli on arvioitu kriittisesti ja objektiivisesti. Pyrin varmistamaan, että opinnäytetyössäni esitetty tieto on ajantasainen ja relevantti, vaikka aineiston rajoitukset ja valintakriteerit voivat vaikuttaa tulosten yleistettävyyteen. Jokainen tutkimus on valittu tarkoituksenmukaisesti, ja niiden analyysi on tehty huolella.

Opinnäytetyössäni käsitellään useita rajoituksia, jotka vaikuttavat tutkimustulosten tulintaan sekä niiden yleistettävyyteen. Yksi merkittävimmistä rajoituksista on aineiston rajallisuus vuosiin 2018–2022. Tämä rajaus on jättänyt tarkastelun ulkopuolelle aiemmin julkaistun, potentiaalisesti relevantin tiedon, ja se estää myös vuoden 2023 tuoreimpien tutkimusten huomioon ottamisen. Lisäksi aineiston rajoittaminen ainoastaan englanninkielisiin julkaisuihin on voinut johtaa muiden merkittävien, eri kielillä julkaistujen tutkimusten sivuuttamiseen. Olen keskittynyt alkuperäisartikkeleihin ja katsausartikkeleihin, mikä on saattanut rajata pois muita potentiaalisesti tärkeitä tietolähteitä. Tutkimuksessani olen huomionnut ainoastaan vapaasti saatavilla olevat tekstit, mikä voi rajoittaa kirjallisuuskatsauksen kattavuutta. Lisäksi käyttämieni hakusanojen laajuudesta huolimatta on olemassa riski, että jotkin relevanteiksi katsotut artikkelit ovat jääneet löytymättä. Koska tämä kirjallisuuskatsaus keskittyy kliinisen vaiheen tutkimuksiin, se rajaa pois esim. retrospektiiviset tutkimukset, jotka tutkivat samaa aihetta. Nämä rajoitukset on syytä pitää mielessä arvioitaessa tutkimukseni tuloksia.

8 Pohdinta

Opinnäytetyöni tavoitteena oli tarjota yleiskatsaus aiemmin tehdyistä tutkimuksista, jotka koskevat digitaalista PCR:ää (dPCR) leukemian diagnosoinnissa. Kirjallisuuskatsauksen avulla pyrin saamaan selville, miten dPCR:ää on sovellettu leukemian diagnosoissa ja kuinka luotettavasti ja tehokkaasti se pystyy tunnistamaan leukemiaa.

Digitaalisen PCR:n (dPCR) tulevaisuus näyttää lupaavalta, erityisesti leukemian diagnosoinnissa. Tämä tekniikka, joka mahdollistaa erittäin tarkan geneettisen materiaalin kvantifioinnin, on merkittävästi edistänyt syövän biomarkkereiden havaitsemista. Tulevaisuudessa dPCR:n odotetaan tuovan lisäarvoa monin tavoin. Ensinnäkin, sen kyky tunnistaa pieniä mutaatioita ja geneettisiä muutoksia voi johtaa tarkempiin ja nopeampiin diagnooseihin, mikä on kriittistä leukemian kaltaisten sairauksien hoidossa.

Toiseksi, dPCR:n kehittyessä ja sen kustannusten laskiessa, tämä tekniikka voi tulla yhä laajemmin käytetyksi rutiinistauksessa, mikä parantaa potilaiden seuranta ja hoitovasteen arviointia.

Tulevaisuudessa dPCR voi myös edistää yksilöllistettyä lääketiedettä. Yksilölliset geneettiset profiilit voivat ohjata hoitosuunnitelmien räätälöintiä, mikä parantaa hoitojen tehokkuutta ja vähentää sivuvaikutuksia. Tämän lisäksi, dPCR:n jatkuva teknologinen kehitys ja integrointi esimerkiksi tekoälyn ja koneoppimisen kaltaisiin alueisiin saattaa avata uusia mahdollisuuksia syövän varhaisdiagnostiikassa ja hoidon seurannassa.

Näiden innovaatioiden myötä dPCR:n rooli leukemian ja muiden syöpien diagnosoinnissa voi vain kasvaa, mikä korostaa sen merkitystä tulevaisuuden diagnostisissa menetelmissä.

Aineiston keräämisen prosessissa huomasin, että erilaiset tietokannat, kuten Pubmed ja CINAHL, sisälsivät runsaasti tietoa aiheesta. Oli kuitenkin haasteellista seuloa ja valita relevanteimmat tutkimukset mukaan. Tässä yhteydessä sain arvokasta kokemusta systemaattisesta tiedonhausta ja kriteerien merkityksestä tutkimusprosessissa.

Käyttämäni aineiston rajaukset, kuten julkaisuvuosi ja artikkelin saatavuus, varmistivat, että saatu tieto oli ajankohtaista ja helposti saatavilla. Tämä oli tärkeää erityisesti, kun otetaan huomioon, että dPCR on melko uusi tekniikka ja sen sovellukset ovat jatkuvasti kehittyneet viime vuosina.

Eettisyyden ja luotettavuuden varmistaminen oli keskeistä tämän opinnäytetyön aikana. TENK:n ohjeiden noudattaminen ja hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti toimiminen olivat olennaisia prosessin jokaisessa vaiheessa.

Lähteet

Atallah, Ehab & Schiffer, Charles A. & Radich, Jerald P. & Weinfurt, Kevin P. & Zhang, Mei-Jie & Pinilla-Ibarz, Javier & Kota, Vamsi & Larson, Richard A. & Moore, Joseph O. & Mauro, Michael J. & Deiniger, Michael W. N & Thompson, James E. & Oehler, Vivian G. & Wadleigh, Martha & Shah, Neil P. & Ritchie, Ellen K. & Silver, Richard T. & Cortes, Jorge & Lin, Li & Visotcky, Alexis & Baim, Arielle & Herrell, Jill & Helton, Bret & Hottowitz, Mary & Flynn, Kathryn E. 2020. Assessment of Outcomes After Stopping Tyrosine Kinase Inhibitors Among Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *JAMA Oncology* 2021; 7 (1). <<https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2772842>>. Viitattu 8.7.2023.

Bernardi, Simona & Malagola, Michele & Zanaglio, Camilla & Polverelli, Nicola & Eke, Elif Dereli & D'Adda, Mariella & Farina, Mirko & Bucelli, Christina & Scaffidi, Luigi & Toffoletti, Elenora & Deambrogi, Clara & Stagno, Fabio & Bergamaschi, Micaela & Franceschini, Luca & Abruzzese, Elisabetta & Divona, Maria Domenica & Gobbi, Marco & Di Raimondo, Francesco & Gaidano, Gianluca & Tiribelli, Mario & Bonifacio, Massimiliano & Cattaneo, Chiara & Iurlo, Alessandra & Russo, Domenico 2019. Digital PCR improves the quantitation of DMR and the selection of CML candidates of TKIs discontinuation. *Cancer Medicine* 8 (5). <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cam4.2087>>. Viitattu 8.7.2023.

Coccaro, Nicoletta & Tota, Giuseppina & Anelli, Luisa & Zagaria, Antonella & Specchia, Giordina & Albano, Francesco 2020. Digital PCR: A Reliable Tool for Analyzing and Monitoring Hematologic Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9). <<https://doi.org/10.3390/ijms21093141>>. Viitattu 20.9.2022.

Fink, Arlene 2014. *Conducting Research Literature Reviews: From the Internet to the Paper*. Thousand Oaks: Sage publications, Inc. Viitattu 21.9.2022.

Garibyan, Lilit & Avashia, Nidhi 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3). 1-4. <[https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)36139-X/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)36139-X/fulltext)>. Viitattu 16.2.2023.

Hands Schuh, Luiza & Kaźmierczak, Maciej & Milewski, Marek C. & Góralski, Michał & Łuczak, Magdalena & Wojtaszewska, Marzena & Uszczyńska-Ratajczak, Barbra & Lewandowski, Krzysztof & Komarnicki, Mieczysław & Figlerowicz, Marek 2018. Gene expression profiling of acute leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. *International Journal of Oncology* 52 (3). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5807040/>>. Viitattu 20.8.2023.

Kadri, Karim 2019. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications*. Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science. IntechOpen. <<https://www.intechopen.com/chapters/67558>>. Viitattu 14.2.2023.

Khan Academy. DNA analysis methods. DNA sequencing. <<https://www.khan-academy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>>. Viitattu 24.9.2022.

Kojabad, Amir Asri & Farzanehpour, Mahdiah & Galeh, Hadi Esmaeili Gouvarchin & Dorostkar, Ruhollah & Jafarpour, Ali & Bolandian, Masoumeh & Nodooshan, Majid Mirzaei 2021. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *Journal of Medical Virology* 93 (7). 4182-4197. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8013307/>>. Viitattu 20.2.2023.

Koskenvesa, Perttu 2022. KML eli krooninen myeloinen leukemia. *Duodecim terveyskirjasto*. <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00822>>. Viitattu 9.8.2023.

Lorenz, Todd C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp* (63). <<https://www.jove.com/t/3998/polymerase-chain-reaction-basic-protocol-plus-troubleshooting-and-optimization-strategies>>. Viitattu 16.2.2023

Mao, Xiaodong & Liu, Chao & Tong, Hua & Chen, Yajun & Liu, Kangsheng 2019. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American Journal of Translation Research*. 11 (12). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943456/>>. Viitattu 20.2.2023

Pabst, Thomas & Joncourt, Raphael & Shumilov, Evgenii & Heini, Alexander & Wiedemann, Gertrud & Legros, Myriam & Seipel, Katja & Schild, Christof & Jalowiec, Katarzyna & Taleghani, Behrouz Mansouri & Fux, Michaela & Novak, Urban & Porret, Naomi & Zeerleder, Sacha & Bacher, Ulrike 2020. Analysis of IL-6 levels and CAR T cell-specific digital PCR in the context of cytokine release syndrome. *Experimental Hematology* 88 (3). <[https://www.exphem.org/article/S0301-472X\(20\)30268-X/fulltext](https://www.exphem.org/article/S0301-472X(20)30268-X/fulltext)>. Viitattu 25.8.2023.

Quan, Phenix-Lan & Sauzade, Martin & Brouzes, Eric 2018. dPCR: A Technology Review. *Sensors* 18 (4). <<https://doi.org/10.3390/s18041271>>. Viitattu 26.9.2022.

Salminen, Ari 2011. Mikä kirjallisuuskatsaus? Johdatus kirjallisuuskatsauksen tyyppeihin ja hallintotieteellisiin sovelluksiin. <https://www.uwasa.fi/materiaali/pdf/isbn_978-952-476-349-3.pdf>. Viitattu 24.9.2022.

Starza, Irene Della & Nunes, Vittorio & Lovisa, Federica & Silvestri, Daniela & Cavalli, Marzia & Garofalo, Andrea & Campeggio, Mimma & De Novi, Lucia Anna & Soscia, Roberta & Oggioni, Carlotta & Mussolin, Lara & Biondi, Andrea & Guarini, Anna & Valsecchi, Maria Grazia & Conter, Valentino & Biffi, Alessandra & Basso, Giuseppe & Foà, Robin & Cazzaniga, Giovanni 2021. Droplet Digital PCR Improves IG-/TR-based MRD Risk Definition in Childhood B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *HemaSphere* 5 (3). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7909459/>>. Viitattu 10.7.2023.

[Terveystukena.fi](https://www.terveydentu-kena.fi). Sairaudet ja hoito. Tietoa syövästä ja eri syöpätautien hoidosta. Syöpätaudit. Verisyövät. Akuutti lymfaattinen leukemia. <<https://www.terveydentu-kena.fi/sairaudet-ja-hoito/syopa/syopataudit/verisyovat/akuutti-lymfaattinen-leukemia>>. Viitattu 9.8.2023.

The Haematological Malignancy Research Network, HMRN. Haematological malignancies. Classification of haematological malignancies. <<https://hmrn.org/about/classification>>. Viitattu 25.9.2022.

Thermofisher a. PCR Cycling Parameters—Six Key Considerations for Success. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>>. Viitattu 14.2.2023.

Thermofisher b. What Is Digital PCR? <<https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/what-is-digital-pcr/>>. Viitattu 14.2.2023.

Tieteen termipankki 2022. Mikrobiologia: in vitro. <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:in_vitro>. Viitattu 20.9.2022

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkaus-epäilyjen käsitteleminen Suomessa. <https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf>. Viitattu 25.9.2022.

UEF 2020. Meta-analyysin arviointi kehityy: Uusi laskentatapa huomioi alkuperäisten tutkimusten tilastollisen voiman. Verkkodokumentti. <<https://www.uef.fi/fi/artikkeli/meta-analyysin-arviointi-kehittyy-uusi-laskentatapa-huomioi-alkuperaisten-tutkimusten-tilastollisen>>. Viitattu 27.9.2022.

Vilka, Hanna 2023. Kirjallisuuskatsaus metodina, opinnäytetyön osana ja tekstilajina. 2023. Arto House. Helsinki. Viitattu 15.11.2023.

YourGenome 2021. What is PCR (polymerase chain reaction)? Methods and Technology? <<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction/>>. Viitattu 16.2.2023.

Zhu Hanliang & Zhang, Haoqing & Xu, Ying & Laššáková Soňa & Korabečná, Marie & Neužil, Pavel 2020. PCR past, present and the future. *Biotechniques* 69 (4). <<https://www.future-science.com/doi/10.2144/btn-2020-0057>>. Viitattu 20.9.2022.

