

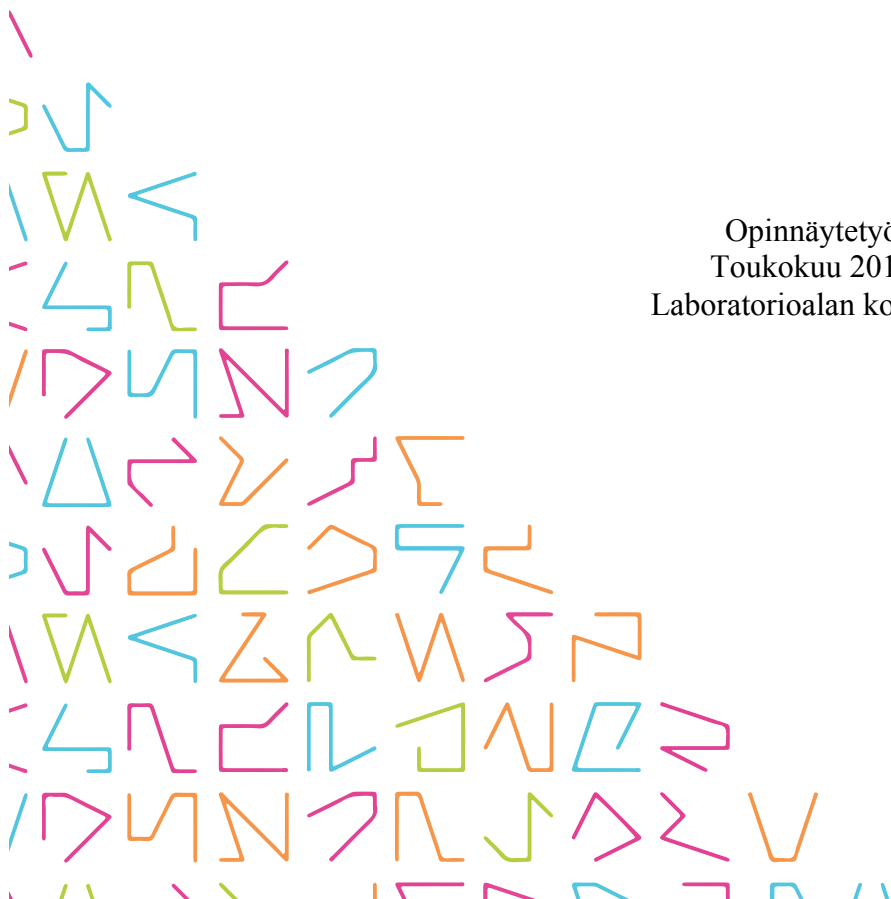


TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

YKSITTÄISTEN SYDÄNLIHASSOLUJEN KASVATUKSEN OPTIMOINTI

Marleena Reponen

Opinnäytetyö
Toukokuu 2016
Laboratorioalan koulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutus

REPONEN, MARLEENA:

Yksittäisten sydänlihassolujen kasvatuksen optimointi

Opinnäytetyö 55 sivua, joista liitteitä 8 sivua

Toukokuu 2016

Potilasspesifisistä iPS-soluista erilaistettuja sydänlihassoluja voidaan hyödyntää muun muassa geneettisten sydänsairauksien mallinnuksessa, lääkekehityksessä ja uusien karakterisointimenetelmien kehityksessä. Yksittäisille sydänlihassoluille tehtävät tutkimukset joudutaan tekemään noin viikon sisällä solujen dissosioinnista, sillä dissosioinnin aikana sykkivien soluaggregaattien mukana soluviljelmään päätyy aina sydänlihassolujen lisäksi muitakin solutyyppejä. Sydänlihassolut eivät jakaannu, mutta jotkin näistä muista solutyypeistä jakaantuvat, peittäen näin viljelmällä kasvavat sydänlihassolut.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää BioMediTechin Sydänryhmän käyttöön sydänlihassoluille spesifinen kasvatusolosuhde, jolla voitaisiin estää tai vähentää muiden kuin sydänlihassolujen kasvaminen maljalla. Samaa olosuhdetta voitaisiin käyttää myös sydänlihassolujen pakastuksen ja sulatuksen jälkeiseen kasvatukseen, jolloin soluja voidaan tarvittaessa lähettää Sydänryhmän yhteistyökumppaneille analysoitavaksi. Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata erilaisia kasvatusolosuhteita, joiden avulla voitaisiin saavuttaa asetettu tavoite ja tutkia, että työssä käytetyt menetelmät eivät vaikuta haitallisesti sydänlihassolujen ominaisuuksiin.

Työssä testattiin neljää eri olosuhdetta kolmella viljelmällä ja työn tuloksia analysoitiin vasta-ainevärjäyksen, videoanalyysiohjelman ja Cell-IQ:n avulla saadun datan perusteella. Laktaattimedium eli kasvatusmedium, jossa glukoosi on korvattu laktaatilla, osoittautui tulosten perusteella kehityskelpoiseksi. Vasta-ainevärjäykset osoittivat, että olosuhteissa, joissa käytettiin laktaattimediumia, oli sydänlihassolujen prosentuaalinen osuus maljalla suurempi kuin muissa olosuhteissa. Cell-IQ:n perusteella voitiin todeta laktaattimediumin vaikuttavan muihin kuin sydänlihassoluihin estäen tai vähentäen niiden jakautumista sekä liikkumista.

Asiasanat: iPS-solu, kantasolu, sydänlihassolu, kasvatusolosuhde

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

REPONEN, MARLEENA:
Optimization of Culture Conditions for Single Cardiomyocytes

Bachelor's thesis 55 pages, appendices 8 pages
May 2016

Cardiomyocytes differentiated from patient specific iPS cells can be used, among other things, for modeling genetic heart diseases and developing drugs and characterization methods. Analyses made for single cardiomyocytes have to be done within a week after dissociating cell aggregates into single cardiomyocytes because, usually during the process some other cell types end up in the cell culture contaminating it. This causes the cell culture to grow confluent since unlike cardiomyocytes, several of these other cell types start to divide and cover non-dividing cardiomyocytes.

The objective of the study was to develop cardiomyocyte specific cell culture conditions for the use of BioMediTech's Heart Group. The culture conditions developed here were intended to inhibit or prevent growth of non-cardiomyocyte cells in the cell culture. Furthermore, they were designed to enhance cardiomyocytes' survival after freezing and thawing processes, therefore improving the longevity of cells sent to the Heart Group's collaborators for analysis. The purpose of the study was to experiment with various culture conditions that could help to achieve the objective of the study and to determine that the said conditions do not have any adverse effects on the properties of cardiomyocytes.

This study was conducted using four culture conditions on three different cultures and results were analyzed using the data from immunostaining, videoanalyzer software and Cell-IQ. The culture medium where glucose was replaced with lactate, also known lactate medium, proved to be a developable medium for the culture of cardiomyocytes. Immunostainings indicated that in the culture conditions where the lactate medium was used, the percentage of cardiomyocytes was higher than in other culture conditions used in the study. Lactate medium's inhibiting effect for non-cardiomyocyte cells was seen on the analyzed data obtained from a Cell-IQ run. It was seen that the lactate medium inhibited movement and division of cells.

Key words: iPS cell, stem cell, cardiomyocyte, culture condition

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	INDUSOIDUT PLURIPOTENTIT KANTASOLUT.....	9
2.1	Ihmisen somaattisten solujen uudelleenohjelmointi indusoiduiksi pluripotenteiksi kantasoluiksi	9
2.2	Vastaavuus ihmisen alkion kantasolujen kanssa sekä käyttö tutkimuksessa.....	10
3	SYDÄNLIHASSOLU	11
3.1	Sydänlihassolun rakenne ja morfologia <i>in vivo</i>	11
3.2	Supistus - relaksaatio	13
3.3	Sydänlihassolun energiametabolia.....	14
4	SYDÄNLIHASSOLUJEN VILJELY	16
4.1	Erilaistusmenetelmät	16
4.2	Solujen pakastus ja sulatus	17
5	PLURIPOTENTEISTA KANTASOLUISTA ERILAISTETTUIJEN SYDÄNLIHASSOLUJEN KARAKTERISOINTI.....	19
5.1	Yksittäisen sydänlihassolun visuaalinen karakterisointi <i>in vitro</i>	19
5.2	Immunosytokemiallinen värjäys.....	19
5.3	Videoanalyysiohjelma	21
6	TAVOITE JA TARKOITUS	23
7	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	24
7.1	Työssä käytetty solulinja sekä soluviljely- ja analyysimenetelmät	24
7.2	Työssä käytetyt viljelyolosuhteet	25
7.3	Dissosiointi	27
7.4	Solujen pakastus ja sulatus	28
7.5	Analyysimenetelmät	29
7.5.1	Analysointi vasta-ainevärjäyksen avulla.....	29
7.5.2	Videoiden kuvaus ja analysointi	31
7.5.3	Cell-IQ -ajo	33
8	TULOKSET	34
8.1	Vasta-ainevärjättyjen sydänlihassolujen määrä suhteessa tumiin	34
8.2	Videoanalyysi	35
8.3	Cell-IQ	37
9	POHDINTA	40
	LÄHTEET.....	44
	LIITTEET	48
	Liite 1. Lista kasvatusmediumeissa käytetyistä reagensseista	48
	Liite 2. Vasta-ainevärjättyjen sydänlihassolujen määrä suhteessa tumien määrään.....	49

Liite 3. Videoanalyysin tulokset.....	52
---------------------------------------	----

LYHENTEET JA TERMIT

ADP	adenosiinidifosfaatti
apoptoosi	ohjelmoitu solukuolema
ATP	adenosiinitrifosfaatti
ATPaasi	adenosiinitrifosfataasi
BMP	luun morfogeeninen proteiini
BSA	naudan seerumin albumiini
DMSO	dimetyylisulfoksidi
EB	(embryoid body) spontaanisti muodostuva soluaggregaatti
END-solu	viskeraalisen endodermin kaltainen solu
ES-solu	alkion kantasolu
FBS	(fetal bovine serum) naudan sikiön seerumi
FGF	fibroblastikasvutekijä
fiksata	solujen kiinnitys alustaan värjäystä varten
Gsk3	glykokeeni-syntaasi kinaasi 3
iPS-solu	indusoitu pluripotentti kantasolu
kardiogeneesi	sydämen ja sydänsolujen kehittyminen
MyBP-C	myosiinia sitova proteiini C
NDS	(normal donkey serum) aasin seerumi
NEAA	(non-essential amino acids) ei-välttämättömät aminohapot
PB	fosfaattipuskuri
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
Pen/Strep	penisilliini ja streptomysiini
PFA	paraformaldehydi
teratooma	kasvain, jossa on havaittavissa jokaisesta kolmesta alkiokerroksesta peräisin olevaa kudosta

1 JOHDANTO

Kantasolu on erilaistumaton solu, jolla on kyky jakautua loputtomasti, sekä erilaistua eri solutyypeiksi. Kantasolut voidaan jakaa niiden lähteen perusteella viiteen ryhmään: embryonaaliset eli alkion kantasolut (ES-solut), aikuisen kantasolut, sikiön kantasolut, istukkaverestä eristetyt kantasolut sekä aikuisen somaattisesta solusta uudelleenohjelmoidut pluripotentit kantasolut eli indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS-solut). ES-solujen käyttöä tutkimuksessa on pidetty eettisistä syistä hyvin kiistanalaisena, joten iPS-solujen kehittäminen vuonna 2006 (Takahashi & Yamanaka 2006) avasi uusia mahdollisuuksia kantasolututkimukselle.

Tämä opinnäytetyö tehtiin BioMediTechin Sydänryhmään. BioMediTech on osa Tampereen yliopiston ja Tampereen teknillisen yliopiston yhteistä instituuttia. Sydänryhmä erilaistaa potilasspesifisiä iPS-soluja sydänlihassoluiksi ja hyödyntää niitä geneettisten sydänsairauksien mallinnuksessa. Ryhmä keskittyy myös muun muassa kehittämään menetelmiä sydänlihassolujen karakterisointiin sekä solumalleja lääkekehitykseen. Opinnäytetyön ohjasivat laboratorioanalyytikko Henna Lappi ja filosofian tohtori Marisa Ojala.

Kun soluagregaatteja dissosioidaan eli hajotetaan yksittäisiksi soluiksi, sykkivien soluagregaatien mukana soluviljelmään päätyy aina sydänlihassolujen lisäksi muitakin solutyyppejä, kuten fibroblasteja ja epiteelisoluja. Sydänlihassolut eivät jakaannu, mutta jotkin näistä muista solutyypeistä jakaantuvat, peittäen näin viljelmällä kasvavat sydänlihassolut. Tästä syystä yksittäisille sydänlihassoluille tehtävät tutkimukset joudutaan tekemään noin viikon sisällä solujen dissosioinnista.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää ainoastaan sydänlihassoluille spesifinen kasvatolosuhde, jolloin muiden solujen osuus maljalla vähenee ja sydänlihassolujen käyttöikä pitenee. Tavoitteena oli myös, että kehitetty menetelmä auttaa yksittäisiä sykkiviä sydänlihassoluja selviämään pakastuksesta ja sulatuksesta ilman, että niiden ominaisuudet muuttuvat. Tällöin niitä voidaan lähettää Sydänryhmän yhteistyökumppaneille analysoitavaksi.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata erilaisia kasvatusolosuhteita, joilla voidaan vähentää tai estää muiden kuin sydänlihassolujen kasvaminen maljalla ja parantaa solujen selviytymistä pakastuksesta ja sulatuksesta. Työn tarkoituksena oli myös eri analyysimenetelmien keinoin varmistaa, että työssä käytetyt menetelmät eivät vaikuta sydänlihassolujen ominaisuuksiin.

2 INDUSOIDUT PLURIPOTENTIT KANTASOLUT

Indusoidut pluripotentit kantasolut ovat tyypillisesti ihmisen somaattisista soluista uudelleenohjelmoituja pluripotentteja eli erittäin monikykyisiä kantasoluja. Pluripotentti solu voi erilaistua miksi tahansa aikuisen somaattiseksi soluksi, mutta ei ekstraembyonaaliseksi kudokseksi. iPS-solut pystyvät siis erilaistumaan ES-solujen tavoin kaikkien kolmen alkiokerroksen eli endodermin, mesodermin ja ektodermin soluiksi. (Takahashi ym. 2007, 861.)

2.1 Ihmisen somaattisten solujen uudelleenohjelmointi indusoiduiksi pluripotentiksi kantasoluiksi

Ensimmäisen kerran iPS-soluja tuotettiin vuonna 2006 hiiren fibroblastisoluista ja vuotta myöhemmin kahdella eri menetelmällä ihmisen fibroblastisoluista (Takahashi & Yamanaka 2006; Takahashi ym. 2007; Yu ym. 2007). Takahashi ja Yamanaka ryhmineen (2007) kehittivät menetelmän ihmisen iPS-solujen tuottamiseen siirtämällä retrovirusvektoreilla ihmisen somaattisiin soluihin transkriptiotekijät Oct4, Sox2, Klf4, ja c-Myc. Kyseiset transkriptiotekijät aktivoivat erilaistuneissa soluissa kantasoluissa ominaisesti aktiiviset geenit ja aiheuttavat näin somaattisten solujen paluun kantasoluasteelle (Takahashi ym. 2007; Takahashi & Yamanaka 2006). Samaan aikaan toinen ryhmä todisti, että iPS-solujen tuottamiseen voidaan käyttää myös muita transkriptiotekijöitä siirtämällä lentivirusvektorilla soluun transkriptiotekijät Oct4, Sox2, Nanog ja Lin8 (Yu ym. 2007, 1917).

iPS-solujen tuottamiseen voidaan käyttää myös muita menetelmiä ja menetelmissä käytetyt geenit saattavat vaihdella. Retro- ja lentivirusvektoreiden avulla siirretyt geenit integroituvat kohdesolun genomiin. Integroitujen geenien oletetaan hiljentyvän kohdesolussa, mutta geenien mahdollinen uudelleenaktivaatio saattaa aiheuttaa mutageenisyyttä. Tämän takia soluja on uudelleenohjelmoitu iPS-soluiksi menetelmin, joissa siirretyt geenit eivät integroidu genomiin. Näitä menetelmiä ovat muun muassa adenovirusvektorin (Stadtfeld ym. 2008) ja sendaivirusvektorin käyttö (Fusaki ym. 2009) sekä geenien siirto plasmiditransfektioilla (Okita ym. 2010) ja transposoneilla (Woltjen ym. 2009).

2.2 Vastaavuus ihmisen alkion kantasolujen kanssa sekä käyttö tutkimuksessa

Ihmisen ES-solujen ja iPS-solujen vastaavuutta on tutkittu runsaasti. iPS-solujen on todettu suurelta osin vastaavan ihmisen ES-soluja morfologialtaan, profiileraatioiltaan, telomeraasiaktiivisuudeltaan ja geenien ilmentymiseltään. iPS-solujen on myös todettu muun muassa ilmentävän ES-soluille spesifisiä antigeenejä, niillä on havaittu olevan kyky muodostaa teratoomia hiireen siirrettynä ja erilaistua jokaiseksi kolmeksi alkiokerrokseksi *in vitro*. (Takahashi ym. 2007, 861). ES-solujen ja iPS-solujen geenien ilmentymistä, DNA:n metylaatiota sekä erilaistumista on verrattu toisiinsa useissa tutkimuksissa. Näiden perusteella on voitu todeta, että nämä kaksi kantasolutyyppiä vastaavat monilta ominaisuuksiltaan toisiaan ja että niitä on vaikea erottaa toisistaan. (Yamanaka 2012, 680.)

Ihmisen somaattisten solujen uudelleenohjelmointi kantasoluiksi mahdollistaa potilas- ja sairausspesifisten kantasolujen käytön tutkimuksessa, jolloin voidaan muun muassa tutkia sairauden syntyä ja toksikologiaa sekä testata lääkkeitä (Takahashi ym. 2007, 869). Kantasolujen avulla voidaan myös mahdollisesti hoitaa oireita sekä parantaa kudosvaurion pohjalta syntyviä tauteja, kuten diabetesta ja Parkinsonin tautia (Tutkimuseettinen neuvottelukunta ym. 2003, 5–6).

Joitakin rajoittavia tekijöitä iPS-solujen käytössä tutkimuksessa on kuitenkin ilmennyt. On esimerkiksi havaittu, että iPS-soluista erilaistetut sydänlihassolut eroavat ihmisen kypsistä sydänlihassoluista muun muassa myofibrillirakenteeltaan, joka on kypsiin sydänlihassoluihin verrattuna usein hyvin järjestäytymätön. Tämä vaikuttaa muun muassa solujen supistumiskykyyn. (Ribeiro ym. 2015, 12705.)

3 SYDÄNLIHASSOLU

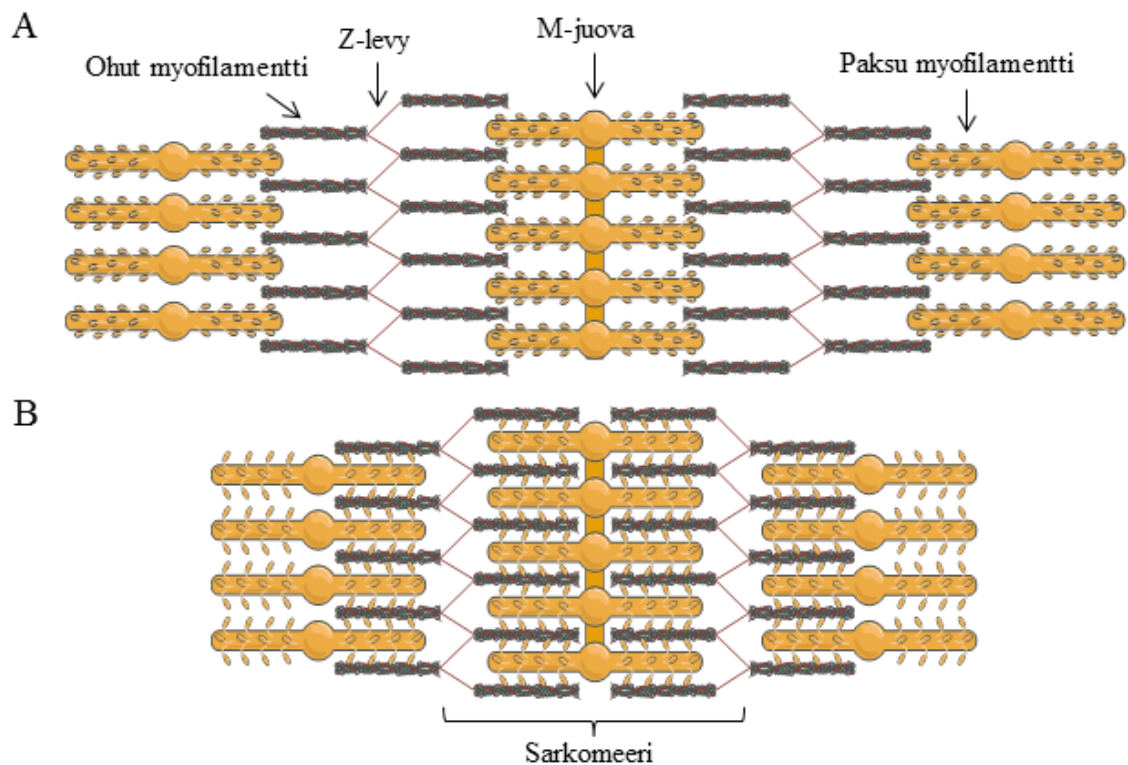
Myokardium eli sydänlihas koostuu sydänlihassoluista, jotka ovat pitkänomaisia ja verkkomaisesti toisiinsa liittyneitä. Myokardiumissa on sydänlihassolujen lisäksi myös muita solutyyppejä, kuten fibroblasteja, endoteelisoluja ja sileitä lihassoluja. Sydänlihassoluja ympäröivä sidekudos pitää sisällään sydänlihassolujen ja sydämen fibroblastien erittämän soluväliaineen, joka on tärkeä tekijä sydänlihassolujen keskinäisessä vuorovaikutuksessa. Soluväliaine koostuu I-, III- ja IV-tyypin kollageenista, laminiinista, fibronektiineista ja proteoglykaaneista. (Kettunen, Hassinen, Peuhkurinen & Kupari 2008, 24; Sarantitis ym. 2012, 367.)

3.1 Sydänlihassolun rakenne ja morfologia *in vivo*

Sydänlihassolut ovat tyypillisesti noin 100 µm pitkiä ja 10–15 µm leveitä ja niillä voi olla yksi tai useampi tuma (Sarantitis ym. 2012, 367). Noin 85 % sydänlihassoluista on kaksitumaisia. Solut kiinnittyvät toisiinsa levymäisillä soluliitoksilla, jotka sisältävät solujenvälisen viestinnän mahdollistavia aukkoliitoksia. (Kettunen ym. 2008, 25.) Sydänlihassolut kuluttavat paljon energiaa, joten soluissa on runsaasti mitokondrioita (Kettunen ym. 2008, 28).

Sydänlihassolun solukalvo eli sarkolemma on kaksikerroksinen fosfolipidimolekyyleistä, kolesterolista sekä proteiinimolekyyleistä muodostunut rakenne. Kalvolla sijaitsevat proteiinit ovat muun muassa reseptorivasteita välittäviä entsyymeitä, reseptoreita sekä toimivat kanavina ioneille ja muille molekyyleille. Tärkeimpiä näistä ovat neurohumaalisten välittäjäaineiden reseptorit sekä reseptoreiden vaikutuksia säätelevät ja guaniniinukleotidejä sitovat G-proteiinit. Sarkolemmän solun ulkopuoliselle pinnalle on kiinnityneenä mukopolysakkaridivaippa, joka kiinnittää sarkolemmän soluväliaineeseen sekä antaa solulle rakenteellista lujuutta. Muita sydänlihassolun tärkeimpiä rakenteita ovat T-putket, joita pitkin ionit ja ravinteet kulkeutuvat soluun, sytoplasmassa kalsiumvarastona toimiva sarkoplasminen kalvosto sekä solun muotoa tukeva tukiranka eli sytoskeleton. (Kantz 2006, 25–34; Kettunen ym. 2008, 27–28.)

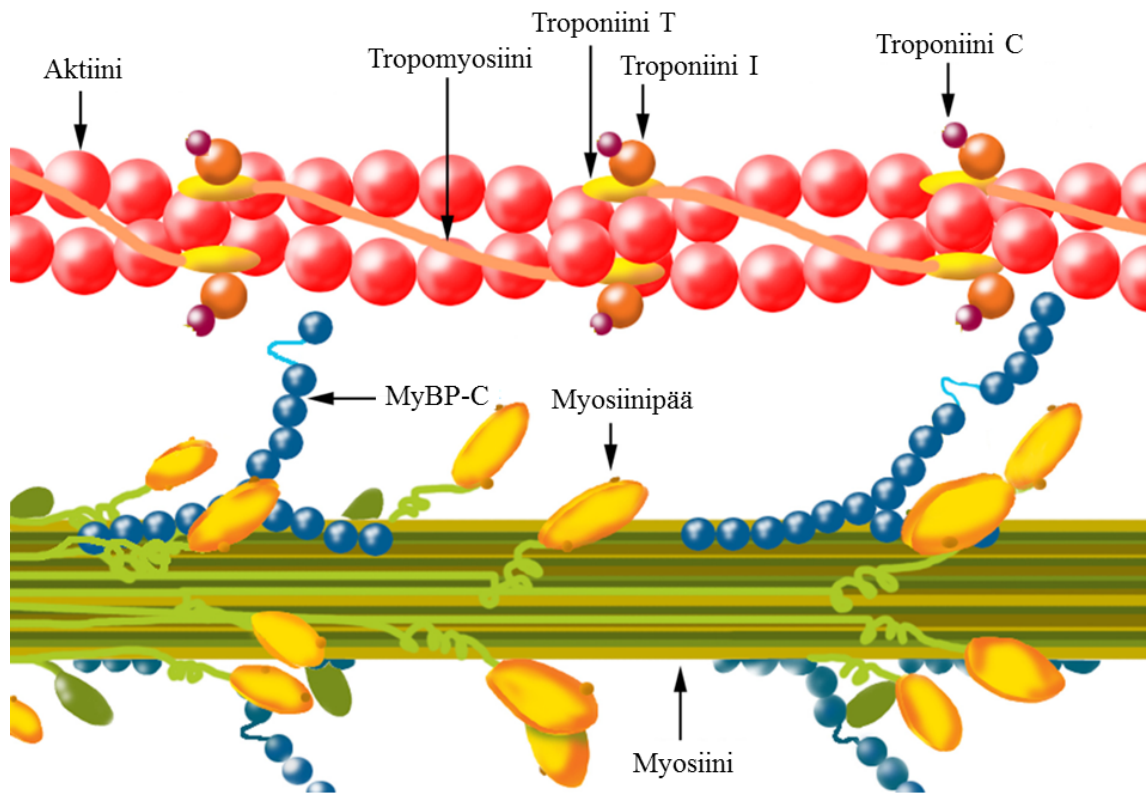
Sydänlihassolun tilavuudesta noin 50 prosenttia muodostuu solun pituussuunnan mukaisesti järjestäytyneistä myofibrilleistä eli sydänlihasta supistavasta proteiinirakenteesta. Myofibrillit ovat säiemäisiä rakenteita, jotka muodostuvat noin 60:stä sarjaan kytkeytyneistä sarkomeerista. Sarkomeerit koostuvat lomittain järjestäytyneistä proteiineista muodostuvista paksuista ja ohuista myofilamenteista. Sydänlihassolu supistuu, kun myofilamentit liukuvat lomittain toistensa väliin lyhentäen näin sarkomeeria (kuvio 1, osa B). Paksut myofilamentit kiinnittyvät toisiinsa M-juovaksi kutsutulla alueella, joka koostuu muun muassa M- ja myomesiiniproteiineista. Ohuet myofilamentit ovat kiinnittyneinä toisiinsa Z-levyksi kutsutussa rakenteessa, joka jakaa myofibrillin sarkomeereiksi. Paksut myofilamentit ovat kiinnittyneinä Z-levyyn titiinistä muodostuvan välisäikeen avulla. (Kuvio 1.) (Kantz 2006, 19–23; Kettunen ym. 2008, 25–26; Tajsharghi 2008, 1261.)



KUVIO 1. Sydänlihassolun lepotilassa (A) ja supistuneena (B) oleva sarkomeerirakenne (Servier 2016, muokattu).

Paksut myofilamentit muodostuvat myosiinimolekyyleistä, joihin on kiinnittyneenä myosiinia sitova proteiini C (MyBP-C) sekä päissä aktiiniin kiinnittyvä raskasketjuinen myosiinipää. Ohuiden myofilamenttien runko muodostuu aktiinimolekyyleistä, joihin on kiinnittyneenä säännöllisin välein kolmesta eri troponiinista (troponiini C, troponiini I ja troponiini T) koostuva troponiiniryhmä sekä tropomyosiinimolekyylillä. (Kuvio 2.)

Nämä estävät aktiinin ja paksun myofilamentin myosiinipään välisen vuorovaikutuksen sydänlihassolun ollessa lepotilassa. (Kantz 2006, 19–23; Kettunen ym. 2008, 25–28; Flashman, Redwood, Moolman-Smook & Watkins 2004, 1279.)



KUVIO 2. Ohuen ja paksun myofilamentin rakenne (Tajsharghi 2008, 1264, muokattu).

3.2 Supistus - relaksaatio

Sydänlihassolun sisä- ja ulkotilan jännite-eron purkautuminen käynnistää kemiallisen prosessin, jossa solukalvon sekä sarkoplasmisen kalvoston kalsiumkanavat avautuvat ja päästävät kalsiumioneja (Ca^{2+}) soluun. Kalsiumpitoisuuden kasvaessa aktiiniin sitoutuneeseen troponiiniryhmän osaan C sitoutuu kalsiumioneja, jolloin troponiini I irttaa aktiinista ja tropomyosiinimolekyylä siirtyy mahdollistaen paksun myofilamentin myosiinipään sitoutumisen aktiiniin. Samalla vapautuvat myosiinipäähän sitoutuneet adenosiinidifosfaatti (ADP) sekä fosfaatti. Energian vapautuminen kääntää myosiinipään kohti sarkomeerin keskustaa supistaen näin sarkomeeria. (Kettunen ym. 2008, 29–30; Liberman & Marks 2013, 889.)

Sydänlihassolun supistuminen päättyy, kun solun ulkopuolelta tuleva kalsiumvirta loppuu ja sarkoplasmisen kalvoston kalsiumpumput aktivoituvat. Tällöin troponiiniryhmän vuorovaikutus kalsiumionien kanssa päättyy, adensiinitrifosfaatti (ATP) sitoutuu myosiinipäähän ja samanaikaisesti myosiinipää irtautuu aktiinista. Tämä johtaa sarkomeerin ja edelleen solun relaksaatioon. Adensiinitrifosfaatti (ATPaasi) hydrolysoi myosiinipäähän sitoutuneen ATP:n ADP:ksi ja fosfaatiksi. (Kettunen ym. 2008, 29–30; Liberman & Marks 2013, 889.)

3.3 Sydänlihassolun energiametabolia

Sydänlihassolun toiminta on riippuvaista keskeytymättömästä ATP:n tuotannosta ja sitä myöten ravinteiden ja hapen saannin jatkuvuudesta. ATP tuotetaan mitokondrioissa, joita sydänlihassoluissa on runsaasti. Sydänlihassolut voivat käyttää energianlähteenään saatavuudesta ja sydänlihaksen fysiologisesta tilasta riippuen glukoosia, laktaattia, rasvahappoja sekä ketoaineita. (Peuhkurinen & Hassinen 2000, 20.) Sydänlihassolun energiasta 98 % tulee aerobisen energiantuotannon kautta ja vain noin 2 % anaerobisen eli glykolyysin kautta. Pelkästään glykolyysista saatava ATP ei riitä kattamaan sydänlihassolun suurta energiantarvetta. (Lieberman & Marks 2013, 887, 891.)

Sydänlihassolun energiasta noin 60–80 prosenttia tulee rasvahapoista, jotka siirtyvät soluun vapaina rasvahappoina. Solussa ne aktivoituvat muodostaessaan asyylikoentsyymi A:n (asyyli-CoA) yhdessä koentsyymi A:n (CoA) kanssa. Voidakseen läpäistä mitokondrion sisäkalvon, asyyli-CoA reagoi karnitiinin kanssa muodostaen asyylikarnitiinia, joka mitokondrion matriksin sisällä muutetaan takaisin asyyli-CoA:ksi. Mitokondriossa asyyli-CoA hajoaa asetyyli-CoA:ksi, joka siirtyy edelleen sitruunahappokiertoon, missä siitä tuotetaan ATP:tä. (Kantz 2006, 58–63; Peuhkurinen & Hassinen 2000, 20–21.)

Laktaattia sydänlihassolu voi käyttää energianlähteenään, kun laktaattidehydrogenaasi katalysoi laktaatin pyruvaatiksi. Laktaattidehydrogenaasi on entsyymi, jota on kahta eri alatyyppeä (M ja H). Näistä alatyypeistä muodostuu viisi eri isoentsyymiä (M4, M3H1, M2H2, M1H3 ja H4), joita esiintyy eri kudoksissa eri määriä. Luurankoliuksessa eli luustorustoon kiinnittyvässä poikkijuovaisessa lihaksessa eniten esiintyvä laktaattidehydrogenaasin isoentsyymi M4 katalysoi pyruvaatin laktaatiksi, kun taas sydänlihasso-

luissa eniten esiintyvä isoentsyymi H4 katalysoi reaktiota toiseen suuntaan, eli laktaatin pyruvaatiksi. Muodostunut pyruvaatti muuttuu mitokondrion matriksissa asetyyli-CoA:ksi, joka siirtyy edelleen sitruunahappokiertoon. (Lieberman & Marks 2013, 891, 405; Tohyama ym. 2013, 128.)

4 SYDÄNLIHASSOLUJEN VILJELY

Soluja viljellään keinotekoisesti luoduissa olosuhteissa kasvatusmediumissa, joka yleensä sisältää soluille välttämättömiä ravintoaineita, kasvutekijöitä ja hormoneita. Myös ympäristön pH, lämpötila ja hiilidioksidipitoisuus ovat tarkoin säädeltyjä. Solujen viljelyalustat pinnoitetaan usein jollakin soluväliaineen yhdisteellä kuten gelatiinilla, fibronektiinilla tai kollageenilla. Tämä auttaa soluja kiinnittymään viljelyalustaan. (Life Technologies 2014, 2, 20–21, 71.)

4.1 Erilaistusmenetelmät

Sydämen kehitykseen vaikuttaa joukko erilaisia signalointireittejä ja kasvutekijöitä, jotka aktivoivat solujen kasvua ja erilaistumista. Tutkituimpia kardiogeneesiin vaikuttavia kasvutekijöitä ovat transformoivan kasvutekijä β -ryhmän eli TGF β -ryhmän kasvutekijät kuten luun morfogeneettiset proteiinit BMP:t, wingless/INT-proteiinit eli Wnt:t sekä fibroblastikasvutekijä FGF. Eri vaiheille ominaiset tekijät toimivat optimaalisesti vain tietyn ajan sisällä, minkä takia sydänlihassolujen erilaistamisprosessin tulee olla tarkkaan optimoitu. (Rajala, Pekkanen-Mattila & Aalto-Setälä 2011, 2–3; Mummery ym. 2012, 345.)

Sydänlihassoluja voidaan erilaistaa kasvutekijöiden avulla useilla eri menetelmillä. Eräs ohjattua erilaistumista käyttävä menetelmä (Laflamme ym. 2007; Takahashi ym. 2007) käyttää TGF β -kasvutekijäryhmään kuuluvia aktiviini A ja BMP4 kasvutekijöitä. Tällä menetelmällä on päästy yli 30 prosentin saantoon. Toisessa menetelmässä (Yang ym. 2008) käytetään kasvutekijöitä aktiviini A, BMP4, bFGF, VEGF ja Dkk-1. Fibroblastikasvutekijäryhmään kuuluvan bFGF:n ja Dkk-1:n eli Dickkopf-1 proteiinin on todettu inhiboivan Wnt-signalointireittiä. Menetelmällä saadaan 30–40 % iPS-soluista erilaistumaan sydänlihassoluiksi. Menetelmissä kasvutekijöiden lisäys tietyissä aikapisteissä on oleellista. (Rajala ym. 2011, 2–3; Mummery ym. 2012, 347–348.)

Yksi yleisesti käytetty menetelmä sydänlihassolujen erilaistukseen on END2-menetelmä, jossa soluja kasvatetaan viskeraalisen endodermin kaltaisten solujen (END2-solujen) päällä. Tämä menetelmä käyttää hyväkseen END2-solujen antamia

solusignaaleja sydänlihassolujen erilaistukseen iP5-soluista. Menetelmän heikkous on huono erilaistumistehokkuus sydänlihassoluiksi, sillä saanto on vain noin 2–3 prosenttia. Saannon kuitenkin on todettu kasvavan noin 25 prosenttia, kun käytetty medium on insuliiniton ja seerumiton. (Mummery ym. 2003; Mummery ym. 2012, 349.)

Sydänlihassoluja voidaan myös erilaistaa EB-menetelmällä (EB, engl. embryoid body) ja yksisolukerrosmenetelmällä (engl. monolayer). EB-menetelmällä solut erilaistuvat solususpensiossa spontaanisti jokaisen kolmen alkiokerroksen soluiksi, esimerkiksi sydänlihassoluiksi. Menetelmän ongelmana on muodostuvien soluaggregaattien vaihteleva koko sekä huono sydänlihassolujen saanto. Soluaggregaattien kokoa on pyritty säätelemään käyttämällä erilaistuksessa U- tai V-mallisia mikrokaivoja, joihin siirretään tunnettu määrä soluja. Yksisolukerrosmenetelmässä (engl. monolayer) solut muodostavat kasvatusalustan pohjalle yhtenäisen yksisoluisen kerroksen. Yksisolukerros- ja EB-menetelmässä on tärkeää, että erilaistuvat solut saavat oikeat signaalit tietyissä aikapisteissä. Tämä toteutetaan pienmolekyyliden ja kasvutekijöiden lisäyksen tai seerumin avulla. (Mummery ym. 2012, 346–348; Rajala ym. 2011, 4–5.)

Pienmolekyyliserilaistusmenetelmässä käytetään pienmolekyylejä, jotka vaikuttavat erilaistumisprosessin signalointireitteihin. Muun muassa useiden Wnt-signalointireitin inhibiittoreiden on todettu edistävän erilaistumista. Xiaojun Lian ym. (2013) kehittämässä menetelmässä käytetään CHIR99021-pienmolekyylä, joka inhiboi glykogeenisyntaasikinaasi 3:a (Gsk3). Solujen esikäsittelyn Gsk3-inhibiittorilla on todettu edistävän solujen erilaistumista sydänlihassoluiksi. Wnt/ β -catenin-signalointireitin on havaittu edistävän kardiogeneesiä erilaistumisen alussa ja estävän sitä erilaistumisen loppupuolella. Tästä syystä menetelmän myöhemmässä vaiheessa solut käsitellään Wnt/ β -catenin-signalointireittiä inhiboivalla IWP4:llä. (Lian ym. 2013.)

4.2 Solujen pakastus ja sulatus

Solujen pakastus mahdollistaa tutkimuksen jatkamisen tilanteessa, jossa solujen käytettävyys on vaarantunut esimerkiksi kontaminaation vuoksi. Solujen morfologia ja toiminta saattaa myös muuttua pitkään jatkuneessa viljelyssä, jolloin on tarpeen sulattaa uusia soluja. Soluja voidaan säilyttää lyhytaikaisesti -80 – (-70) °C:ssa, mutta pitkäaikai-

seen säilytykseen tulee käyttää nestetyyppijäähdytteistä pakastinta, jolla voidaan saavuttaa tarvittava $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$:een lämpötila. (McAteer & Davis 2002, 179.)

Kun soluja pakastetaan ja sulatetaan, muodostuu niiden sisälle jääkiteitä. Solujen vaurioitumisen estämiseksi ja niiden elinkelpoisuuden takaamiseksi, käytetään kryoprotektantteja. Kryoprotektantit voidaan jakaa solunsisäisiin (esimerkiksi dimetyylisulfoksidi eli DMSO sekä glyseroli) sekä solunulkoisiin (esimerkiksi sakkaroosi ja trehaloosi) yhdisteisiin. Solunsisäiset yhdisteet pääsevät kulkeutumaan solun sisälle estäen jääkiteiden muodostumisen sekä soluelimien ja solukalvon vaurioitumisen. Solunulkoiset yhdisteet pitävät yllä liuoksen osmoottista tasapainoa pakastuksen aikana. (McAteer & Davis 2002, 176; de Lara Janz ym. 2012, 1.)

Kasvatusliuokseen lisättyinä DMSO ja glyseroli laskevat solujen jäätymislämpötilaa sekä päästävät solunsisäisen nesteen kulkeutumaan solusta ulos lämpötilan laskiessa. Pakastuksen aikana lämpötilaa lasketaan noin $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, jolloin ylimääräinen neste solujen sisältä on poistunut ja jääkiteet muodostuvat vasta solun ulkopuolelle. Solujen sulatus tulee sen sijaan tehdä mahdollisimman nopeasti jolloin estetään jääkiteiden muodostuminen. Pakastus voidaan suorittaa joko manuaalisesti tai koneellisesti. Koneelliset pakastuslaitteet käyttävät nestemäistä tyyppiä kryoputkien jäähdyttämiseen kun taas manuaalisesti pakastettaessa käytetään isopropanolia sisältävää jäähdytintä, joka siirretään syväjäähdyttimeen, missä se jäähdyttää kryoputket noin $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ nopeudella. (McAteer & Davis 2002, 176–178.)

5 PLURIPOTENTEISTA KANTASOLUISTA ERILAISTETTUJEN SYDÄNLIHASSOLUJEN KARAKTERISOINTI

Ihmisen pluripotentteista kantasoluista erilaistettuja sydänlihassoluja voidaan karakterisoida niiden toiminnallisten, rakenteellisten ja biokemiallisten ominaisuuksien perusteella. Sydänlihassolut ilmentävät eräitä niille spesifisiä geenejä ja proteiineja, joita voidaan käyttää apuna solujen karakterisoinnissa. Näitä ovat muun muassa sydänlihassoluspesifinen troponiini T (cTnT) ja sitä koodaava geeni *TNNT2*, sekä paksussa myofilaamentissa esiintyvä proteiini MHC- β ja sitä koodaava *MYH7*-geeni. (Megy, Audic, Claverie, 2002, 3, 5; Kehat ym. 2001, 411.)

5.1 Yksittäisen sydänlihassolun visuaalinen karakterisointi *in vitro*

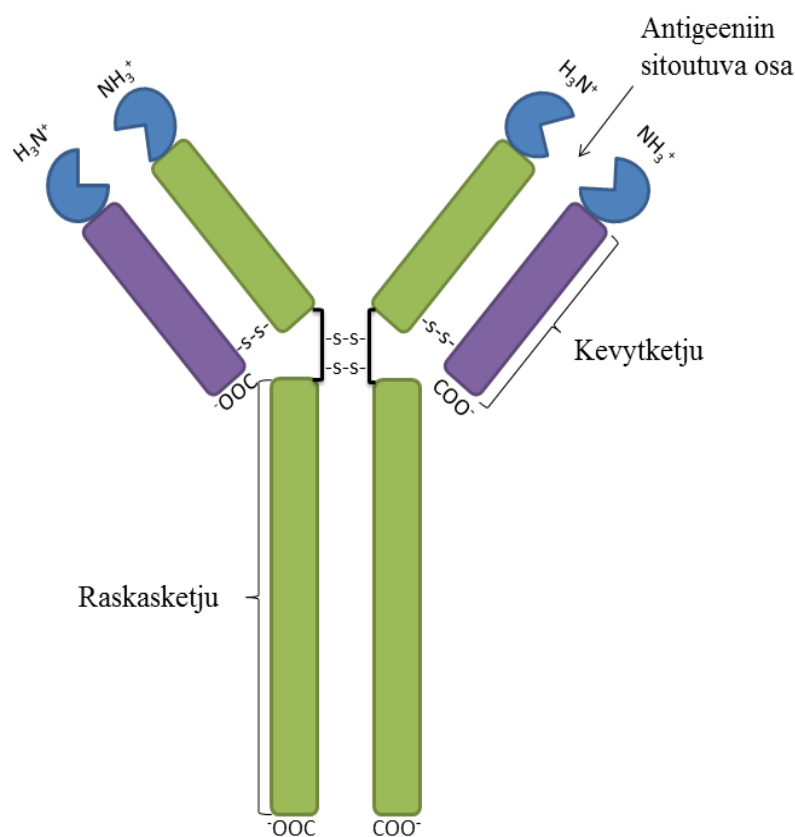
Sydänlihassolun ensimmäinen visuaalisesti karakterisoitavissa oleva piirre on yleensä solun spontaani syke (Mummery ym. 2003; Kehat ym. 2001). Aikuisen sydänlihassoluihin verrattaessa iPS-solut ovat morfologialtaan ja rakenteeltaan kehittymättömiä. Solujen myofibrillirakenteet ovat lyhyempiä ja järjestäytymättömiä sekä solut ovat usein muodoltaan litteitä ja pyöreitä kolmiulotteisen sauvamaisen muodon sijaan. (Khan ym. 2015. 10–11; Ribeiro ym. 2015, 12705.)

Kineettinen elävien solujen kuvantaminen mahdollistaa solujen dynaamisten vasteiden tutkimisen. Visuaalisesti tunnistettavat parametrit kuten solujen jakaantuminen, kiinnittyminen kasvualustaan, migraatio sekä solukuolema ovat analysoitavissa siihen kehitettyjen laitteiden avulla kuten Cell-IQ (Chip-Man Technologies Oy). Laitteistot sisältävät usein sisäänrakennetun soluviljelyinkubaattorin, mikroskoopin sekä kameran. Soluja voidaan tällä tavoin seurata jopa useiden viikkojen ajan sekä soluja voidaan tutkia myös yhdessä fluoresoivan leiman kanssa. (FICAM 2016; Stephens & Allans 2008, 82.)

5.2 Immunosytokemiallinen värjäys

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (kuvio 3) ovat Y:n muotoisia glykoproteiineja. Vasta-aineiden rakenteen muodostavat toisiinsa disulfididisidoksin sitoutuneet kaksi identtistä

raskasta polypeptidiketjua ja kaksi kevyttä polypeptidiketjua. Y:n kärjissä sijaitsevat antigeeniin sitoutuvat osat, joissa on kyseiselle vasta-aineelle spesifinen aminohappojärjestys. Vasta-aineet voidaan jakaa raskaan polypeptidiketjunsä perusteella viiteen eri luokkaan seuraavasti: immunoglobuliinit G (IgG), IgM, IgA, IgD ja IgE. (Alberts ym. 2015, 1315–1317; Delves, Martin, Burton & Roitt 2011, 54.) Vasta-aineita muodostuu, kun auttaja-T-solu sitoutuu antigeeniä esittelevään B-soluun imusolmukkeissa. Tällöin vapautuu interleukiineja, jotka käynnistävät B-solun kypsymisen ja proliferaation. Kehittyneet B-solut erilaistuvat plasmasoluiksi, jotka tuottavat ja vapauttavat vasta-aineita verenkiertoon. (Campbell & Farrell 2011, 409–410.)

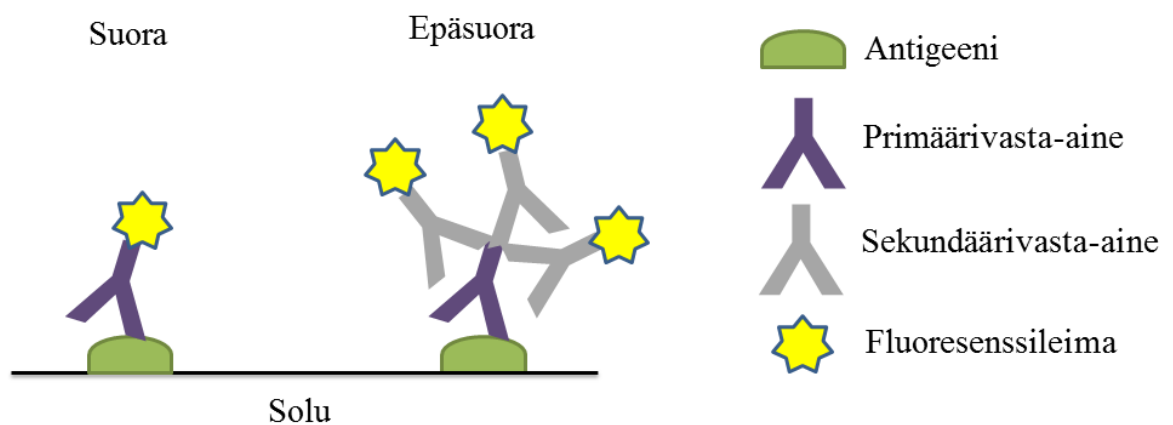


KUVIO 3. Vasta-aineen rakenne (mukaillen Alberts ym. 2015, 1315).

Vasta-aineet sitoutuvat valikoidusti antigeeneihin eli esimerkiksi tiettyihin bakteerien pintarakenteisiin, viruksiin ja solukalvon rakenteisiin. Sitoutuessaan vasta-aine inaktivoi patogeenin tai muuttaa esimerkiksi toksiinin harmittomaksi. Vasta-aineet ovat tärkeä osa ihmisen immuunipuolustusta, samoin kuin hyödyllinen väline esimerkiksi solujen rakenteiden tutkimiseen. (Alberts ym. 2015, 539, 1315–1317; Campbell & Farrell 2011, 411–412; Delves ym. 2011, 53.)

Immunosytokemiallinen värjäys perustuu vasta-aineen kykyyn tunnistaa jokin solun antigeeninä toimivista molekyyleistä ja sitoutua siihen. Vasta-aine voidaan leimata esimerkiksi fluoresenssileimalla, jolloin antigeeniin sitoutunut vasta-aine voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla. Värjäyksen avulla voidaan todentaa näiden antigeenien määrä ja sijainti solussa. Menetelmää voidaan käyttää myös tunnistamaan eri solutyyppejä soluspesifisten antigeenien avulla. (Alberts ym. 2015, 539.) Kun immunosytokemiallista värjäystä käytetään sydänlihassolujen karakterisointiin, voidaan antigeeninä käyttää esimerkiksi troponin T –proteiinin sydänlihassolulle spesifistä alatyyppeä cTnT. (Fuerstenau-Sharp ym. 2015, 1, 9.)

Suorassa menetelmässä leimattu primäärivasta-aine tunnistaa antigeenin ja sitoutuu siihen. Tällä tavoin saatava fluoresoiva signaali ei ole kuitenkaan kovin vahva. Vahvempi signaali voidaan saavuttaa käyttäen epäsuoraa menetelmää, jossa primäärivasta-aineen sijaan leimataan joukko siihen sitoutuvia sekundäärivasta-aineita. Epäsuorassa menetelmässä siis primäärivasta-aine toimii sekundäärivasta-aineen antigeeninä. (Alberts ym. 2015, 539.) (Kuvio 4.)



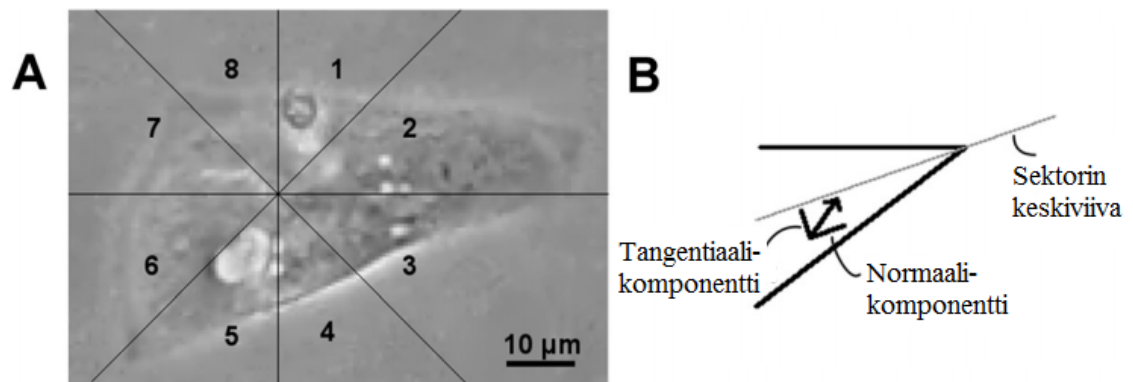
KUVIO 4. Suora ja epäsuora immunosytokemiallinen värjäys.

5.3 Videoanalyysiohjelma

BioMediTechin Sydänryhmän kehittämää videoanalyysiohjelmaa voidaan käyttää yksittäisen sykkivän sydänlihassolun sykkeen analysointiin. Sydänlihassoluista kuvataan videoanalyysiä varten videoita, joissa kuvataajuuden tulisi olla vähintään 60 kuvaa sekunnissa. Tällöin videoista saatavan informaation määrä on riittävän korkea tuottamaan hyvälaatuisen sykesignaalin. Kuvattujen videoiden tulisi sisältää vähintään 12 lyöntiä,

jotta ne edustaisivat kattavasti kyseisen sydänlihassolun sykesignaalia. (Ahola, Kiviaho ym. 2014, 1; Ahola, Pradhapan ym. 2014, 1140.)

Videoanalyysiohjelma valitsee sydänlihassolusta otetusta videokuvasta tarkasti sykkivän alueen sekä sen keskipisteen. Alue jaetaan kuvion 5 mukaisesti kahdeksaan sektoriin, joista jokainen kattaa 45 astetta. Jokaisesta sektorista ohjelma laskee kiihtyvyyden normaalikomponentin ja tangentialikomponentin summavektorin. Tämän avulla ohjelma piirtää 16 sykesignaalia eli jokaisesta kahdeksasta sektorista radiaalisen ja tangentialisen signaalin (kuvio 5). Näistä valitaan vähintään kolme parasta signaalia, joiden avulla saadaan tietoa solun syketiheydestä, relaksaation ja supistuksen kestosta, sekä sykkeessä mahdollisesti esiintyvistä poikkeamista. (Ahola, Kiviaho ym. 2014, 6, 8.)



KUVIO 5. Analysoitava solu jaetaan kahdeksaan sektoriin (A), joista videoanalyysiohjelma laskee kiihtyvyyden normaali- ja tangentialikomponenttien summavektorin (B) (Ahola, Kiviaho ym. 2014, 6, muokattu.)

6 TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida ainoastaan sydänlihassoluille spesifiset kasvatolosuhteet, joita voidaan käyttää myös sydänlihassolujen pakastuksen ja sulatuksen jälkeiseen kasvatukseen. Tällöin soluja voidaan lähettää Sydänryhmän yhteistyökumppaneille analysoitavaksi. Kehitetty menetelmä ei saa vaikuttaa haitallisesti sydänlihassolujen ominaisuuksiin, kuten morfologiaan ja sykkeeseen.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kokeilla erilaisia kasvatusolosuhteita, joilla voidaan vähentää tai estää muiden kuin sydänlihassolujen kasvaminen kaivossa. Tarkoituksena oli myös testata eri kasvatusmediumeja solujen sulatuksen jälkeiseen kasvatukseen sekä lopulta yhdistää nämä kasvatusolosuhteet.

Opinnäytetyön tehtävät olivat seuraavat:

1. Kasvattaa yksittäisiä sydänlihassoluja esitestien perusteella valituissa kasvatusolosuhteissa.
2. Kuvata soluja kasvatuksen aikana ja ottaa sykkivistä sydänlihassoluista ennalta määrättyinä päivinä videokuvaa ja analysoida sitä tarkoitukseen kehitetyllä videoanalyysiohjelmalla.
3. Värjätä solut immunosytokemiallisesti ja määrittää sydänlihassolujen esiintyvyys kaivoissa verrattuna muihin soluihin.
4. Käyttää samoja kasvatusolosuhteita ja analyysimenetelmiä myös sulatetuille soluille.
5. Seurata Cell IQ –laitteen avulla soluja kasvatuksen aikana, saaden muun muassa tietoa kaivossa olevasta solumäärästä sekä solujen liikkumisesta kaivossa.

7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

7.1 Työssä käytetty solulinja sekä soluviljely- ja analyysimenetelmät

Työssä käytetty solulinja oli UTA.04602.WT. Kyseessä on kontrollilinja, joka on tehty uudelleenohjelmoimalla vuonna 1954 syntyneen terveen naisen ihon fibroblastisoluja iPS-soluksi. Koepala on otettu vuonna 2010. iPS-solut on tuotettu viemällä retrovirusvektoreilla soluun transkriptiotekijät Oct4, Sox2, KLF4 ja cMyc. Valmistettujen iPS-solujen pluripotenttisuus on varmistettu karakterisoimalla geenien ilmentymistä RT-PCR:llä, proteiinien ilmentymistä immunosytokemiallisesti ja teratooman muodostumisesta. On myös varmistettu, että valmistetut iPS-solut muodostavat spontaanisti kaikkia alkiokerroksen soluja ja ettei kyseisessä kontrollilinjassa esiinny Sydänryhmässä tutkittavia geenimutaatioita. (Lahti ym. 2012.)

Työtä varten kasvatettiin soluja neljällä 24-kuoppalevyllä. Käytetty solulinja oli kaikissa viljelmissä sama. Viljelmät A ja B olivat END2-erilaistettuja, viljelmän C solut olivat sulatettuja sekä pienmolekyylierilaistettuja ja viljelmän D solut olivat sulatettuja ja END2-erilaistettuja. Pakastetut solut oli dissosioitu ennen pakastusta. Viljelmien analysointiin käytettiin videoanalyysiä ja vasta-ainevärjäystä. Tämän lisäksi viljelmän B soluja kuvannettiin Cell-IQ –laitteiston (Chip-Man Technologies Oy) avulla. (Taulukko 1, Kuvio 6.) Viljelmän D solut eivät selvinneet sulatuksesta, joten niille ei voitu suorittaa tarvittavia analyysijä.

TAULUKKO 1. Työssä suoritettut soluviljelyt sekä analyysimenetelmät.

Viljelmä		A	B	C	D
Erihaustusmenetelmä	END2	X	X		X
	Pienmolekyyli			X	
Pakastettu / sulatettu				X	X
Analyysimenetelmä	Videoanalyysi	X	X	X	
	Värjäys	X	X	X	
	Cell-IQ		X		

7.2 Työssä käytetyt viljelyolosuhteet

Työn tavoitteena oli kehittää menetelmä, jolla estetään muiden kuin sydänlihassolujen kasvaminen soluviljelmissä. Tämä mahdollistaa sydänlihassolujen pidempiaikaisen viljelyn ja analysoinnin. Tähän tavoitteeseen pyrittiin pääsemään erilaisten kasvatusmediumien sekä pinnoitteiden avulla (taulukko 2). Liitteenä 1 on käytettyjen kasvatusmediumien tarkemmat sisällöt ja käytetyt reagenssit.

TAULUKKO 2. Työssä käytetyt kasvatusmediumit ja pinnoitteet (Liite 1).

Kasvatusmedium	Pinnoite
20 % EB-medium	0,1 % gelatiini (Gelatine Type A, Sigma-Aldrich®)
5 % EB-medium	0,1 % gelatiini (Gelatine Type A, Sigma-Aldrich®)
5 mM laktaattimedium	+ 0,02 % kondroitiinisulfaatti

Sydänryhmän käyttämissä normaaliolosuhteissa kasvatusmediumina on 20 % EB-medium (naudan sikiön seerumi (FBS) -pitoisuus 20 %) ja pinnoitteena 0,1 % gelatiini. Työhön valittiin yhdeksi testattavaksi kasvatusmediumiksi 5 % EB-mediumi, sillä yli 10 % seerumipitoisuuden on todettu lisäävän fibroblastien proliferaatiota (Salameh & Dhein 2005, 570–571). Toinen työhön valituista kasvatusmediumeista oli 5 mM laktaattimedium. Kuten luvussa 3.3 mainittiin, sydänlihassolut voivat käyttää laktaattia energianlähteenään. Kasvatusmediumia, johon on glukoosin sijaan lisätty laktaattia energianlähteeksi, on käytetty menestyksekkäästi saannon parantamiseen sydänlihassolujen erilaistuksessa (Tohyama ym. 2013). Laktaattimediumin pitoisuuteen 5 mM päädyttiin esitestien perusteella. Testattavaksi pinnoitteeksi valittiin 0,1 % gelatiini + 0,02 % kondroitiinisulfaatti, sillä kondroitiinisulfaatti on eräs soluväliaineessa esiintyvistä yhdisteistä ja sen on aiemmin todettu vähentävän solujen liikkumista (Alberts ym. 2015, 1185). Esitestien perusteella ei havaittu suuremman (0,2 %) ja pienemmän (0,02 %) kondroitiinisulfaattipitoisuuden välillä eroavaisuuksia, joten työssä päädyttiin käyttämään pienempää pitoisuutta.

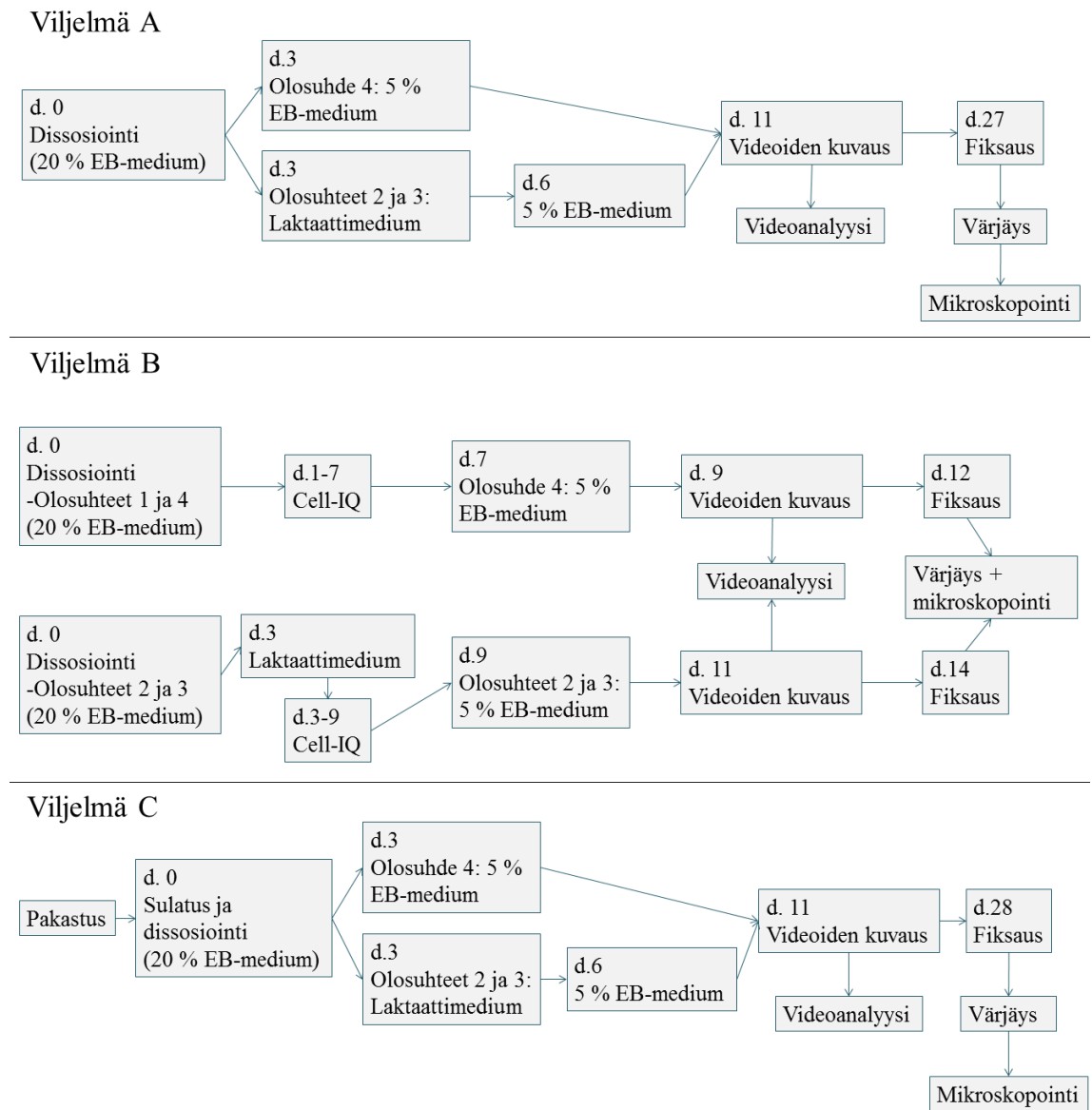
Työssä soluja viljeltiin neljässä eri olosuhteessa (taulukko 3) ja jokaista olosuhdetta oli neljä kaivoa viljelmää kohden. Soluja viljeltiin + 37 °C lämpötilassa 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa. Kasvatusmedium vaihdettiin soluille kaksi kertaa viikossa. Olosuhteet on nimetty työssä taulukon 3 mukaisesti olosuhteiksi 1, 2, 3, ja 4. Taulukossa 3 on kerrottu kussakin olosuhteessa käytetty medium ja pinnoite sekä ilmoitettu päivä, jona me-

dium on vaihdettu soluille. Päivä 0 (d. 0) on päivä, jona sydänlihassoluiksi erilaistuneet soluaggregaatit on dissosioitu yksittäisiksi sydänlihassoluiksi tai aiemmin pakastetut solut on sulatettu. Dissosioinnista/sulatuksesta seuraava päivä on päivä 1 (d. 1) ja niin edelleen.

TAULUKKO 3. Työssä käytetyt olosuhteet.

Olosuhde	Medium	Pinnoite
Olosuhde 1 (kontrolli)	d. 0 20 % EB-medium	0,1 % gelatiini
Olosuhde 2 (laktaatti)	d. 0 20 % EB-medium d. 3 5 mM laktaattimedium d. 6 5 % EB-medium	0,1 % gelatiini
Olosuhde 3 (yhdistelmä)	d. 0 20 % EB-medium d. 3 5 mM laktaattimedium d. 6 5 % EB-medium	0,1 % gelatiini + 0,02 % kondroitiinisulfaatti
Olosuhde 4 (kondroitiinisulfaatti)	d. 0 20 % EB-medium d. 3 5 % EB-medium	0,1 % gelatiini + 0,02 % kondroitiinisulfaatti

Kontrolliolosuhteena työssä (olosuhde 1) käytettiin Sydänryhmän käytössä olevan viljelymenetelmän mukaista olosuhdetta. Mediumina olosuhteessa käytettiin 20 % EB-mediumia ja pinnoitteena 0,1 % gelatiinia. Olosuhteessa 2 soluja kasvatettiin aluksi olosuhteen 1 mukaisissa kontrolliolosuhteissa, mutta päivänä kolme (d. 3) soluille vaihdettiin glukoositon 5 mM laktaattimedium. Tähän päädyttiin esitestien perusteella, joiden avulla todettiin solujen selviytyvän näin paremmin dissosioinnista sekä kiinnittyvän viljelyalustaan ennen d. 3 tapahtuvaa mediumin vaihtoa. Päivänä 6 (d. 6) laktaattimedium vaihdettiin 5 % EB-mediumiksi, sillä pidemmän laktaattialtistuksen todettiin edistävän yksittäisten sydänlihassolujen apoptoosia. Olosuhde 3 oli olosuhteiden 2 ja 4 yhdistelmä. Se oli vastaava kuin olosuhde 2, mutta pinnoitteena käytettiin 0,1 % gelatiini + 0,02 % kondroitiinisulfaatti –pinnoitetta. Olosuhteessa 4 soluja kasvatettiin aluksi 20 % EB-mediumissa, joka päivänä kolme vaihdettiin 5 % EB-mediumiin. Pinnoitteena olosuhteessa 4 käytettiin 0,1 % gelatiini + 0,02 % kondroitiinisulfaatti –pinnoitetta. (Taulukko 3, Kuvio 6.) Edellä mainittuihin päiviin kuitenkin poikkeuksena viljelmä B, jossa Cell-IQ -ajon vuoksi 5 % EB-medium vaihdettiin olosuhteelle 4 päivänä 7 ja olosuhteelle 2 ja 3 päivänä 9.



KUVIO 6. Kullekin viljelmälle suoritettavat analyysimenetelmät sekä käytetyt olosuhteet aikapisteittäin.

7.3 Dissosiointi

Työssä tutkittiin yksittäisiä sydänlihassoluja, joten erilaistettuja soluja dissosioitiin 24-kuoppalevylle. Erilaistuneita sykkiviä soluaggregaatteja pyrittiin leikkaamaan irti yksi jokaista 24-kuoppalevyn kaivoa kohden. Tällä tavoin saavutettiin sopiva solumäärä kussakin kaivossa. Levyn kaivot pinnoitettiin kunkin olosuhteen vaatimalla pinnoitteella ja dissosoinnin jälkeen solujen viljelyä jatkettiin kyseisen olosuhteen mukaisesti. (Kuvio 6.)

Työ aloitettiin leikkaamalla mikroskoopin alla skalpellilla kaivosta yksittäisiä sykkiviä alueita. Leikatut kohdat siirrettiin pienessä määrässä mediumia yhteen kaivoon, jossa niille laitettiin ensimmäinen dissosiointipuskuri. Puskuri 1 oli pesuliuos, jonka annettiin vaikuttaa 30 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen puskurit poistettiin ja soluille lisättiin toinen dissosiointipuskuri (entsyymipuskuri), jonka tehtävänä on löysyttää solujen väliset liitokset. Toista puskuria inkuboitiin 45 minuuttia + 37 °C:ssa. Toisen inkubaation aikana pinnoitettiin kaivot, joille solut haluttiin siirtää. Inkubaation päätyttyä soluille vaihdettiin kolmas dissosiointipuskuri, joka sisälsi kaliumia. Tämän tehtävänä on auttaa soluja selviämään prosessista. Kolmannen puskurin lisäyksen jälkeen soluja inkuboitiin tunnin ajan huoneenlämmössä, minkä päätyttyä kolmas puskurit vaihdettiin kasvatusmediumiin ja soluja pipetoitiin varovasti ylös-alas pyrkien näin erottamaan solut yksittäisiksi. Tämän jälkeen solut jaettiin tasaisesti pienessä määrässä (noin 30 µl) mediumia kaivoihin ja lisättiin tarpeellinen määrä mediumia päälle niin, että lopullinen kasvatusmediumin tilavuus oli 750 µl.

7.4 Solujen pakastus ja sulatus

Työssä tutkittiin myös sydänlihassolujen selviämistä pakastus- ja sulatusprosessista sekä käytettyjen olosuhteiden vaikutusta sulatettuihin soluihin. Viljelmiin C ja D käytettiin sulatettuja soluja. Solujen pakastukseen käytettiin niiden selviämistä edistävää pakastusliuosta, jonka pitoisuudesta oli 90 % FBS:ää, 10 % DMSO:ta ja joka sisälsi 5 µM solujen selviytymistä edistävää ROCK-inhibiittoria (Rho-associated kinase). Viljelmää C varten soluja kerättiin yhteensä neljään pakastusputkeen ja viljelmää D varten yhteen pakastusputkeen. Soluja käsiteltiin aluksi normaalin dissosiointiprotokollan mukaisesti, jonka jälkeen yksittäisiä sydänlihassoluja kerättiin viljelmää C varten yksi 12-kuoppalevyn kaivollinen pakastusputkea kohden ja viljelmää D varten yhteensä 20 soluaggregaattia yhteen pakastusputkeen. Putket siirrettiin isopropanolia sisältävässä jäädyttimessä ensin vuorokaudeksi syväjäähäpakastimeen -80 °C:n lämpötilaan, jossa putket jäähtyivät noin 1 °C/min nopeudella, jonka jälkeen putket siirrettiin nestetyypisäiliöön -196 °C:n lämpötilaan.

Viljelmän C solut sulatettiin päivänä 38 pakastuksesta ja viljelmän D päivänä 35. Solujen sulatus aloitettiin sulattamalla putkia nopeasti vesihauteessa, päästämättä putkea täysin sulaksi. Putkeen lisättiin varovasti tippa kerrallaan 1,0 ml 20 % EB-mediumia

samalla sekoittaen. Solususpensio siirrettiin lämmitettyyn mediumiin, josta solut jaettiin mahdollisimman pienen mediummäärän kanssa kuuteentoista pinnoitettuun 24-kuoppalevyn kaivoon. Kaivoihin lisättiin 20 % EB-mediumia niin, että lopullinen tilavuus oli 750 µl. Viljelmän D solut eivät selviytyneet pakastuksesta ja sulatuksesta, joten niille ei voitu suorittaa tarvittavia analyysejä.

7.5 Analyysimenetelmät

7.5.1 Analysointi vasta-ainevärjäyksen avulla

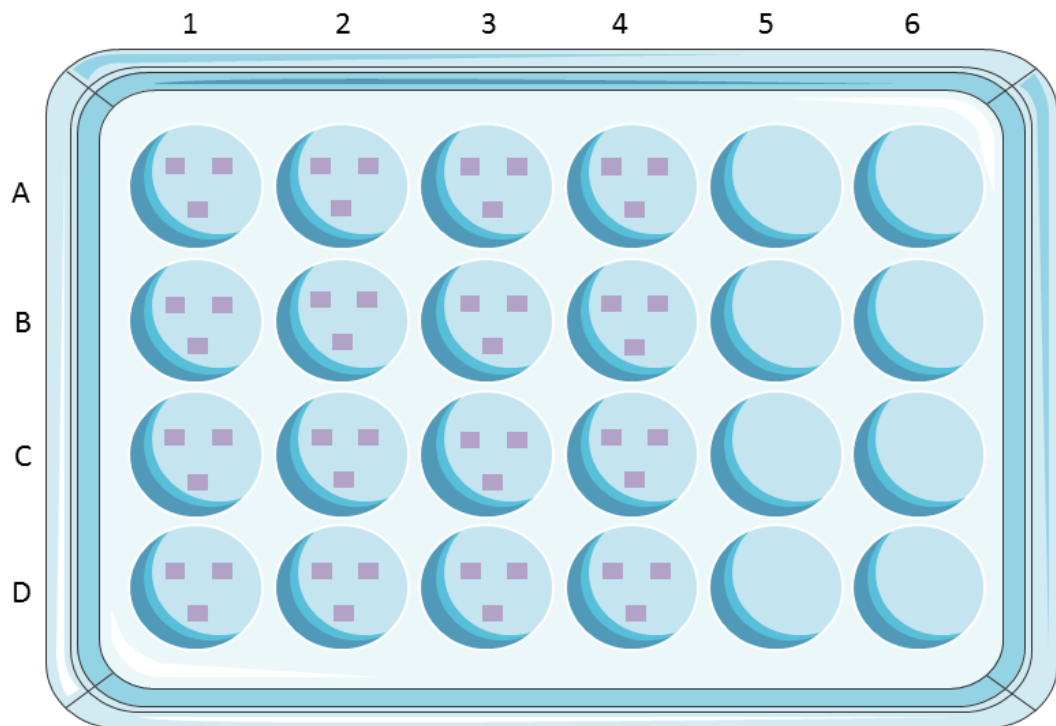
Viljelmän A solut fiksattiin päivänä 27, viljelmän B päivänä 12/14 ja viljelmän C päivänä 28. Viljelmiltä värjättiin kaikki kaivot ja värjäyksissä käytetty antigeeni oli troponiini T-proteiinia. Primäärivasta-aineena oli vuohen troponiini T –vasta-aine ja sekundäärivasta-aineena aasin anti-vuohi-vasta-aine Alexa Fluor® 568 fluoresenssileimalla (ThermoFisher Scientific). Tumien värjäämiseen käytettiin DNA:han sitoutuvaa kaupallista fluoresenssiväriä DAPIa (Vector Laboratories, USA).

Solujen värjäys aloitettiin suorittamalla kaksi kertaa viiden minuutin pesu fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS), jonka jälkeen solut fiksattiin käyttäen 4 % paraformaldehydiä (PFA). PFA:n annettiin vaikuttaa 20 minuuttia, jonka jälkeen soluja pestiin taas kaksi kertaa 5 minuuttia käyttäen PBS-puskuria. Soluja inkuboitiin 45 minuutin ajan blokkauksliuoksessa. Tämän avulla estetään vasta-aineiden kiinnittyminen epäspesifisiin kiinnityskohtiin. Blokkauksliuoksessa oli 10 % aasin seerumia (NDS, engl. normal donkey serum), 0,1 % TritonX-100 ja 1 % naudan seerumista eristettyä albumiinia (BSA, engl. bovine serum albumin) liuotettuna PBS-puskuriin. Blokkauksen jälkeen solut ensin pestiin liuoksella, joka sisälsi 1 % NDS, 0,1 % TritonX-100 ja 1 % BSA liuotettuna PBS-puskuriin. Tämän jälkeen soluja inkuboitiin yön yli + 4 °C lämpötilassa edellisen kaltaisessa liuoksessa, johon oli lisätty 1:1500 primäärivasta-ainetta.

Seuraavana päivänä soluja pestiin kolme kertaa 5 minuuttia 1 % BSA-PBS-liuoksella, minkä jälkeen soluille lisättiin 1:800 sekundäärivasta-aineliuos, jonka annettiin vaikuttaa yksi tunti huoneenlämmössä. Tämän jälkeen solut pestiin kolme kertaa 5 minuuttia PBS-puskurilla sekä kaksi kertaa 5 minuuttia fosfaattipuskuriliuoksella (PB, engl.

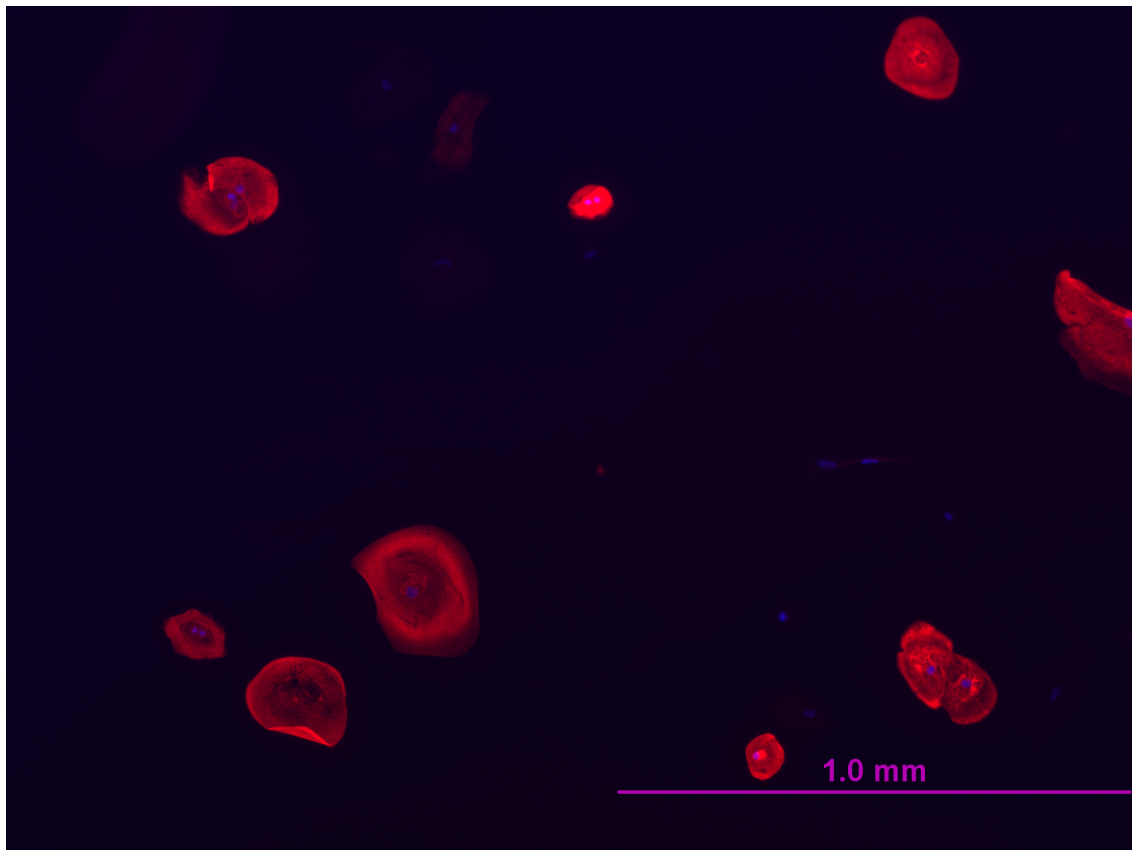
Phosphate Buffer). Pesujen jälkeen kaivot kuivattiin sekä niihin lisättiin näytteen haalistumista ja kuivumista estävää Mounting-liuosta, joka sisältää myös tumat värjäävää DAPIa. Tämän jälkeen kaivot peitettiin 13 mm peitinlevyillä. Värjäyksen jälkeen soluja tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla (Olympus IX51 Fluoresence microscope).

Viljelmissä A ja B solumäärät olivat niin suuria, että solujen manuaalinen laskeminen ei ollut mahdollista. Tästä syystä jokaisesta kaivosta otettiin kuvion 7 mukaisesti kolme kuvaa 4x objektiivilla. Otetuista kuvista laskettiin sydänsolujen määrä suhteessa tumiin. Viljelmässä C solujen määrä oli huomattavasti pienempi, joten manuaalinen laskenta oli mahdollista.



KUVIO 7. Havainnointikuvio viljelmissä A ja B käytetystä kuvantamismallista, jossa violetit suorakulmiot edustavat kussakin kaivossa kuvanottokohtaa (Servier 2016, muokattu).

Värjätystä soluista otetuissa kuvissa on 1 mm:n mittajana, joka on pituudeltaan 620 pikseliä. Kuvien koko on 1360 x 1024 pikseliä, jolloin kuva vastaa 3,62 mm² aluetta kaivolla. (Kuva 1.) Käytettyjen 24-kuoppalevyjen (Thermo Scientific™ Nunc™) kaivon pinta-ala on 180 mm². Kuvat kattavat siis noin 6 % kaivon pinta-alasta.



KUVA 1. Esimerkkikuva solujen laskemista varten otetuista kuvista, jossa näkyvissä värjättyjä sydänlihassoluja (punainen) ja tumia (sininen).

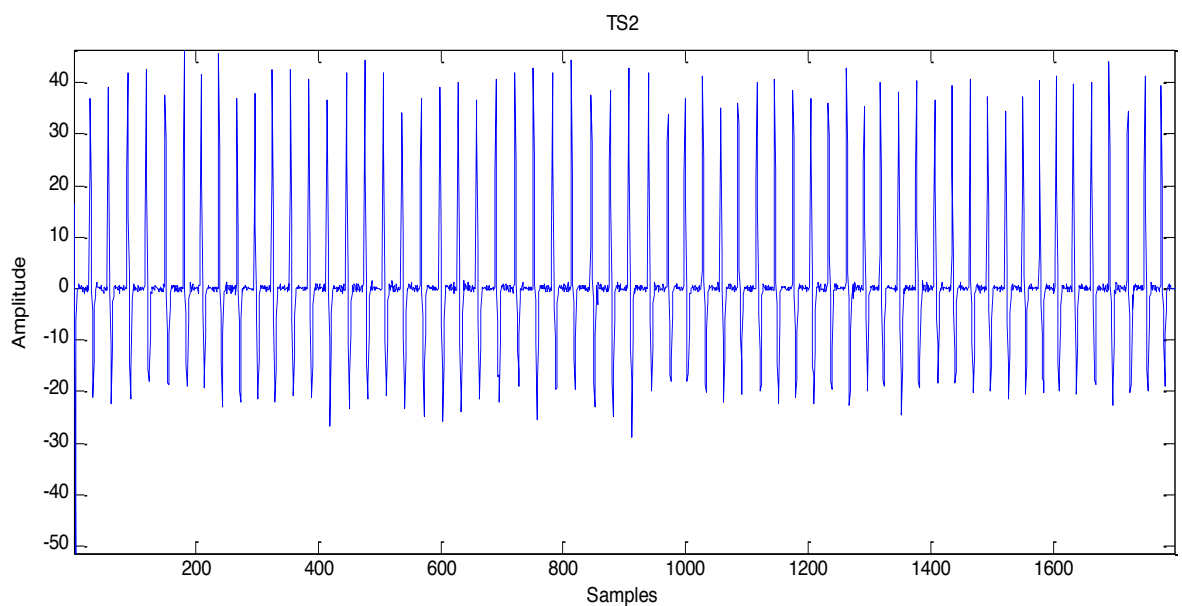
7.5.2 Videoiden kuvaus ja analysointi

Sykkivät alueet kuvattiin käyttäen Nikon Eclipse TS100 vaihekontrastimikroskooppia (Nikon Instruments) sekä videokameraa (IGV-B1620M-KC000, Imperx). Soluja kuvattiin aina 30 minuuttia kerrallaan + 38 °C lämpölevyn päällä, jonka jälkeen kuoppalevyn annettiin olla 2 tuntia inkubaattorissa mediumin lämpötilan ja pH:n tasaantumiseksi. Kuvatut videot olivat 30 sekuntia pitkiä ja niiden kuvataajuus oli 40 kuvaa sekunnissa. Videot sisälsivät yhteensä 168 sykkivää solua/soluaggregaattia, joista 41 oli kuvattu olosuhteesta 1, 44 olosuhteesta 2, 42 olosuhteesta 3 ja 41 kpl olosuhteesta 4. Näistä videoista analyysikelpoisia oli 52 videota (taulukko 4).

TAULUKKO 4. Analysoitavissa olevat videot olosuhteittain.

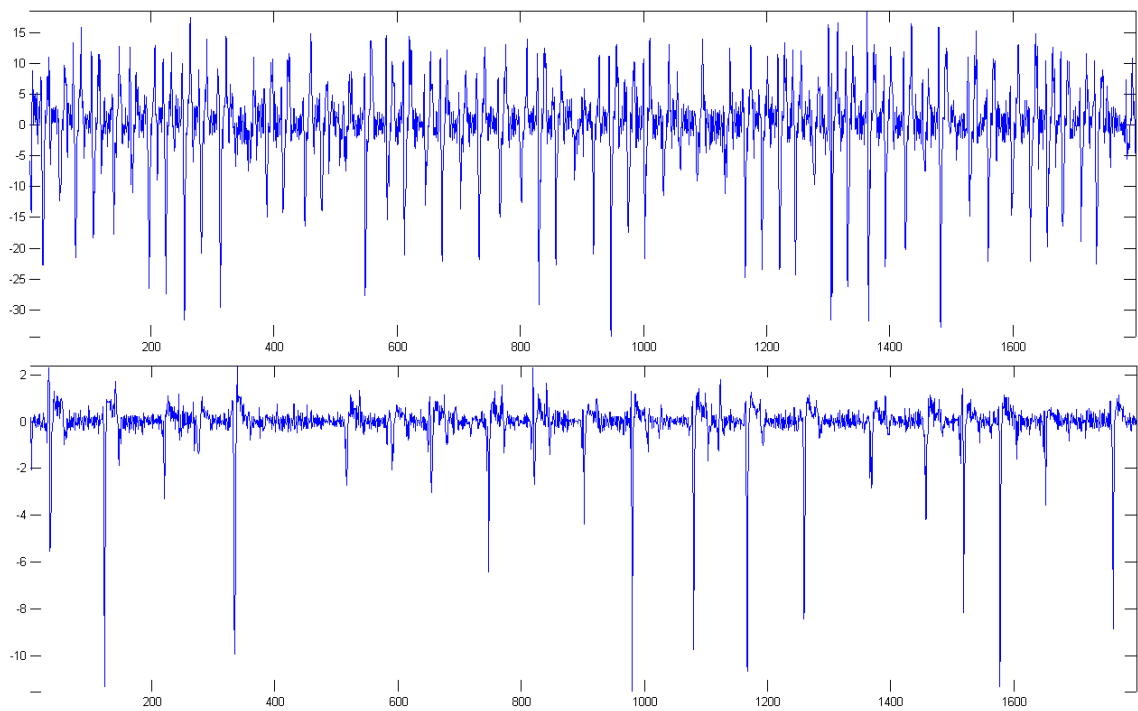
Olosuhde	Analysoitavissa olevat videot (kpl)
1	8
2	14
3	17
4	13

Videot analysoitiin Sydänryhmän siihen kehittämällä ohjelmalla, joka muodostaa sydänlihassolun sykkeestä 16 kappaletta kuvion 8 mukaisia sykesignaaleja. Näistä valittiin kolme hyvälaatuisinta signaalia, joiden perusteella ohjelma tulosti Excel-taulukkoon signaalista saatavan informaation. Signaalista saatava informaatio kattaa muun muassa syketiheyden, relaksaation ja supistuksen keston millisekunteina, sekä sykkeessä mahdollisesti esiintyvät poikkeamat. Kuviossa 8 on X-akselilla videon kuvien määrä ja Y-akselilla sykkeen amplitudi eli liikkeen laajuus. Signaalissa näkyy kuvatun solun sykkeen supistus ja relaksaatio amplitudin nollakohdasta poikkeavina korkeina piikkeinä.



KUVIO 8. Sykesignaali.

Osa soluista/soluaggregaateista ei voitu analysoida (kuvio 9), sillä joidenkin solujen syke oli joko hyvin epäsäännöllinen ja/tai muulla tavoin poikkeava. Osa solusta saattoi esimerkiksi ikään kuin nopeasti ”väristä”, kun muu osa solua sykki tasaiseen tahtiin tai solussa saattoi esiintyä rytmihäiriöitä muistuttavaa epätasaista sykettä ja liikettä.



KUVIO 9. Kaksi esimerkkiä signaaleista, joita ei voitu analysoida.

7.5.3 Cell-IQ -ajo

Viljelmän B soluja kuvattiin 7 vuorokauden ajan Cell-IQ –laitteella (Chip-Man Technologies Oy). Olosuhteiden 2 ja 3 solujen viljely aloitettiin kaksi päivää ennen olosuhteiden 1 ja 4 soluja. Tällä tavoin olosuhteiden 2 ja 3 soluille voitiin vaihtaa 5 mM laktaatimedium ennen kaikkien solujen siirtämistä Cell-IQ –laitteeseen. Laitteessa on sisäänrakennettuna soluviljelyinkubaattori, mikroskooppi sekä kamera. Kaikkien olosuhteiden soluja kuvattiin Cell-IQ:ssa seitsemän vuorokauden ajan + 37 °C lämpötilassa 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa kunkin olosuhteen mukaisissa kasvatusolosuhteissa. Soluille ei vaihdettu mediumia Cell-IQ ajon aikana.

Laite ohjelmoitiin ottamaan ennalta määrätystä alueista yhden kuvan 30:n minuutin välein seitsemän vuorokauden ajan. Käytössä oli 20x objektiivi. Otetuista kuvasarjoista koottiin aikaviivevideoita Cell-IQ Analyzer–ohjelmalla (Chip-Man Technologies Oy).

8 TULOKSET

8.1 Vasta-ainevärjättyjen sydänlihassolujen määrä suhteessa tumiin

Taulukkoon 5 on laskettu viljelmien A, B ja C eri olosuhteissa havaittujen sydänlihassolujen lukumäärän keskiarvo, tumien lukumäärän keskiarvo, kuinka monta prosenttia olosuhteissa esiintyvistä soluista on sydänlihassoluja ja tulosten suhteellinen keskihajonta (RSD). Jokaisella viljelmällä oli kutakin olosuhdetta neljä kaivoa. Viljelmien A ja B tulokset on laskettu kappaleen 7.6.1 kuvion 7 (s. 29) mukaisesti otetuista kuvista. Viljelmän C (pakastettu/sulatettu) tuloksiin on laskettu kaivoilla esiintyvä solupopulaatio kokonaisuudessaan.

Taulukosta 5 voidaan nähdä, että viljelmissä A ja B olosuhteissa 2 (laktaatti), 3 (yhdistelmä) ja 4 (kondroitiinisulfaatti) sydänlihassolujen määrä suhteessa muihin soluihin on suurempi kuin olosuhteessa 1 (kontrolli). Olosuhteiden 2 ja 3 välillä ei ole eroavaisuuksia. Viljelmässä C ei olosuhteiden välillä ole huomattavia eroavaisuuksia. Suhteellinen keskihajonta on kuitenkin kaikkien olosuhteiden ja viljelmien kohdalla hyvin suuri.

TAULUKKO 5. Vasta-ainevärjäyksen tulokset.

Viljelmä	Olosuhde	Otos	Sydänlihassolut	Tumat	Sydänlihassolut	Suhteellinen keskihajonta
		(n)	(kpl)	(kpl)	(%)	(RSD)
A	1	12	11,6	45,2	37,6	62,6 %
	2	12	14,3	30,4	50,9	29,6 %
	3	12	18,4	74,0	51,5	68,5 %
	4	12	23,9	37,4	64,3	24,7 %
B	1	12	40,8	157,5	36,2	49,4 %
	2	12	10,9	15,1	76,0	25,9 %
	3	12	11,9	16,2	71,3	32,5 %
	4	12	70,4	213,2	42,7	44,7 %
C	1	4	5,5	28,0	28,7	67,8 %
	2	4	11,3	56,0	30,1	87,0 %
	3	4	21,3	104,0	26,1	55,5 %
	4	4	14,3	72,5	22,0	46,8 %

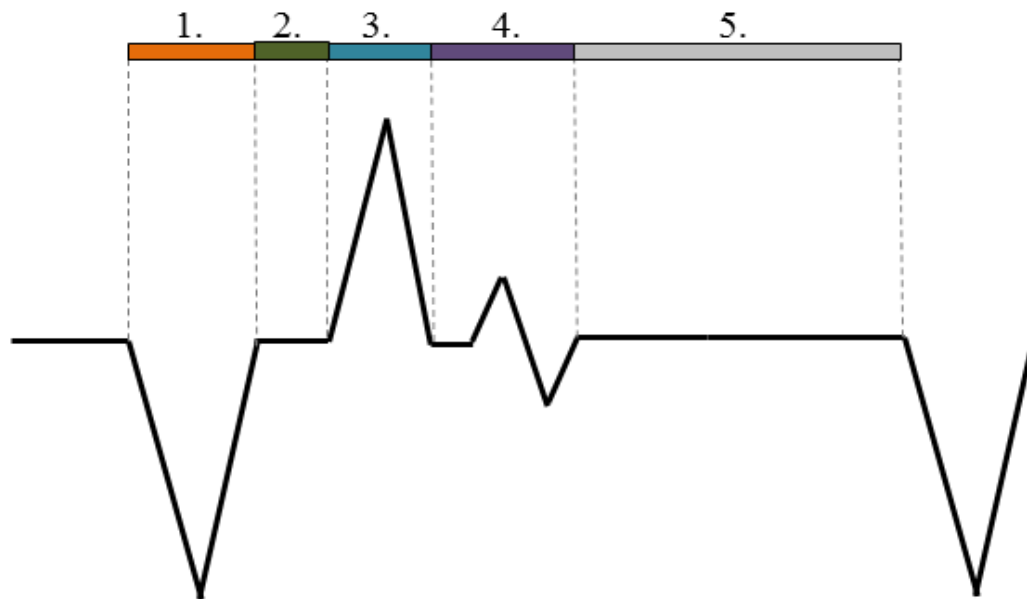
Tarkemmat tiedot viljelmistä on taulukoitu liitteeseen 2. Taulukoissa 7–9 on ilmoitettu jokaisesta olosuhteesta otetuissa kuvissa olevien värjättyjen sydänsolujen sekä tumien

summa, sydänsolujen suhde verrattuna tumiin, näiden keskiarvot olosuhteen sisällä sekä sydänsolujen prosenttiosuus tumista. Samoin taulukoihin 7–9 on laskettu otoskeskihajonta (s) ja suhteellinen keskihajonta (RSD). (Liite 2.)

8.2 Videoanalyysi

Videoanalyysillä tutkittiin solujen sykettä ja siinä mahdollisesti esiintyviä poikkeavuuksia. Analysoiduissa soluissa esiintyviä poikkeavuuksia olivat pitkittynyt relaksaatio sekä solun pysyminen supistuneena jonkin aikaa ennen relaksaatiota. Videoanalyysiohjelma ilmoitti sykkeen vaiheiden (kuvio 10) keston millisekunteina sekä solun sykkeen yksikössä lyöntiä/minuutti.

Kuvio 10 kuvaa yhden sykähdyksen muodostama signaalia vaiheineen 1, 2, 3, 4 ja 5. Sykkeen ensimmäisessä (1) vaiheessa solu supistuu, toisessa (2) vaiheessa solu pysyy supistuneena kunnes kolmannessa (3) vaiheessa tapahtuu relaksaatio. Neljäs (4) vaihe kuvaa solun epätäydellistä relaksaatiota ja viides (5) kuvaa vaihetta jossa solu pysyy relaksoituneena aina seuraavaan supistumiseen asti. Solun yhdessä sykähdyksessä esiintyvät aina vaiheet 1, 3 ja 5 ja vaiheet 2 ja 4 ovat toisinaan solun sykkeessä esiintyviä poikkeamia.



KUVIO 10. Yhden sykähdyksen muodostama signaali vaiheineen 1, 2, 3, 4 ja 5.

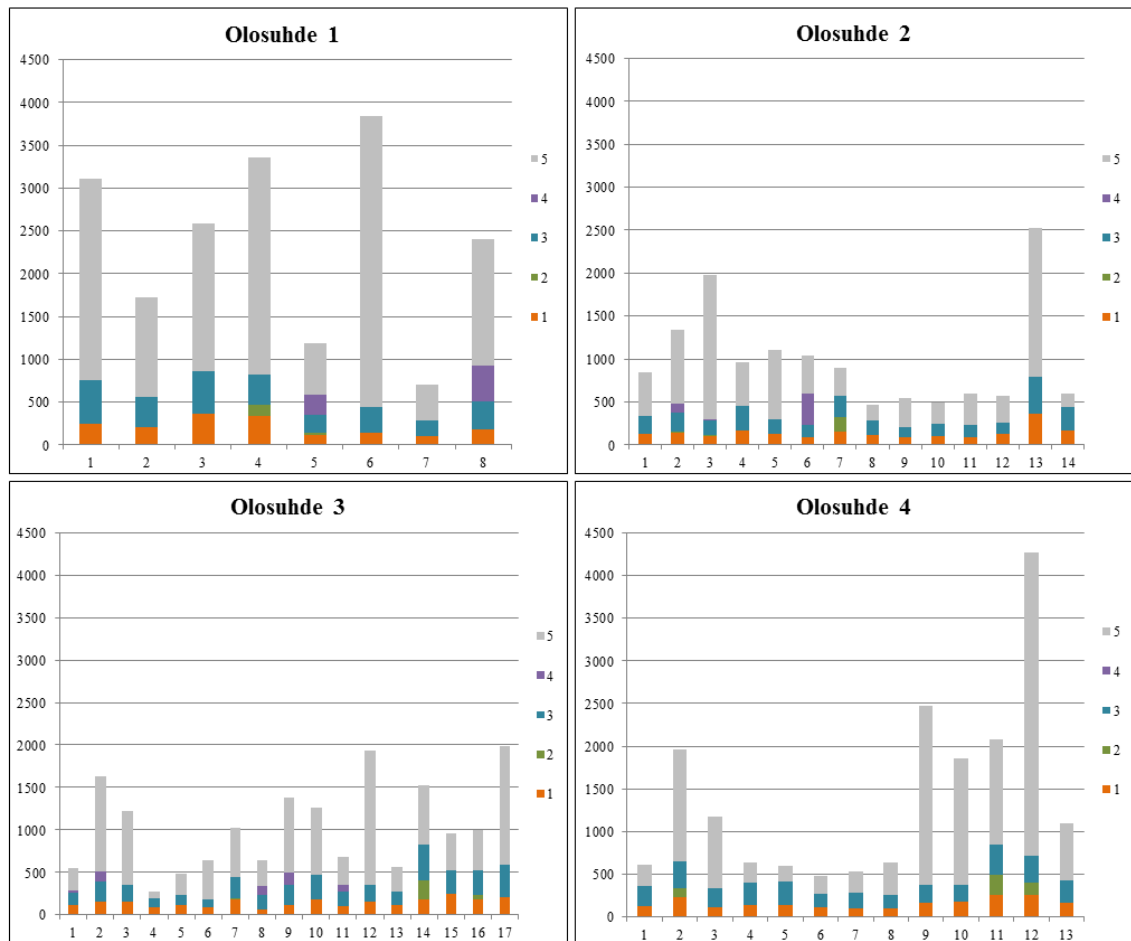
Taulukossa 6 on jokaisesta olosuhteesta kuvattujen videoiden lukumäärä ja videoista analysoitujen solujen/soluaggregaattien yhteenlaskettu lukumäärä. Analysoiduista so-

luista on ilmoitettu erikseen normaalin sykkeen omaavat solut sekä solut joiden sykkeessä esiintyi poikkeamia. Taulukossa 6 on myös ilmoitettu niiden solujen lukumäärä, joita ei voitu analysoida epänormaalien sykkeen vuoksi.

TAULUKKO 6. Kuvatut ja analysoidut solut/soluaggregaatit.

	Olosuhde			
	1	2	3	4
Kuvattuja soluja/soluaggregaatteja	41	44	42	41
Analysoidut solut/soluaggregaatit	8	14	17	13
Normaali syke	5	10	9	10
Epänormaali syke	3	4	8	3
Soluja, joita ei voitu analysoida	7	9	5	7

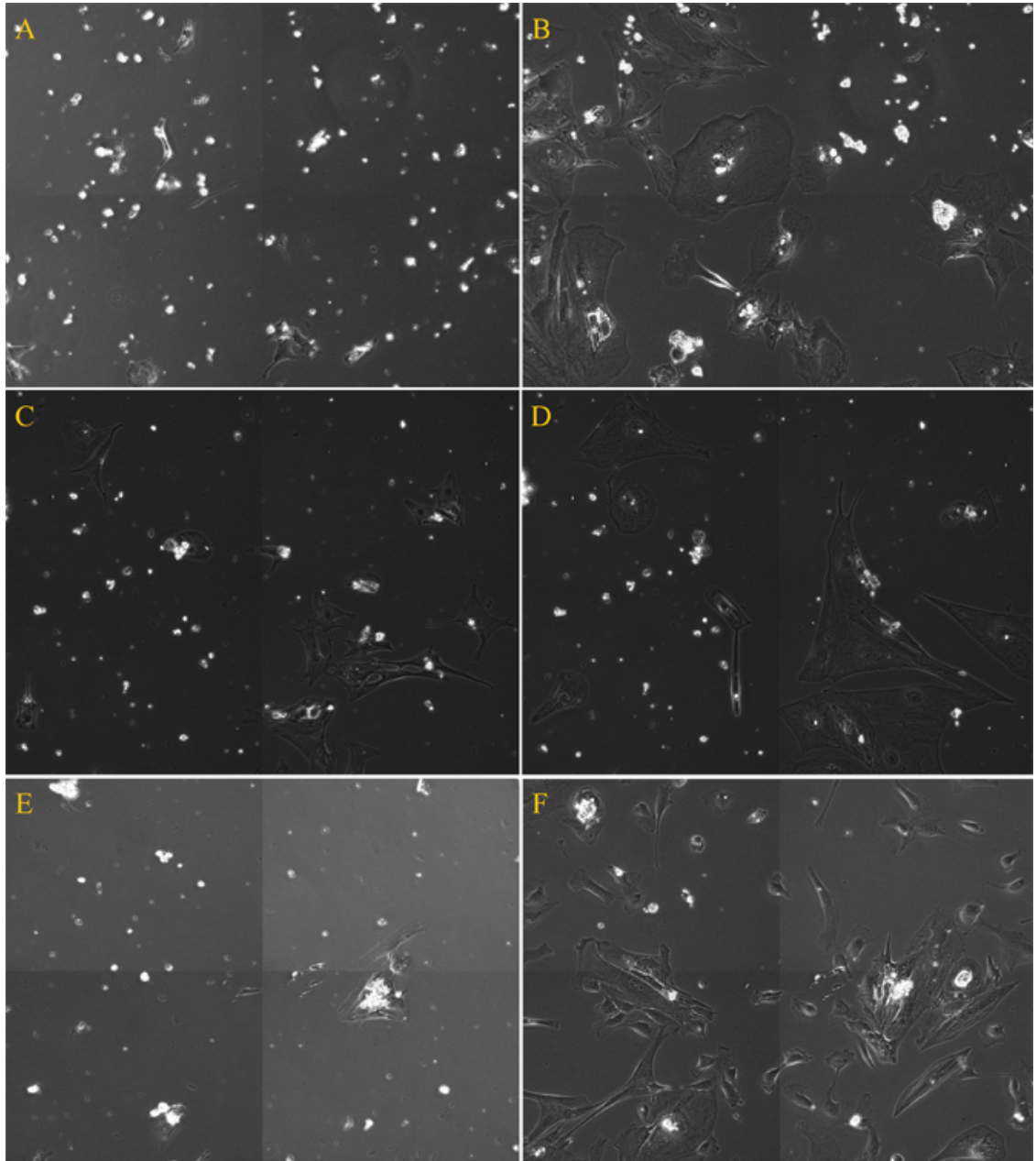
Kuviossa 11 on videoanalyysillä tutkittujen solujen sykkeen vaiheet mahdollisine poikkeamineen. Jokaisesta olosuhteesta on tehty pylväsdiagrammi, johon on lisätty viljelmien A, B ja C tulokset. Kuviossa 11 nähdään Y-akselilla sykäyksien vaiheiden (kuvio 10) kestot millisekunteina ja X-akselilla kuvattu solu. Yhden sykäyksen vaiheet on numeroitu sekä värikoodattu samoin kuin kuviossa 10. Liitteessä 3 on jokaisen olosuhteen tulokset taulukoissa 10–13. Edellä mainituissa taulukoissa on sykkeen vaiheiden yhteenlasketut kestot ilmoitettu millisekunteina ja solun syke yksikössä lyöntiä/minuutti. Liitteessä 3 on myös kuviossa 11 esiintyvät pylväsdiagrammit kuvioina 12–15.



KUVIO 11. Videoanalyysillä tutkittujen solujen sykkeen vaiheet (1–5) mahdollisine poikkeamineen (vaiheet 2 ja 4).

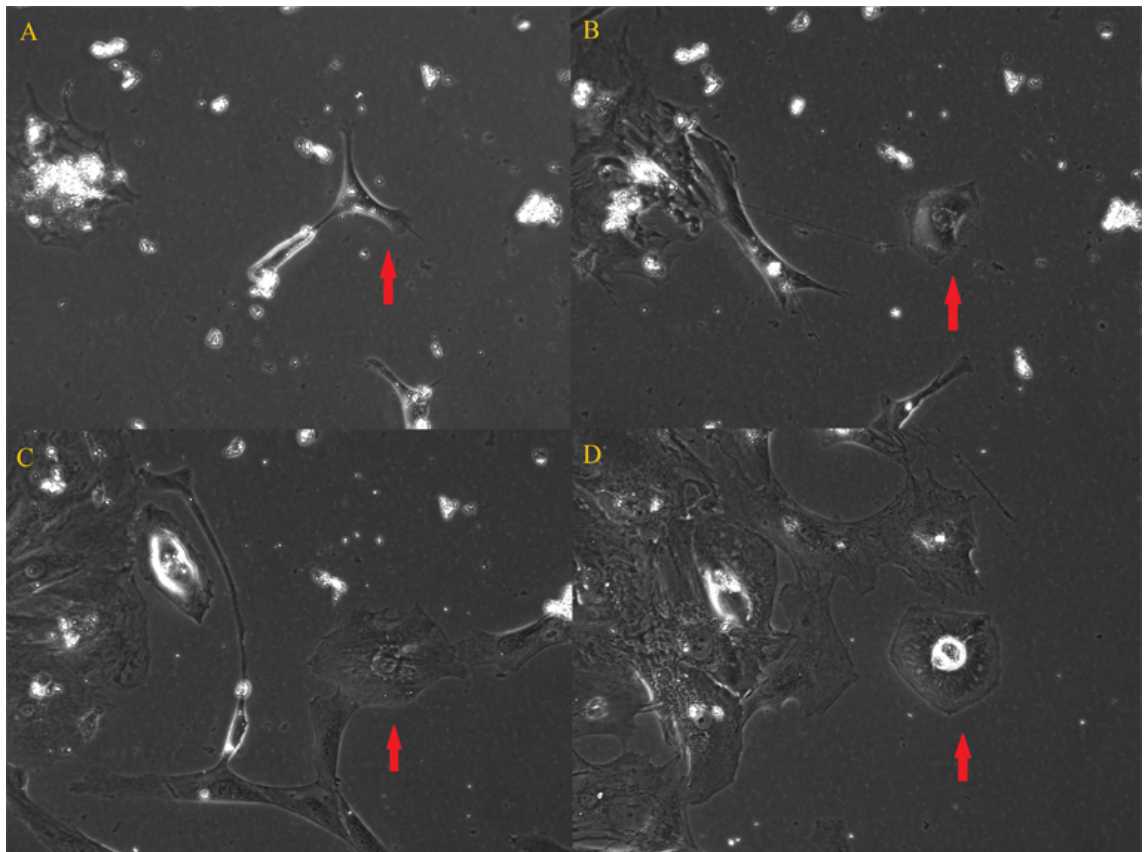
8.3 Cell-IQ

Cell-IQ:n perusteella voitiin selvästi havaita käytetyn laktaattimediumin vaikutus muiden kuin sydänlihassolujen liikkumiseen ja jakautumiseen. Olosuhteiden 2 (laktaatti) ja 3 (yhdistelmä) kaivoissa solujen liikkuminen ja jakautuminen oli huomattavasti vähäisempää verrattuna muihin olosuhteisiin. Osa soluista näytti aloittavan jakautumisen, mutta se joko keskeytyi tai jakautuminen kesti huomattavasti kauemmin verrattuna kontrolliolosuhteeseen. Kondroitiinisulfaattilla ei havaittu olevan vaikutusta soluihin. Olosuhteen 4 (kondroitiinisulfaatti) solut käyttäytyivät samoin kuin olosuhteen 1 (kontrolli) solut. Kuvasta 2 voidaan nähdä kuinka olosuhteissa 1 (kuvat A ja B) ja 4 (kuvat E ja F) solut ovat liikkuneet ja solujen määrä on kasvanut ajan aikana. Olosuhteessa 2 (kuvat C ja D) solujen määrä on pysynyt vakiona.



KUVA 2. Esimerkkikuvat (20 x objektiivi) olosuhteiden 1, 2 ja 4 kaivoilta otettuna samasta kohtaa kaivoa Cell-IQ ajon alussa (vasemmalla) ja lopussa (oikealla).

Cell-IQ videoiden perusteella laktaattimediumilla ja kondroitiinisulfaatilla ei havaittu olevan sydänlihassoluihin vaikutusta. Sydänlihassolujen morfologia sekä käyttäytyminen oli kaikissa olosuhteissa samankaltaista. Solut eivät jakaantuneet ja ne kiinnittyivät hitaasti kuoppalevyn pintaan, jonka jälkeen solut eivät enää liikkuneet kaivossa. Kuvas-
ta 3 voidaan havaita kuinka sydänlihassolu (merkittynä punaisella nuolella) kiinnitty-
ään kuoppalevyn pintaan, ei enää liiku paikoiltaan. Kuvan 3 kuva A on otettu Cell-IQ
ajon ensimmäisenä päivänä ja kuvat B ja C tasaisin aikapistein ajon viimeiseen päivään,
jolloin on otettu kuva D.



KUVA 3. Olosuhteesta 1 (kontrolli) otettu esimerkkikuva (20 x objektiivi), josta voidaan havaita kuinka sydänlihassolu (merkittynä punaisella nuolella) ei enää liiku kiinnittyään kuoppalevyn pintaan.

9 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida iPS-soluista erilaistetuille sydänlihassoluille kasvatusolosuhteet, joilla voitaisiin estää tai vähentää muiden kuin sydänlihassolujen kasvaminen kaivoilla. Kehitetyn menetelmän haluttiin myös parantavan solujen selviytymistä pakastuksesta ja sulatuksesta, jolloin soluja voidaan lähettää Sydänryhmän yhteistyökumppaneille analysoitavaksi. Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata erilaisia kasvatusolosuhteita, joiden avulla päästään asetettuihin tavoitteisiin. Työssä testattiin neljää eri olosuhdetta ja työn tuloksia analysoitiin vasta-ainevärjäyksen, videoanalyysin ja Cell-IQ:n avulla.

Olosuhteiden välillä voitiin vasta-ainevärjäyksen avulla havaita selvä ero viljelmissä A ja B. Viljelmässä C ei havaittu merkittäviä eroavaisuuksia eri olosuhteiden välillä. Tämä voi kuitenkin johtua eriävästä erilaistusmenetelmästä (pienmolekyylierilaistus) sekä solujen pakastus- ja sulatusprosessista. Viljelmässä C solumäärä oli myös huomattavasti pienempi kuin muissa viljelmissä.

Viljelmissä A ja B, etenkin olosuhteissa 2 (laktaatti) ja 3 (yhdistelmä), sydänlihassolujen määrä suhteessa tumiin oli keskimäärin noin 25 prosenttiyksikköä suurempi kuin kontrolliolosuhteessa. Tämän voidaan olettaa olevan laktaattimediumin sekä mahdollisesti 5 % EB-mediumin vaikutusta. Kondroitiinisulfaattilla ei värjäysten perusteella havaittu olevan vaikutusta. Olosuhteiden 2 ja 3 välillä ei ollut merkittäviä eroja, joten olosuhteen 4 (kondroitiinisulfaatti) kontrolliolosuhteeseen verrattuna suurempi tulos on luultavimmin selitettävissä 5 % EB-mediumilla. Kuten voidaan kuitenkin taulukosta 5 (s. 35) havaita on tulosten suhteellinen keskihajonta suuri.

Tuloksiin tuo virhettä muun muassa se, että viljelmien A ja B sydänlihassoluja ja tumia ei voitu laskea kokonaan. Tuloksiin voi myös mahdollisesti vaikuttaa viljelmille eri päivinä tehty fiksaus ja viljelmän C soluille tehty pakastus- ja sulatusprosessi. Viljelmän B solut fiksattiin noin 16 päivää aiemmin kuin muiden viljelmien solut. Tämä on mahdollisesti vaikuttanut kaivoilla olevaan solumäärään, mikä onkin havaittavissa taulukossa 5 (s. 35) viljelmän B olosuhteiden 1 (kontrolli) ja 4 kohdalla. Niissä solumäärät ovat huomattavasti suurempia verrattuna viljelmän A kaivoihin. Viljelmän B olosuhteissa 2

ja 3 oli sen sijaan huomattavasti vähemmän soluja. Tähän on luultavimmin vaikuttanut olosuhteissa laktaattimediumin pitkä vaikutusaika (7 vrk) Cell-IQ –ajon ajan.

Eri viljelmien ja olosuhteiden solumäärissä oli vasta-ainevärjäyksessä huomattavia eroavaisuuksia. Laktaattimediumin annettiin viljelmässä B vaikuttaa koko Cell-IQ ajon ajan (7 päivää), joten tästä syystä olosuhteiden 2 ja 3 solumäärät kyseisessä viljelmässä olivat huomattavasti pienemmät verrattuna olosuhteisiin 1 ja 4. Viljelmän C pienemmät solumäärät johtuivat jo alunperinkin pienemmästä solumäärästä. Viljelmien A ja B tuloksia ei kuitenkaan voida pitää yhtä tarkkoina kuin viljelmän C, sillä suurten solumäärien vuoksi ei A:n ja B:n kaivoilta voitu laskea soluja kokonaisuudessaan.

Videoanalyysin perusteella ei voida tehdä työn tuloksista johtopäätöksiä, sillä eri olosuhteiden välillä ei ollut havaittavissa huomattavia eroja. Kuvatuista videoista vain noin 31 % oli analysointikelpoisia. Tämä johtui mahdollisesti väärästä kuvataajuudesta sekä joissain videoissa ajoittain esiintyvistä huonosta tarkkuudesta ja värinästä. Nämä loivat signaaleihin runsaasti taustakohinaa, mikä vaikeutti solujen analysointia. Poikkeavasta sykkeestä johtuen videoissa oli myös runsaasti analysointiin kelpaamattomia soluja. Joissakin analysoiduissa soluissa voitiin myös havaita poikkeavuuksia sykkeessä. Näitä esiintyi kuitenkin tasaisesti kaikissa olosuhteissa, joten sen perusteella ei voida vetää johtopäätöksiä.

Cell-IQ:n perusteella kondroitiinisulfaatilla ei havaittu olevan vaikutusta soluihin vaan solut käyttäytyivät olosuhteessa 4 samoin kuin olosuhteessa 1 (kontrolli). Sydänlihassoluja lukuun ottamatta solut liikkuivat ja jakaantuivat kaivoilla paljon. Laktaattimediumilla sen sijaan havaittiin olevan vaikutus muihin solutyyppeihin kuin sydänlihassoluihin. Solut jakaantuivat ja liikkuivat huomattavasti vähemmän kuin olosuhteessa 1. Sydänlihassoluihin laktaattimediumilla ei näyttänyt olevan vaikutusta.

Tämän opinnäytetyön perusteella voidaan jatkaa sydänlihassoluille spesifisten viljelyolosuhteiden kehittämistä. Analyseissa saatujen tulosten perusteella laktaattimedium osoittautui lupaavaksi yksittäisten sydänlihassolujen viljelyssä. Glukoosin korvaaminen kasvatusmediumissa laktaatilla on tutkittu menetelmä (Tohyama ym. 2013), jota erilais-tumisvaiheessa käytettäessä on saavutettu sydänlihassolujen suurempi erilaistumise-hokkuus. Esitestien ja varsinaisen työn aikana oli havaittavissa joissain viljelmissä, että yksittäiset sydänlihassolut käynnistivät laktaattimediumissa apoptoosin soluaggregaatte-

ja herkemmin. Tämä antaisi viitteitä siihen, että sydänlihassolut selviävät glukoosin puutteesta paremmin aggregaateina kuin yksittäisinä. Niinpä laktaattimediumin testausta esimerkiksi erilaistuneilla, mutta vielä dissosioimattomilla soluilla voisi harkita.

Solujen toipuminen mahdollisista laktaatin vaikutuksista on tärkeä huomioon otettava asia. Vaikka suoritettujen testien ja visuaalisen tarkkailun avulla ei havaittu huomattavia eroavaisuuksia eri olosuhteiden välillä, tulee kuitenkin ottaa huomioon laktaattimediumin vaikutus mahdollisiin morfologisiin, mekaanisiin, sähköfysiologisiin, biokemiallisiin ja molekyylitason muutoksiin.

Laktaattimediumin vaikutusaika tulisi määrittää tarkemmin, sillä esitestien aikana osa soluista kuoli ollessaan vain alle viikon laktaattimediumissa. Kuitenkin viljelmän B soluja pidettiin laktaattimediumissa seitsemän päivää ja kaivoilla oli vielä runsaasti soluja elossa. Esitestien ja varsinaisen työn aikana myös havaittiin sydänlihassolujen lopettavan sykkimisen niiden altistuessa pitkäaikaisesti laktaattimediumille. Solut kuitenkin jatkoivat sykkimistä, kun niille vaihdettiin EB-medium. Tämä vaikeuttaa sydänlihassolujen visuaalista tunnistamista laktaattimediumin aikana. Jotta voitaisiin tarkemmin selvittää kuinka nopeasti muut kuin sydänlihassolut kuolevat glukoosittomassa laktaattimediumissa, voi olla hyödyllistä viljellä esimerkiksi fibroblasteja, endoteelisoluja ja epiteelisoluja olosuhteen 2 kaltaisissa kasvatusolosuhteissa. Tällä tavoin voidaan olla varmoja, että kaivoilla mahdollisesti vielä elossa olevat solut eivät ole sydänlihassoluja.

Pakastuksesta ja sulatuksesta selviytymiseen testatuilla olosuhteilla ei näyttänyt olevan vaikutusta. Työn aikana kuitenkin havaittiin viitteitä siihen, että pakastus- ja sulatusprosessissa tapahtuva soluhävikki on niin suuri, että soluja tulee pakastaa runsaasti. Tällä tavoin osa niistä selviytyisi elossa. END2-erilaistettuja (viljelmä D) soluja selviytyi vain muutamia prosessista. Tämä voi mahdollisesti johtua alunperin huomattavasti pienemmästä solumäärästä kuin pienmolekyylierilaistetuissa (viljelmä C). Pienmolekyylierilaistuksessa sydänlihassolujen saanto on huomattavasti suurempi, joten soluja voidaan pakastaa suurempia määriä. Tämä parantaa mahdollisuuksia saada osa soluista selviytymään elossa sulatuksesta.

Kim ym. (2011) selvittivät tutkimuksessaan myös solujen pakastusajankohdan vaikutusta solujen selviytymiseen. Tutkimuksessa havaittiin, että erilaistuksen päivänä 12 pakastetut solut selviytyivät sulatuksesta paremmin kuin päivänä 16 pakastetut solut. Kysei-

sessä tutkimuksessa saatuja tuloksia ei kuitenkaan voida täysin verrata tähän työhön, sillä tutkimuksessa käytetyt solut olivat aggregaatteina. (Kim ym. 2011, 258–259.) Kun soluja dissosioidaan, valitaan dissosioitavat soluaggregaatit sykkeen perusteella. Mikäli solujen syke ei ole havaittavissa, ei soluja kannata dissosioida, sillä ei voida olla varmoja, että dissosioitu soluaggregaatti muodostuu sydänlihassoluista. Mikäli siis solut halutaan pakastaa yksittäisinä, voidaan niitä pakastaa vasta siinä vaiheessa kun soluaggregaatit sykkivät. Kuten tutkimuksessakin mainitaan, sydänlihassolut alkavat kuitenkin yleensä sykkimään vasta erilaistuksen päivänä 14 (Kim ym. 2011, 258).

LÄHTEET

- Ahola, A., Kiviaho, A., Larsson, K., Honkanen, M., Aalto-Setälä, K. & Hyttinen, J. 2014. Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation. *Biomedical Engineering OnLine* 13(39).
- Ahola, A., Pradhapan, P., Laurila, E., Aalto-Setälä, K. & Hyttinen, J. 2014. Motion Analysis Method for Determining Cardiomyocyte Beating Properties Based on Digital Image Correlation and Templates. *Computing in Cardiology Conference*, 1137–1140.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewia, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. 6. painos. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. 2011. *Biochemistry*. 7. painos. Boston: Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. & Roitt, I. M. 2011. *Roitt's Essential Immunology*. 12. painos. Wiley-Blackwell.
- FICAM, Finnish Centre for Alternative Methods. 2016. Kineettinen solujen kuvantaminen. Tulostettu 6.3.2016. <http://ficam.fi/fi/menetelmien-kehittaaminen/kineettinen-solujen-kuvantaminen>
- Flashman, E., Redwood, C., Moolman-Smook, J. & Watkins, H. 2004. Review: Cardiac Myosin Binding Protein C: Its Role in Physiology and Disease. *Circulation Research* 94, 1279-1289.
- Fuerstenau-Sharp, M., Zimmermann, M. E., Stark, K., Jentsch, N., Klingenstein, M., Drzymalski, M., Wagner, S., Maier, L. S., Hehr, U., Baessler, A., Fischer, M. & Hengstenberg, C. 2015. Generation of Highly Purified Human Cardiomyocytes from Peripheral Blood Mononuclear Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* 10(5).
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(8), 348–362
- Kantz, A. M. 2006. *Physiology of the Heart*. 4. painos. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 108(3), 407–414.
- Kettunen, R., Hassinen, I., Peuhkurinen, K. & Kupari, M. 2008. Sydänlihaksen rakenne ja toiminnot, sydän pumppuna. Teoksessa Heikkilä, J., Kupari, M., Airaksinen, J., Hui-kuri, H., Nieminen, M. S., & Peuhkurinen, K. (toim.) *Kardiologia*. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 24–51.

Khan, M., Xu, Y., Hua, S., Johnson, J., Belevych, A., Janssen, P. M. L., Gyorke, S., Guan, J. & Angelos, M. G. 2015. Evaluation of Changes in Morphology and Function of Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes (HiPSC-CMs) Cultured on an Aligned-Nanofiber Cardiac Patch. *PLoS ONE* 10(5).

Kim, Y. Y., Ku, S. Y., Liu, H. C., Cho, H. J., Oh, S. K., Moon, S. Y., Choi, Y. M. 2011. Cryopreservation of Human Embryonic Stem Cells Derived-Cardiomyocytes Induced by BMP2 in Serum-Free Condition. *Reproductive Sciences* 18(2), 252–260.

Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V. Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., O'Sullivan, C., Collins, L., Chen, Y., Minami, E., Gill, E. A., Ueno, S., Yuan, C., Gold, J. & Murry, C. E. 2007. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology* 25(9), 1015–1024.

Lahti, A. L., Kujala, V. J., Chapman, H., Koivisto, A.-P., Pekkanen-Mattila, M., Kerke­lä, E., Hyttinen, J., Kontula, K., Swan, H., Conklin, B. R., Yamanaka, S., Silvennoinen, O. & Aalto-Setälä, K. 2012. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis. Model. Mech.* 5(2), 220–230.

de Lara Janz, F., de Aguiar Debes, A., de Cássia Cavaglieri, R., Duarte, S. A., Romão, C. M., Morón, A. F., Zugaib, M. & Bydlowski, S. P. 2012. Evaluation of Distinct Freezing Methods and Cryoprotectants for Human Amniotic Fluid Stem Cells Cryopreservation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, 1–10.

Lian, X., Zhang, J., Azarin, S., Zhu, K., Hazeltine, L. Bao, X., Hsiao, C. Kamp, T. & Palecek, S. 2013. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocols* 8,162–175.

Lieberman, M. & Marks, A. D. 2013. *Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach*. 4. painos. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.

Life Technologies. 2014. *Cell culture basics*. Thermo Fisher Scientific Inc.

McAteer, J. A. & Davis, J. M. 2002. *Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines*. Teoksessa Davis, J. M. (toim). *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. 2. painos. New York: Oxford University Press, 135–189.

Megy, K., Audic, S., Claverie, J-M. 2002. Heart-specific genes revealed by expressed sequence tag (EST) sampling. *Genome Biology* vol 3, 12.

Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendas, P., Spjiker, R., van der Brink, S., Hassink, R., van der Heyden, M., Opthof, T., Pera, M., de la Riviere, A. B., Passier, R. & Tertoolen, L. 2003. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture with Visceral Endoderm-like Cells. *Circulation* 107(21), 2733–2740.

Mummery, C., Zhang, J., Ng, E., Elliot, D., Elefanty, A. & Kamp, T. 2012.

- Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview. *Circulation Research* 111, 344-358
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. 2008. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* 322, 949–953.
- Peuhkurinen, K. & Hassinen, I. 2000. Sydänlihaksen metabolian erityispiirteet. Teoksessa Heikkilä, J., Huikuri, H., Luomanmäki, K., Nieminen, M. S. & Peuhkurinen, K. (toim.) *Kardiologia*. 1. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 20–30.
- Rajala, K., Pekkanen-Mattila, M. & Aalto-Setälä, K. 2011. Review article: Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International* 2011, 1–12.
- Ribeiro, A. J. S., Ang, Y-E., Fu, J-D., Rivas, R. N., Mohamed, T. M. A., Higgs, G. C., Srivastava, D. & Pruitt, B. L. 2015. Contractility of single cardiomyocytes differentiated from pluripotent stem cells depends on physiological shape and substrate stiffness. *Pnas* 112(41), 12705–12710.
- Salameh, A. & Dhein, S. 2005. Culture on neonatal cardiomyocytes. Teoksessa Dhein, S., Mohr, F. W. & Delmar, M. (toim.) *Practical Methods in Cardiovascular Research*. New York: Springer-Verlag Berlin Heiderberg. 568–576.
- Sarantitis, I., Papanastasopoulos, P., Manousi, M., Baikoussis, N. G. & Apostolakis, E. 2012. The Cytoskeleton of the Cardiac Muscle Cell. *Hellenic Journal of Cardiology* 53(5), 367–379.
- Servier. 2016. Servier Medical Art. Powerpoint image bank. Tulostettu 5.1.2016. <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>
- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. & Hochedlinger, K. 2008. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science* 322(5903), 945–949.
- Stephens, D. J. & Allans, V. J. 2008. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* 300, 82–86.
- Tajsharghi, H. 2008. Thick and Thin Filament Gene Mutations in Striated Muscle Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 1259–1275.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126(4), 663–676 . 08/2006.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131(5), 861–872. 11/2007
- Tohyama, T., Hattori, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., Yamashita, H., Satoh, Y., Egashira, T., Seki, T., Muraoka, N., Yamakawa, N., Ohgino, Y., Tanaka, T., Yoichi, M., Yuasa, S., Murata, M., Suematsu, M., & Fukuda, K. 2013. Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell* 12(1), 127–137.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta (TENK), Valtakunnallinen terveydenhuollon eettinen neuvottelukunta (ETENE), ETENE:n Lääketieteellinen tutkimuseettinen jaosto (TUKI-JA), Koe-eläintoiminnan yhteistyöryhmä (KYTÖ), Biotekniikan neuvottelukunta (BTNK) & Geenitekniikan lautakunta (GTLK). 2003. Ihmisen kantasolut, kloonaus ja tutkimus. Vantaa: Kirjapaino Keili Oy.

Woltjen, K., Michaeli, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H-K. & Nagy, A. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.

Yamanaka, S. 2012. Review: Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present and Future. *Cell* 10(6), 678–684.

Yang, L., Soonpaa, M. H., Adler, E. D., Roepke, T. K., Kattman, S. J., Kennedy, M., Henekaerts, E., Bonham, K., Abbott, G. W., Linden, R. M., Field, L. J. & Keller, G. W. 2008. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic stem-cell-derived population. *Nature* 453, (7194), 524–528, 2008.

Yu J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. & Thomson, J. A. 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318 (5858), 1917–1920.

LIITTEET

Liite 1. Lista kasvatusmedieumeissa käytetyistä reagensseista

20 % EB-medium (20% FBS KO-DMEM), 50 ml

38,75 ml	KO-DMEM
10 ml	FBS
0,5 ml	NEAA
0,5 ml	Glutamax
0,25 ml	Pen/Strep

5 % EB-medium (5% FBS KO-DMEM), 50 ml

46,25 ml	KO-DMEM
2,5 ml	FBS
0,5 ml	NEAA
0,5 ml	Glutamax
0,25 ml	Pen/Strep

5 mM laktaattimedium, 50 ml

49,75 ml	DMEM
250 µl	Pen/Strep
35 µl	Sodium-DL-lactate

Liite 2. Vasta-ainevärijättyjen sydänlihassolujen määrä suhteessa tumien määrään

1(3)

TAULUKKO 7. Viljelmä A.

Olosuhde	Kaivo	kuva 1			kuva 2			kuva 3		
		sydänlihass.	tumat	suhdel.	sydänlihass.	tumat	suhdel.	sydänlihass.	tumat	suhdel.
1	1A	6	7	0,857	6	10	0,600	12	17	0,706
	1B	10	38	0,263	10	68	0,147	10	32	0,313
	1C	38	176	0,216	9	27	0,333	1	11	0,091
	1D	21	116	0,181	12	30	0,400	4	10	0,400
2	2A	4	11	0,364	8	10	0,800	4	8	0,500
	2B	7	19	0,368	9	12	0,750	9	27	0,333
	2C	49	117	0,419	12	21	0,571	10	25	0,400
	2D	11	18	0,611	29	59	0,492	19	38	0,500
3	3A	2	3	0,667	4	3	1,333	4	8	0,500
	3B	22	50	0,440	10	65	0,154	9	48	0,188
	3C	14	237	0,059	53	121	0,438	79	318	0,248
	3D	5	6	0,833	10	16	0,625	9	13	0,692
4	4A	4	10	0,400	49	75	0,653	7	19	0,368
	4B	16	28	0,571	8	11	0,727	16	18	0,889
	4C	27	33	0,818	61	92	0,663	46	79	0,582
	4D	9	11	0,818	27	47	0,574	17	26	0,654

Olosuhde	Kaivo	Kaivon keskiarvo			Otoskeskihajonta		Suhteellinen keskihajonta (RSD)
		sydänlihass.	tumat	suhdeluku	Otos (n)	(s)	
1	1A	8,00	11,33	0,721	3	0,129	17,92 %
	1B	10,00	46,00	0,241	3	0,085	35,26 %
	1C	16,00	71,33	0,213	3	0,121	56,81 %
	1D	12,33	52,00	0,327	3	0,126	38,66 %
2	2A	5,33	9,67	0,555	3	0,223	40,26 %
	2B	8,33	19,33	0,484	3	0,231	47,76 %
	2C	23,67	54,33	0,463	3	0,094	20,29 %
	2D	19,67	38,33	0,534	3	0,067	12,49 %
3	3A	3,33	4,67	0,833	3	0,441	52,92 %
	3B	13,67	54,33	0,260	3	0,156	60,05 %
	3C	48,67	225,33	0,249	3	0,189	76,24 %
	3D	8,00	11,67	0,717	3	0,106	14,83 %
4	4A	20,00	34,67	0,474	3	0,156	32,95 %
	4B	13,33	19,00	0,729	3	0,159	21,77 %
	4C	44,67	68,00	0,688	3	0,120	17,43 %
	4D	17,67	28,00	0,682	3	0,124	18,22 %

Olosuhde	Koko olosuhteen keskiarvo					
	Otos (n)	Sydänlihass.	Tumat	Prosentit	Otoskeskihajonta (s)	Suhteellinen keskihajonta (RSD)
1	12	11,58	45,17	37,56 %	23,50 %	62,57 %
2	12	14,25	30,42	50,90 %	15,06 %	29,58 %
3	12	18,42	74,00	51,48 %	35,24 %	68,45 %
4	12	23,92	37,42	64,33 %	15,88 %	24,69 %

TAULUKKO 8. Viljelmä B.

Olosuhde	Kaivo	kuva 1			kuva 2			kuva 3		
		sydänlihass.	tumat	suhdel.	sydänlihass.	tumat	suhdel.	sydänlihass.	tumat	suhdel.
1	2A	56	121	0,463	36	78	0,462	19	94	0,202
	2B	36	89	0,404	45	294	0,153	34	81	0,420
	2C	77	152	0,507	22	145	0,152	32	562	0,057
	2D	30	80	0,375	16	25	0,640	86	169	0,509
2	3A	11	15	0,733	11	16	0,688	4	4	1,000
	3B	4	13	0,308	7	7	1,000	14	23	0,609
	3C	13	13	1,000	12	16	0,750	15	18	0,833
	3D	18	26	0,692	13	19	0,684	9	11	0,818
3	4A	8	10	0,800	1	4	0,250	30	31	0,968
	4B	15	26	0,577	6	6	1,000	16	18	0,889
	4C	7	21	0,333	19	23	0,826	2	3	0,667
	4D	15	20	0,750	11	16	0,688	13	16	0,813
4	5A	65	160	0,406	61	105	0,581	39	76	0,513
	5B	61	130	0,469	36	81	0,444	44	217	0,203
	5C	39	88	0,443	92	158	0,582	53	273	0,194
	5D	139	177	0,785	144	361	0,399	72	732	0,098

Olosuhde	Kaivo	Kaivon keskiarvo			Otoskeskihajonta		Suhteellinen keskihajonta (RSD)
		sydänlihass.	tumat	suhdeluku	Otos (n)	(s)	
1	1A	37,00	97,67	0,375	3	0,150	39,98 %
	1B	38,33	154,67	0,326	3	0,150	45,97 %
	1C	43,67	286,33	0,238	3	0,237	99,42 %
	1D	44,00	91,33	0,508	3	0,133	26,09 %
2	2A	8,67	11,67	0,807	3	0,169	20,91 %
	2B	8,33	14,33	0,639	3	0,347	54,34 %
	2C	13,33	15,67	0,861	3	0,127	14,78 %
	2D	13,33	18,67	0,732	3	0,075	10,27 %
3	3A	13,00	15,00	0,673	3	0,375	55,82 %
	3B	12,33	16,67	0,822	3	0,219	26,69 %
	3C	9,33	15,67	0,609	3	0,251	41,31 %
	3D	13,00	17,33	0,750	3	0,063	8,33 %
4	4A	55,00	113,67	0,500	3	0,088	17,61 %
	4B	47,00	142,67	0,372	3	0,147	39,56 %
	4C	61,33	173,00	0,407	3	0,197	48,37 %
	4D	118,33	423,33	0,428	3	0,344	80,55 %

Olosuhde	Koko olosuhteen keskiarvo					
	Otos (n)	Sydänlihass.	Tumat	Prosentit	Otoskeskihajonta (s)	Suhteellinen keskihajonta (RSD)
1	12	40,75	157,50	36,19 %	17,88 %	49,40 %
2	12	10,92	15,08	75,96 %	19,67 %	25,89 %
3	12	11,92	16,17	71,33 %	23,15 %	32,46 %
4	12	70,42	213,17	42,66 %	19,06 %	44,69 %

TAULUKKO 9. Viljelmä C.

Olosuhde	Kaivo	sydänlihass.	tumat	suhdel
1	1A	4	16	0,250
	1B	8	57	0,140
	1C	6	32	0,188
	1D	4	7	0,571
2	2A	21	124	0,169
	2B	6	40	0,150
	2C	9	47	0,191
	2D	9	13	0,692
3	3A	20	120	0,167
	3B	28	134	0,209
	3C	27	141	0,191
	3D	10	21	0,476
4	4A	13	48	0,271
	4B	22	65	0,338
	4C	17	144	0,118
	4D	5	33	0,152

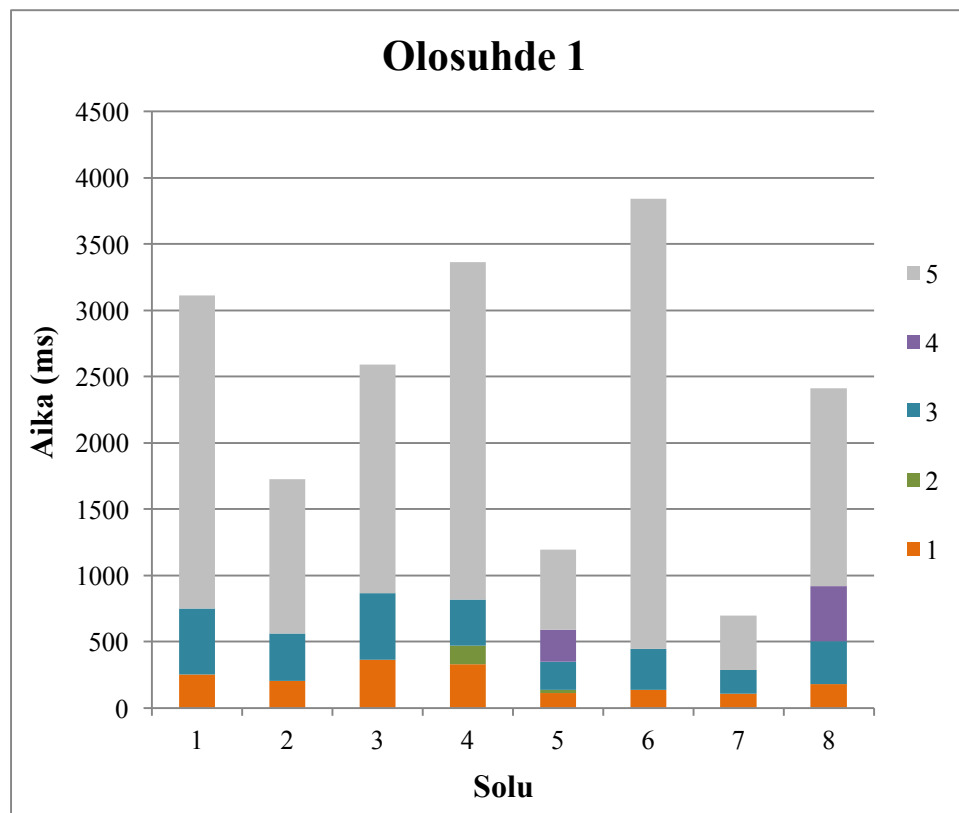
Olosuhde	Olosuhteen keskiarvo					
	Otos (n)	Sydänlihass.	Tumat	Prosentit	Otoskeskihajonta (s)	Suhteellinen keskihajonta (RSD)
1	4	5,50	28,00	28,73 %	19,47 %	67,75 %
2	4	11,25	56,00	30,08 %	26,16 %	86,96 %
3	4	21,25	104,00	26,08 %	14,46 %	55,45 %
4	4	14,25	72,50	21,97 %	10,28 %	46,78 %

Liite 3. Videoanalyysin tulokset

1(4)

TAULUKKO 10. Olosuhteen 1 (kontrolli) videoanalyysin tulokset millisekunneina (ms).

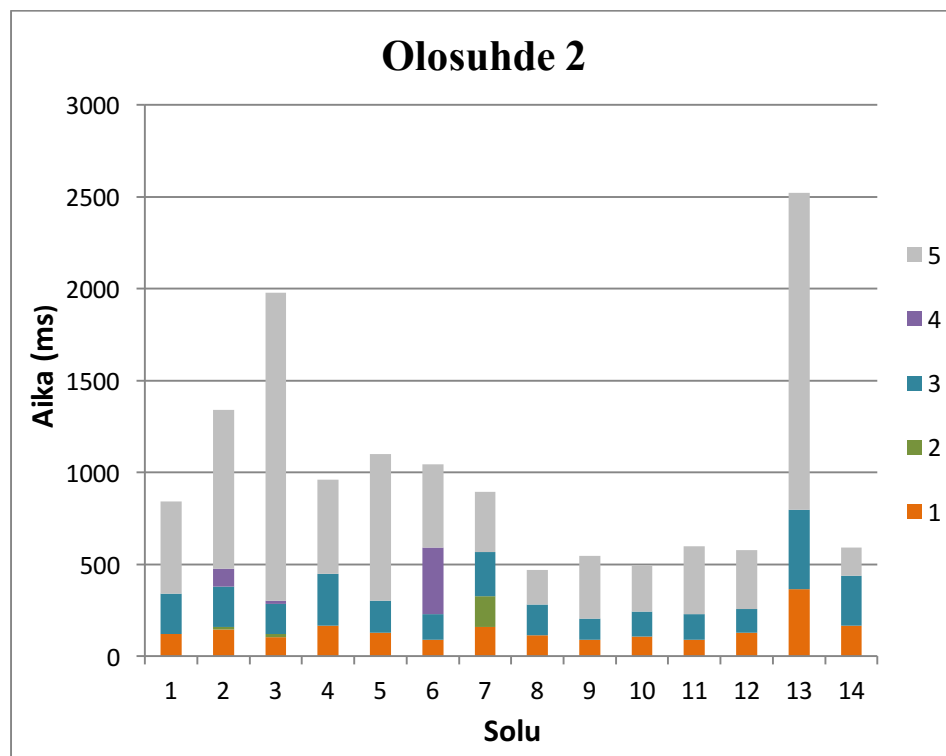
Solu	Supistus	Supistuneena	Relaksaatio	Epätäydellinen relaksaatio	Relaksoitunut	Syke
1	250,00	0,00	500,00	0,00	2363,63	18,38
2	204,54	0,00	356,06	0,00	1166,67	31,81
3	363,63	0,00	500,00	0,00	1727,27	22,00
4	331,82	136,36	350,00	0,00	2545,45	17,03
5	113,64	22,73	210,23	244,32	602,27	67,69
6	136,36	0,00	310,61	0,00	3393,94	14,92
7	106,06	0,00	181,82	0,00	409,09	69,47
8	181,82	0,00	323,86	414,77	1488,64	23,15



KUVIO 12. Olosuhteen 1 (kontrolli) videoanalyysin tulokset pylvasdiagrammina. Y-akselilla aika millisekunneina ja X-akselilla kuvattu solu.

TAULUKKO 11. Olosuhteen 2 (laktaatti) videoanalyysin tulokset millisekunteinä (ms).

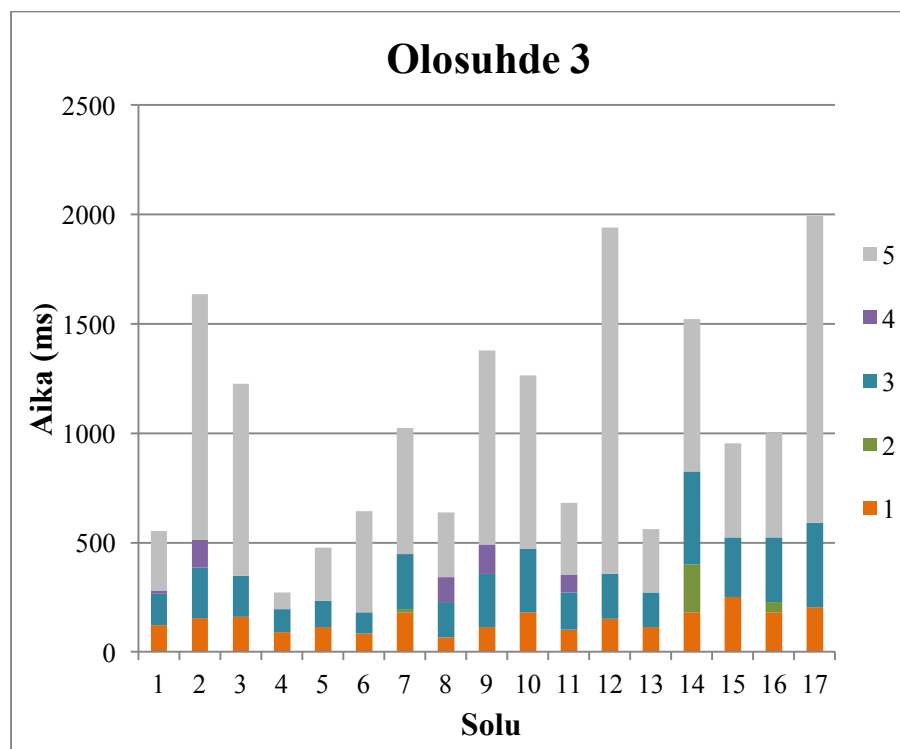
Solu	Supistus	Supistuneena	Relaksaatio	Epätäydellinen relaksaatio	Relaksoitunut	Syke
1	121,21	0,00	219,70	0,00	500,00	58,67
2	143,94	15,15	219,70	98,48	863,64	39,40
3	102,27	17,05	164,77	17,05	1676,14	27,89
4	166,67	0,00	280,30	0,00	515,15	53,88
5	128,79	0,00	174,24	0,00	795,45	49,81
6	90,91	0,00	136,36	363,64	454,55	48,89
7	159,09	166,67	242,42	0,00	325,76	56,17
8	113,64	0,00	166,67	0,00	189,39	101,54
9	90,91	0,00	113,64	0,00	340,91	110,00
10	106,06	0,00	136,36	0,00	250,00	97,78
11	90,91	0,00	136,36	0,00	371,21	91,03
12	128,79	0,00	128,79	0,00	318,18	80,83
13	363,64	0,00	431,82	0,00	1727,27	22,56
14	166,67	0,00	272,73	0,00	151,52	80,00



KUVIO 13. Olosuhteen 2 (laktaatti) videoanalyysin tulokset pylväsdiagrammina. Y-akselilla aika millisekunteinä ja X-akselilla kuvattu solu.

TAULUKKO 12. Olosuhteen 3 (yhdistelmä) videoanalyysin tulokset millisekunneina (ms).

Solu	Supistus	Supistuneena	Relaksaatio	Epätäydellinen relaksaatio	Relaksoitunut	Syke
1	121,21	0,00	143,94	15,15	272,73	82,50
2	153,41	0,00	232,95	125,00	1125,00	33,00
3	159,09	0,00	189,39	0,00	878,79	42,58
4	90,91	0,00	106,06	0,00	75,76	132,00
5	113,64	0,00	121,21	0,00	242,42	101,54
6	83,33	0,00	98,48	0,00	462,12	78,43
7	181,82	15,15	250,00	0,00	575,76	50,77
8	68,18	0,00	159,09	113,64	295,45	73,33
9	113,64	0,00	242,42	136,36	886,36	46,36
10	181,82	0,00	287,88	0,00	795,45	42,58
11	102,27	0,00	170,45	79,55	329,55	69,47
12	151,52	0,00	204,55	0,00	1583,33	28,39
13	113,64	0,00	159,09	0,00	287,88	80,83
14	181,82	219,70	424,24	0,00	696,97	35,2
15	250,00	0,00	272,73	0,00	431,82	53,88
16	181,82	45,45	295,45	0,00	477,27	51,76
17	204,55	0,00	386,36	0,00	1401,52	27,79

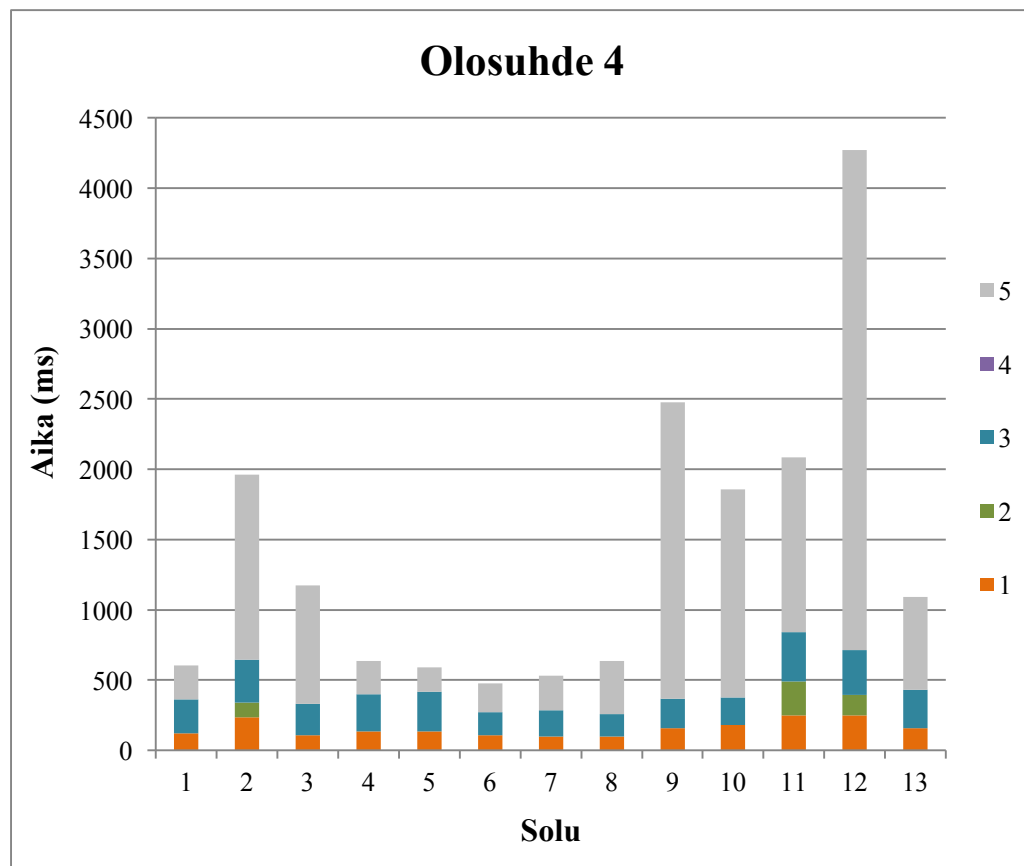


KUVIO 14. Olosuhteen 3 (yhdistelmä) videoanalyysin tulokset pylväsdiagrammina. Y-akselilla aika millisekunneina ja X-akselilla kuvattu solu.

4(4)

TAULUKKO 13. Olosuhteen 4 (kondroitiinisulfaatti) videoanalyysin tulokset millisekunteinä (ms).

Solu	Supistus	Supistuneena	Relaksaatio	Epätäydellinen relaksaatio	Relaksoitunut	Syke
1	121,21	0,00	242,42	0,00	242,42	82,2
2	234,85	106,06	303,03	0,00	1318,18	28,39
3	106,06	0,00	227,27	0,00	840,91	44,25
4	136,36	0,00	265,15	0,00	234,85	80,00
5	136,36	0,00	280,30	0,00	174,24	77,65
6	106,06	0,00	166,67	0,00	204,55	91,03
7	98,48	0,00	189,39	0,00	242,42	92,12
8	98,48	0,00	159,09	0,00	378,79	73,33
9	159,09	0,00	210,23	0,00	2107,95	22,56
10	181,82	0,00	196,97	0,00	1477,27	31,43
11	250,00	242,42	348,48	0,00	1242,42	26,67
12	250,00	143,94	318,18	0,00	3560,61	13,54
13	159,09	0,00	272,73	0,00	659,09	47,14



KUVIO 15. Olosuhteen 4 (kondroitiinisulfaatti) videoanalyysin tulokset pylväsdiagrammina. Y-akselilla aika millisekunteinä ja X-akselilla kuvattu solu.