



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

ADIPOGENEESIMALLIN KEHITTÄMINEN

Komponenttien pakastuksen ja viljelyn optimointi
sekä monosyyttien vaikutus rasvan määrään

Tuula Järvinen

Opinnäytetyö
Helmikuu 2016
Laboratorioalan koulutusohjelma



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

JÄRVINEN, TUULA:

Adipogeneesimallin kehittäminen

Komponenttien pakastuksen ja viljelyn optimointi sekä monosyyttien vaikutus rasvan määrään

Opinnäytetyö 57 sivua, joista liitteitä 7 sivua

Helmikuu 2016

Rasvakudos ja rasvasolut toimivat kehon energiavarastona. Liikalihavilla ihmisillä valkoisessa rasvakudoksessa vallitsee jatkuva tulehdustila, jolloin immuunisolujen määrä kudoksessa nousee. Adipogeneesiä eli rasvasolujen erilaistumista tutkimalla voidaan tulevaisuudessa kehittää muun muassa lääkehoitoja, joilla voitaisiin vaikuttaa ylipainoon ja sen seurauksena kehittyviin sairauksiin. Koska eläinten biologia on erilainen kuin ihmisbiologia, ihmissolupohjaiset *in vitro* -mallit voivat tarjota luotettavamman, nopeamman ja eettisemmän vaihtoehdon eläinoketutkimukselle.

Opinnäytetyön tavoitteena oli jatkokehittää FICAM:n (Finnish Centre for Alternative Methods) adipogeneesimallia. Tarkoituksena oli tutkia, voidaanko seerumiton kasvatusliuosta käyttää rasvan kantasolujen (hASC) viljelyssä, saadaanko uudella pakastusliuksella hASC-solujen ja monosyyttien pakastamisessa parempi selviytymisprosentti sekä sitä, vaikuttavatko monosyytit rasvan kertymiseen adipogeneesimallissa. Kasvatusliuoskokeissa tarkasteltiin solujen morfologiaa, saantoa, elävyyttä sekä proteiinimarkkerien CD73, CD90 ja CD105 ilmentymistä. Pakastusliuoskokeissa tarkasteltiin hASC-solujen ja monosyyttien morfologiaa, saantoa ja elävyyttä. Adipogeneesimallikokeissa tarkasteltiin WST-1- ja AdipoRed Assay -värjäysten avulla hASC-solujen rasvanmuodostuskykyä monosyyttien kanssa viljeltäessä.

Kasvatusliuoskokeiden perusteella FICAM ei ota FreeAdd-seeruminkorviketta käyttöön hASC-solujen viljelyssä. Perustestiliuos on lupaavampi seerumiton vaihtoehto, mutta ennen mahdollista viljelykäyttöönottoa tulisi optimoida kasvatusajan pituus sekä tutkia hASC-solujen proteiinimarkkerien ilmentymistä. Pakastusliuoskokeiden perusteella FICAM ottaa Stem-CellBanker-liuksen käyttöön monosyyttien pakastamisessa. hASC-soluilla havaittiin proteiinimarkkerin CD105 ekspresion kasvu, ja jos tämä varmistuu jatkokokeissa, Stem-CellBanker otetaan käyttöön myös hASC-solujen pakastamisessa. Adipogeneesimallikokeissa nähtiin viitteitä siitä, että monosyyttien läsnäolo saattaa lisätä hASC-solujen rasvanmuodostusta. Jatkotutkimuksissa voidaan tarkastella myös sitä, muuttuuko rasvasolujen geeniekspressio tai eritystoiminta monosyyttien läsnä ollessa.

Asiasanat: rasvakudos, adipogeneesi, hASC, monosyytti, *in vitro* -malli

ABSTRACT

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

JÄRVINEN, TUULA:

Improvement of Adipogenesis Model

Optimization of Freezing and Culturing Components, and How Monocytes Influence the Amount of Fat

Bachelor's thesis 57 pages, appendices 7 pages

February 2016

Adipose tissue and adipocytes are the body's energy reserve. Obesity is associated with a low-grade inflammation of white adipose tissue, when the number of immune cells in tissue increases. In the future for example medication for obesity, and treatment for diseases caused by obesity, may be generated by researching adipogenesis. Animal biology is very different from human biology, so using human cells in *in vitro* -models may offer a more reliable, faster and more ethical option for animal experiments.

The aim of the thesis was to improve FICAM's (Finnish Centre for Alternative Methods) adipogenesis model. The purpose was to study if a serum-free medium could be used when culturing adipose stem cells (hASC): the morphology, number and viability of cells and expression of proteins CD73, CD90 and CD105 was determined. The second purpose was to study if a new freezing solution would enable better survival when freezing hASCs and monocytes, by determining the morphology, number and viability of cells. The third purpose was to study whether monocytes have an influence on fat accumulation in the adipogenesis model: hASC cell's ability to collect fat was analysed with WST-1 staining and AdipoRed Assay staining.

Because of the results with serum-free mediums, FICAM will not start using FreeAdd serum replacement when culturing hASCs. FICAM's own serum-free medium is a more promising option, but the length of the culturing period should be optimized and hASC's protein expression should be studied before introduction. FICAM will start using Stem-CellBanker when freezing monocytes. It was found that expression of the hASC protein CD105 increased with the new freezing solution, and if this will be confirmed in further studies, FICAM will start using Stem-CellBanker when freezing hASCs. It was also found that monocytes in the adipogenesis model might increase the fat accumulation of hASCs. In further studies it could be analysed if monocytes affect gene expression or protein secretion of hASCs.

Key words: adipose tissue, adipogenesis, hASC, monocyte, *in vitro* -models

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	TEORIATAUSTA.....	9
2.1	Rasvakudos	9
2.1.1	Rasvan stroomasolut	11
2.1.2	Adipogeneesi.....	11
2.1.3	Matala-asteinen tulehdus rasvakudoksessa.....	13
2.2	Tyypin 2 diabetes.....	14
2.3	Rasvakudosmallit.....	15
2.4	Rasvakudosuute	16
2.5	Kantasolut	16
2.6	Monosyytit.....	17
2.7	Seerumi kasvatusliuoksissa.....	19
2.8	Tutkimusmenetelmät	20
2.8.1	Solujen elävyyden mittaaminen	20
2.8.2	Solujen pakastaminen.....	21
2.8.3	Virtaussytometria	22
2.8.4	Rasvan määrän mittaaminen	23
3	TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS.....	24
4	TYÖN SUORITUS	25
4.1	Solujen alkuperä	25
4.2	Soluviljelykäytännöt	25
4.2.1	Solujen herätys	26
4.2.2	Solulaskut.....	26
4.3	Kasvatusliuoskokeiden suoritus.....	27
4.4	Pakastusliuoskokeiden suoritus	28
4.4.1	Pakastusliuos hASC-soluille	28
4.4.2	hASC-solujen valmistelu virtaussytometriaa varten.....	29
4.4.3	Pakastusliuos monosyyteille	29
4.5	Adipogeneesimallikokeet.....	31
4.5.1	Solujen kasvatus.....	31
4.5.2	Analyysimenetelmät.....	32
5	TULOKSET	34
5.1	Kasvatusliuoskokeiden tulokset.....	34
5.2	Pakastusliuoskokeiden tulokset	37
5.3	Adipogeneesimallikokeiden tulokset.....	40

6	POHDINTA.....	42
6.1	Kasvatusliuoskokeet	42
6.2	Pakastusliuoskokeet	43
6.3	Adipogeneesimalli	44
6.4	Yhteenveto	45
	LÄHTEET.....	47
	LIITTEET	51
	Liite 1. Kasvatusliuosten valmistusohjeet	51
	Liite 2. Pakastusliuosten valmistusohjeet.....	53
	Liite 3. Virtaussytometria-liuokset.....	54
	Liite 4. Adipogeneesimallin liuosten valmistusohjeet	55
	Liite 5. hASC-solujen tulokset	56
	Liite 6. Monosyyttien tulokset.....	57

LYHENTEET JA TERMIT

Adipogeneesi	Rasvasolun erilaistumisprosessi kantasolusta
Adiposyytti	Rasvasolu
ATE	(Adipose Tissue Extract), rasvakudosuute, rasvakudoksesta eristetty soluton rasvan muodostumista edistävä materiaali
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DPBS	(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), fosfaattipuskuroitu suolaliuos, joka ei sisällä kalsiumia eikä magnesiumia
Elävyyssprosentti	Elävien solujen prosentuaalinen osuus solupopulaatiosta
FACS	(Fluorescence-Activated Cell Sorting), fluoresenssiin perustuva soluerottelumenetelmä
FICAM	(Finnish Centre for Alternative Methods), Suomen vaihtoehtomenetelmäkeskus
GLP	(Good Laboratory Practice), hyvä laboratoriokäytäntö -laatu järjestelmä
hASC	(human Adipose Stromal Cell), strooma-vaskulaarifraktio, rasvan kantasolut
Insuliiniresistenssi	Tila, jossa insuliinin vaikutus on heikentynyt
<i>In vitro</i>	Elävän organismin ulkopuolella suoritettu testi
<i>In vivo</i>	Elävässä organismissa suoritettu testi
Konfluentti	Elävät solut peittävät lähes 100 % viljelyastian pinta-alasta
Makrofagi	Kudoksissa esiintyvä syöjäsolu, erilaistuvat monosyyteistä
MS	Monosyytti, veressä esiintyvä syöjäsolu
PBS	(Phosphate-Buffered Saline), fosfaattipuskuroitu suolaliuos

1 JOHDANTO

Viranomaismääritelmän mukaan eläinkokeella tarkoitetaan toimenpidettä, jossa eläimelle on tutkimustarkoituksessa aiheutettu vähintään neulanpistoon verrattavaa kipua, tuskaa, kärsimystä tai pysyvää haittaa. Vuonna 2013 Suomessa astui voimaan uudistettuun EU-direktiiviin pohjautuva koe-eläinten suojelua koskeva lakiuudistus, mutta tilastotiedoissa ei ole vielä nähtävissä merkittävää eläinkokeiden vähenemistä. (Lääninhallitus & ELLA-Eläinkoelautakunta 2015.) EU:n alueella eniten koe-eläimiä käytetään biologiseen perustutkimukseen sekä ihmis-, hammas- ja eläinlääketieteen tutkimus- ja kehitystyöhön (Euroopan komissio 2013).

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivin 2010/63/EU 4. artiklan mukaan Euroopan unionin jäsenvaltioiden tulee käyttää niin vähän koe-eläimiä kuin mahdollista hankkeen tavoitteiden vaarantumatta, sekä eläimiä käytettäessä minimoida toimenpiteestä aiheutuva haitta. Jokainen eläimiä käyttävä tutkimushanke arvioidaan ennen tutkimusluvan myöntämistä, ja samalla selvitetään voidaanko tutkimus tehdä eläinkokeettomasti. Jäsenvaltioiden on myös edistettävä vaihtoehtoisten menetelmien kehittämistä ja validointia sekä huolehdittava niitä koskevan tiedon kansainvälisestä jakamisesta.

Suurin ongelma eläinkokeissa on se, että eläinten biologia on erilainen kuin ihmisbiologia. Sen vuoksi ihmisvaikutuksia arvioitaessa eläimet mallintavat kemikaalien haittoja verrattain huonosti. (Basketter ym. 2012, 16.) Erittäin selvästi tämä näkyy lääkekehityksen huonona onnistumisena: yli 90 % kokeellisen vaiheen läpäisseistä lääkekandidaateista kaatuu jossakin kliinisessä vaiheessa (Arrowsmith & Miller 2013, 569). Vaikka tarvetta eläinkokeettomille menetelmille on, tiedon puutteen ja validoitujen, viranomais- ja hyväksytyjen testimenetelmien vähyden vuoksi niiden käyttö tutkimuksessa on vielä vähäistä. Sen vuoksi olisi tärkeää luoda tutkijoiden käyttöön luotettavia, eläinkokeettomia ihmistä mallintavia menetelmiä. (Heinonen 2015, 32, 36.)

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston lääketieteen yksikköön kuuluvalla FICAM-tutkimusryhmälle (Finnish Centre for Alternative Methods). FICAM toimii eläinkokeettomien vaihtoehtomenetelmien asiantuntijakeskuksena Suomessa. Yhtenä sen tavoitteena on vähentää koe-eläinten käyttöä kehittämällä ja validoimalla GLP (Good Laboratory Practice) -tasoisia ihmissolu- ja kudoksalleja korvaamaan tutkimuksessa ja

teollisuudessa käytettäviä eläinkokeita. Tutkimus on toteutettu GLP:n periaatteiden mukaisesti, ja sen ohjaajana toimi väitöskirjatutkija, FM, Outi Huttala sekä arvioijana vanhempi tutkija, FT, Tarja Toimela.

Rasvakudoksen kehittymisen ja solujen rasvanmuodostuksen tutkiminen on tärkeää lihavuuden sekä sen seurauksena kehittyvien sairauksien, kuten tyypin 2 diabeteksen, tutkimisessa. FICAM:n adipogeenesimalli koostuu ihmisen rasvakudoksesta eristetyistä kantasoluista sekä rasvakudosuutteesta. Mallilla tutkitaan triglyseridien kertymistä rasvasoluiksi erilaistuviin rasvan kantasoluihin, sekä yhdisteiden vaikutusta solujen erilaistumiseen ja rasvan kertymiseen. Tällä tavoin voidaan ilman eläinkokeita tutkia, onko esimerkiksi lääkkeillä ja muilla kemikaaleilla rasvakudosta lisääviä tai vähentäviä vaikutuksia.

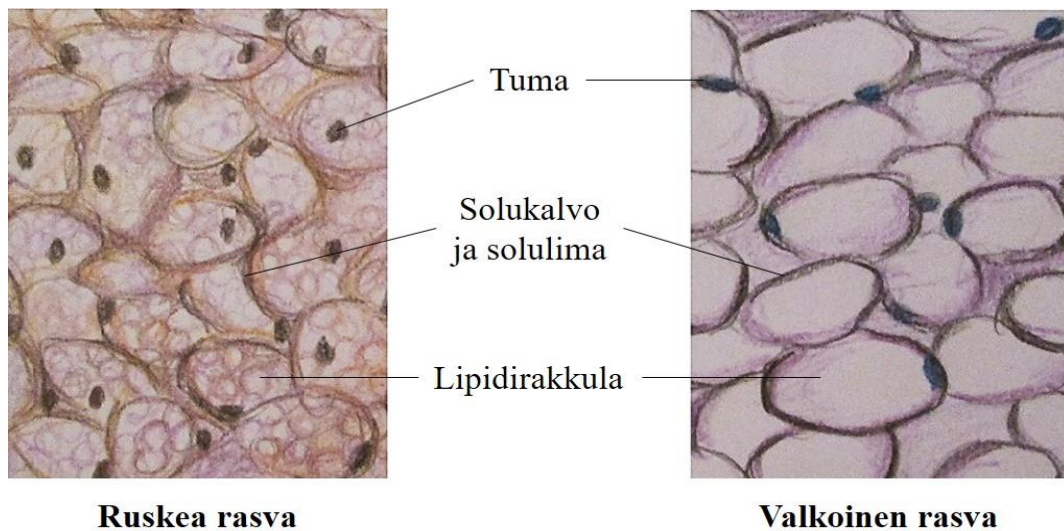
Opinnäytetyön tavoitteena on jatkokehittää FICAM:n adipogeenesimallia, jotta siitä saataisiin tarkka, luotettava ja toistettava malli kemikaalitestaukseen. Saatuja tuloksia hyödynnetään soluviljelykäytäntöjen päivittämisessä sekä adipogeenesimallin kehittämisen suunnittelussa. Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia, voidaanko seerumitonta kasvatusliuosta käyttää rasvan kantasolujen viljelyssä eli säilyykö solujen morfologia, saanto ja elävyys, tutkia saadaanko uudella pakastusliuoksella hASC-solujen ja monosyyttien pakastamisessa parempi selviytymisprosentti sekä sitä, vaikuttavatko monosyytit rasvan kertymiseen adipogeenesimallissa.

2 TEORIATAUSTA

2.1 Rasvakudos

Ihonalainen rasvakudos toimii elimistön lämmöneristeenä ja energiavarastona. Rasvaa on useiden sisäelinten välisissä tiloissa, jolloin se myös suojaa ja pitää paikallaan joitakin elimiä. (Fonseca-Alaniz, Takada, Alonso-Vale & Lima 2007, 193.) Rasvakudos koostuu rasvan kantasoluista, erilaistuneista rasvasoluista (adiposyyteistä), verisoluista, endoteelisoluista, fibroblasteista, monosyyteistä ja makrofageista. Adiposyyttejä on lukumääräisesti noin kaksi kolmasosaa kudoksen soluista, mutta suuren kokonsa vuoksi ne kattavat yli 90 % kudostilavuudesta. Rasvakudos ja rasvasolut toimivat rasvavarastona ja ovat siten tärkeä osa kehon energia-aineenvaihduntaa. (van Harmelen ym. 2005, 125.) Adiposyytit ovat ainoita soluja, jotka ovat erikoistuneet varastoimaan rasvaa triglyserideinä. Tarvittaessa ne myös kykenevät syntetisoimaan rasvahappoja energiaksi. (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 193.)

Rasvakudos voidaan jakaa kahteen päätyyppiin, valkoiseen ja ruskeaan rasvakudokseen (kuva 1). Valtaosa kehon rasvakudoksesta on valkoista, ja se toimii rasvavarastona (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 193). Valkoiset adiposyytit myös erittävät monia hormoneita, jotka liittyvät muun muassa kehon energia-aineenvaihduntaan ja immuunipuolustukseen (van Harmelen ym. 2005, 125). Ruskea rasvakudos on erikoistunut lämmöntuottoon. Sikiöllä ja vauvalla on melko paljon ruskeaa rasvaa, mutta sen määrä vähenee iän myötä, kun taas valkoisen rasvakudoksen määrä lisääntyy ihmisen vanhetessa. (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 193.)



KUVA 1. Ruskea ja valkoinen rasvakudos (Hossler 2011, muokattu)

Valkoisen rasvakudoksen solut ovat suuria (60–100 μm), ja niiden koko muuttuu sen mukaan, paljonko rasvaa solulla on varastossa. Solut varastoivat lipidit yhteen isoon rakkulaan, joka voi kattaa jopa 85–90 % solun tilavuudesta. Tuma ja muut soluelimet ovat painuneet solun reunoille. Kehittyessään ”nuorilla” valkoisilla adiposyyteillä voi olla useita pieniä lipidirakkuloita sytoplasmassaan, mutta solun kypsyessä ne yhdistyvät yhdeksi isoksi rakkulaksi. (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 193.)

Ruskeat adiposyytit ovat pienempiä kuin valkoiset (30–40 μm) ja niiden sytoplasmassa on paljon pieniä lipidirakkuloita. Pyöreä tuma on keskellä solua. Rusehtava väri johtuu siitä, että soluilla on runsaasti mitokondrioita, jotka vapauttavat lämpöä hapettaessaan rasvahappoja. (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 193.) Kylmissä olosuhteissa ruskean rasvakudoksen verenvirtaus lisääntyy ja sokeriaineenvaihdunta aktivoituu. Koska verenvirtaus liittyy koko kehon energiankulutukseen, ruskea rasva kuluttaa energiaa kylmässä. Siten se muistuttaakin toiminnaltaan enemmän lihaskudosta kuin valkoista rasvakudosta. (Orava ym. 2011, 272–273.)

Hiljattain on löydetty myös kolmas rasvasolutyyppe, niin kutsuttu beige rasvasolu (tai brite cell = brown-in-white cell). Nimitys johtuu siitä, että ruskeiden adiposyyttien kaltaiset solut sijaitsevat hajallaan valkoisten adiposyyttien seassa. Ne varastoivat rasvaa useina pieninä lipidipisaroina, sisältävät paljon mitokondrioita, kykenevät lämmöntuottoon ja ilmentävät useita samoja geenejä kuin ruskeat adiposyytit. Ruskeiden ja beigejen adiposyyttien energiaa kuluttava aineenvaihdunta on herättänyt suurta kiinnostusta niiden tarjoamista mahdollisuuksista liikalihavuuden hoitoon. (Harms & Seale 2013, 1252.)

2.1.1 Rasvan stroomasolut

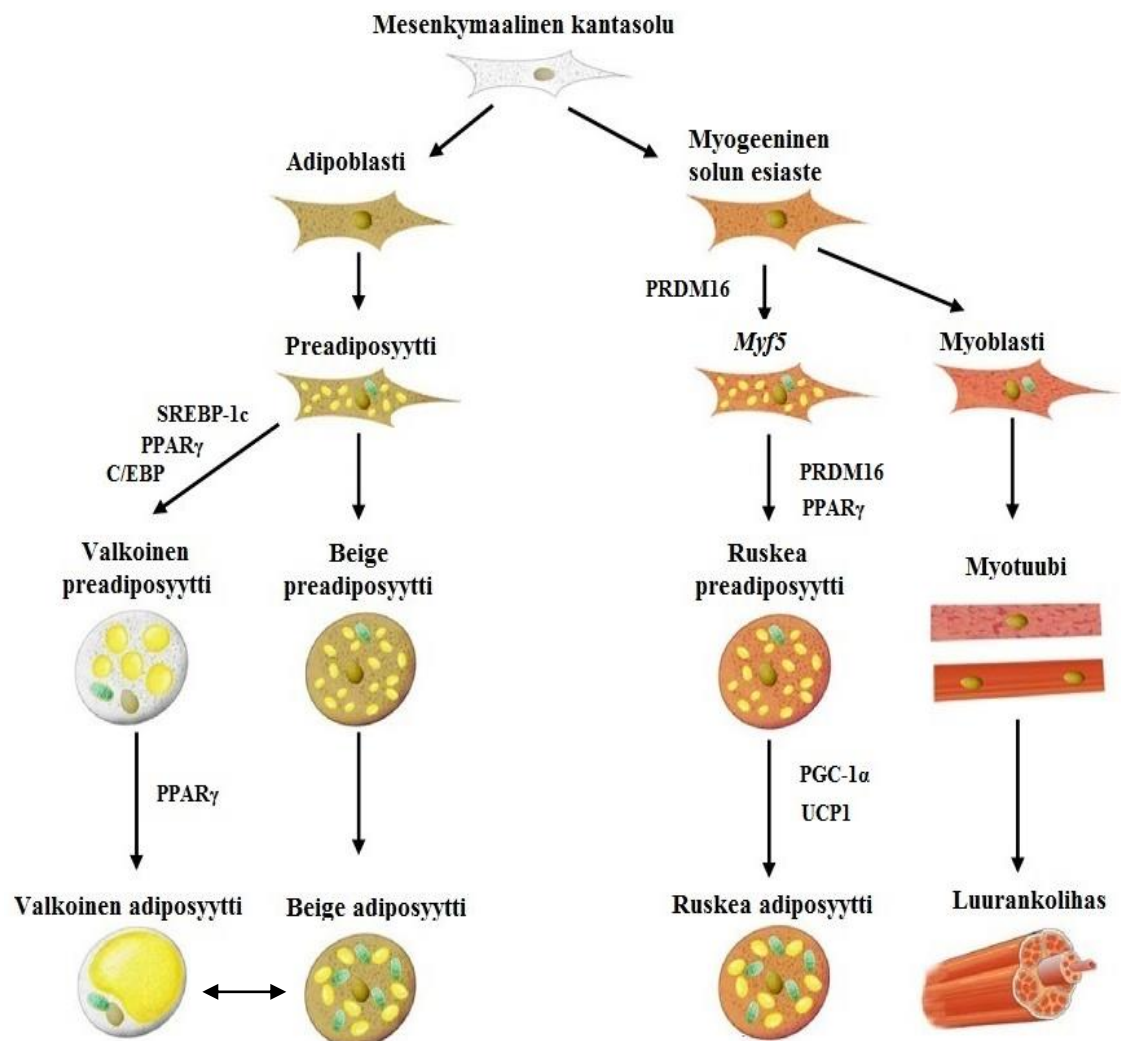
Yleisesti rasvan stroomasoluiksi eli rasvan kantasoluiksi (hASC) kutsutaan heterogeenistä solupopulaatiota, joka sisältää muun muassa erilaistumiskykyisiä rasvan kantasoluja, endoteelisoluja sekä immuunisoluja (Bourin ym. 2013, 642). Erilaisten eristämisen-, erilaistuksen- ja karakterisointimenetelmien vuoksi rasvan stroomasoluilla tehtyjen tutkimusten tuloksia olisi hankala vertailla keskenään ilman jonkinlaisia solustandardeja. Sen vuoksi ISCT (International Society for Cellular Therapy) on määritellyt, että rasvakudoksesta eristetyt stroomasolut voidaan luokitella kantasoluiksi, kun ne ekspressoivat kantasolujen proteiinimarkkereita CD73, CD90 ja CD105. (Dominici ym. 2006, 315.) Oikein stimuloituina rasvan kantasolut voivat luuytimen kantasolujen tavoin erilaistua luu-, rusto-, rasva- ja hermolinjan soluiksi *in vitro* (Lindroos, Suuronen & Miettinen 2011, 269).

Rasvan stroomasoluja on runsaasti valkoisessa rasvakudoksessa, niitä on helppo eristää ja ne lisääntyvät hyvin *in vitro*, minkä vuoksi käyttö kantasoluhoidoissa ja kudosteknologisissa sovelluksissa on lisääntymässä (Lindroos ym. 2011, 269). Solut voidaan eristää entsymaattisesti ihmisen rasvakudosnäytteestä, eli leikkauksista ylijäämäkudoksena saadusta rasvapalasta tai rasvaimunäytteestä. Näkyvästä verestä puhdistettu rasvakudos pilkotaan pieniksi paloiksi ja inkuboidaan kollageenaasissa, joka irrottaa rasvasolut kudoksesta. Sentrifugoinneilla, pesuilla ja suodatuksilla saadaan puhdistettua rasvasolut muista soluista ja kudoksen jäänteistä. Puhdistetut rasvan kantasolut voidaan tutkimustarpeen mukaan pakastaa tai aloittaa niiden viljely ja erilaistus. (van Harmelen, Skurk & Hauner 2005, 128–131.)

2.1.2 Adipogeneesi

Adipogeneesi eli rasvasolujen erilaistuminen kantasoluista on yksi tutkituimmista solujen erilaistumismalleista, koska soluja on helposti saatavilla ja *in vitro* -mallit toistavat hyvin rasvasolujen muodostumista *in vivo* (Rosen & Spiegelman 2000, 145). Rasvasolut erilaistuvat mesenkymaalisisista kantasoluista (kuva 2), joita voidaan eristää sekä luuytimestä että valkoisesta rasvakudoksesta. Adipogeneesi on monimutkainen prosessi, jonka aikana solulle tapahtuu muutoksia sekä morfologiassa, hormonitoiminnassa että geeniekspressiossa. (Bunnell ym. 2008, 116.) Adipogeenin tutkiminen voi tulevaisuudessa tarjota

sovelluksia, joissa erilaistumista manipuloimalla voitaisiin vähentää ylipaino-ongelmia (Rosen & Spiegelman 2000, 145).



KUVA 2. Adiposyyttien erilaistuminen (Yao, Shan, Zhang & Ying 2011, 3, muokattu)

Kehon hormonaaliset ja ravitsemukselliset signaalit vaikuttavat adipogeneesiin lisäävästi tai vähentävästi sen mukaan, tarvitaanko ylimääräisen rasvan käsittelyyn ja varastointiin lisää adiposyyttejä (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 201). Mesenkymaalisisista kantasoluista voi erilaistua adipoblasti eli valkoisten ja beigejen solujen esiaste, tai myogeeninen solu eli ruskeiden adiposyyttien esiaste (Yao ym. 2011, 1–2).

Adipoblasti kehittyä preadiposyytiksi, josta erilaistuu valkoisia ja beigejä preadiposyyttejä. Transkriptiofaktorit PPAR γ , SREBP-1c sekä C/EBP ovat valkoisten adiposyyttien erilaistumisen avainasemassa. SREBP-1c lisää PPAR γ :n aktiivisuutta, jolloin suurempi

osa soluista alkaa erilaistua. PPAR γ stimuloi useiden adiposyyttispesifisten geenien ekspressiota ja siten kriittisiä adipogeneesin alkuvaiheita. C/EBP α ja PPAR γ yhdessä aktivoivat valkoisille adiposyyteille spesifisiä genejä kuten *AP2* ja *PEPCK*. (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 201–202.) Beiget adiposyytit kehittyvät samasta preadiposyyttilinjasta kuin valkoiset adiposyytit. Myös stressille ja kylmälle altistetut valkoiset solut voivat muuttua beigeiksi ja aloittaa lämmöntuoton. Kun olosuhteet palautuvat normaaleiksi, ne voivat muuttua takaisin valkoisiksi adiposyyteiksi. Beigejen solujen tarkat syntymekanismit ovat kuitenkin vielä heikosti tunnettuja. (Harms & Seale 2013, 1255.)

Myogeenisestä solun esiasteesta voi kehittyä luurankolihasolu tai ruskea rasvasolu. Ruskean rasvasolun esiaste ekspressoii hetkellisesti geeniä *Myf5*, joka on alun perin vain lihassoluihin liitetty geeni. Tästä esiasteesta kehittyy ruskea preadiposyytti ja lopulta kypsä, toiminnallinen ruskea adiposyytti. (Harms & Seale 2013, 1255.) Proteiini PRDM16 saa aikaan ruskean adiposyytin kehittymisen: jos se puuttuu, solusta tulee lihassolu. Myös UCP1 ja PPAR γ ovat oleellisia ruskeiden solujen kehittymiselle. Kylmä stimuloi ruskeille adiposyyteille oleellisen proteiinin PGC-1 α ekspressiota. Se vaikuttaa mitokondrioaktiivisuuteen, ja proteiinin puuttumisen on todettu heikentävän solujen lämmöntuottokykyä. (Yao ym. 2011, 3–4.)

2.1.3 Matala-asteinen tulehdus rasvakudoksessa

Kun solujen kyky käyttää ylimääräistä energiaa ylittyy ja valkoiset adiposyytit ylläajenevat, erilaiset solunsisäistä stressiä aistivat signaalinsiirtoketjut aktivoituvat. Tämä vaikuttaa mitokondrioiden toimintaan ja johtaa tulehdukselliseen tilaan. (Mäkinen, Skrobuk, Nguyen & Koistinen 2013, 2121.) Liikalihavilla ihmisillä valkoisessa rasvakudoksessa vallitsee jatkuvana matala-asteinen tulehdus, ja makrofagien määrä kudoksessa on huomattavasti lisääntynyt verrattuna normaalipainoisiin (Gil, Aguilera, Gil-Campos & Canete 2007, 121).

Rasvakudoksen makrofagit voidaan karkeasti jakaa kahteen luokkaan. M1-makrofagit erittävät proinflammatorisia eli tulehdusta edistäviä välittäjäaineita, kun taas M2-makrofagit erittävät tulehdusta ehkäiseviä välittäjiä. Rasvakudoksen makrofagit voivat kuitenkin tarvittaessa muuttaa luonnettaan ympäristön mukaan: esimerkiksi runsasrasvaisen ruokavalion muuttamisen vähärasvaiseksi on huomattu ohjaavan M1-makrofagien

muuntumista M2-makrofageiksi. Proinflammatorisia välittäjiä ovat esimerkiksi tuumori-nekroositekijä α (TNF- α) ja monosyyttien kemotaktinen proteiini 1 (MCP-1), ja ne vaikuttavat osaltaan insuliiniresistenssiin ja tyypin 2 diabeteksen kehittymiseen. (Mäkinen, Skrobuk, Nguyen & Koistinen 2013, 2118.)

Myös valkoiset adiposyytit erittävät useita proteiineja. Esimerkiksi resistiini vähentää insuliiniherkkyyttä, angiotensiini vaikuttaa valtimoiden paineen säätelyyn ja PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) veren hyytymiseen. (Fonseca-Alaniz ym. 2007, 193–195.) Kun liikalihavilla rasvasolut keräävät itseensä enemmän rasvaa, myös adiposyyttien hormonieritys lisääntyy. Tämä vaikuttaa joihinkin ylipainoon liitettyihin sairauksiin kuten kohonneeseen verensokeritasoon (angiotensiini), verihyytymäriskiä (PAI-1) ja tyypin 2 diabetekseen (resistiini). (van Harmelen ym. 2005, 125.)

2.2 Tyypin 2 diabetes

Tyypin 2 diabeteksessa keho tuottaa insuliinia normaalisti, mutta elimistö reagoi siihen heikosti. Tämä johtaa kohonneeseen verensokeripitoisuuteen. Kaikista diabetestapauksista 80–90 % on nimienomaan tyypin 2 diabetesta, joka yleistyy jatkuvasti ja yhä nuoremmissa ikäryhmissä kaupunki- ja roskaruokakulttuurin aiheuttaman liikalihavuuden vuoksi. Ylipaino lisää merkittävästi riskiä sairastua, koska ylipainoisilla on kehossaan kohonnut pitoisuus resistiini- ja TNF α -proteiineja, jotka heikentävät insuliinireseptorien toimintaa. (Engel 2009, 231.) Erityisesti vatsaontelon sisällä ja maksassa olevan valkoisen rasvakudoksen määrän lisääntyminen aiheuttaa tyypin 2 diabetesta (Mustajoki 2015).

Normaalipainon saavuttaminen laskee nopeasti resistiini- ja TNF α -pitoisuudet normaali-tasolle, jolloin insuliinivaste palautuu (Engel 2009, 231). Laihduttaminen vähentää rasvakudosta vatsaontelosta suhteellisesti enemmän kuin ihon alta, ja siksi jo muutaman kilon painon lasku näkyy verensokeriarvojen selvänä parantumisena. Myös pelkkä liikunta vähentää vatsaontelon rasvaa ja siten parantaa verensokeriarvoja ilman laihtu-mistakin. (Mustajoki 2015.)

2.3 Rasvakudosmallit

Rasvakudosmalleja tarvitaan muun muassa kudoksen kehittymisen, tautien etenemisen ja pehmytkudoksen uudistumisen tutkimiseen sekä *in vitro* -lääketutkimukseen. Tähän mennessä rasvakudoksen biologiaa on tutkittu enimmäkseen kaksisolteisilla soluviljelymalleilla ja pienillä eläimillä *in vivo*. Kumpikin menetelmä antaa jonkin verran tietoa rasvakudoksen ja adiposyyttien toiminnasta, muttei kuitenkaan optimaalisesti mallinna ihmisen monimutkaista rasvakudosta. (Bellas, Marra & Kaplan 2013, 745.) Eläinmalleilla voidaan selvittää muun muassa geenimutaatioiden ja eri proteiinien ekspansion vaikutuksia rasvakudoksen kehittymiseen ja ylipainoon (Brommage ym. 2008, 2362).

Perinteisesti adiposyyttejä on viljelty kaksisolteisesti tasaisella kasvatusalustalla. Kypsien adiposyyttien pitkäaikainen 2D-viljely on kuitenkin melko hankalaa, koska erilaistuneina ne irtoavat helposti kasvatusalustasta. Siten solut ovat herkkiä esimerkiksi liuosten vaihdoissa. Kolmiolteinen rasvakudosmalli tukee kypsien adiposyyttien kehittymistä ja pitkäaikaista viljelystä paremmin kuin perinteinen 2D-viljely, ja syntynyt kudos voi pysyä jopa kuukausia hyväkuntoisena *in vitro*. (Gerlach ym. 2012, 54–55.)

Kudosmallissa solut tarvitsevat biomateriaalia tukemaan 3D-rakennetta. 3D-malli voidaan rakentaa esimerkiksi puoliläpäisevien onttojen kuitujen avulla, jotka mahdollistavat tehokkaan kaasujen ja ravinteiden kulkeutumisen solupopulaatiossa. Näin biomateriaalit tarjoavat hyvän ympäristön pitkäaikaisille soluviljelyille. 3D-kasvatus *in vitro* mahdollistaa rasvasolujen tehokkaamman erilaistumisen ja pidemmän kasvatusajan myös siksi, että soluilla on enemmän tilaa levittäytyä ympäristöönsä. (Gerlach ym. 2012, 55.) Esimerkiksi haavojen ompelussa käytettyjen silkkimateriaalien on todettu tukevan adipogeneesia sekä *in vitro* että *in vivo*. Endoteelisolujen kanssa huokoisessa silkkiproteiinirakenteessa viljeltäessä hASC-soluista erilaistetut adiposyytit ilmentävät rasvakudoksen ominaisuuksia jopa kuuden kuukauden ajan. (Bellas ym. 2013, 745.) 3D-malli, joka mahdollistaisi pitkäjaksoisen adiposyyttien viljelyn sekä nopean ja tarkan sytokiinien ja adipokiinien ekspansion määrittämisen, tarjoaisi hyvän testimallin useille tutkimuksille ja kemikaalitestauksille (Gerlach ym. 2012, 55).

2.4 Rasvakudosuute

Rasvakudosuute (ATE, Adipose Tissue Extract) on rasvakudoksesta eristettyä solutonta materiaalia, joka soluviljelmissä edistää adipogeneesiä sekä verisuonituksen ja rasvan muodostumista (Sarkanen ym. 2012, 17). ATE aikaansaa triglyseridien kertymistä rasvakudoksen kantasoluihin sekä indusoi kypsän, pysyvän rasvakudoksen muodostumista. Rasvakudosuute on kudosityhteensopivaa, joten se on lupaava soluton hoitomuoto muun muassa verisuonimuodostuksen ja rasvakudoksen aikaansaamiseksi pehmytkudosvaurioissa. Sitä voidaan hyödyntää myös erilaisissa kudosteknologisissa sovelluksissa verisuonituksen parantamiseen ja luonnollisen rasvanmuodostuksen mallintamiseen. (Sarkanen 2012, 11.)

ATE sisältää muun muassa paljon proteiineja, kasvutekijöitä ja sytokiinejä, joiden ansiosta se stimuloi tehokkaasti rasvanmuodostusta (Sarkanen ym. 2012, 17). Rasvanmuodostusta tehostava vaikutus kuitenkin vaihtelee hieman näytteen luovuttajasta riippuen, koska proteiinipitoisuudet vaihtelevat yksilöillä. Sen vuoksi jokaisen erän proteiinipitoisuus mitataan ennen käyttöä. Tällä hetkellä pehmytkudosvaurioissa on yleisesti käytössä rasvan kantasoluterapia, joka kuitenkin on aikaa vievää solujen *in vitro* -kasvatuksen vuoksi. ATE:n eristäminen rasvakudoksesta ei vaadi erikoisvälineitä tai vaikeita menetelmiä, joten se voi tarjota tehokkaan ja nopean soluttoman hoitomuodon pehmytkudosvaurioihin. (Sarkanen 2012, 61, 100.)

2.5 Kantasolut

Kantasolut ovat erilaistumattomia, uusiutumiskykyisiä soluja, joilla on kyky erilaistua muiksi solutyypeiksi. Ne jakautuvat epäsymmetrisesti, eli jakautuessa syntyy aina yksi emosolun kaltainen kantasolu sekä yksi erilaistuva solu; näin kantasolujen määrä säilyy vakiona. (National Institutes of Health 2015a.) Erilaistumiskykyensä mukaan kantasolut voidaan jaotella alkion kantasoluihin sekä aikuisen kantasoluihin. Alkion kantasolut ovat pluripotentteja, eli ne voivat alkion kehittyessä erilaistua miksi tahansa elimistön solu- tai kudostyyppiä, kun taas aikuisen kantasolut ovat multipotentteja, eli niiden erilaistumiskyky on rajallinen. (National Institutes of Health 2015b.)

Yksilön vanhetessa kantasolujen määrä suhteessa muihin soluihin vähenee. Aikuisella kantasoluja on eniten luuytimessä, rasvassa ja perifeerisessä veressä. (Stem Cell Institute 2015.) Muissakin kudoksissa, kuten ihossa ja hermostossa, on kantasoluja. Ne ovat kuitenkin yksittäisinä soluina muiden joukossa eivätkä siten niin helposti eristettävissä. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta ym. 2003, 4.)

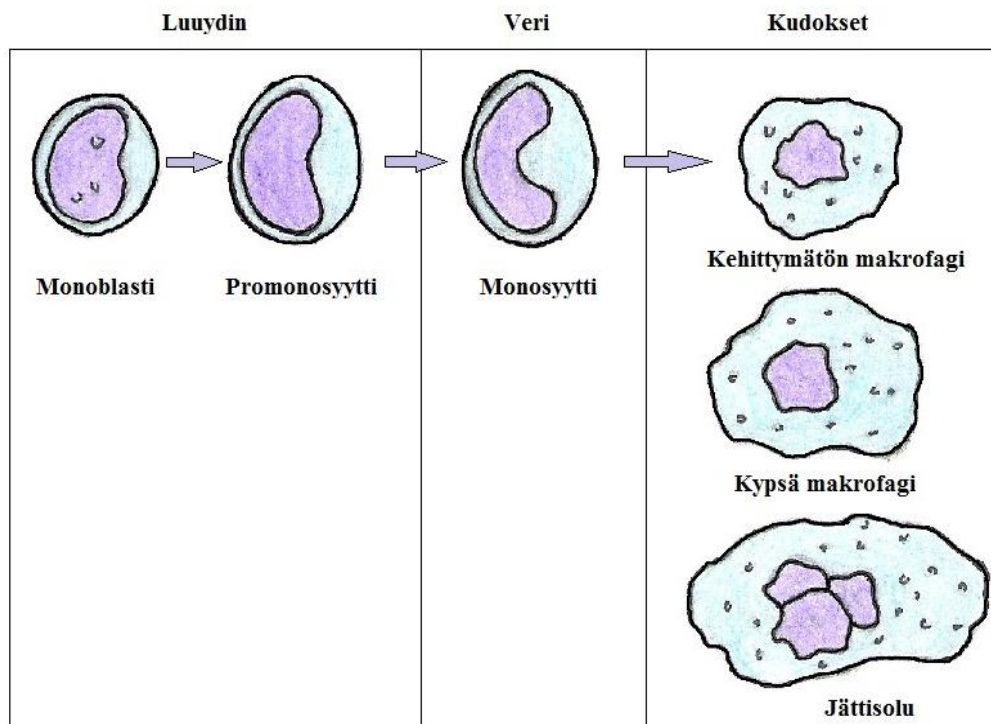
Kantasoluja saadaan tutkimuskäyttöön vain luvanvaraisesti luovuttajilta. Ne ovat hyvää materiaalia tutkimukseen, koska kantasolut voivat jakautua rajattomasti niin kauan kuin ne ovat erilaistumattomia. Kantasoluhoidot antavat mahdollisuuden kudostuhon pohjalta syntyvien tautien parantamiseen sekä oireiden hoitoon. Lääketieteellistä käyttöä rajoittaa kuitenkin se, että erilaistumista ei voida täysin ennustaa. Kantasolututkimukseen liittyy myös eettisiä ongelmia: sikiöt ja alkio ovat parhaita kantasolulähteitä, mutta soluja eristettäessä sikiö tai alkio tuhoutuu. Sikiöiden kantasolulinjoja saadaan raskaudenkeskeytysten yhteydessä, ja alkion kanta-soluja hedelmöityshoitojen yhteydessä 6–7 vrk ikäisestä alkiorakkulasta. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta ym. 2003, 4–6, 8.) Aikuisen kantasoluja saadaan parhaiten eristettyä luuytimeä, rasvasta ja perifeerisestä verestä (Stem Cell Institute 2015).

2.6 Monosyytit

Monosyytit ovat suurimpia veressä esiintyvistä soluista, läpimitaltaan noin 12–20 µm. Ne kuuluvat valkosolujen ryhmään, ja solunsyöjinä ne vastaavat osaltaan kehon immuunipuolustuksesta. (Bain 2006.) Tyypillistä monosyyteille on kaareva, hevosenkengän muotoinen tuma (Blann, Knight & Moore 2010, 242). Niiden tehtävänä on poistaa muiden immuunipuolustuksen mekanismien tunnistamia tunkeutujamikrobeja. Monosyytit nielevät mikrobin ja tappavat sen hajottavien entsyymiensä avulla mikrobin lajiin katsomatta. (Lumio 2014.) Monosyytit kykenevät siirtymään verenkierrosta kudoksiin, jolloin ne erilaistuvat makrofageiksi ja osallistuvat sidekudoksien immuunipuolustukseen (Bain 2006). Solunsyönnin lisäksi makrofagit tuottavat kasvutekijöitä kudoksissa (Siitonen & Koistinen 2007, 27).

Kaikki verisolut erilaistuvat luuytimen kantasoluista. Kuvassa 3 on esitetty monosyyttien syntyminen ja erilaistuminen. Monosyytit ja makrofagit saavat alkunsa luuytimessä monoblastista, josta kehittyy promonosyytti. (Siitonen & Koistinen 2007, 17, 25.)

Promonosyytti erilaistuu noin viidessä vuorokaudessa monosyytiksi, joka vapautuu verenkiertoon. Monosyytit kiertävät periferaalisessa veressä noin 2–3 vuorokautta, mistä ne siirtyvät kudoksiin ja alkavat kehittyä makrofageiksi. Kehittymättömät makrofagit syntetisoivat vielä DNA:ta ja jakautuvat, mutta muutaman jakautumisen jälkeen ne eivät siihen enää pysty: tällöin ne ovat kypsiä makrofageja. Makrofageista voi kehittyä myös monitumaisia jättisoluja, joita esiintyy erityisesti kroonisen tulehduksen alueilla. (Blann ym. 2010, 242.) Makrofagit voivat elää kudoksissa jopa kuukausia (Siitonen & Koistinen 2007, 27).



KUVA 3. Monosyyttien syntyminen ja kehittyminen (Blann ym. 2010, 243, muokattu)

Mononukleaariset solut (lymfosyytit ja monosyytit) voidaan eristää kokoverinäytteestä esimerkiksi Ficoll-erottelulla, joka on menetelmänä helppo ja halpa. Erottelu perustuu Ficoll-polysakkaridiin, joka aikaansaa tiheysgradientin verinäytettä sentrifugoitaessa. Ficoll aiheuttaa punasolujen kasaantumista, mikä nopeuttaa niiden painumista putken pohjalle. Myös granylosyytit laskeutuvat Ficoll-kerroksen alle, kun lymfosyytit, monosyytit ja verihiutaleet jäävät pienemmän tiheydensä vuoksi Ficoll-kerroksen yläpuolelle. Mono- ja lymfosyytit sisältävä kerros kerätään talteen, ja siitä pestään pois verihiutaleet sekä Ficoll- ja plasmajäämät. Tätä mononukleaaristen solujen suspensiota voi viljellä sellaisenaan, tai jatkaa käsittelyä lymfosyyttien ja monosyyttien erottelulla. (Yona 2005, 137–138.)

2.7 Seerumi kasvatusliuoksissa

Solujen onnistunut viljely *in vitro* vaatii mahdollisimman samanlaiset olosuhteet kuin soluilla on *in vivo*, koskien muun muassa lämpötilaa, happi- ja hiilidioksidipitoisuutta, pH:ta ja ravinnepitoisuuksia. Kasvatusliuos on tärkein yksittäinen tekijä soluviljelyssä, koska liuos on soluille se elinympäristö, jonka täytyy tarjota sopivat olosuhteet ja ravinteet kasvulle. Seerumi sisältää paljon soluille tarpeellisia kasvutekijöitä, ja se sopii useimmille solutyypeille. Siten seerumia sisältävän kasvatusliuoksen kanssa ei tarvitse käyttää aikaa sopivan mediumin optimointiin kullekin solutyypille erikseen. (Cartwright & Shah 2002, 69, 78.)

Eläinsolujen viljelyssä käytetään usein naudan tai vasikan seerumia, koska se sisältää paljon kasvua stimuloivia tekijöitä ja vain vähän kasvua inhiboivia tekijöitä. Kuitenkin ihmisolujen viljelyssä eläinperäisen seerumin käyttö aiheuttaa kontaminaatoriskin. Naudan seerumi myös sisältää ihmisoluille haitallisia xenobioottisia yhdisteitä eli vieraita proteiineja, mikä saattaa muuttaa solujen morfologiaa tai estää kantasolujen erilaistumisen. Eläinseerumissa kasvatetut tai erilaistetut kantasolut aiheuttavat teoreettisen riskin erityisesti silloin, jos tarkoitus olisi palauttaa ne ihmiseen sairauden hoidon yhteydessä. Silloin ei voida olla varmoja, miten ne kehoon palautettuina reagoisivat. (Mannello & Tonti 2007, 1605.)

Eläinseerumin aiheuttamien riskien vuoksi kantasolujen viljelyssä suositaan humaaniseerumin käyttöä. Se tukee hyvin kantasolujen kasvua ja erilaistumista ilman ihmiskehelle vieraiden proteiinien tuomia riskejä. Seerumin käytössä on kuitenkin ongelmana tuotantoerien väliset biologiset erot, koska seerumi eristetään yksilöistä: esimerkiksi proteiinipitoisuuksien vaihtelut voivat vaikuttaa solujen kasvuun ja aiheuttaa vaihtelua tuloksissa. (Mannello & Tonti 2007, 1606.) Humaaniseerumin tuotto on kallista ja hinta riippuvainen saatavuudesta, koska se täytyy eristää luovutetusta verestä. On myös olemassa viruskontaminaation riski, joten jokaisen seerumierän käyttöturvallisuus täytyy tutkia tarkasti. (He ym. 2011, 19078.)

Tällä hetkellä tehdään paljon tutkimusta kokonaan seerumittomien kasvatusliuosten käytömahdollisuuksista. Seerumittomuus poistaisi eläin- ja ihmisperäisten komponenttien tuomat kontaminaatoriskit sekä tuotantoerien vaihtelevuusongelman. Tällöin kasvatusliuokseen täytyy kuitenkin lisätä kaikki solujen tarvitsemat kasvutekijät. Joillekin soluille

seerumittoman kasvatusliuoksen on todettu sopivan, mutta esimerkiksi luuytimeistä eristetyt mesenkymaaliset stroomasolut eivät erilaistu seerumittomassa mediumissa, johon ei ole lisätty sytokiinejä ja/tai kasvutekijöitä. Tämä johtuu luultavimmin siitä, että seerumi voi käynnistää solunsisäisen kalsiumvasteen, joka on välttämätöntä kantasolujen kasvulle ja erilaistumiselle. (Mannello & Tonti 2007, 1606–1607.)

2.8 Tutkimusmenetelmät

2.8.1 Solujen elävyyden mittaaminen

Solujen elävyydellä tarkoitetaan elävien solujen osuutta tai lukumäärää solupopulaatiossa. Elävyys voidaan määrittää erilaisten soluvärjäysten tai solujen aineenvaihduntaan perustuvien mittausten avulla. Solujen elävyyden mittausta voi olla esimerkiksi toksisuuskokeissa pääanalysointimenetelmä, tai sitä voidaan käyttää osana muita analyysejä korreloimaan solujen aktiivisuutta. Mittausmenetelmät voidaan karkeasti jakaa koko solupopulaation analysointiin (esimerkiksi WST-1) sekä yksittäisten solujen analysointiin pienemmästä näytteestä (esimerkiksi trypan blue). Populaation analysointi on nopeampaa, mutta antaa epätarkemmat tulokset kuin yksittäisten solujen laskeminen. Tutkimukselle sopivin mittausmenetelmä valitaan tarkkuuden, nopeuden, kustannusten ja toteutuksen vaativuuden mukaan. (Stoddart 2011, 1–3.)

Yksi perinteisimmistä ja edelleen käytetyimmistä menetelmistä solujen elävyyden määrittämiseen on trypan blue -värjäys. Trypan blue on väriaine, joka värjää kuolleet solut voimakkaan siniseksi, kun taas elävät solut eivät värjäydy. Tämä johtuu siitä, että elävien solujen toimiva solukalvo ei päästä kasvatusliuokseen lisättyä väriainetta solun sisälle, kun taas kuolleiden solujen vaurioitunut solukalvo päästää värimolekyylit lävitseen. Siten mikroskoopilla tarkasteltaessa solut erottuvat hyvin toisistaan: elävät solut ovat värjäytymättömiä, pieniä ja pyöreitä, kun kuolleet solut ovat sinisiä ja väristä turvonneita. Solut voi laskea joko manuaalisesti esimerkiksi Bürkerin laskukammiolla tai automaattisesti tietokoneohjatulla solulaskurilla. (Louis & Siegel 2011, 7.)

Solujen elävyyden voi määrittää myös mittaamalla solupopulaation mitokondrioaktiivisuutta tetratsoliumsuolojen avulla. Paljon käytetty on WST-1-suola. Aktiivisten solujen

mitokondrioiden dehydrogenaasientsyymi pilkkoo WST-1:tä elektroninsiirtäjien läsnä ollessa, jolloin muodostuu vesiliukoista formatsaania. Liuoksessa formatsaani on väriltään punaista, ja värireaktion voi mitata spektrofotometrillä. Tällöin absorbanssin voimakkuus korreloi suoraan mitokondrioaineenvaihdunnan aktiivisuuteen eli solupopulaation elävyyteen. WST-1:stä muodostuva formatsaani on liukoisempi kuin esimerkiksi XTT- ja MTS-suoloilla, minkä ansiosta mittaussuora on lineaarinen suuremmalla alueella ja siten tulokset ovat tarkempia. Yleensä WST-1-värjäystä käytetään 2–3 tunnin inkubatioajalla yhdellä aikapisteellä, mutta se soveltuu myös vuorokauden mittaiseen inkubointiin ja pitkäaikaisempaan elävyyden tarkkailuun useilla mittapisteillä. (Yin ym. 2013).

2.8.2 Solujen pakastaminen

Solujen ikääntyessä liian pitkään jatkuvassa solulinjan viljelyssä niiden morfologia ja toiminta saattaa muuttua. Soluja voi kuitenkin oikein pakastettuna säilyttää elinkelpoisina ja toiminnallisina jopa vuosia, mikä tarjoaa pitkällekin tutkimukselle solulähteen. Pakastus antaa myös turvan viljelyssä tapahtuvien virheiden varalle, koska varastoon jää vielä soluja, jos viljelmä esimerkiksi kontaminoituu. Muutaman viikon lyhytaikaisessa säilytyksessä soluja voi pitää syväjäähäpakastimessa -70 – (-80) °C:ssa, mutta pidempiaikaiseen säilytykseen vaaditaan alle -130 °C lämpötila. Pitkäaikais säilytykseen käytetään nestetyyppeä tai sen kaasufaasia, jolloin saavutetaan -196 °C lämpötila. (McAteer & Davis 2002, 176, 179.)

Solut täytyy suojata kryoprotektanteilla eli suoja-aineilla, jotta ne selviävät pakastuksesta ja sulatuksesta elinkelpoisina (McAteer & Davis 2002, 176). Kryoprotektantit jaetaan kahteen pääryhmään: solunsisäisiin ja solunulkoisiin yhdisteisiin. Solunsisäiset yhdisteet (esimerkiksi dimetyylisulfoksidi ja glyseroli) kulkeutuvat solun sisälle ehkäisemään jääkiteiden muodostumista ja solukalvon vaurioitumista. Solunulkoiset yhdisteet (esimerkiksi sakkaroosi ja trehaloosi) eivät läpäise solukalvoa, vaan pitävät yllä liuoksen osmoottista tasapainoa pakastuksen aikana. (de Lara Janz ym. 2012, 1.)

Usein käytettyjä suoja-aineita ovat glyseroli ja dimetyylisulfoksidi (DMSO). Kasvatusliuokseen lisättyinä ne aikaansaavat sen, että solukalvo päästää solun sisällä olevan veden kulkemaan ulos solusta lämpötilaa laskettaessa. Suoja-aineet myös laskevat jäätymislämpötilaa niin, että jääkiteitä alkaa muodostua vasta noin -5 °C:ssa. Kun

lämpötilaa lasketaan tarpeeksi hitaasti (noin 1 °C/min) ja ylimääräinen vesi solujen sisältä on poistunut, jääkiteitä muodostuu vain solun ulkopuolelle pakastusliuokseen eikä solun sisälle vaurioittamaan soluelimiä. Solut täytyy sulattaa mahdollisimman nopeasti esimerkiksi 37–40 °C vesihauteella, ettei jääkiteitä muodostu myöskään sulamisen aikana. (McAteer & Davis 2002, 176–177.)

DMSO on myrkyllistä kudoksille ja soluille myrkyllisyyden ollessa aika-, lämpötila- ja pitoisuusriippuvaista. Siksi soluja pyritään pitämään mahdollisimman vähän aikaa lämpimässä DMSO:ssa. Pakastettaessa solut suspensoidaan valmiiksi jäähdytettyyn liuokseen, ja herätyksessä pakastusliuoksen DMSO laimennetaan mahdollisimman nopeasti lämpimällä kasvatusliuoksella. DMSO:n käyttöä on pyritty vähentämään joko käyttämällä mahdollisimman pientä pitoisuutta tai korvaamalla se kokonaan toisella kryoprotektantilla. (Hunt 2011, 110–111.)

Solut voidaan pakastaa joko koneellisesti tai manuaalisesti. Manuaalisesti pakastettaessa kryoputket laitetaan erityiseen isopropanolia sisältävään jäähdyttimeen, joka syväjäähdytimestä jäädyttää ampullit tasaisella vauhdilla noin 1 °C minuutissa. 4–5 tunnin kuluttua tai seuraavana päivänä ampullit siirretään kaasufaasipakastimeen. Pakastuslaitteet käyttävät nestemäistä tyyppiä ampullien jäädyttämiseen. Laitteelle voi tehdä sopivan jäähdytysohjelman, ja siirtää ampullit sitten kaasufaasipakastimeen pitkäaikaissäilytykseen. Pakastuslaitteella on aina riskinä toimintahäiriöt, kun taas manuaalinen pakastus on yksinkertaisempaa protokollana turvallisempi. Kuitenkin laitteen hyötynä on se, että pakastuksen ajalta laite dokumentoi ohjelman tiedot (lämpötilan ja ajan seuranta), joten onnistumisen voi tarkistaa jälkikäteen. (McAteer & Davis 2002, 178.)

2.8.3 Virtaussytometria

Sytometria on solujen, tai muiden biologisten tai ei-biologisten, yksittäisten partikkelien kemiallisia ja fyysisiä ominaisuuksia tutkiva tieteenala. Virtaussytometriassa tutkittavat solut kulkevat yksitellen mittausinstrumentin eli virtaussytometrin läpi nestevirrassa. Näytepartikkeleiden ominaisuuksia voidaan mitata solu kerrallaan, eikä vain koko näytteen keskiarvoja. Siten näytteestä voidaan tarkasti määrittää esimerkiksi solujen kokoa, rakennetta ja pintareseptorien toimintaa. (Shapiro 2003, 1.)

Solujen proteiiniekspressiota voidaan mitata virtausytometrillä fluoresenssivärjäysten avulla. Näyte värjätään tietyn proteiinin fluoresoivalla vasta-aineella. Merkittävät soluja säteilytetään lasersäteellä, ja solun lähettämän emission voimakkuus mitataan. Tällöin solut analysoidaan ja lajitellaan sekä fluoresenssin että valosironnan perusteella. Näin voidaan nopeasti ja tarkasti määrittää, kuinka suuri osa solupopulaatiosta ekspressoi tutkittavaa proteiinia. (Shapiro 2003.)

2.8.4 Rasvan määrän mittaaminen

Rasvahappojen kuvaaminen ja määrän mittaaminen kudoksista on avainasemassa tutkimuskohteen aineenvaihdunnan ymmärtämisessä ja arvioinnissa. Yleisimmin käytetyillä lipidienvärjäysmenetelmillä rasvan suhteellisen määrän solupopulaatiossa voi mitata helposti, nopeasti ja vain peruslaboratoriovälineitä ja -tietokoneohjelmia käyttäen. (Mehlem ym. 2013, 1149.)

AdipoRed Assay -värjäys on eräs paljon käytetty menetelmä solunsisäisen rasvakertymän määrittämiseen. AdipoRed Assay -reagenssi reagoi spesifisesti vain triglyserideihin, jolloin solun rasvapisarat fluoresoivat aallonpituudella 572 nm. Tällöin pisarat saadaan kuvattua fluoresenssimikroskoopilla ja mitattua fluorometrillä. AdipoRed Assayn on todettu olevan tarkempi kuin esimerkiksi samalla periaatteella toimiva Oil-Red-O-värjäysmenetelmä. (BioResearch 2014, 4.)

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena on jatkokehittää FICAM:n adipogeenesimallia. Rasvakudoksen kehittymisen ja triglyseridien soluihin kertymisen tutkiminen on tärkeää liikalihavuuden ja sen seurauksena kehittyvien sairauksien tutkimisessa. Kasvatus- ja pakastusliuoskokeiden tuloksia hyödynnetään FICAM:n soluviljelykäytäntöjen päivittämisessä, ja adipogeenesimallikokeiden tuloksia käytetään pohjana mallin kehittämisen jatkotutkimusten suunnittelussa. Opinnäytetyön tarkoituksena on tutkia, voidaanko seerumitonta kasvatusliuosta käyttää hASC-solujen viljelyssä, tutkia uuden pakastusliuoksen sopivuutta hASC-solujen ja monosyyttien pakastamiseen sekä sitä, vaikuttaako monosyyttien läsnäolo rasvan kertymiseen adipogeenesimallissa.

Kasvatusliuoskokeissa tarkastellaan solujen morfologiaa, saantoa, elävyyttä sekä proteiini-markkerien CD73, CD90 ja CD105 ilmentymistä. hASC-kasvatusliuoksen korvaajaksi testataan sekä Biowestin valmistamaa FreeAdd-seeruminkorviketta sisältävää kasvatusliuosta että FICAM:n omaa seerumitonta perustestiliuosta. Pakastusliuoskokeissa tutkitaan, saadaanko Amsbion valmistamalla STEM-CELLBANKER[®]-pakastusliuoskella parempi saanto tai selviytymisprosentti hASC-solujen ja monosyyttien pakastamisessa kuin DMSO:lla. Adipogeenesimallissa tarkastellaan, onko monosyyteillä vaikutusta hASC-solujen rasvanmuodostuskykyyn. WST-1-käsittelyn avulla mitataan solujen elävyys ja AdipoRed Assay -käsittelyn avulla rasvan määrä.

4 TYÖN SUORITUS

4.1 Solujen alkuperä

Työssä käytetyt rasvan kantasolut olivat peräisin Tampereen yliopistollisesta sairaalasta, leikkauksista ylijäämäkudoksena saaduista rasvanäytteistä. Solujen käyttöön on saatu Pirkanmaan sairaanhoitopiirin eettisen toimikunnan lupa. Solut oli eristetty ja säilötty kaasufaasipakastimeen FICAM:n omien laboratoriokäytäntöjen mukaan. Näytteistä eristetyt solulinjat oli merkitty niin, että näytteen tiedot (luovuttajan ikä, sukupuoli, mistä rasvanäyte on otettu sekä näytteenottotapa) on aina jäljitettävissä. Työssä käytettiin aiemmin eristettyjä ja pakastettuja hASC-soluja.

Monosyytit olivat peräisin Suomen Punaisen Ristin toimittamista verinäytteistä. Pakastusliuoskokeita varten solut eristettiin FICAM:n laboratoriokäytäntöjen mukaan. Adipogeneesimallissa käytettiin aiemmin eristettyjä, kaasufaasipakastimessa säilytettyjä soluja.

4.2 Soluviljelykäytännöt

Kaikki työskentely solujen kanssa suoritettiin aseptisissa olosuhteissa, laminaarikaapissa päätepesteanalyysiin asti. Soluja kasvatettiin 37 °C lämpötilassa inkubaattorissa, jonka hiilidioksidipitoisuudeksi oli säädetty 5,0 %. Hiilidioksidi pitää viljelmän pH-pitoisuuden tasaisena. Inkubaattorin kosteustasosta huolehdittiin pitämällä steriiliä vettä astiassa inkubaattorin sisällä. hASC-solut kasvatettiin pinnoitetuissa soluviljelypulloissa, ja monosyytit pinnoittamattomissa suspensiosolupulloissa. Kaikkien kasvatusliuosten valmistusohjeet ovat liitteessä 1.

hASC-soluja säilytettiin syväpakastettuna $0,5-1,0 \times 10^6$ solua/ml erissä, ja monosyyttejä 10×10^6 solua/ml erissä. Kaasufaasipakastimen käyttölämpötila oli noin -196 °C, ja siinä säilytysampullit olivat kuivafaasissa, eivätkä siten kontaktissa nestemäiseen tyypeen. Osa pakastuksista tehtiin Planer Kryo 360 -pakastuslaitteella ja osa isopropanolijäähdyttimellä. Pakastusliuosten valmistusohjeet ovat liitteessä 2.

4.2.1 Solujen herätys

hASC-soluja herätettäessä soluampulli vietiin suoraan kaasufaasipakastimesta vesihautteelle. Kun sisältö oli reunoista sulanut, se siirrettiin sentrifugiputkeen, johon oli valmiiksi pipetoitu 10 ml vesihauteella lämmitettyä kasvatusliuosta. Sulamisaika vesihauteelle laitosta putkeen siirtämiseen sai olla korkeintaan 2 min, ettei korkea DMSO-pitoisuus ehdi vahingoittaa heräviä soluja. Solususpensiota sentrifugoitiin $131 \times g$ 5 min. Supernatantti imettiin pois imupulloon liitetyllä aspiraatiopipetillä, ja solupelletti suspensioitiin 1 ml:aan esilämmitettyä kasvatusliuosta. Sitten suspensio siirrettiin soluviljelypulloon, jossa oli 9 ml vesihauteella lämmitettyä kasvatusliuosta. Solujen kunto tarkistettiin mikroskoopilla, ja ne siirrettiin inkubaattoriin kasvamaan. Kasvatusliuos vaihdettiin 3–4 vuorokauden välein, ja viljelmä oli konfluentti noin viikon kuluttua.

Monosyyttejä herätettäessä solususpensiopulloon pipetoitiin vesihauteella lämmitettyä kasvatusliuosta, ja annettiin sen tasaantua inkubaattorissa. Soluampulli vietiin kaasufaasipakastimesta suoraan vesihauteelle, ja reunojen alkaessa sulaa sisältö siirrettiin kasvatuspulloon. Sulamisaika vesihauteelta pulloon saamisessa oli oltava alle 2 min, ettei korkea DMSO-pitoisuus ehdi vahingoittaa heräviä soluja. Solujen kunto tarkistettiin mikroskoopilla, ja ne siirrettiin inkubaattoriin kasvamaan. Kasvatusliuosta lisättiin tai se vaihdettiin 4–5 vuorokauden välein, ja solut pyrittiin käyttämään viimeistään viikon kuluttua herätyksestä.

4.2.2 Solulaskut

Solut laskettiin Bürkerin laskukammion avulla. 20 μ l solususpensiota pipetoitiin 180 μ l:aan 0,2 % trypan blue -liuosta, joka värjää kuolleet solut sinisiksi. Elävät solut laskettiin laskukammion neljästä ruudusta, mutta jos näiden yhteenlaskettu solumäärä alitti sata kappaletta, solut laskettiin kahdeksasta ruudusta. Suspension elävien solujen tiheys laskettiin käyttäen yhtälöä 1.

$$s = n(\text{ka}) \times 10^4 \times l, \quad (1)$$

jossa

s = suspension solutiheys, s/ml

$n(\text{ka})$ = laskettujen solujen keskiarvo

l = laimennuskerroin

Solujen elävyysprosentti määritettiin yhtälön 2 avulla.

$$\text{elävyys} = \text{elävät solut} / \text{kaikki solut} \times 100 \% \quad (2)$$

Pakastuksia ja maljauksia varten tarvittavat solumäärät laskettiin käyttäen yhtälöä 3.

$$V = n(\text{tavoite}) / s, \quad (3)$$

jossa

V = siirrostettavan solususpension tilavuus

$n(\text{tavoite})$ = haluttu määrä soluja, kpl

s = laskettu suspension solutiheys, s/ml

4.3 Kasvatusliuoskokeiden suoritus

Kasvatusliuoskokeissa tehtiin kolme viljelyä (taulukko 1), joissa herätettiin samasta solulinjasta yksi ampulli hASC-soluja seerumittomaan kasvatusliuokseen sekä yksi ampulli seerumilliseen kasvatusliuokseen kontrolliksi. Kussakin viljelyssä käytettiin eri solulinjoja. Viljelyjen päättyessä solut kuvattiin Nikon Eclipse Ti-S -käänteismikroskoopilla, elävien solujen tiheys laskettiin yhtälöllä 1 sekä solujen elävyys määritettiin yhtälöllä 2.

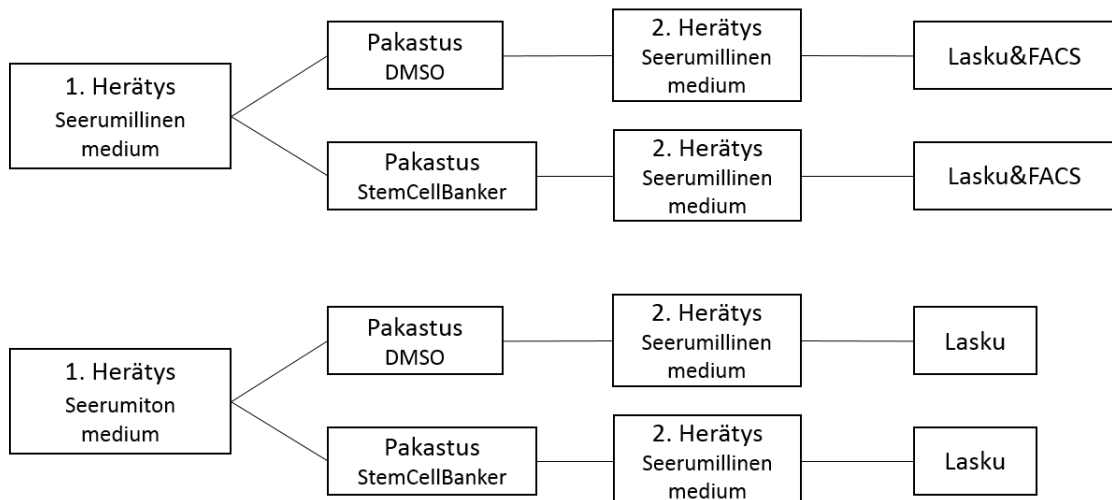
TAULUKKO 1. Kasvatusliuoskokeiden suoritus

Solulinja	Kasvatusliuos	Viljelyaika	Jatko
hASC161	FreeAdd (Biowest)	1 vko	Lasku, ei pakastukseen
hASC160	Perustestiliuos	1 vko	Lasku ja pakastus
hASC164	Perustestiliuos	2 vko	Lasku ja pakastus

4.4 Pakastusliuoskokeiden suoritus

4.4.1 Pakastusliuos hASC-soluille

Kuviossa 1 on pakastusliuoskokeiden suoritus kaaviokuvana. hASC-solut pakastettiin suoraan kasvatusliuoskokeiden viljelyiden päätyttyä. Seerumittomassa kasvatusliuoksessa ja perustestiliuoksessa kasvatettuja soluja pakastettiin kahdessa ampullissa: toinen ampulli käyttäen DMSO:ta ja toinen Stem-CellBanker-pakastusliuosta (Amsbio). Pakastuksesta kaikki solut herätettiin seerumilliseen mediumiin ja niitä viljeltiin viikko. Kasvatuksen jälkeen solut laskettiin (yhtälö 1) ja määritettiin elävyysprosentti (yhtälö 2). Lisäksi seerumillisessa mediumissa ennen pakastusta kasvaneet solut karakterisoitiin FACS-virtaussytometrillä.



KUVIO 1. hASC-solujen pakastusliuoskokeiden suoritus

Pakastuksen aluksi Stem-CellBanker sekä valmistettu DMSO-pakastusliuos laitettiin jäähtymään jäälle. hASC-solut irrotettiin kasvatuspullon pohjasta käyttäen Tryple Express -liuosta. Viljelypullosta imettiin pois kasvatusliuos, solut huuhdeltiin nopeasti 1 ml Tryple Expressiä, ja pipetoitiin tilalle 2,5 ml Tryple Expressiä. Soluja inkuboitiin niin kauan, että ne alkoivat irrota pullon pohjasta (korkeintaan 10 minuuttia). Irtoamista tarkasteltiin mikroskoopilla, ja irronneille soluille pipetoitiin 5 ml kasvatusliuosta. Solususpensio pipetoitiin 15 ml sentrifugiputkeen, ja sentrifugoitiin $131 \times g$ 5 min. Supernatantti imettiin pois, ja solupelletti suspensioitiin 0,5–1 ml kasvatusliuosta. Elävien solujen tiheys laskettiin Bürkerin laskukammion avulla (yhtälö 1).

Solususpensiosta pakastettiin $0,15-0,30 \times 10^6$ solua kahteen ampulliin, joista toinen DMSO-pakastusliuokseen ja toinen Stem-CellBankeriin. Yhtälön 3 avulla laskettiin tarvittava määrä solususpensiota, joka pipetoitiin kahteen putkeen. Putkia sentrifugoitiin $131 \times g$ 5 min ja poistettiin supernatantti. Solupelletit suspensoitiin 0,5 ml:aan jääkylmiä pakastusliuoksia, ja siirrettiin merkittyihin kryoputkiin. Putket vietiin jäällä Planer Kryo 360 -pakastuslaitteelle ja pakastettiin laitteen toimintaohjeen mukaan. Ajon päättyessä (noin 90 min) putket siirrettiin kaasufaasipakastimeen.

4.4.2 hASC-solujen valmistelu virtaussytometriaa varten

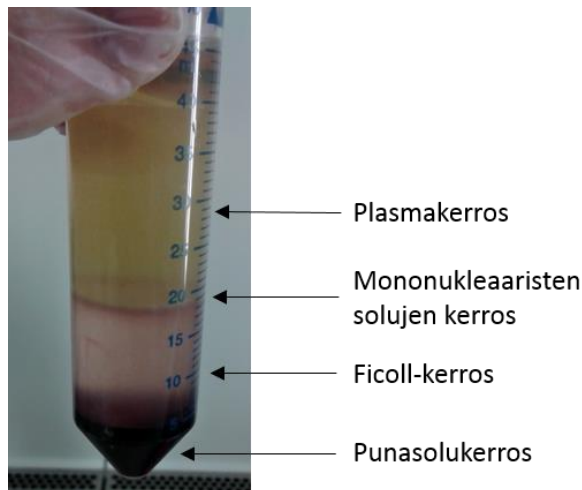
Virtaussytometrilla karakterisoitiin seerumillisessa mediumissa kasvatetut, eri pakastusliuoksilla pakastetut hASC-solut. Karakterisointi aloitettiin irrottamalla solut kasvatuspullosta, värjäämällä ne trypaanisinisellä ja laskemalla elävien solujen tiheys Bürkerin laskukammiolla (yhtälö 1). Kolmeen putkeen siirrostettiin 500 000 solua (yhtälö 3). Putkia sentrifugoitiin $135 \times g$ 5 min, ja supernatantti kaadettiin pois. Kontrolliin eli värjäämättömään solunäytteeseen lisättiin 500 μ l kylmää PBS:ää. Kontrollia sentrifugoitiin $167 \times g$ 5 min, liuos kaadettiin pois ja solupelletti suspensoitiin 500 μ l:aan kylmää PBS:ää. Kontrollia säilytettiin jääkaapissa näytteiden ajamiseen asti.

Pintamarkkerivärjättäville soluille lisättiin 100 μ l värjäyspuskuria ja 5 μ l vasta-aineita (liite 3). Putkia inkuboitiin 30 min jääkaapissa. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 500 μ l värjäyspuskuria, ja sentrifugoitiin 4 °C:ssa $167 \times g$ 5 min. Liuos kaadettiin pois ja lisättiin 500 μ l kylmää PBS:ää. Näytteitä sentrifugoitiin uudestaan 4 °C:ssa $167 \times g$ 5 min, liuos kaadettiin pois ja solut suspensoitiin 500 μ l kylmää PBS:ää. Näytteitä säilytettiin jääkaapissa ajoon asti. Ajo suoritettiin FACSCanto II -virtaussytometrilla (BD Biosciences) valmistajan toimintaohjeiden mukaan.

4.4.3 Pakastusliuos monosyyteille

Pakastusliuoskoikeita varten monosyytit eristettiin verinäytteestä ja pakastettiin ne samana päivänä. Herätyksen jälkeen soluja kasvatettiin yhden viikon ajan, minkä jälkeen ne laskettiin Bürkerin laskukammiolla (yhtälö 1) ja määritettiin elävyys (yhtälö 2).

Monosyyttien eristämisen aluksi pipetoitiin 15 ml Ficoll-liuosta neljään 50 ml sentrifugi-putkeen. Veripussia sekoiteltiin varovasti, katkaistiin letku ja valutettiin verinäyte 250 ml pulloon. Lisättiin 80 ml PBS:ää. 30 ml tätä näytelaimennosta pipetoitiin sentrifugiputkiin hyvin varovasti niin, ettei näyte sekoittunut Ficoll-kerrokseen, ja sentrifugoitiin $400 \times g$ 40 min ilman jarrua. Tätä sentrifugointia ei voida tehdä kuin kerran, joten jos kerrokset pääsevät sekoittumaan keskenään, putkesta ei saada soluja eristettyä. Kuvassa 4 näkyy kerrokset sentrifugoinnin jälkeen.



KUVA 4. Verinäytteen kerrokset Ficoll-käsittelyn ja sentrifugoinnin jälkeen

Vaalea mononukleaaristen solujen kerros kerättiin kertakäyttöpasteurpipetillä uusiin 50 ml putkiin, ja lisättiin 45 ml PBS:ää. Putkia sentrifugoitiin $350 \times g$ 10 min. Supernatantti imettiin pois, solupelletti suspensoitiin 45 ml PBS:ää ja sentrifugoitiin $200 \times g$ 10 min. Supernatantti imettiin jälleen pois, solupelletti suspensoitiin 45 ml PBS:ää ja sentrifugoitiin $350 \times g$ 10 min. Supernatantti imettiin pois, solut suspensoitiin pieneen määrään monosyyttien kasvatusliuosta, ja neljän rinnakkaisen putken solut yhdistettiin 10 ml tilavuuteen. Tätä solususpensiota laimennettiin solujen laskemista varten 1:100; 10 μ l suspensiota ja 490 μ l PBS:ää, josta pipetoitiin 50 μ l ja lisättiin 50 μ l 0,2 % trypan blueta. Elävien solujen tiheys laskettiin Bürkerin laskukammiolla (yhtälö 1).

Solususpensiosta pakastettiin 5×10^6 solua kahteen ampulliin, joista toinen monosyyttien DMSO-pakastusliuokseen ja toinen Stem-CellBankeriin. Yhtälön 3 mukaan laskettiin tarvittava määrä suspensiota ja pipetoitiin kahteen putkeen, sentrifugoitiin $350 \times g$ 10 min ja poistettiin supernatantti. Solupelletit suspensoitiin jääkylmiin pakastusliuoksiin, ja siirrettiin merkittyihin kryoputkiin. Putket laitettiin heti $4 \text{ }^\circ\text{C}$ isopropanolijäähdyttimeen

ja siinä -80 °C syväjäähäpakkastimeen. Seuraavana päivänä putket siirrettiin kaasufaasipakkastimeen. Herätyksen jälkeen pakastuseriä kasvatettiin 25 cm² suspensiosolupulloissa viikon ajan, lisäten kasvatusliuosta päivänä 3 tai 4. Viikon jälkeen solut laskettiin Bürkerin laskukammiolla (yhtälö 1) sekä määritettiin elävyysprosentti (yhtälö 2).

4.5 Adipogeneesimallikokeet

4.5.1 Solujen kasvatus

Adipogeneesimallia varten hASC-solut irrotettiin kasvatuspullosta Tryple Express -käsittelyllä, ja solut laskettiin Bürkerin laskukammiolla, kuten on kuvattu luvussa 4.4.1. Taulukon 2 pipetointikaavion mukaisesti 48-kuoppalevyille siirrostettiin 22 000 hASC-solua/kuoppa. Monosyyttejä siirrostettiin pipetointikaavion mukaan hASC-solujen päälle sekä omille kontrollikuopilleen 7 500 monosyyttiä/kuoppa. Siirrostettavat solumäärät laskettiin yhtälöllä 3.

TAULUKKO 2. hASC-solujen ja monosyyttien (MS) pipetointikaavio 48-kuoppalevyille adipogeneesimallissa

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	MS
B	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	MS
C	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	hASC + MS	MS
D	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	MS
E	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	MS
F	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	hASC	MS

Taulukossa 3 näkyvät eri käsittelyiden kasvatusliuosten vaihdot. Pipetointikaavion (taulukko 2) sarakkeet 1 ja 2 olivat hASC-kontrolleja, sarakkeille 3 ja 4 tehtiin erilaistus 1, sarakkeille 5, 6 ja 7 erilaistus 2, ja sarake 8 oli monosyyttikontrolli. hASC-solut ja

monosyytit maljattiin päivänä 0. Altistuspäivinä hASC-kuopilta imettiin vanha kasvatusliuos pois, ja lisättiin pipetillä 500 µl uutta liuosta. Monosyyttikontrolleilta pipetoitiin pois 250 µl vanhaa kasvatusliuosta, ja lisättiin tilalle 250 µl tuoretta kasvatusliuosta.

TAULUKKO 3. Altistukset adipogeesimallissa

	hASC-kontrolli	Erilaistus- menetelmä 1	Erilaistus- menetelmä 2	Monosyytti- kontrolli
Päivä 0, maljaus	hASC-medium	hASC-medium	hASC-medium	MS-medium
Päivä 1, altistus 1	hASC-medium	ATE-medium	ATE-medium	MS-medium
Päivä 4, altistus 2	perustestiliuos	ATE-medium	stimulaatioliuos	MS-medium
Päivä 7, altistus 3	perustestiliuos	ATE-medium	stimulaatioliuos	MS-medium
Päivä 9, altistus 4	perustestiliuos	ATE-medium	stimulaatioliuos	MS-medium
Päivä 13, lopetus	-	-	-	-

4.5.2 Analyysimenetelmät

Päivänä 13 soluille tehtiin elävyyssmittaus käyttäen WST-1-reagenssia sekä rasvan määrän mittaus käyttäen AdipoRed Assay -reagenssia. Taulukon 2 pipetointikaavion mukaan sarakkeilta 1, 3 ja 5 sekä kuopilta 8A-8C mitattiin solujen elävyys. Sarakkeilta 2, 4, 6 ja 7 sekä kuopilta 8D-8F mitattiin rasvan määrä. 50 µl WST-1-liuosta pipetoitiin mitattaville kuopille ja inkuboitiin 1,5 h. Inkuboinnin jälkeen levyä ravisteltiin kevyesti vaakatasorivistelijassa 1 min, ja tehtiin elävyyssmittaukset Thermo Scientificin Varioskan Flash -monileimalukijalla valmistajan ohjeiden mukaan.

Rasvan määrän mittausta varten AdipoRed Assay -reagenssia laimennettiin: jokaista mitattavaa kuoppaa varten pipetoitiin 12 µl AdipoRed-liuosta ja 400 µl PBS:ää. Kuopat imettiin tyhjiksi ja vanhan liuoksen tilalle pipetoitiin 412 µl AdipoRed-laimennosta. Tämän jälkeen levyä käsitellään ja säilytetään mahdollisuuksien mukaan pimeässä, koska

fluoresoivana aineena AdipoRed himmenee valon vaikutuksesta. Levyä inkuboitiin 10 min huoneenlämmössä, ja rasvan määrä mitattiin Thermo Scientificin Varioskan Flash-monileimalukijalla valmistajan ohjeiden mukaan.

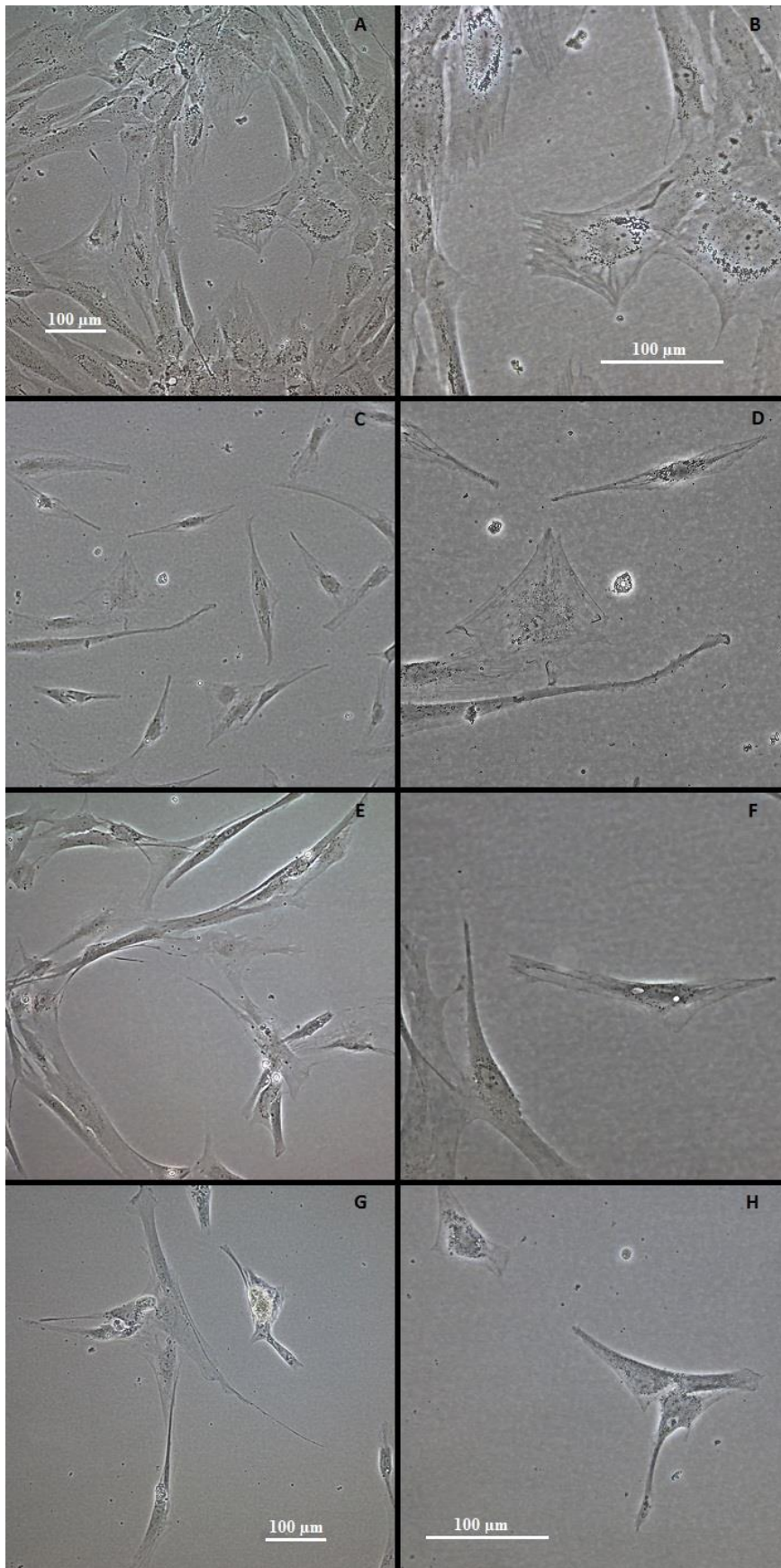
Mittausten jälkeen solut kiinnitettiin kuopille paraformaldehydilla. Vanhat liuokset poistettiin ja kuopat pestiin 500 µl DPBS:llä. Tilalle pipetoitiin 300 µl 4 % paraformaldehydiä, ja inkuboitiin 30 min huoneenlämmössä. Paraformaldehydi poistettiin, ja tilalle pipetoitiin 500 µl DPBS:ää. Levy suojattiin parafilmillä ja foliolla, ja laitettiin säilytykseen jääkaappiin. Myöhemmin levyt kuvattiin Nikon Eclipse Ti-S -käänteis-mikroskoopilla sekä Cell IQ -soluseurantalaitteella (Chipman tech).

5 TULOKSET

5.1 Kasvatusliuoksokokeiden tulokset

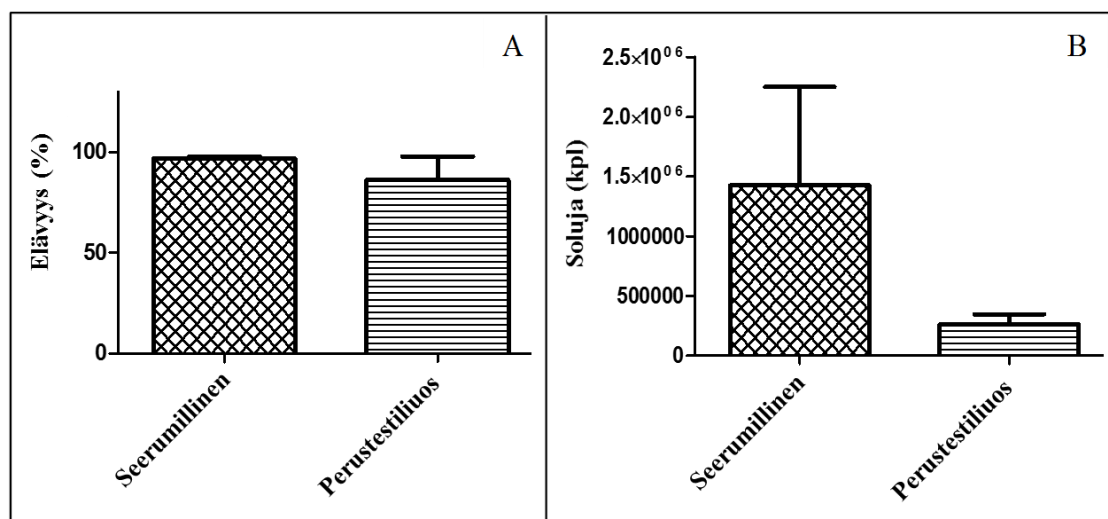
Mikroskopoitaessa nähtiin selkeitä eroja seerumillisessa ja seerumittomissa kasvatusliuoksissa kasvatettujen hASC-solujen välillä (kuva 5). Kuvat on otettu Nikon Eclipse Ti-S -käänteismikroskoopilla. FreeAdd-liuoksessa solujen kasvu oli silmännähdessä harvempaa kuin seerumillisessa kontrollissa, ja pullossa oli enemmän kuolleita soluja. Myös solujen morfologia oli poikkeava: solut olivat ohuempia, heikon näköisiä ja niissä oli pitkiä ulokkeita, joilla etsivät solukontaktia. FreeAdd-liuoksessa solut kasvoivat pääosin yksittäin eivätkä tasaisina ryhmittyminä.

Seerumittomassa perustestiliuoksessa kasvatetut solut olivat terveemmän näköisiä kuin FreeAdd-liuoksen solut, mutta kuitenkin poikkeavia verrattuna kontrolliin. Viikon ajan kasvatetut solut olivat heikon näköisiä ja pitkänomaisia. Niillä oli jo yritystä kasvaa yhdessä, mutta soluja oli kuitenkin niin vähän, että etsivät kontaktia pitkillä ulokkeilla. Kahden viikon ajan kasvatetut solut olivat jo ylikasvaneita: ne olivat alkaneet kuolla ja irrota viljelypullon pohjasta, joten solutiheys oli pieni.



KUVA 5. Mikroskooppikuvat hASC-soluista kasvatusliuoskokeiden loppuvaiheessa (Nikon Eclipse Ti-S -käänteismikroskooppi). A: Seerumillinen medium 10x. B: Seerumillinen medium 20x. C: FreeAdd-medium 10x. D: FreeAdd-medium 20x. E: Perustestiliuos 1 vko 10x. F: Perustestiliuos 1 vko 20x. G: Perustestiliuos 2 vko 10x. H: Perustestiliuos 2 vko 20x.

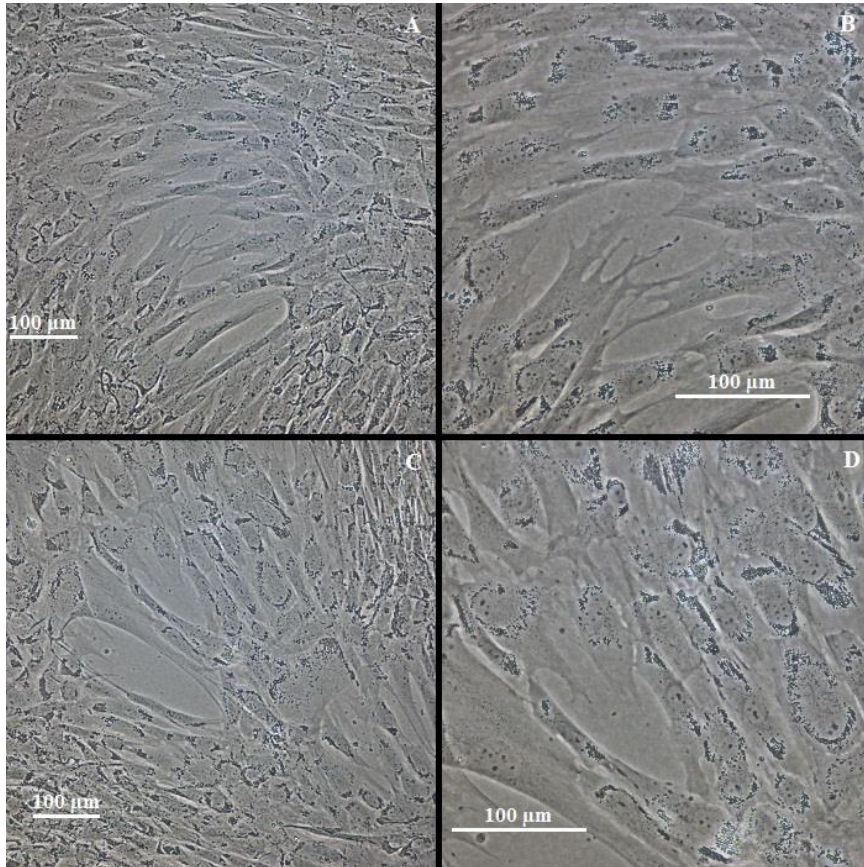
Kuviossa 2 on esitetty hASC-solujen elävyys ja saanto seerumillisessa kasvatusliuoksessa sekä seerumittomassa perustestiliuoksessa viljelyn jälkeen. Seerumitonta FreeAdd-kasvatusliuosta ei ole huomioitu kuviossa, koska tulokset saannosta ja elävyydestä olivat selvästi huonompia kuin seerumillisella kasvatusliuoksella ja perustestiliuoksella saadut tulokset (liite 5, taulukko 1). hASC-solujen elävyys oli perustestiliuoksessa hieman heikompi kuin seerumillisessa kasvatusliuoksessa, ja perustestiliuoksessa kasvatettujen solujen saanto oli selvästi pienempi kuin seerumillisessa mediumissa kasvatettujen. Ryhmien välillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkittävää eroa. Tulokset analysoitiin T-testillä.



KUVIO 2. A: hASC-solujen elävyys seerumillisessa kasvatusliuoksessa ja perustestiliuoksessa. B: hASC-solujen saanto seerumillisessa kasvatusliuoksessa ja perustestiliuoksessa. Tulokset on analysoitu T-testillä.

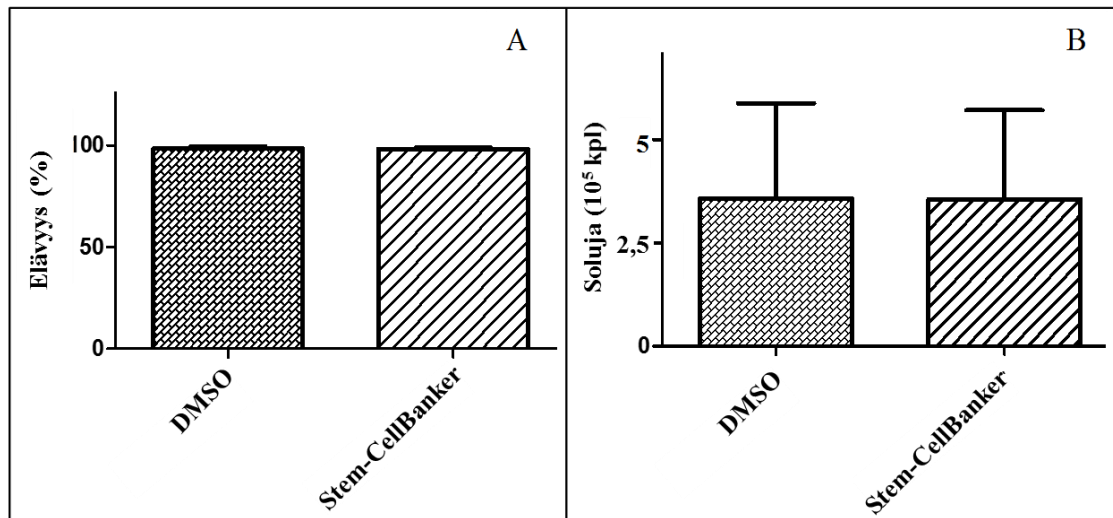
5.2 Pakastusliuuskokeiden tulokset

DMSO:lla ja Stem-CellBanker-liuoksella pakastettujen hASC-solujen morfologiassa ei huomattu eroa herätyksen ja viikon kasvatuksen jälkeen (kuva 6). Solut näyttivät hyvinvoivilta, ne kasvoivat tasaisesti viljelypulloissa ja niiden tumien ympärillä oli tyypilliset vakuoliympyrät. Kuvat on otettu Nikon Eclipse Ti-S -käänteismikroskoopilla.



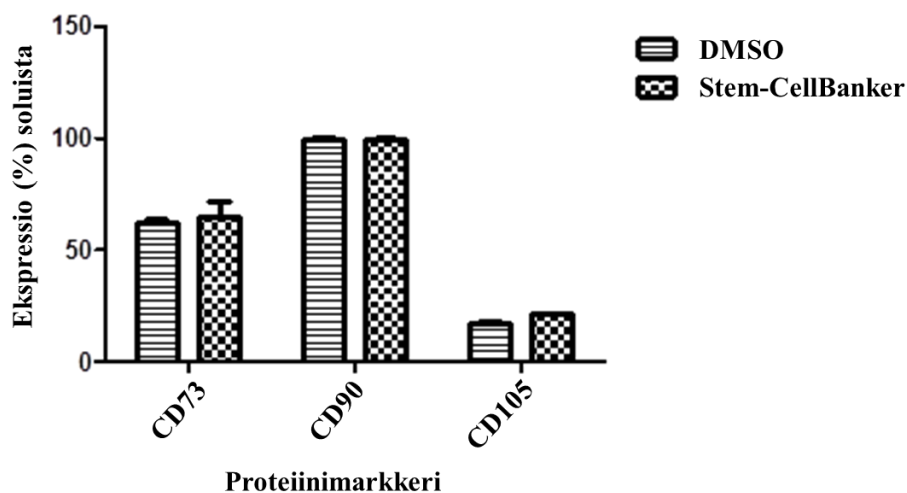
KUVA 6. Mikroskooppikuvat hASC-soluista pakastuksen ja viikon viljelyn jälkeen (Nikon Eclipse Ti-S -käänteismikroskooppi). A: DMSO 10x. B: DMSO 20x. C: Stem-CellBanker 10x. D: Stem-CellBanker 20x.

hASC-solujen elävyydessä tai saannossa (kuvio 3) ei ollut merkittäviä eroja eri pakastusliuosten välillä viikon viljelyn jälkeen. Tulokset (liite 5, taulukko 2) analysoitiin Mann Whitney -testillä.



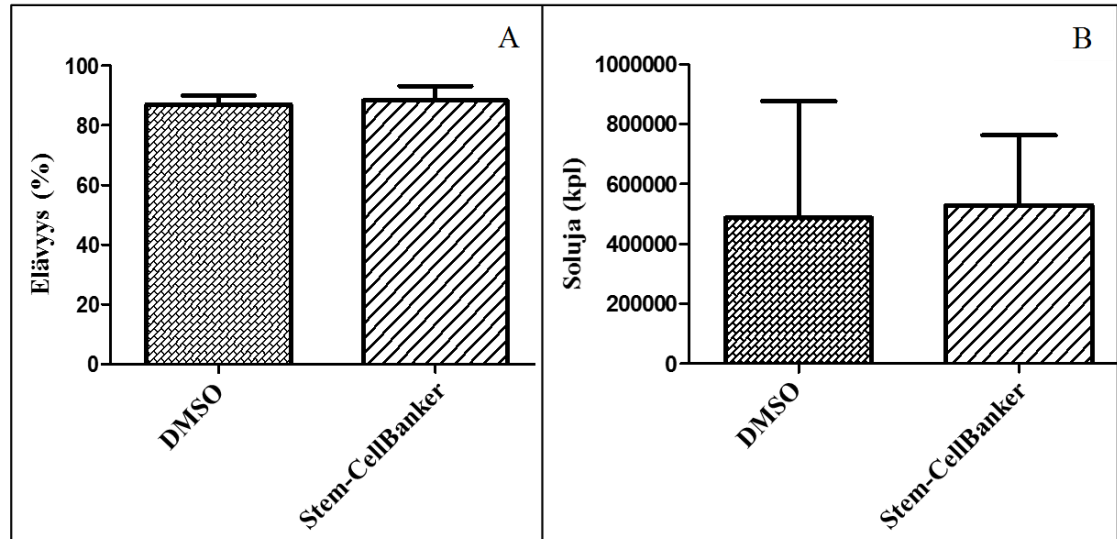
KUVIO 3. A: hASC-solujen elävyys DMSO:ssa ja Stem-CellBanker-liuoksessa pakastamisen jälkeen. B: hASC-solujen saanto DMSO:ssa ja Stem-CellBanker-liuoksessa pakastamisen jälkeen. Tulokset on analysoitu Mann Whitney -testillä.

Kuviossa 4 on esitetty hASC-solujen karakterisoinnin tulokset. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkittäviä eroja, mutta markkerin CD105 ekspressio oli hieman korkeampi Stem-CellBanker-liuoksella pakastetuilla soluilla kuin DMSO:lla pakastetuilla soluilla. Markkereilla CD73 ja CD90 ei ollut huomattavaa eroa pakastusliuosten välillä. Kokeessa tehtiin 2 toistoa (liite 5, taulukko 3), ja tulokset analysoitiin Mann Whitney -testillä.



KUVIO 4. Proteiinimarkkerien ekspressio hASC-soluissa pakastusliuoskoekien jälkeen. Tulokset on analysoitu Mann Whitney -testillä.

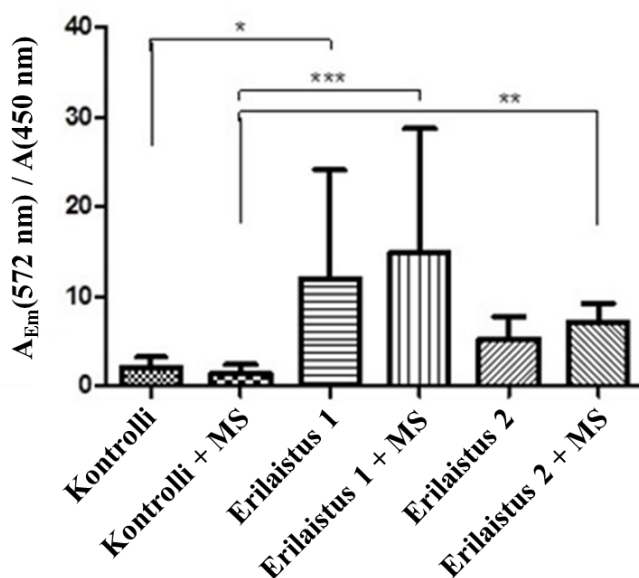
Kuviossa 5 on esitetty monosyyttien elävyys ja saanto DMSO:ssa ja Stem-CellBanker-liuoksessa pakastamisen, herätyksen ja viikon viljelyn jälkeen. Tulokset (liite 5, taulukko 4) analysoitiin T-testillä. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa, mutta elävyys näytti kuitenkin olevan hieman parempi Stem-CellBanker-liuoksella kuin DMSO:lla.



KUVIO 5. A: Monosyyttien elävyys DMSO:ssa ja Stem-CellBanker-liuoksessa pakastamisen jälkeen. B: Monosyyttien saanto DMSO:ssa ja Stem-CellBanker-liuoksessa pakastamisen jälkeen. Tulokset on analysoitu T-testillä.

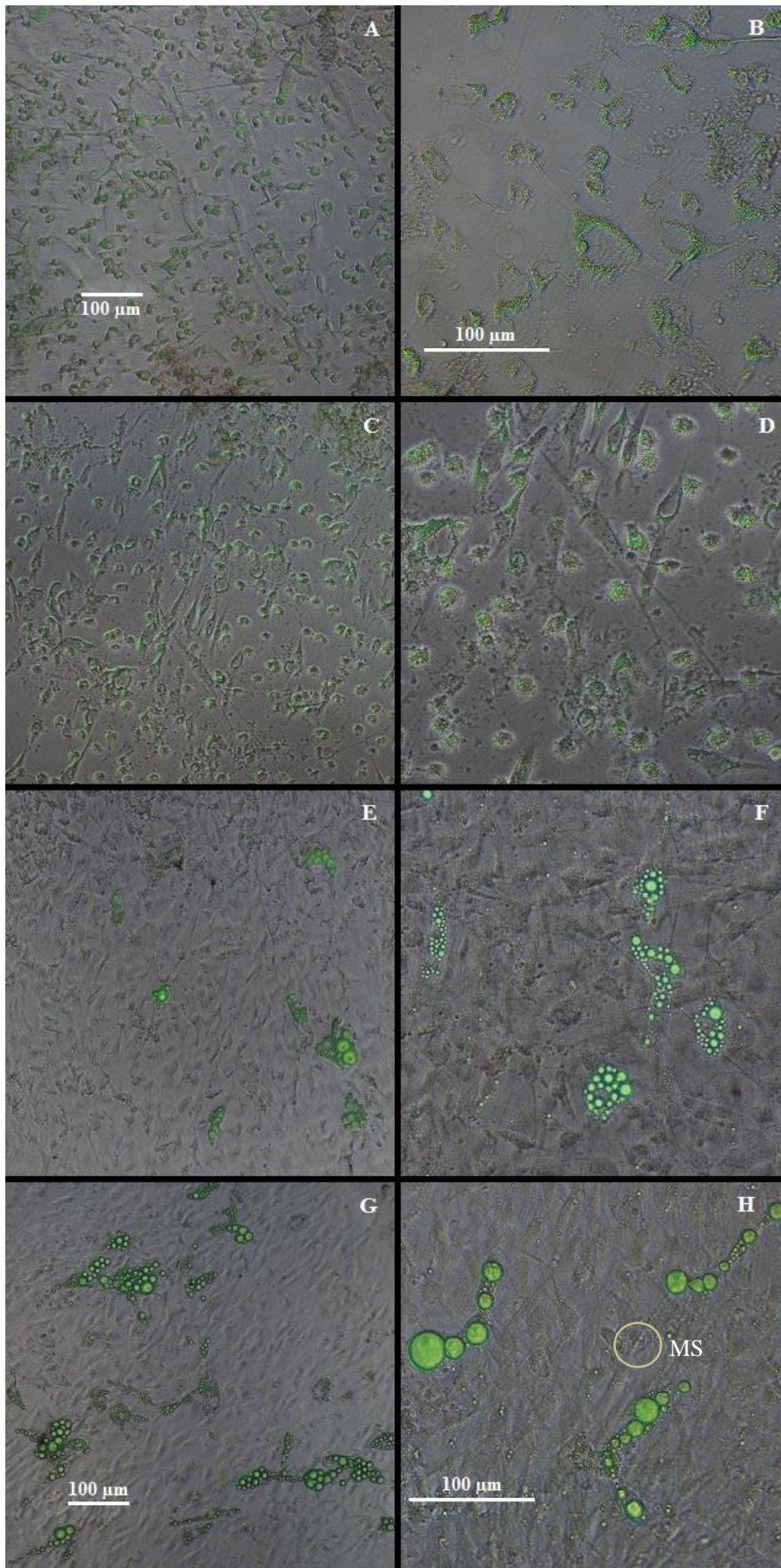
5.3 Adipogeneesimallikokeiden tulokset

Kuviossa 6 on esitetty adipogeneesimallin rasvaa/solu-arvot. Tilastollisesti merkittävä ero oli havaittavissa kontrollin ja erilaistusmenetelmä 1:n välille (*), kontrolli monosyyttien kanssa ja erilaistusmenetelmä 1 monosyyttien kanssa välille (***), sekä kontrolli monosyyttien kanssa ja erilaistusmenetelmä 2 monosyyttien kanssa välille (**). Oli kuitenkin nähtävissä suuntaus sille, että monosyyttien läsnä ollessa rasvaa/solu-arvot olivat suurempia erilaistus 1:ssä sekä erilaistus 2:ssä kuin pelkillä hASC-soluilla. Kokeessa tehtiin 2 toistoa, ja tulokset analysoitiin Kruskal-Wallis-testillä sekä Dunn's Multiple Comparison -testillä.



KUVIO 6. Adipogeneesimallin rasvaa/solu-arvot. Tilastollisesti merkittävä ero oli kontrollin ja erilaistusmenetelmä 1:n välillä (*), kontrolli monosyyttien kanssa ja erilaistusmenetelmä 1 monosyyttien kanssa välillä (***), sekä kontrolli monosyyttien kanssa ja erilaistusmenetelmä 2 monosyyttien kanssa välillä (**). Tulokset on analysoitu Kruskal-Wallis-testillä sekä Dunn's Multiple Comparison -testillä.

Viljelyiden lopussa solut kuvattiin Nikon Eclipse Ti-S -käänteismikroskoopilla (kuva 7). Kuvissa rasvapisarat on korostettu vihreällä värillä. Huomattavaa on se, että vaikka erilaistus 1:ssä rasvaa/solu-arvo oli suurempi kuin erilaistus 2:ssä, hASC-solut sisälsivät selvästi isompia lipidirakkuloita, kun taas erilaistus 1:n soluissa oli paljon pieniä lipidirakkuloita. Erilaistus 2:ssä isommat, ketjumaisesti järjestäytyneet lipidirakkulat olivat hieman yleisempiä monosyyttien läsnä ollessa kuin pelkillä hASC-soluilla. Kontrollien kuvat jätettiin pois, koska silminnähtäviä eroja ei ollut.



KUVA 7. Mikroskooppikuvat adipogeneesimallikokeiden loppuvaiheessa. (Nikon Eclipse Ti-S -käänteismikroskooppi). A: Eriäistys 1 10x. B: Eriäistys 1 20x. C: Eriäistys 1 + MS 10x. D: Eriäistys 1 + MS 20 x. E: Eriäistys 2 10x. F: Eriäistys 2 20x. G: Eriäistys 2 + MS 10x. H: Eriäistys 2 + MS 20x.

6 POHDINTA

6.1 Kasvatusliuoskokeet

Humaaniseerumi eristetään yksilöistä, joten sen ominaisuudet voivat vaihdella eri tuotantoerien välillä: esimerkiksi proteiinipitoisuuksien erot voivat vaikuttaa solujen kasvuun ja aiheuttaa vaihtelua tuloksissa (Mannello & Tonti 2007, 1606). Siten seerumittoman kasvatusliuoksen käyttö hASC-solujen viljelyssä poistaisi seerumierien välisen vaihtelun aiheuttaman ongelman. FreeAdd-seeruminkorvike on kaupallinen valmiste, joka sisältää solujen kasvuun ja kehitykselle tarpeelliset ravinteet ilman eläin- tai ihmisperäisiä komponentteja (Biowest 2015).

Kahta eri seerumitonta kasvatusliuosta testattiin hASC-solujen viljelyyn: FreeAdd-seeruminkorviketta sisältävää kasvatusliuosta sekä FICAM:n omaa seerumitonta perustestiliuosta. Koska ensimmäinen viljely FreeAdd-mediumilla antoi selkeästi huonot tulokset, kokeita sen kanssa ei jatkettu. Solujen saanto oli heikko ja ne olivat morfologialtaan selvästi hASC-kontrollista poikkeavia, joten ei lähdetty testaamaan pitoisuuden nostamista tai pidempää kasvatusaikaa. FreeAdd-kasvatusliuoksessa soluilta selvästi puuttui jotakin kasvuun ja hyvinvointiin tarvittavaa. FreeAdd-seeruminkorvikkeen kalleudenkaan vuoksi pitoisuuden nostaminen ei olisi ollut jatkokäyttöä ajatellen järkevää. FICAM:lla ei oteta käyttöön FreeAdd-seeruminkorviketta hASC-solujen viljelyssä.

Tutkittiin myös soveltuuko seerumiton perustestiliuos hASC-kasvatusliuoksen korvajaksi. Perustestiliuosta käytetään FICAM:ssa verisuonenmuodostusmallissa (Huttala ym. 2015) sekä osana rasvanmuodostumista stimuloivaa liuosta. Perustestiliuoksessa kasvanneiden solujen saanto oli selvästi parempi kuin FreeAdd-mediumilla, ja yhden viikon kasvatuksen jälkeen solujen morfologia oli kontrollisolujen kaltainen. Saannon parantamiseksi testattiin myös kahden viikon kasvatusaikaa, mutta silloin solut olivat jo ylikasvaneet: ne irtoilivat viljelypullon pohjasta ja olivat alkaneet kuolla. Myös hASC-kontrollin solut olivat kahden viikon jälkeen lähteneet kuroutumaan ja irtoilemaan. Seerumillisissa mediumissa saannon suuresta hajonnasta näkyikin, että solumäärät poikkesivat toisistaan eri viljelyaikojen takia (kuvio 2). Perustestiliuoksessa saannon hajonta oli pieni, mutta solujen elävyys oli selvästi heikentynyt kahden viikon kasvatuksessa. Solut olivat siis kasvaneet hyvin, mutta kuolleisuus lisääntyi liian pitkän viljelyn vuoksi.

Koska perustestiliuoksessa solujen saanto oli merkittävästi huonompi kuin seerumillisessa mediumissa, voi olla, että liuos oli vielä liian ravinneköyhää hASC-solujen kunnollista kasvua varten. Seerumittomaan kasvatusliuokseen täytyy olla lisätynä kaikki solujen tarvitsemat sytokiinit ja kasvutekijät, jotka seerumi tarjoaisi (Mannello & Tonti 2007, 1606). Perustestiliuos on kuitenkin lupaava seerumiton vaihtoehto hASC-solujen kasvatukseen, mutta ennen viljelykäyttöönottoa tarvitaan jatkotutkimuksia. Kasvatusajan pituus tulisi optimoida eli tutkia, milloin solujen saanto on parhaimmillaan. Perustestiliuoksessa kasvatettuja soluja tulisi myös karakterisoida virtaussytometrillä, jotta nähtäisiin, onko sillä vaikutusta proteiinimarkkerien CD73, CD90 ja CD105 ilmentymiseen verrattuna seerumillisessa mediumissa kasvatettuihin soluihin.

6.2 Pakastusliuuskokeet

DMSO on myrkyllistä kudoksille ja soluille (Hunt 2011, 110), joten sen korvaaminen hellävaraisemmalla pakastusliuoksella voisi parantaa solujen selviytymistä pakastuksen ja uudelleen herätyksen jälkeen. STEM-CELLBANKER[®]-pakastusliuos on solujen pakastussäilöntään tarkoitettu liuos, joka ei sisällä lainkaan eläinperäisiä komponentteja. Joillain solulinjoilla sen on todettu parantavan solujen selviytymisprosenttia verrattuna DMSO:n. (Amsbio 2013.)

Tässä tutkimuksessa uudella pakastusliuoksella ei saatu merkittävää parannusta solujen saantoon tai elävyyteen hASC-soluilla eikä monosyyteillä. Kuitenkin hASC-solujen proteiinimarkkereita määritettäessä havaittiin lievä parannus markkerin CD105 ekspressiossa. Tulokset vaikuttivat lupaavilta, koska FICAM:lla on ollut ongelmia tämän markkerin ilmentymisessä. Proteiinimarkkereiden määrittelyllä varmistetaan kantasolujen laatu, eli jos yhdenkin markkerin ekspressio on liian vähäistä, soluja ei käytetä. Jos jatkokokeissa edelleen havaitaan CD105-markkerin ekspression nousu, FICAM ottaa Stem-CellBankerin käyttöön hASC-solujen pakastamisessa.

Monosyyttien saannossa ja elävyydessä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa eri pakastusliuosten välillä, mutta elävyys oli kuitenkin hieman parempi Stem-CellBankerilla kuin DMSO:lla. Ylipäätään oli merkittävää havaita, kuinka nopeasti pakastuksesta herätetyt monosyytit alkoivat kuolla. Herätyksen jälkeen jo viikon päästä saanto oli pienentynyt huomattavasti, vaikka soluja käsiteltiin mahdollisimman vähän: pakastettiin

5×10^6 solua, ja viikon jälkeen oli parhaimmillaankin jäljellä 800 000 solua. Kuollessaan monosyytit hajoavat, joten laskukammiolla näkyy kokonaisten solujen lisäksi paljon solujen palasia. Tämän vuoksi monosyyttien laskeminen oli hankalaa. Mahdolliset lasku-
virheet ovat kuitenkin vaikuttaneet enemmän elävyyden kuin saannon määrittämisessä.

Koska monosyytit eivät selvästi kestä pakastamista kovin hyvin, jatkossa ne pyritään käyttämään suoraan eristyksen jälkeen kasvatukseen jätetyistä solueristä, tai mahdollisimman nopeasti herätyksen jälkeen. β -merkaptetanolin ja glutationin lisäämisen pakastusliuokseen ja herätyksen jälkeiseen kasvatusliuokseen on todettu parantavan selviytymistä esimerkiksi alkion kantasoluilla (Hunt 2011, 117). Ne ovat antioksidanteja eli yhdisteitä, jotka suojaavat soluja estämällä vapaiden radikaalien aiheuttamaa hapettumista itse pelkistymällä. Vapaat radikaalit voivat muun muassa vaurioittaa DNA:ta ja solukalvoja. (Aro 2013.) Tämän perusteella voitaisiin testata β -merkaptetanolin ja/tai glutationin lisäämistä monosyyttien pakastusliuokseen ja/tai herätyksen jälkeiseen mediumiin. Koska tulokset olivat kuitenkin jo nyt samaa luokkaa kuin DMSO:lla, FICAM ottaa Stem-CellBankerin käyttöön monosyyttien pakastamisessa. Se on käyttäjällekin turvallisempi vaihtoehto, koska DMSO on ihon läpi helposti imeytyvä liuotin.

6.3 Adipogeneesimalli

Adipogeneesimallin halutaan kuvaavan koko adipogeneesiprosessi alusta loppuun, jotta kemikaalin mahdollinen vaikutus adiposyyttien erilaistumiseen voidaan todeta. Toisaalta halutaan pystyä kasvattamaan kypsiä rasvasoluja, jotta voidaan havaita kemikaalien vaikutukset rasvan kertymiseen; nähdään edistävätkö vai ehkäisevätkö ne rasvan muodostumista, ja onko niillä siten vaikutusta lihavuuteen. Tulehdustilan eli immuunisolujen (mononukleaariset solut ja makrofagit) lisäämisellä saataisiin luonnollisemman kaltainen tila liikalihavuusmalliin.

Liikalihavilla ihmisillä valkoisessa rasvakudoksessa vallitsee jatkuva matala-asteinen tulehdus, ja makrofagien määrä kudoksessa on huomattavasti lisääntynyt verrattuna normaalipainoisiin. Makrofagit erittävät rasvakudoksessa tulehdusta edistäviä välittäjäaineita. (Mäkinen, Skrobuk, Nguyen & Koistinen 2013, 2118, 2121.) Siten ne myös ruokivat vallitsevaa tulehdusta. Opinnäytetyössä tutkittiin, onko monosyyteistä erilaistuvien makrofagien läsnäololla vaikutusta rasvasolujen kypsymiseen ja rasvan kertymiseen.

Tuloksista nähtiin suuntaus sille, että monosyytit viljelmässä lisäisivät rasvan määrää. Tämä tukee havaintoa, että makrofagien määrä korreloi suoraan adiposyyttien kokoa (Gil, Aguilera, Gil-Campos & Canete 2007, 121). Monosyyttien läsnä ollessa muodostui myös enemmän isoja lipidirakkuloita, mikä viittaa hASC-solujen nopeampaan kypsymiseen. Erilaistusmenetelmässä 2 hASC-solut vaikuttivat morfologialtaan kypsemmiltä kuin erilaistusmenetelmässä 1. Kuitenkin rasvan määrä oli erilaistus 2:ssa matalampi, mutta adipogeneesimallin kannalta tärkeämpää on erilaistaa kypsiä rasvasoluja kuin saada aikaan määrällisesti paljon rasvaa. Koska erilaistus 1:ssä solut keskittyvät enemmän jakautumiseen kuin erilaistumiseen, tulosten hajontakin oli suurta.

Erilaistus 2:n tulokset vaikuttivat luotettavilta, mutta erilaistus 1 tarvitsisi vielä kolmannen toiston nyt tulleen suuren hajonnan vuoksi. Monosyytit saattavat tarvita pidemmän kasvatusajan, jotta ne ehtisivät kehittyä kypsemmiksi ja toiminnallisemmiksi makrofageiksi. Voitaisiin myös tutkia, muuttuuko rasvasolujen geeniekspressio tai proteiinien erityistoiminta monosyyttien läsnä ollessa: geenien ilmentymisen tarkastelu kertoo enemmän solujen kypsyysasteesta kuin morfologia. Työssä aiheutti hankaluuksia hASC-solujen irtoaminen kasvatusalustalta, joten jatkossa voitaisiin tutkia jonkin pinnoitteen tai mahdollisesti 3D-viljelyn soveltuvuutta adipogeneesimalliin.

FICAM:lla ei tehdä vielä rutiininomaisesti monosyyttien ja hASC-solujen yhteisviljelmiä, joten kokeista saatiin hyödyllisiä tuloksia. Monosyytit ja makrofagit pysyivät hengissä vielä viljelyiden lopussa. Erilaistus 2:ssa ne olivat selkeästi vaikuttaneet hASC-solujen morfologiaan ja lipidien järjestäytymiseen, ja erilaistus 1:een verrattuna hASC-solut näyttivät morfologialtaan huomattavasti kypsemmiltä. Tämän perusteella erilaistusmenetelmä 2 on jatkossa parempi solujen yhteisviljelmään.

6.4 Yhteenveto

Eläinkokeiden eettisyys ja tehokkuus herättää paljon keskustelua, ja lisäksi koe-eläimet mallintavat kemikaalien vaikutuksia ihmisessä melko huonosti (Basketter ym. 2012, 16). Tämän vuoksi vaihtoehtoisten menetelmien kehittäminen on tärkeää. Ihmissolupohjaiset testimenetelmät voivat tulevaisuudessa tarjota eläinkokeita nopeampia ja tarkempia tuloksia, koska ne kertovat esimerkiksi lääketutkimuksessa lääkeaineiden vaikutuksista nimenomaan ihmisen soluille ja kudoksille. Ihmisen kantasolujen käyttöön liittyy omat

eettiset kysymyksensä, mutta esimerkiksi rasvan kantasoluja saadaan helposti eristettyä lihavuusleikkausten ylijäämäkudoksista.

Adipogeenesimallin pääajatuksena on korvata eläinkokeita lihavuustutkimuksessa. Kemikaalitestaukseen tarvitaan luotettava menetelmä, jolla saadaan hyvin toistuvat tulokset. FICAM:n adipogeenesimallissa on käytetty sekä humaaniseerumia että hASC-soluja. Primäärisolut aiheuttavat aina jonkin verran hajontaa tuloksiin, koska niiden ominaisuudet voivat vaihdella yksilöstä riippuen (Bunnell ym. 2008). hASC-soluille on kuitenkin kansainväliset suositukset pintaproteiinien ekspressiolle, joten solujen laatua voidaan tarkkailla ja siten välttää huonojen erien käyttö. Koska monosyytitkin eristetään yksilöistä, niiden lisääminen malliin toisi taas yhden vaihtelua lisäävän tekijän. Mallissa käytettävien solujen tulee olla hyvin karakterisoituja, ja niiden ominaisuudet tulee tuntea, jotta saadaan toistettavia tuloksia.

Myös humaaniseerumin ominaisuudet voivat vaihdella eri valmistuserien välillä, joten sen poistaminen kasvatusliuoksesta pienentäisi komponenttien aiheuttamaa hajontaa. Kemikaalitestauksissa seerumin sisältämät komponentit saattavat aiheuttaa myös tuntemattomia yhteisvaikutuksia tutkittavan kemikaalin kanssa. Adipogeenesimalli on valmis kemikaalitestauskäyttöön, kun kaikki sen osatekijät on optimoitu, ja niiden vaihtelulle on asetettu hyväksyttävät rajat.

Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella voidaan osaltaan kehittää FICAM:n adipogeenesimallia, jotta siitä saataisiin tarkka, luotettava ja toistettava malli kemikaalitestaukseen. Seerumittoman kasvatusliuoksen käyttöönotto poistaisi humaaniseerumi-ongelman, StemCell-Banker-pakastusliuos mahdollisesti parantaa hASC-solujen geeniekspressiota, ja monosyyttien lisäämisellä voidaan saada rasvasolut paremmin kypsytettyä. Mallin valmistuessa se validoidaan, eli sen toimivuus osoitetaan GLP-laaturjärjestelmän vaatimusten mukaisesti. Validoinnin jälkeen mallia voidaan tarjota viranomaisohjeistoihin. Adipogeenesimallia voidaan käyttää rasvakudoksen ja adiposyyttien toiminnan sekä liikalihavuuden tutkimisessa. Tästä voisi tulevaisuudessa olla apua jatkuvasti yleistyvän lihavuuden ja sen aiheuttamien sairauksien hoidossa sekä lääkekehityksessä.

LÄHTEET

Amsbio. 2013. STEM-CELLBANKER®. Tulostettu 27.10.2015. <http://www.amsbio.com/STEM-CELLBANKER-Stem-Cell-Cryopreservation-Solution.aspx>

Aro, A. 2013. Antioksidantit. Artikkelit tarkastettu 4.3.2013. 100 kysymystä ravinnosta. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Tulostettu 2.11.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=skr00037

Arrowsmith, J. & Miller, P. 2013. Trial Watch: Phase II and Phase III attrition rates 2011–2012. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12, 569.

Bain, B. 2006. *Blood Cells: A Practical Guide*. 4. painos. Oxford: Blackwell Publishing, 119–121.

Basketter, D. A., Clewell, H., Kimber, I., Rossi, A., Blaauboer, B. J., Burrier, R., Dane-shian, M., Eskes, C., Goldberg, A. & Hasiwa, N. 2012. t4 report: A Roadmap for the Development of Alternative (Non-Animal) Methods for Systemic Toxicity Testing. *ALTEX: Alternatives to Animal Experimentation*. 29 (1), 3–91.

Bellas, E., Marra, K. G. & Kaplan, D. L. 2013. Sustainable Three-Dimensional Tissue Model of Human Adipose Tissue. *Tissue Engineering: Part C, Methods*. 19 (10), 745–754.

BioResearch. 2014. Assay Solutions: Luminescent and Cell Based Assays. Päivitetty 1.9.2014. Tulostettu 10.11.2015. <http://www.biocenter.hu/pdf/Bioassay.pdf>

Biowest. 2015. FreeAdd. Tulostettu 27.10.2015. <http://www.biowest.net/products/serum-replacement/freeadd/8526-freeadd-5x.html>

Blann, A., Knight, G. & Moore, G. 2010. *Haematology*. 1. painos. New York: Oxford University Press, 242–243.

Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K. & Gimble, J. M. 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 15 (6), 641–648.

Brommage, R., Desai, U., Revelli, J.-P., Donoviel, D., Fontenot, G., DaCosta, C., Smith, D., Kirkpatrick, L., Coker, K., Donoviel, M., Eberhart, D., Holt, K., Kelly, M., Paradee, W., Philips, A., Platt, K., Suwanichkul, A., Hansen, G., Sands, A., Zambrowicz, B. & Powell, D. 2008. High-throughput Screening of Mouse Knockout Lines Identifies True Lean and Obese Phenotypes. *Obesity*. 16 (10), 2362–2367.

Bunnell, B. A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B. & Ripoll, C. 2008. Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation. *Methods*. 45 (2), 115–120.

Cartwright, T. & Shah, G. P. 2002. Culture media. Teoksessa Davis, J. M. (toim). *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. 2. painos. New York: Oxford University Press, 69–106.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 8 (4), 315–317.

Engel, P. 2009. *Pain-Free Biochemistry. An essential guide for the health sciences*. 1. painos. West Sussex: Wiley-Blackwell, 229–231.

Euroopan komissio. 2013. Komission kertomus neuvostolle ja Euroopan parlamentille. Seitsemäs kertomus Euroopan unionin jäsenvaltioissa kokeisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettyjen eläinten lukumäärää koskevista tilastoista. 5.12.2013. Bryssel.

Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU. Annettu 22.9.2010 tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta. 4 artikla: Korvaamista, vähentämistä ja parantamista koskeva periaate.

Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. & Lima, F. B. 2007. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *Jornal de Pediatria*. 83 (5), 192–203.

Gerlach, J., Lin, Y.-C., Brayfield, C., Minter, D., Li, H., Rubin, J. & Marra, K. 2012. Adipogenesis of Human Adipose-Derived Stem Cells Within Three-Dimensional Hollow Fiber-Based Bioreactors. *Tissue Engineering: Part C, Methods*. 18 (1), 54–61.

Gil, A., Aguilera, C. M., Gil-Campos, M. & Canete, R. 2007. Altered signalling and gene expression associated with the immune system and the inflammatory response in obesity. *British Journal of Nutrition*. 98 (1), 121–126.

van Harmelen, V., Skurk, T. & Hauner, H. 2005. Primary Culture and Differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells. Teoksessa Picot, J. (toim). *Human Cell Culture Protocols*. 2. painos. New Jersey: Humana Press, 125–135.

Harms, M. & SealeBrown, P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*. 19, 1252–1263.

Heinonen, T. 2015. Better Science with Human Cell-based Organ and Tissue Models. *ATLA*. 43, 29–38.

He, Y., Ning, T., Xie, T., Qiu, Q., Zhang, L., Sun, Y., Jiang, D., Fu, K., Yin, F., Zhang, W., Shen, L., Wang, H., Li, J., Lin, Q., Sun, Y., Li, H., Zhu, Y. & Yanga, D. 2011. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 108(47), 19078–19083.

Hossler, F. 2011. Brown and white adipose cells. © Dr. Fred Hossler/Visuals Unlimited/Corbis.

Hunt, C. J. 2011. Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 38 (2), 107–123.

- Huttala, O., Vuorenperä, H., Toimela, T., Uotila, J., Kuokkanen, H., Ylikomi, T., Sarkanen, J.-R. & Heinonen, T. 2015. Human Vascular Model with Defined Stimulation Medium – A Characterization Study. *ALTEX*. 32 (2), 125–136.
- 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, 10 sivua.
- Lindroos, B., Suuronen, R. & Miettinen, S. 2011. The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*. 7 (2), 269–291.
- Louis, K. S. & Siegel, A. C. 2011. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. Teoksessa Stoddart, M. J. (toim). *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. 1. painos. New Jersey: Humana Press, 7–12.
- Lumio, J. 2014. Elimistön vastustuskyky, immunitetti. Artikkelitarkastettu 17.4.2014. *Lääkärikirja Duodecim*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Tulostettu 26.8.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01150&p_haku=monosyytti
- Lääninhallitus & ELLA–Eläinkoelautakunta. 2015. Koe-eläinten käyttömäärät Suomessa: Vuosittaiset käyttömäärät 2007 - 2013. Tulostettu 20.3.2015. <http://www.laainhallitus.fi/lh/etela/hankkeet/ellapro/home.nsf/pages/BFD5CAFA94D8E7C7C225728A00475B11?opendocument>
- Orava, J., Nuutila, P., Lidell, M. E., Oikonen, V., Noponen, T., Viljanen, T., Scheinin, M., Taittonen, M., Niemi, T., Enerba, S. & Virtanen, K. A. 2011. Different Metabolic Responses of Human Brown Adipose Tissue to Activation by Cold and Insulin. *Cell Metabolism*. 14 (2), 272–279.
- Mannello, F. & Tonti, G. A. 2007. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, or Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? All That Glitters Is Not Gold! *Stem Cells*. 25 (7), 1603–1609.
- 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.
- Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U. & Falkevall, A. 2013. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature Protocols*. 8, 1149–1154.
- Mustajoki, P. 2015. Tyypin 2 diabeteksen hoito. Artikkelitarkastettu 2.3.2015. *Lääkärikirja Duodecim*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Tulostettu 31.7.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00775
- Mäkinen, S., Skrobuk, P., Nguyen, Y. H. & Koistinen, H. 2013. Insuliiniresistenssin mekanismit. *Duodecim*. 129, 2115–2122.

National Institutes of Health. 2015a. Stem Cell Basics. Introduction: What are stem cells, and why are they important? Päivitetty 5.3.2015. Stem Cell Information. Tulostettu 9.10.2015. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>

National Institutes of Health. 2015b. Stem Cell Basics. What are the similarities and differences between embryonic and adult stem cells? Päivitetty 3.3.2015. Stem Cell Information. Tulostettu 9.10.2015. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics5.aspx>

Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. 2000. Molecular Regulation of Adipogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 16, 145–171.

Sarkanen, J.-R. 2012. Engineering Vascularized Soft Tissue. Tampereen yliopisto. Lääketieteen yksikkö. Acta Universitatis Tamperensis; 1765. Acta Electronica Universitatis Tamperensis; 1238. Väitöskirja.

Sarkanen, J.-R., Kaila, V., Mannerström, B., Rätty, S., Kuokkanen, H., Miettinen, S. & Ylikomi, T. 2012. Human Adipose Tissue Extract Induces Angiogenesis and Adipogenesis *In Vitro*. Tissue Engineering Part A. 18 (1-2), 17–25.

Shapiro, H. M. 2003. Practical Flow Cytometry. 4. painos. New Jersey: Wiley-Liss Inc.

Siitonen, T. & Koistinen, P. 2007. Verisolujen tuotanto ja sen säätely. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A., Lassila, R. & Porkka, K. (toim). Veritaudit. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 16–30.

Stem Cell Institute. 2015. Types of Adult Stem Cells. Tulostettu 24.10.2015. <https://www.cellmedicine.com/types-of-stem-cells/>

Stoddart, M. J. 2011. Cell Viability Assays: Introduction. Teoksessa Stoddart, M. J. (toim). Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. 1. painos. New Jersey: Humana Press, 1–6.

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

Yao, X., Shan, S., Zhang, Y. & Ying, H. 2011. Recent progress in the study of brown adipose tissue. Cell & Bioscience. 1 (35), 9 sivua.

Yin, L.-M., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y.-D. & Yang, Y.-Q. 2013. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. International Journal of Medical Sciences. 10 (1), 68–72.

Yona, K. 2005. Human Mononuclear Phagocytes in Tissue Culture. Teoksessa Picot, J. (toim). Human Cell Culture Protocols. 2. painos. New Jersey: Humana Press, 137–145.

LIITTEET

1(2)

Liite 1. Kasvatusliuosten valmistusohjeet

TAULUKKO 1. hASC-solujen kasvatusliuos, seerumillinen

Määrä (100 ml:aan)	Komponentti	Valmistaja
89 ml	DMEM/F-12	Gibco (Life Technologies)
10 ml	Humaaniseerumi	PAA Laboratories
1 ml	L-glutamiini (2 mM)	Lonza Group LTD

TAULUKKO 2. hASC-solujen FreeAdd-kasvatusliuos, seerumiton 1

Määrä (50 ml:aan)	Komponentti	Valmistaja
47,5 ml	DMEM/F-12	Gibco
2 ml	FreeAdd (5x)	Biowest
0,5 ml	L-glutamiini (2 mM)	Lonza Group LTD

TAULUKKO 3. hASC-perustestiliuos, seerumiton 2

Määrä (100 ml:aan)	Komponentti	Valmistaja
92,456 ml	DMEM/F-12	Gibco
3,33 ml	30 % BSA	Biosera
2,80 ml	Natriumpyruvaatti (2,8 mM)	Gibco
1,28 ml	L-glutamiini (2 mM)	Lonza Group LTD
133 µl	ITS-liuos (6,65 µg/ml insuliini, 6,65 µg/ml transferriini, 6,65 ng/ml seleeni)	BD Biosciences
1 µl	T3-liuos (0,1 nM)	Sigma-Aldrich

(jatkuu)

TAULUKKO 4. Monosyyttien kasvatusliuos

Määrä (100 ml:aan)	Komponentti	Valmistaja
99 ml	RPMI-1640	Gibco
1 ml	Penisilliini/Streptomysiini-liuos (50 yksikköä/ μ l penisilliini, 50 μ g/ μ l streptomysiini)	Gibco

Liite 2. Pakastusliuosten valmistusohjeet

TAULUKKO 1. hASC-solujen pakastusliuos

Pitoisuus liuksessa	Komponentti	Valmistaja
10 %	DMSO	Sigma-Aldrich
90 %	Humaaniseerumi	PAA Laboratories

TAULUKKO 2. Monosyyttien pakastusliuos

Pitoisuus liuksessa	Komponentti	Valmistaja
80 %	Monosyyttien kasvatusliuos	FICAM
10 %	DMSO	Sigma-Aldrich
10 %	AB-seerumi (lämpöinaktivoitu)	Lonza Group LTD

Liite 3. Virtausytometria-liuokset

TAULUKKO 1. Värjäyspuskuri

Määrä (10 ml:aan)	Komponentti	Valmistaja
1 ml	10 % BSA	Biosera
9 ml	PBS	Lonza Group LTD

TAULUKKO 2. Leimatut vasta-aineet

Vasta-aine (leima)	Valmistaja
CD73 (-FITC)	BD Biosciences
CD105 (-V450)	BD Biosciences
CD90 (-PE-CY7)	BD Biosciences

TAULUKKO 3. Vasta-aineiden isotyyppikontrollit

Isotyyppikontrolli	Valmistaja
FITC	BD Biosciences
V450	BD Biosciences
PE-CY7	BD Biosciences

Liite 4. Adipogeneesimallin liuosten valmistusohjeet

TAULUKKO 1. Suplementti ATE-mediumiin

Määrä (12 ml:aan)	Komponentti	Valmistaja
10 ml	Humaaniseerumi	PAA Laboratories
1 ml	L-glutamiini (2 mM)	Gibco
1 ml	Penisilliini/Streptomysiini-liuos (50 yksikköä/μl penisilliini, 50 μg/μl streptomysiini)	Gibco

TAULUKKO 2. ATE-medium

Pitoisuus/ml	Komponentti	Valmistaja
1800 μg/ml	ATE	FICAM
lopput	DMEM/F-12	Gibco
120 μl/ml	Suplementti	FICAM

TAULUKKO 3. hASC-stimulaatioliuos

Määrä (100 ml:aan)	Komponentti	Valmistaja
98,936 ml	hASC-perustestiliuos	FICAM
784 μl	Askorbiinihappoliuos (200 μg/ml): Askorbiinihappo Natriumhydroksidi (0,1 M)	Sigma-Aldrich Fluka
100 μl	FGF-β (1 ng/ml)	R&D Systems
40 μl	VEGF (10 ng/ml)	R&D Systems
40 μl	Hydrokortisoniliuos (2 μg/ml): Hydrokortisoni Etanoli	Sigma-Aldrich Altia
100 μl	Hepariiniliuos (0,5 μg/ml): Hepariini Steriili vesi	Sigma-Aldrich Gibco

Liite 5. hASC-solujen tulokset

TAULUKKO 1. hASC-solujen kasvatusliuoskokeiden tulokset

Kasvatusliuos	Saanto ($\times 10^6$ solua)	Elävyys (%)
Seerumillinen 1 vko	2,21	96,5
	1,5	96,0
FreeAdd	0,016	86,7
Perustestiliuos 1 vko	0,319	94,4
Perustestiliuos 2 vko	0,2	78,0
Seerumillinen 2 vko	0,56	98,0

TAULUKKO 2. hASC-solujen pakastusliuoskokeiden tulokset

Pakastusliuos	Saanto ($\times 10^6$ solua)	Elävyys (%)
DMSO	1,79	97,3
	1,97	98,6
	3,43	99,3
Stem-CellBanker	1,95	97,5
	1,89	97,8
	3,28	99,2

TAULUKKO 3. Proteiinimarkkerien ekspressio hASC-soluissa pakastusliuoskokeiden jälkeen (% mitatuista soluista)

Proteiinimarkkeri	DMSO		Stem-CellBanker	
CD73	60,5	63,1	60,1	69,6
CD90	99,8	98,7	99,6	98,4
CD105	16,7	18,0	21,3	20,7

Liite 6. Monosyyttien tulokset

TAULUKKO 1. Monosyyttien pakastusliuoskokeiden tulokset

Pakastusliuos	Saanto ($\times 10^6$ solua)	Elävyys (%)
DMSO	0,21	85,0
	0,76	89,1
Stem-CellBanker	0,36	85,0
	0,69	91,7