

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2015

Hanna Lehtilä

SOLUJEN VIABILITEETIN MÄÄRITTÄMINEN GEELIMÄISISSÄ JA VAAHTOMAISISSA BIOMATERIAALEISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

2015 | Sivumäärä 66

Mika Jokinen, Yliopettaja

Hanna Lehtilä

SOLUJEN VIABILITEETIN MÄÄRITTÄMINEN GEELIMÄISISSÄ JA VAAHTOMAISISSA BIOMATERIAALEISSA

Biomateriaaleja käytetään kudosteknologiassa solujen kasvu- ja kiinnittymisalustana, jonka tärkeimpiä ominaisuuksia ovat sekä materiaalin elastisuus että huokoisuus. Ominaisuuksiltaan erilaisia materiaaleja voidaan käyttää erityyppisten solujen kasvatukseen. Biomateriaalien ominaisuuksia pyritään kehittämään paitsi soluja ylläpitäviksi, myös kasvua edistäviksi. Vaahtomainen hydrogeeli tarjoaa soluille kolmiulotteisen kasvuympäristön, joka simuloi *in vivo* -kasvatusta paremmin kuin perinteinen solukasvatus pulloissa tai maljoilla. 3D-solukasvatuksen uskotaankin korvaavan perinteiset menetelmät *in vitro* -tutkimuksessa.

Opinnäytetyössä tutkittiin solujen viabiliteettia silikapohjaisissa biomateriaaleissa. Materiaalit valmistettiin sooli-geeli -menetelmällä ja niiden tilavuutta lisättiin vaahdottamalla. Tavoitteena oli valmistaa materiaali, jossa solut (WEHI-164) saataisiin säilymään hengissä vähintään kahden viikon ajan sekä kehittää menetelmä solujen viabiliteetin määrittämiseksi materiaalissa. Osasta materiaaleja tutkittiin myös niiden reologisia ominaisuuksia, kuten häviö- ja varastomoduulia sekä häviötekijää.

Työssä valmistettiin kuusi eri materiaalia, joihin istutettujen solujen viabiliteettia seurattiin 14–39 vuorokauden ajan materiaalista riippuen. Viabiliteetin todentamiseen käytettiin kaupallista reagenssia Alamar Blueta. Osana opinnäytetyötä tutkittiin prototyyppivaiheessa olevan akustisen sensorin käyttömahdollisuuksia sekä solukasvun että materiaalin kehittymisen seurannassa.

Solut saatiin säilymään hengissä kolmessa eri materiaalissa, joiden kaikkien lopullinen silikapitoisuus oli sama. Positiivisia tuloksia saatiin pisimmillään 39 vuorokauden ajan. Akustisella sensorilla saatiin havaittavia signaaleja kaikista tutkituista materiaaleista. Akustiset tulokset korreloivat aiemman solujen kasvua ja materiaalien kehittymistä käsittelevän tiedon kanssa.

ASIASANAT:

biomateriaali, hydrogeeli, 3D-solukasvatus, solukapselointi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 66

Mika Jokinen, Principal Lecturer

Hanna Lehtilä

CELL VIABILITY IN GEL-LIKE AND FOAM-LIKE BIOMATERIALS

Biomaterials are used in tissue engineering as a scaffold for cell attachment and proliferation. When aspiring to support cell viability, elasticity and porosity are the most important properties of the material. Different types of cells benefit from different types of materials. Biomaterials are under constant development not only to keep the cells alive but to promote cell proliferation and migration. Foam-like hydrogel offers the cells a three-dimensional growth environment that simulates *in vivo* conditions better than traditional cell culturing in a bottle or on a dish. 3D cell culture is believed to outdo the traditional methods in *in vitro* studies.

The objective of the thesis was to study cell viability in silica based biomaterials. The materials were prepared in a sol-gel process and the final volume was increased by foaming. The aim was to prepare a material where the cells (WEHI-164) could be kept alive for at least two weeks. There was also need for a method for determining cell viability in the materials used. In the case of some of the materials, also rheological properties, such as storage and loss modulus and damping factor, were examined.

Six different types of materials were prepared and the viability of the seeded cells was monitored 14 to 39 days depending on the material. In verifying the viability, the commercial reagent Alamar Blue was used.

As part of the thesis, the use of a prototype stage acoustic sensor in monitoring cell viability and material development was surveyed.

In three different materials, all with same final silica content, cells were confirmed to stay alive. The longest time period with positive signals was 39 days. Signals were detected from all examined materials with the acoustic sensor. The results correlate with previous knowledge about cell proliferation and maturation of the materials.

KEYWORDS:

biomaterial, hydrogel, 3D cell culture, cell encapsulation

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET/SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 BIOMATERIAALIT JA KUDOSTEKNOLOGIA	10
2.1 Biologiset biomateriaalit	10
2.2 Synteettiset biomateriaalit	11
2.3 Kudosteknologia	12
3 SOLUVILJELY	16
3.1 Solun elinkaari	16
3.2 Solulinjatyytit	17
3.3 WEHI-164	19
4 3D-SOLUKASVATUS	20
5 SOOLI-GEELI –PROSESSI	25
6 REOLOGIA	27
7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
7.1 Materiaalin valmistus	30
7.2 Solujen kasvatus ja lisääminen materiaaliin	34
7.3 Näytteiden tutkiminen	36
8 TULOKSET	40
8.1 Solujen viabiliteetti materiaaleissa	40
8.2 Reologia	49
8.3 Akustinen sensori	53
9 POHDINTA	57
10 JOHTOPÄÄTÖKSET	62
LÄHTEET	63

LIITTEET

Liite 1. Valmistettujen soolien reseptit.	
Liite 2. Käytettyjen liuosten koostumukset.	
Liite 3. R-arvon laskeminen	
Liite 4. Prosessikaavio, soolin valmistus	
Liite 5. Prosessikaavio, etanolin erotus	
Liite 6. Vaahdotus	
Liite 7. Solujen lisäys	

KUVAT

Kuva 1. Solusyklin vaiheet.	16
Kuva 2. Solujen morfologiatyypit.	18
Kuva 3. 3D-solukasvatuksen eri menetelmiä.	20
Kuva 4. Levy-levy -mittapää.	28
Kuva 5. Kartio-levy -mittapää.	29
Kuva 6. Havainnekuva soolinvalmistuslaitteistosta.	31
Kuva 7. Hydrogeelivaahdot (R80).	34
Kuva 8. Akustisen sensorin kaaviokuva. Lähde: MicroAtmos Oy.	37
Kuva 9. Solu-hydrogeelivaahdot -yhdistelmä mittauksen jälkeen.	54

KUVIOT

Kuvio 1. Taustan signaalin muutos ajan funktiona.	49
Kuvio 2. Hydrogeelivaahdot 5, reologisten arvojen seuranta (195 h).	50
Kuvio 3. Hydrogeelivaahdot 5, häviötekijän seuranta (195 h).	51
Kuvio 4. Varastomoduuili, hydrogeelivaahdot 3, 4 ja 5.	52
Kuvio 5. Häviömoduuili, hydrogeelivaahdot 3, 4 ja 5.	52
Kuvio 6. Häviötekijä, hydrogeelivaahdot 3, 4 ja 5.	53
Kuvio 7. Replikamateriaali, varastomoduuili.	55
Kuvio 8. Replikamateriaali, häviömoduuili.	56
Kuvio 9. Replikamateriaali, häviötekijä.	56

TAULUKOT

Taulukko 1. Eri pehmytkudosten elastisia moduuleja.	15
Taulukko 2. Valmistetut materiaalit.	33
Taulukko 3. Solututkimuksessa käytetyt materiaalit.	40
Taulukko 4. Fluoresenssi, hydrogeelivaahdot 1, näyte 1.	42
Taulukko 5. Fluoresenssi: hydrogeelivaahdot 1, näyte 2.	42
Taulukko 6. Fluoresenssi: hydrogeelivaahdot 2, näyte 1.	43

Taulukko 7. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 2, näyte 2.....	43
Taulukko 8. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 3, näyte 1.....	44
Taulukko 9. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 3, näyte 2.....	44
Taulukko 10. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 3, näyte 3.....	45
Taulukko 11. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 3, näyte 4.....	45
Taulukko 12. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 4, näyte 1.....	46
Taulukko 13. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 4, näyte 2.....	46
Taulukko 14. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 4, näyte 3.....	47
Taulukko 15. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 5.	47
Taulukko 16. Fluoresenssi: geeli, näyte 1.	48
Taulukko 17. Fluoresenssi: geeli, näyte 2.	48

KÄYTETYT LYHENTEET/SANASTO

Lyhenne/termi	Selitys (Lähdeviite)
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
FBS	Fetal Bovine Serum, naudan sikiön seerumi
Fibroblasti	Pitkänmallinen sidekudossolu, joka tuottaa soluväliainetta (Solunetti 2015)
G'	Varastomoduli (Mezger 2011)
G''	Häviömoduli (Mezger 2011)
HCl	Suolahappo
Pen-Strep	Penisilliini-streptomysiini, antibiootti
PBS	Fosfaattisuolapuskuri
RPMI	Roswell Park Memorial Institute –soluviljelymedium
Sferoidi	Kolmiulotteinen, järjestäytynyt soluaggregaatti (Raghavan <i>et al.</i> 2015)
tan δ	Häviötekijä (Mezger 2011)
TEOS	Tetraetyyliortosilikaatti
Scaffold	Tukiranka; solujen kasvua tukeva matriisi (biomateriaali)

1 JOHDANTO

Kudosteknologiassa erilaisia biomateriaaleja käytetään solujen kasvu- ja kiinnitysmisälustoina. Näitä materiaaleja on lukuisia erilaisia, kulloisenkin käyttökohteen vaatimusten mukaan. Biomateriaaleja voidaan luokitella monin eri tavoin, mutta ominaisuuksia, käyttöä ja kehitystä säädellään tarkasti niin kansainvälisin standardein kuin kansallisin säädöksin.

Opinnäytetyön tavoitteena oli tuottaa solujen kasvua ylläpitävä hydrogeelivaahdot, kehittää menetelmä solujen viabiliteetin seurantaan, sekä ylläpitää solujen kasvua valituissa materiaaleissa vähintään kahden viikon ajan. Opinnäytetyö tehtiin osana Turun Ammattikorkeakoulun biomateriaalit ja diagnostiikka - tutkimusryhmän projektia, jonka tarkoituksena on kehittää solukapselointiin soveltuva hydrogeelipohjainen biomateriaali. Projektia toteutetaan yhteistyössä Åbo Akademin ja belgialaisen Plantijn Hogeschoolin kanssa.

Työssä käytetyt materiaalit valmistettiin kaksivaiheisella sooli-geeli -menetelmällä. Prosessin ensimmäisessä vaiheessa valmistettiin silikapohjainen sooli, jonka pH nostettiin neutraaliksi prosessin toisessa vaiheessa. pH:n nosto mahdollistaa solujen säilymisen hengissä sekä nopeuttaa geeliytymistä. Materiaalia vaahdotettiin homogenisaattorilla ennen geeliytymistä huokoskoon kasvatamiseksi.

Vaahdotettuun materiaaliin istutettiin hiiren fibrosarkoomasoluja, joiden viabiliteettiä seurattiin ottamalla materiaaleista koepaloja ja käsittelemällä ne kaupallisella reagenssilla Alamar Bluella. Solun aineenvaihdunta muokkaa Alamar Bluen voimakkaasti fluoresoivaksi, jolloin solujen viabiliteetti voidaan määrittää saadun fluoresenssisignaalin avulla. Osana opinnäytetyötä materiaaleja testattiin myös prototyypivaiheessa olevalla akustisella sensorilla.

Työssä on esitelty paitsi kokeellisen osan menetelmät ja tulokset, myös kudosteknologian ja soluviljelyn eri tekniikoiden teoriaa. Kudosteknologia-osiossa kerrotaan niin materiaalien eri käyttökohteista, kuin erilaisista käytössä olevista

biomateriaaleista. Soluviljelyn teoria painottuu erilaisiin kolmiulotteisiin viljelytekniikoihin tarjoten tietopohjaa työssä käytetyn menetelmän vaihtoehtoista. Työssä käytetty sooli-geeli -prosessi on esitetty sekä teoreettisella tasolla että selvityksenä työn menetelmistä. Reologian teoriaa virtausominaisuuksien osalta on myös esitelty lyhyesti helpottamaan materiaalien mittauksista saatujen tulosten tulkintaa. Osana opinnäytetyötä tutkittiin akustisen sensorin käyttömahdollisuuksia solukasvun seurannassa ja materiaalien kehittämisessä. Laitteen rakennetta ja toimintaperiaatetta on esitelty kappaleessa Materiaalit ja menetelmät.

2 BIOMATERIAALIT JA KUDOSTEKNOLOGIA

Biomateriaaleiksi kutsutaan materiaaleja, joiden tarkoituksena on olla vuorovaikutuksessa elimistön kanssa. Niitä voidaan käyttää minkä tahansa kudoksen, elimen tai elimistön toiminnan arviointiin, hoitoon, kasvattamiseen tai korvaamiseen. (O'Brien 2011) Biomateriaalilla on kohdekudoksen kanssa yhteinen rajapinta, jota muokkaamalla pystytään vaikuttamaan itse biomateriaalin ja sen kohdekudoksen väliseen vuorovaikutukseen (Balani *et al.* 2015). Tuotteiden tulee niin ikään olla käyttötarkoitukseen sopiva ja saavuttaa niille suunniteltu toimivuus ja suorituskyky (Törmälä *et al.* 2003). Niitä voidaan käyttää sellaisenaan esimerkiksi proteeseissa ja implanteissa, mutta myös kudosteknologian eri sovelluksissa (Park & Bronzino 2002).

Lääkinnällisissä laitteissa ja implanteissa käytettävien biomateriaalien vaatimuksista on säädetty laissa (Valvira 2015). Biomateriaalien laissa säädettyjen vaatimusten lisäksi alaa säätelevät useat Euroopan sisällä yhdenmukaiset standardit, jotka asettavat vaatimukset materiaalien ja tuotteiden kemiallisiin, fysikaalisiin ja biologisiin ominaisuuksiin, sekä steriiliyteen (Valvira 2015). Biomateriaaleilta vaaditaan käyttötarkoituksen mukaan erilaisia mekaanisia ominaisuuksia, kuten puristus-, taivutus-, veto- ja väsymislujuus, jäykkyys, sitkeys ja kovuus. Mikäli biomateriaali on suunniteltu käytettäväksi nivelpinnalla, tulee sillä olla riittävät kitka-, voitelu- ja kulumisominaisuudet. (Törmälä *et al.* 2003)

2.1 Biologiset biomateriaalit

Alkuperältään biologiset biomateriaalit ovat nimensä mukaisesti peräisin luonnosta ja kudosteknologiassa niitä käytetään useimmiten muodostamaan soluväliaineen kaltaisia biokemiallisia rakenteita. Biologisista biomateriaaleista käytetyimpiä ovat kollageeni ja hyaluronihappo, joita molempia esiintyy nisäkkäiden elimistössä luonnostaan. Näiden aineiden biologinen aktiivisuus on hyvä, mutta lopullisen tuotteen saaminen tasalaatuiseksi on osoittautunut haastavaksi. Myös materiaalien hajoamisnopeus ja mekaaniset ominaisuudet ovat vaikeasti hallit-

tavissa varsinkin, jos lähtömateriaali on eristetty kudoksista. Kuten useissa luonnosta peräisin olevissa tuotteissa, materiaalin saatavuus rajoittaa kudospereäisten biomateriaalien mahdollisuuksia. (Paakinaho & Kellomäki 2011) Alkuperältään biologiset materiaalit voidaan jaotella useilla eri tavoilla: alkuperän, prosessoinnin asteen ja tuotteen rakenteen, lainsäädännön tai käyttötarkoituksen mukaan (Törmälä *et al.* 2003).

2.2 Synteettiset biomateriaalit

Tunnetuimpia synteettisiä biomateriaaleja ovat erilaiset polymeerit, biokeraamit, bioaktiivinen lasi, metalli sekä erilaiset komposiitit, eli yhdistelmäateriaalit (Paakinaho & Kellomäki 2011; Törmälä *et al.* 2003). Seuraavissa kappaleissa esitellään tarkemmin joidenkin synteettisten biomateriaalien ominaisuuksia ja käyttökohteita. Opinnäytetyössä käytetty materiaali luokitellaan biokeraameihin.

Polymeerit

Monet polymeerit ovat rakenteeltaan joustavia, elastisia, helppoja valmistaa, sekä monikäyttöisiä. Muuntelemalla polymeerien fyysisiä ominaisuuksia, voidaan niitä käyttää korvaamaan niin pehmytkudosta kuin luutakin. Jotkin polymeerit ovat myös biohajoavia. Polymeerien huonoina puolina pidetään niiden alttiutta hapettumiselle sekä bakteeri- ja sienitartunnoille. Myös valmistusprosessissa materiaaliin jääneet kemikaalit voivat aiheuttaa potilaalle oireita. (Allcock 2008)

Biokeraamit

Keraameja käytetään yleisimmin hammasimplanteissa, luun korjaamisessa, tai keinotekoisissa lonkkanivelissä mutta myös lääkeannostelussa. Kalsiumhydroksiapatiittia on luonnostaan luissa ja hammaskiilteessä, joten siitä valmistettuja komposiitteja käytetään hammashuollossa sekä luiden korjauksessa. (Allcock 2008)

Bioaktiivinen lasi

Bioaktiivinen lasi on yksi bioaktiivisen keraamin muoto. Sen on todettu kiinnittyvän luuhun muita keraameja nopeammin, sekä stimuloivan luusolujen kasvua. Bioaktiivisen lasin yleistymistä on hidastanut ongelmat sen prosessoinnissa, mutta uudet menetelmät, kuten sooli-geeli -menetelmä, ovat poistaneet monet noista ongelmista. (Jones 2015)

Metallit

Yleisimmät biomateriaaleina käytettävät metallit ovat ruostumaton teräs, koboltti-kromiseokset, titaani, sekä hammaslääketieteessä kulta. Vaihtelemalla seoksia ja lisäämällä pääraaka-aineeseen muita aineita, pystytään materiaalin ominaisuuksiin sekä bioyhteensopivuuteen vaikuttamaan. Ruostumatonta terästä käytetään useimmiten lyhytaikaisissa sovelluksissa, kuten murtumien korjauksissa ja titaania pidempiaikaisissa, kuten proteeseissa. (Törmälä *et al.* 2003)

Komposiitit

Komposiiteissa eli yhdistelmäateriaaleissa on havaittavissa vähintään kaksi rakenteeltaan tai ominaisuuksiltaan toisistaan poikkeavaa faasia. Erilaisia faasiyhdistelmiä voivat olla esimerkiksi kiteinen - amorfinen tai jatkuva - epäjatkuvaa. Lasikuitulujitteinen muovi on hyvä esimerkki jatkuva – epäjatkuvaa faasiyhdistelmästä. Useimmat biologista alkuperää olevat biomateriaalit ovat komposiitteja, esimerkkeinä voidaan mainita luu, rusto, sidekudos ja iho. (Törmälä *et al.* 2003; Muoviteollisuus 2015)

2.3 Kudosteknologia

Kudosteknologian pääajatuksena on kehittää toiminnallisia kudosteknologia korvikkeita vamman tai sairauden vuoksi vaurioituneen tai tuhoutuneen kudoksen tilalle. Kudosteknologiassa kehitetään tyypillisesti biomateriaali, joka jäljittelee elimistön omia rakenteita ja tätä kautta tarjoaa potilaan omille soluille tukirangan, jotta ne pystyvät muodostamaan uutta ja tervettä kudosta. (Paakinaho & Kellomäki 2011) Kudosteknologia on osa regeneratiivista lääketiedettä. Regeneratiivisen

lääketieteen tarkoituksena on kehittää elimistön omaa kykyä korjata ja parantaa itseään, ja tarjota tähän avuksi kehon ulkopuolisia biologisia materiaaleja. Kudosteknologian avulla tuotettuja kudoksia voidaan käyttää apuna myös lääketutkimuksessa. (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering 2013)

Elimistössä soluja ympäröi soluväliaine, joka tarjoaa soluille tuki- ja tarttumispinnan. Soluväliaine muodostuu proteiineista tai hiilihydraateista, joiden rakenteen erityispiirteet määrittelevät kudosten ominaisuudet, kuten vetolujuuden ja elastisuuden. Koska kiinnittyminen on soluille elinehto, synnyttää soluväliaineeseen tarttuminen ohjelmoitua solukuolemaa estäviä signaaleja. Ilman näitä viestejä solu tulkitsee joutuneensa väärään ympäristöön ja kuolee. (Heino & Vuento 2014) Kudosteknologia pyrkii kehittämään biomateriaaleilla soluväliainetta muistuttavan kolmiulotteisen huokoisen tukirangan (scaffold) tukemaan solujen kasvua (Paakinaho & Kellomäki 2011).

Biomateriaalien, sekä niistä valmistettujen tukirankojen mekaaniset ominaisuudet määrittävät kulloisenkin käyttökohteen (O'Brien 2011). Materiaalin valmistavalla ja lähtöaineilla voidaan vaikuttaa lopullisen materiaalin ominaisuuksiin. Esimerkiksi käsittelemällä kemiallisesti metalleja tai keraameja voidaan luoda lujia bioaktiivisia materiaaleja, jotka ovat jäykkiä, mutta toisaalta pinnaltaan hauraita. Keraamien elastiset ominaisuudet ovat yleensä heikot. Sooligeeli -menetelmällä saadaan valmistettua pehmeämpiä materiaaleja, joilla on hyvät elastiset ominaisuudet, mutta heikot mekaaniset. (Kokubo, T. *et al.* 2003; O'Brien 2011). Erityisesti polymeerien mekaanisia ominaisuuksia pystytään parantamaan yhdistämällä niihin eri materiaaleja, jolloin syntyy komposiittirakenne (Shi *et al.* 2015).

Tukirangan tärkeimpiä ominaisuuksia ovat huokosten rakenne, koko ja määrä, mitkä mahdollistavat solujen levittäytymisen sekä riittävän aineenvaihdunnan. Optimaalinen huokoskoko riippuu sekä solu- että kudostyyppistä. (O'Brien 2011) Materiaalin rakenne voi olla joko järjestelmällinen tai sattumanvarainen. Sattumanvaraisissa rakenteissa huokokset voivat olla joko jatkuvia tai suljettuja ja niiden koko ja määrä vaihtelevat, mikä saattaa aiheuttaa rakenteellista heikkoutta.

Järjestäytyneissä rakenteissa sama verkkomainen rakenne toistuu ja niiden on huomattu olevan mekaanisilta ominaisuuksiltaan sattumanvaraisia rakenteita vahvempia. (Cansizoglu et al. 2008; Queheillalt & Wadley 2005) Järjestäytyneiden rakenteiden huono puoli on niiden sattumanvaraisia rakenteita pienempi pinta-ala (Melchels *et al.* 2010). Solujen kasvu ja kiinnittyminen materiaaliin muuttavat materiaalin rakennetta ajan kuluessa (Lutolf *et al.* 2003). Materiaalin rakenne vaikuttaa sen vettymisominaisuuksiin. Heikosti vettyvään rakenteeseen jää ilmakuplia, jotka estävät solususpension siirtymisen syvemmälle materiaalin sisälle. Vettymistä helpottaa materiaalin järjestelmällinen rakenne. (Melchels *et al.* 2010)

Huokosten väliset yhteydet ovat tärkeitä solujen istutuksessa, ravinteiden kuljetuksessa, sekä solujen levittäytymisessä. Jatkuvahuokoisissa rakenteissa solut eivät siirry materiaalin niihin osiin, joiden väliset yhteydet ovat läpimitaltaan alle 5-10 kertaa solun halkaisijan verran. Toisaalta materiaalin liian väljä rakenne päästää solut liian nopeasti lävitseen, eivätkä ne ehdi kiinnittyä. Solujen kiinnittymisen, kasvun ja levittäytymisen kannalta optimaalisin vaihtoehto näyttäisi olevan selkeä jatkuvahuokoinen materiaali. (Melchels *et al.* 2010) Vaahtomaisissa materiaaleissa huokosten kokoon ja rakenteeseen voidaan vaikuttaa esim. suolaeluutiolla, materiaalikalvojen laminoinnilla, faasierottelulla, emulsion pakastekuivauksella, sekä hydrogeelin pakastekuivauksella (Li *et al.* 2001). Materiaalin mekaaniset ominaisuudet sekä jäykkyys heikkenevät huokoskoon kasvaessa (Yan *et al.* 2012).

Materiaalin mekaanisilla ominaisuuksilla on suuri merkitys solujen kasvuun ja kehitykseen. Elävää kudosta simuloivan kantajamateriaalin ominaisuuksien tulisi olla mahdollisimman lähellä esikuvaansa solukasvun optimoimiseksi. Koska biologiset kudokset ovat rakenteeltaan monimutkaisia, niiden reologiset ominaisuudet muuttuvat ajan funktiona. Nisäkkäiden pehmytkudosten elastiset moduulit vaihtelevat suuresti kudostyypistä riippuen, yleisimmin 100 ja 10 000 Pa:n välillä (Taulukko 1). Materiaalin jäykkyys vaikuttaa mm. solujen levittäytymiseen, morfologiaan, sekä solun sisäisen tukirangan rakenteeseen. Hydrogeeleillä pystytään tuottamaan biomateriaaleja matalamman elastisen moduulin

vaativiin kohteisiin, suurempaa jäykkyyttä materiaaleihin saadaan esim. komposiittigeleillä. (Levental *et al.* 2007)

Taulukko 1. Eri pehmytkudosten elastisia moduuleja.

Kudostyyppi	Eläin	Elastinen moduuli
Akillesjänne	Rotta	310 Mpa
Poikkijuovainen lihaskudos	Rotta	100 kPa
Sydänlihas	Hiiri	20–150 kPa
Selkäydin	Ihminen	89 kPa
Maksa	Ihminen	640 Pa
Maitorauhanen	Ihminen	160 Pa

(Levental *et al.* 2007)

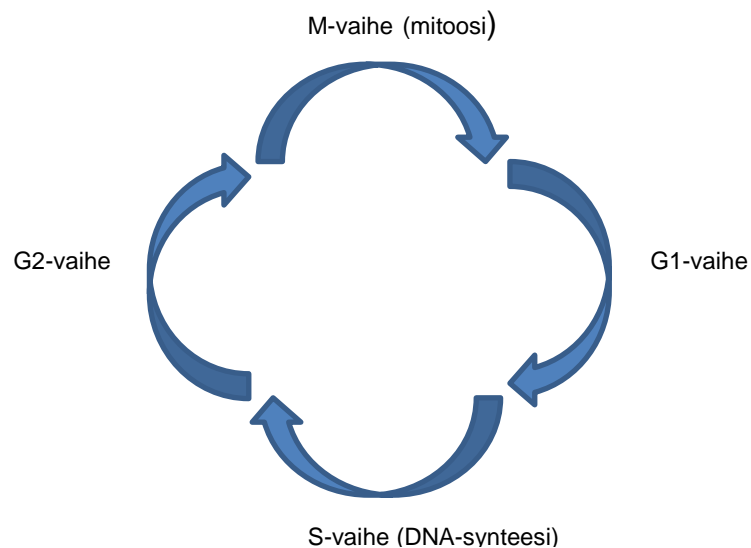
Useissa kudosteknologian sovelluksissa on tärkeää, että materiaali hajoaa hallitusti. Materiaalin kontrolloidulla hajoamisella pystytään esimerkiksi säätämään materiaaliin kapseloidun lääkeaineen vapautumista, sekä pääsemään eroon solujen kantajana toimineesta tukirangasta. Tukirankana toimivan biomateriaalin hajoamiselle on ensiarvoisen tärkeää, että hajoaminen tapahtuu solujen kasvua ja levittäytymistä tukevasti. Hydrogeeleillä on kolme mekanismiltaan erilaisista hajoamistapaa: hydrolyysi, entsyymaattinen hajoaminen, sekä liukeneminen. (Drury & Mooney 2003)

3 SOLUVILJELY

Soluviljely on lähtökohta monille *in vitro* -tutkimuksille. Solutyyppejä on useita ja niistä valitaan kulloiseenkin käyttötarkoitukseen sopivin. Seuraavassa kappaleessa on kerrottu solun elinkaaresta, erilaisista solulinjatyypeistä, sekä lopuksi hieman itse työssä käytetystä solulinjasta.

3.1 Solun elinkaari

Jokaista solujakautumista edeltää solun sisältämän DNA:n kahdentuminen. Solun kasvaminen, valmistautuminen jakaantumiseen ja lopulta jakaantuminen tunnetaan solusyklinä, jota ohjaavat sykliineiksi kutsutut proteiinit. Kuvassa 1 on esitetty solusyklin eri vaiheet. G1-vaiheessa solun koko kasvaa kun lähetti-RNA- ja proteiinisynteesi toimivat vilkkaasti. Solun kaikki kromosomit ovat tässä vaiheessa normaalisti kahtena kappaleena.



Kuva 1. Solusyklin vaiheet.

G1-vaiheesta solun on mahdollista siirtyä G0-tilaan, jolloin se poistuu normaalin solusyklin ulkopuolelle, eikä siis enää jakaannu. G1-vaiheen lopussa on niin sanottu säätelykohta, jonka ohitettuaan solun on pakko edetä mitooseen, eli jakaantumisvaiheeseen saakka. G1-vaiheen jälkeen solusyklissä seuraa S-vaihe, jossa solun DNA kahdentuu, ja jonka loputtua kutakin kromosomia on kahden sijaan neljä. G2-vaiheessa solu valmistautuu jakautumiseen ja tuottaa proteiineja. G2-vaiheen jälkeen solu siirtyy mitooseen, jossa se kahdentuu. (Heino & Vuento 2014)

3.2 Solulinjatyyppit

Solut voidaan luokitella sekä niiden jakaantumis- että kasvutavan mukaan. Jakaantumistapa ei vaikuta solulinjan morfologiaan, eikä päinvastoin. Seuraavaksi kerrotaan luokittelun perusteista ja kuvataan työssä käytetyn solulinjan tyyppiä ja morfologiaa.

Primääriset ja jatkuvat solulinjat

Solulinjoilla on kahta erilaista jakaantumistapaa, joita kutsutaan primääriseksi (primary) sekä jatkuvaksi (continuous). Primäärinen solulinja on erotettu suoraan kudoksesta ja tarpeen vaatiessa se voidaan entsyymien avulla pilkkoa yksittäisistä soluista koostuvaksi suspensioksi. Tästä johtuen primäärinen solulinja on lähtökohtaisesti heterogeeninen. Primäärisen solulinjan ylläpito on työlästä ja solulinjat ovat usein lyhytikäisiä. (European Collection of Cell Cultures 2015)

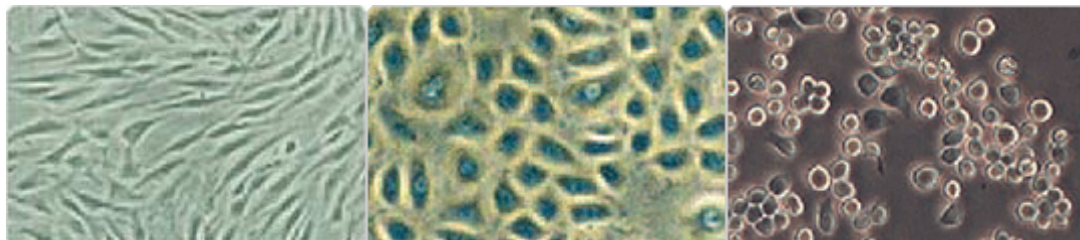
Jatkuvat solulinjat ovat homogeenisia, eli koostuvat vain yhden tyyppisistä soluista. Tämä ominaisuus mahdollistaa solulinjan pidempiaikaisemman ja muuttumattomamman viljelyn kuin primäärisellä solulinjalla. Jatkuvia solulinjoja on kahta eri tyyppiä; linjoja, joilla on vain tietty määrä jakautumiskertoja (noin 30), sekä loputtomasti jakaantuvia linjoja (ECACC 2015). Solun jakaantumiskertoja säätelee kromosomin päässä olevat DNA-jaksot, eli telomeerit. Jokaisessa jakaantumisessa osa kromosomin päistä jää jakaantumatta, ja jotta varsinainen DNA säilyisi, pystyy solu kasvattamaan kromosomin päihin DNA-jaksot, jotka solu voi uhrata jakaantuessaan. Näiden telomeerien kasvattamiseen solu tuot-

taa telomeraasientsyymiä, jonka tarpeeseen nähden liian vähäinen aktiivisuus johtaa lopulta solujakautumisen loppumiseen. Nisäkässoluilla telomeraasiaktiivisuus on korkeinta nopeasti uusiutuviissa kudoksissa. (Heino & Vuento 2014) Loputtomasti jakaantuvat solulinjat ovat joko lähtökohtaisesti syöpäsoluja, tai muokattu sellaisiksi käyttämällä joko viruspohjaisia onkogeeneja tai kemiallista käsittelyä. (ECACC 2015)

Kiinnittyvät ja suspensiosolulinjat

Morfologialtaan solulinjoja on kahta eri tyyppiä: kiinnittyviä, sekä suspensiona kasvavia soluja. Suspensiossa solut kelluvat irrallaan yksittäisinä soluina, kun taas kiinnittyvät solutyypit tarvitsevat alustan, jossa kasvaa. Solulinjan morfologia määräytyy sen alkuperäisen kudostyyppin mukaan. (ECACC 2015) Nisäkässoluilla on kolme morfologian päätyyppiä: fibroblastin kaltaiset, epiteelisolun kaltaiset, sekä lymfoblastin kaltaiset (Kuva 2). Näistä kaksi ensimmäistä solutyyppeä tarvitsee alustan kiinnittymiseen, kun taas lymfoblastin kaltaiset kasvavat suspensiona. (ThermoFisher 2015)

Fibroblastin kaltaiset solut ovat isoja, litteitä ja pitkänomaisia soluja. Niiden tehtävänä on tuottaa soluväliainetta ja osallistua haavojen paranemisprosessiin. (Encyclopedia Britannica 2015) Epiteelisolun kaltaiset solut taas ovat muodoltaan monikulmioita ja kasvavat laikkuina (ThermoFisher 2015). Ne osallistuvat elimistön pintarakenteiden muodotukseen ja tästä syystä kiinnittyvät toisiinsa tiukasti (Solunetti 2015). Lymfoblastin kaltaiset solut ovat näistä kolmesta solutyypistä ainoat, jotka kasvavat suspensiona. Ne ovat muodoltaan pallomaisia, vielä kypsyttömiä veren valkosoluja (Encyclopedia Britannica 2015).



Fibroblastin kaltaisia soluja

Epiteelisolujen kaltaisia soluja

Lymfoblastin kaltaisia soluja

Kuva 2. Solujen morfologiatyypit.

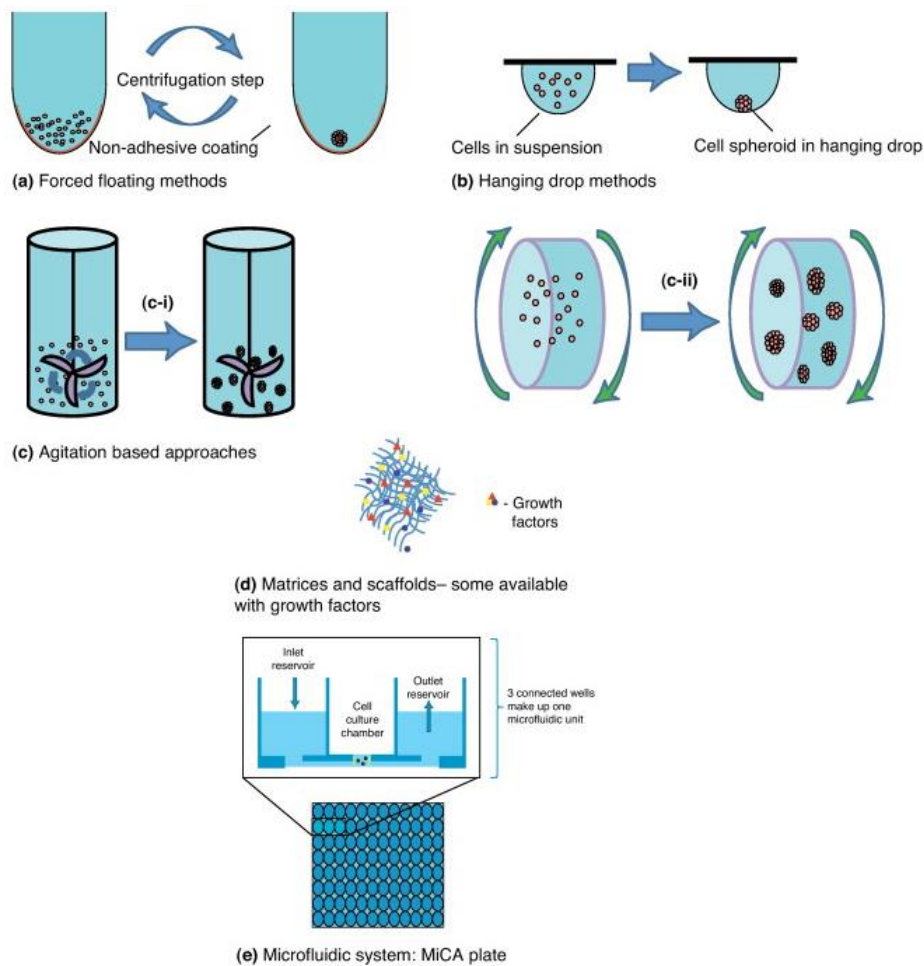
Lähde: ThermoFisher 2015

3.3 WEHI-164

Opinnäytetyössä käytettiin hiiren ihosta eristettyä syöpäsolulinjaa WEHI-164:ää. Morfologialtaan WEHI-164 on fibroblasti ja tarvitsee siksi kasvamiseen alustan, joka mahdollistaa solujen kiinnittymisen. Solulinjaa on käsitelty kemiallisesti ja sitä käytetään mm. syöpätutkimuksessa. (Sigma-Aldrich 2015) WEHI-164:n jakaantumisaika on 30–50 tuntia (Romano *et al.* 2009).

4 3D-SOLUKASVATUS

Tyypillisesti soluja kasvatetaan kerroksina kasvatuspullojen tai -maljojen pohjal- la, mutta 3D-kasvatusmenetelmistä on huomattu olevan runsaasti hyötyä *in vit- ro* -työskentelyssä. 3D-solukasvatusalustojen etuna on kyky toistaa *in vivo* - olosuhteita perinteistä kaksiulotteista mallia paremmin. (Breslin & O’Driscoll 2013) Kolmiulotteiseen solukasvatukseen on olemassa useita eri menetelmiä (Kuva 3).



Drug Discovery Today

Lähde: Breslin & O’Driscoll 2013

Kuva 3. 3D-solukasvatuksen eri menetelmiä.

Pakotettu kellutus

Pakotetun kellutuksen (forced-floating) menetelmässä solujen kiinnittyminen estetään, jolloin ne muodostavat kolmiulotteisia, monisoluisia soluaggregaatteja, sferoideja, joissa varsinkin primääristen solulinjojen on havaittu saavuttavan hyvät elinolosuhteet. (Lin & Chang 2008) Sferoideja käytetään erityisesti syöpäsolujen lisääntymisen, apoptoosin, erilaistumisen sekä aineenvaihdunnan tutkimiseen. (Ivascu & Kubbies 2006) Soluaggregaattien sekä sferoidien muodostumista edesautetaan estämällä solujen kiinnittyminen pinnoittamalla kasvualusta soluja hylkivällä materiaalilla tai sekoittamalla kasvatusmediumia (Sutherland & Durand 1984; Carlsson & Yuhas 1984). Sferoidien valmistaminen on kohtalaisen helppoa ja edullista, mutta varsinkin suuria määriä tuottaessa kasvualustalta vaadittava pinnoitus on työlästä ja saattaa tehdä menetelmän käytöstä vähemmän houkuttelevaa. (Breslin & O'Driscoll 2013; Ivascu & Kubbies 2006)

Pisarakasvatus

Pisarakasvatus-menetelmällä (hanging drops) valmistetaan soluaggregaatteja tai -sferoideja aivan kuten pakotetun kellutuksen menetelmälläkin (Breslin & O'Driscoll 2013). Yksi esimerkki pisarakasvatuksen menetelmistä on kasvatus, jonka alussa kasvatusmaljan pohjalle pipetoidaan suolafosfaattipuskuria. Tämän jälkeen solususpensiota pipetoidaan pieniksi pisaroiksi kasvatusmaljan kanteen, ja kansi käännetään maljan päälle. Kun maljaa inkuboidaan soluviljelyolosuhteissa, alkaa pisaroiden kärkiin neste-kaasu -rajapinnalle muodostua aggregaatteja. Nämä aggregaatit voidaan siirtää lasipulloon, jossa niiden inkubointia jatketaan lämminvesihauteessa ravistelijassa. Ravistelun aikana aggregaateista muodostuu sferoideja. (Foty 2011; Breslin & O'Driscoll 2013) Pisarakasvatus -menetelmässä yhteen sferoidiin riittää parhaimmillaan vain kymmenen solua, mikä on hyödyllistä erityisesti syöpätutkimuksessa (Raghavan *et al.* 2015) Toisaalta pieni solumäärä voi olla myös este menetelmän käytölle, mikäli tarkoituksena on tuottaa suuria määriä sferoideja (Breslin & O'Driscoll 2013). Pisarakasvatus -menetelmää voidaan soveltaa useisiin eri solutyyppeihin ja sen

avulla saadaan tuotettua tehokkaasti kooltaan ja rakenteeltaan homogeenisia sferoideja (Kelm *et al.* 2003).

Sekoittamiseen perustuvat menetelmät

Sekoittamiseen perustuvissa menetelmissä kasvumedium ja solut pidetään jatkuvassa liikkeessä. Tällöin solut eivät pääsisi kiinnittymään astiaan, vaan kiinnittyisivät toisiinsa solujen omilla vuorovaikutuksilla. (Breslin & O'Driscoll 2013) Jatkuvan liikkeen ansiosta solujen metabolia on tehokkaampaa kuin staattisissa kasvatuksissa (Guoqing & Dongqing 2007). Kasvatuksen aikainen sekoitus saadaan aikaiseksi joko lisäämällä kasvatusastiaan sekoitin tai pyörittämällä itse astiaa (Breslin & O'Driscoll 2013). Sekoittimen sijoitus astian sisälle lisää soluihin kohdistuvaa leikkausvoimaa, mikä voidaan välttää astiaa pyörittämällä (Lin & Chang 2008). Sekoitinpullossa pystytään kasvattamaan suuria määriä soluja kerralla. Vaihtamalla sekoittimen mallia pystytään vaikuttamaan esimerkiksi hapetukseen. (Life Technologies 2015) Astian liikkeeseen pohjautuvassa kasvatusmallissa ei astian sisällä ole leikkausvoimia aiheuttavaa sekoitinta, vaan astiaa pyöritetään akselinsa ympäri vaakatasossa. Pyörivän liike auttaa soluja kellumaan kasvatusmediumissa ja muodostamaan aggregaatteja. (Mittregger 1999)

Mikrofluidiset soluviljelyalustat

Mikrofluidisissa soluviljelyalustoissa solut istutetaan kapeisiin putkiin, joiden läpi pumpataan kasvatusmediumia (Ong *et al.* 2008). Soluista voidaan pintakäsittelyn ja linkkereiden avulla muodostaa putkissa sellaisenaan pysyviä aggregaatteja, tai ne voidaan sitoa hydrogeeliin (Kunze *et al.* 2009; Ong *et al.* 2008)

Matriisit ja tukirangat

Matriisien tarkoituksena on jäljitellä soluväliainetta sekä tukea solujen kasvua ja levittäytymistä aidon soluväliaineen tavoin. Matriiseissa yleisimmin käytetty proteiini on kollageeni, mutta myös fibronectiini ja gelatiini ovat suosittuja. (Life Technologies 2015) Opinnäytetyössä käytetty materiaali voidaan luokitella ominaisuuksiltaan matriisiksi.

Suosittu matriisimateriaali on hydrogeeli. Hydrogeelin rakenne koostuu pääosin vedestä, joka on sitoutunut geeliä koossa pitävään tukiverkkoon. (Tibbit & Anseth 2010) Verkko koostuu polymeereistä, joita yhdistävät joko ioni-, vety- tai kovalenttiset sidokset tai Van der Waalsin voimat (Shi *et al.* 2015). Tärkeimmät ominaisuudet soluväliainetta jäljittelevälle hydrogeelille ovat vedensitomiskyky, huokoisuus sekä riittävä kokoonpuristuvuustekijä (Bryant & Anseth 2002). Hydrogeeliä voidaan valmistaa joko täysin orgaanisista lähtöaineista, täysin epäorgaanisista lähtöaineista tai näiden yhdistelmänä. Orgaanisten hydrogeelien on osoitettu edistävän solujen toimintoja, kuten viestien välitystä soluväliaineessa, kun taas epäorgaaniset hydrogeelit vain ylläpitävät soluille tarpeellista kasvuympäristöä. (Tibbit & Anseth 2010) Toisaalta epäorgaanisissa hydrogeeleissä on todettu materiaalin hajotessa soluväliaineen lisääntymistä ja sitä kautta solukasvua (Ren *et al.* 2015). Orgaanisten hydrogeelien ongelmana on lähtömateriaalien epätasalaatuisuus, kontaminaatoriski, sekä valmiin materiaalin ominaisuuksien säätäminen (Tibbit & Anseth 2010). Työssä käytetty materiaali on siliikapohjainen synteettinen hydrogeeli, jonka nestefaasista osa muodostuu soluviljelymediumista ja seerumista, joiden tarkoituksena on tukea solukasvua sekä laskea pintajännitystä vaahdotuksessa.

Hydrogeelien ominaisuuksiin ja rakenteeseen pystytään vaikuttamaan paitsi lähtömateriaaleilla myös valmistustavalla. Solujen välisiä vuorovaikutuksia, verisuonten muodostumista sekä solujen levittäytymistä materiaaliin voidaan tehostaa huokosten hallitulla muodostamisella. Tähän käytettyjä tekniikoita ovat mm. emulgointi, fotolitografia, mikrofluidinen synteesi, sekä mikromuovaus. Näin pystytään luomaan hallittuja rakenteita aina 0,1 µm:stä yli 400 µm:iin saakka. (Khademhosseini & Langer 2007)

Valmistettuja materiaaleja pystytään hyödyntämään kahdenlaisissa sovelluksissa, ylhäältä alaspäin (top-down), sekä alhaalta ylöspäin (bottom-up) valmistettavissa rakenteissa. Ylhäältä alaspäin suuntautuvassa menetelmässä olemassa olevaa tukirankaa muokataan halutunlaiseksi. Tällöin tukirangan huokoisuutta ja rakennetta on mahdollista muunnella tarpeen mukaan. Alhaalta ylöspäin -menetelmässä lopullinen rakenne saavutetaan yhdistelemällä pienempiä osia

toisiinsa, jolloin pystytään vaikuttamaan tukirangan rakenteeseen, sekä tarvittaessa yhdistämään siihen useita erilaisia soluja hallitusti. Tämä menetelmä muisuttaa luonnollista kudosten kehittymistä. (Khademhosseini & Langer 2007)

Tukirankojen (scaffold) tehtävänä on tarjota soluille kasvupinta, ja muokkaamalla tukirangan materiaalin, pinnan, sekä muotojen ominaisuuksia pystytään vaikuttamaan solujen kiinnittymishalukkuuteen, sekä lisääntymiseen. Valitsemalla kulloiseenkin kohteeseen sopivat materiaalit, huomioimalla tukirangan mekaaniset ominaisuudet sekä hajoaminen, on mahdollista tuottaa juuri halutunlaista kudosta. (Carletti *et al.* 2011) Tukirangan tärkein ominaisuus on materiaalin huokoisuus, joka käsittää paitsi huokosten jakaantumisen materiaalissa myös niiden kokojakauman. Huokoisuus voi olla joko sattumanvaraista tai säädeltyä, riippuen materiaalin valmistustavasta. (Carletti *et al.* 2011)

5 SOOLI-GEELI -PROSESSI

Työssä käytetty materiaali on silikapohjainen hydrogeeli, joka valmistetaan kaksiosaisella sooli-geeli -prosessilla. Valmistetun hydrogeelin kiinteä faasi on silika ja jatkuvana faasina ovat vesi, soluviljelymedium sekä seerumi.

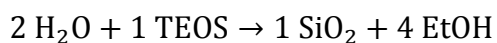
Silika, eli piidioksidi, on veteen liukeneva väritön tai valkoinen piin oksidi, jonka eri muotoja esiintyy monin paikoin luonnossa. Piidioksidia käytetään yleisesti myös esimerkiksi elintarviketeollisuudessa. Silikan liuetessa veteen syntyy piihappoa, jonka yhtä muotoa ortopiihappoa esiintyy useissa ihmiskehon osissa, kuten luissa, jänteissä, munuaisissa ja maksassa. Ortopiihapon puutteen uskotaan aiheuttavan mm. kallon epämuodostumia. (Martin 2007) Sooli-geeli -menetelmällä valmistettu silika on amorfista, huokoista sekä bioyhteensopivaa, ja sen on todettu liukenevan hyvin elimistössä. Se myös muistuttaa sekä rakenteeltaan että valmistusprosessiltaan luonnossa esiintyvää silikaa. (Jokinen *et al.* 2010)

Materiaalin geelityminen käynnistyy soolissa olevien partikkeleiden alkaessa aggregoitua (Jokinen *et al.* 1998). Partikkeleiden aggregoituminen voi alkaa joko spontaanisti, tai olosuhteita, kuten pH:ta tai suolan määrää muuttamalla (Jokinen *et al.* 2010).

Hydrogeelin valmistusprosessi koostuu kahdesta osasta. Ensimmäisessä vaiheessa valmistetaan kolloidaalinen suspensio, sooli, joka geeliytetään prosessin toisessa vaiheessa. Kolloidaalisessa suspensiossa dispergoitunut faasi eli partikkelit tai niiden aggregaatit ovat niin pieniä, ettei painovoimalla ole niiden suhteen merkitystä, vaan kappaleiden välisiä vuorovaikutuksia ohjaavat heikot Van der Waalsin voimat, sekä pinnan varaukset. (Brinker & Scherer 1990)

Reagoidessaan veden kanssa silikan yksi yleisimmistä lähtöaineista, TEOS (tetraetyyliortosilikaatti) reagoi vaihtamalla alkoksiryhmän (-OR) hydrolyysireaktiossa hydroksyyliiryhmään (-OH) muodostaen kondensaatioreaktioiden jälkeen sili-

kaa ja etanolia (Kaava 1) (Brinker & Scherer 1990). Prosessissa käytetyn veden ja alkoxidin moolisuhdetta kuvataan R-arvolla (Jokinen *et al.* 2010).



Kaava 1

Käyttämällä reaktiossa riittävä määrä vettä sekä happoa (HCl) katalyyttinä, pysytään hydrolyysireaktio saattamaan loppuun saakka. Hydrolyysireaktiota seuraa kondensaatiovaihe, jossa osittain hydratoituneet molekyylit kiinnittyvät toisiinsa vapauttaen pienempiä molekyylejä, kuten vettä ja etanolia. (Brinker & Scherer, 2009) Polymerisaation kautta molekyylit muodostavat lopulta partikkeleita, jotka happamassa liuoksessa saadaan aggregoitumaan esim. pH:ta nostamalla (Jokinen *et al.* 2010). Aggregoituneet partikkelit muodostavat tukirangan, joka antaa geelille sen tunnusomaisen viskoelastisen rakenteen (Brinker & Scherer 2009).

Soolin voidaan katsoa muuttuneen geeliksi, kun aggregoituminen on edennyt riittävän pitkälle ja elastiset ominaisuudet ylittävät viskoosiset. Tarkka geelitysmispiste määritetään reologisilla tutkimuksilla. (Jokinen *et al.* 1998) Materiaali kehittyä vielä geelitysmispisteen jälkeen. Kondensaatio jatkuu ja materiaalissa jäljellä olevan soolin molekyylit kiinnittyvät tukirankaan muuttaen materiaalin ominaisuuksia ja rakennetta. (Brinker & Scherer 2009)

Materiaalin lopulliseen rakenteeseen vaikuttavat paitsi lähtöaineet sekä niiden moolisuhde, myös hydrolyysin ja kondensaation eri vaiheet, materiaalin ikääntyminen, sekä mahdollinen jälkikäsitely, kuten kuivaus (Brinker & Scherer 2009; Jokinen *et al.* 2010).

6 REOLOGIA

Reologia on tiede, joka tutkii aineiden muodonmuutosta, sekä virtausominaisuuksia. Kohdistettaessa aineeseen riittävästi leikkausvoimaa, voidaan lähes mikä tahansa aine saada juoksevaksi. Aineet voidaan luokitella ominaisuuksiensa puolesta viskoosisiin, elastisiin, tai viskoelastisiin. Viskoelastiset aineet ilmentävät samanaikaisesti sekä viskoosisia että elastisia ominaisuuksia. Viskoosiset ominaisuudet kuvaavat aineen kykyä vastustaa virtausta ja elastiset ominaisuudet aineen kykyä palautua rasituksesta. (Mezger 2011)

Aineen viskoosisia ominaisuuksia kuvataan reologiassa häviömoduulilla (G''). Kun ainetta rasitetaan, siihen siirretään energiaa, jota kuluu aineen rakenteen muutokseen. Rakenteen muuttuessa, aineen sisältämät molekyylit alkavat liikkua, jolloin niiden välille muodostuu kitkaa, joka puolestaan synnyttää lämpöä. Tämä prosessi kuluttaa energiaa, jolloin energia häviää, eikä varastoidu aineeseen. (Mezger 2011)

Varastomoduuili (G') kuvaa aineen elastisia ominaisuuksia, sekä sen kykyä sitoa siihen siirrettyä energiaa. Ainetta rasitettaessa siihen kohdistetaan energiaa, joka saa aikaan rakenteen muutoksen. Erilaiset aineet pystyvät varastoimaan tätä energiaa erilaisia määriä. Varastoidun energian avulla aine pystyy palautumaan joko osittain tai kokonaan alkuperäisen rasituksen aiheuttamasta rakenteen muutoksesta. (Mezger 2011)

Häviötekijä ($\tan\delta$) on häviömoduulin ja varastomoduulin suhdeluku, joka kertoo aineen viskoosisten ja elastisten ominaisuuksien suhteesta. Sooli-geeli - prosessissa häviötekijää käytetään mittarina materiaalin muutoksesta ajan funktiona:

- Materiaali on nestemäistä: $\tan\delta > 1$
- Materiaali on geelipisteessään: $\tan\delta = 1$
- Materiaali on geelitynyt: $\tan\delta < 1$

(Mezger 2011)

Työssä käytettyyn reometriin on saatavilla kahta erilaista mittapäätä ns. levy-levy- ja kartio-levy -mittapäät. Levy-levy -mittapää (Kuva 4) koostuu pohjaltaan tasaisesta liikkuvasta mittapäästä, sekä kiinteästi asennetusta pohjalevystä. Mittapään muodon vuoksi näytteeseen kohdistuva leikkausvoima ei ole vakio, vaan kasvaa mittapään reunoja lähestyttäessä, mikä vaikuttaa tuloksiin jonkin verran. Levy-levy -mittapäällä voidaan mitata esimerkiksi geelejä, pastoja sekä kumeja. (Mezger 2011)



Kuva 4. Levy-levy -mittapää.

Kartio-levy -mittapää (Kuva 5) koostuu heikosti kartionmallisesta liikkuvasta mittapäästä sekä paikallaan pysyvistä pohjalevystä. Kartio-levy -mittapäällä pystytään saavuttamaan yhteneväiset leikkausolosuhteet koko näytteeseen, mutta näytteen sisältämien kiinteiden partikkeleiden suurin mahdollinen koko on kartio-levy -mittapäällä rajattu. Liian suuret partikkelit eivät mahdu liikkumaan mittauksen aikana esteettä mikä vaikuttaa saatuihin tuloksiin. Sama ongelma toistuu mitattaessa näytteitä, jotka sisältävät esim. aggregaatteja, geelipartikkeleita tai kuituja. (Mezger 2011)



Kuva 5. Kartio-levy -mittapää.

Opinnäytetyössä reologisiin mittauksiin käytettiin laitteen valmistajan suosittelemaa levy-levy -mittapäätä.

7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyön käytännön tutkimuksen kohteena oli selvittää solujen selviytymistä silikapohjaisissa vaahtomaisissa hydrogeeleissä sekä kehittää tämän solujen kapselointiin käytettävän biomateriaalin valmistusta ja karakterisointia. Valmistetuista vaahtomaisista hydrogeeleistä käytetään työssä nimityksiä hydrogeelivaaho sekä materiaali. Vaahdotettu hydrogeeli muodostaa kolmiulotteisen biohajoavan kantajamateriaalin, johon siirrostettujen solujen viabiliteettia seurattiin usean viikon ajan. Materiaali valmistettiin sooli-geeli -menetelmällä.

Materiaalin vaahdottamiseen käytettiin homogenisaattoria. Happamaan sooliin lisättiin RPMI-kasvumediumia, 1 M natriumhydroksidia sekä seerumia. Natriumhydroksidin määrä laskettiin riittäväksi neutraloimaan soolin happamuus, taasaamaan sopiva pH solukasvulle ja kiihdyttämään geelityymistä. Seerumissa on pinta-aktiivisia aineita, jotka helpottavat vaahtoutumista.

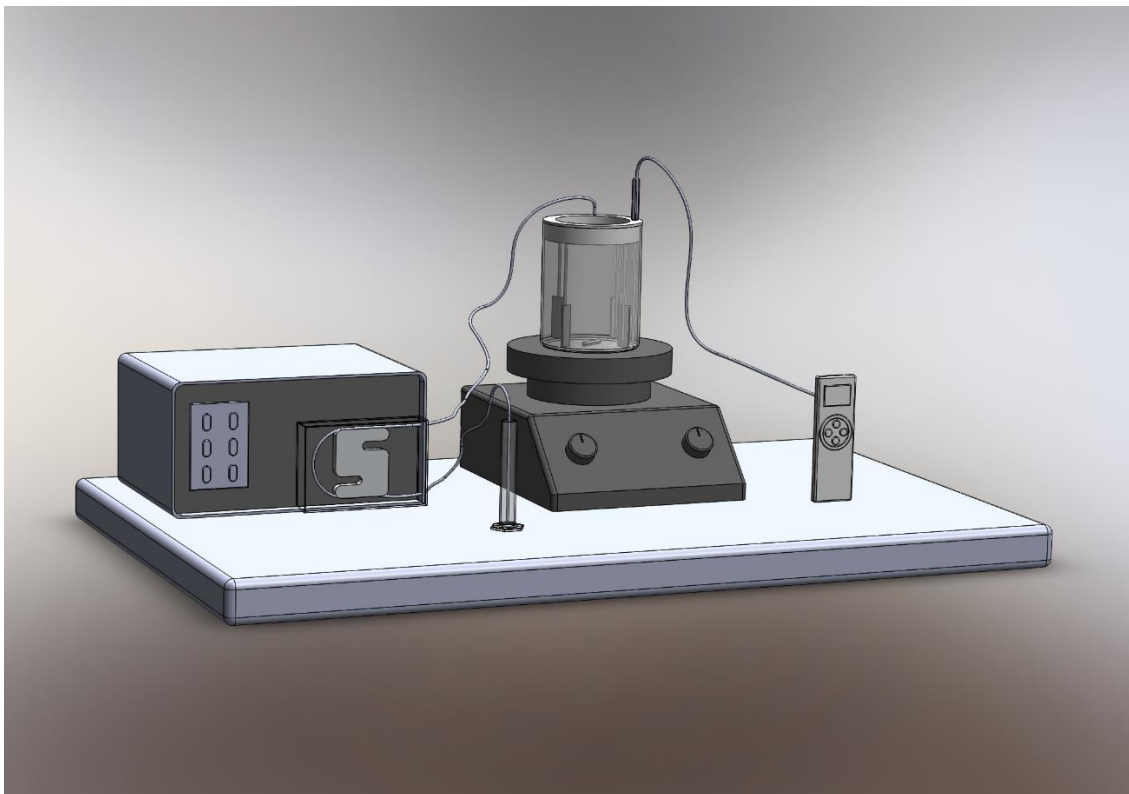
Valmiiseen hydrogeelivaahtoon istutettiin hiiren fibrosarkoomasoluja ja materiaali peitettiin solukasvatusmediumilla. Tämän jälkeen materiaalia inkuboitiin soluviljelyolosuhteissa ja seurattiin solujen säilymistä hengissä. Viabiliteettia seurattiin ottamalla materiaalista koepaloja, käsittelemällä ne kaupallisella reagenssilla Alamar Bluella, ja mittaamalla näytteestä fluoresenssi. Rinnakkaisia tutkimuksia tehtiin myös prototyyppivaiheessa olevalla akustisella sensorilla.

7.1 Materiaalin valmistus

Työssä käytetyt hydrogeelit valmistettiin sooli-geeli -menetelmällä. Lähtökohtana useimmissa tutkituissa materiaaleissa käytettiin R50-soolia, josta valmistettiin R77- ja R81-hydrogeelivaahoja. R-arvoa laskettaessa HCl, NaOH, RPMI-medium ja FBS huomioitiin vetenä (Liite 3).

Soolin lähtöaineita olivat vesi sekä 98 % TEOS (tetraetyyliortosilikaatti). Katalyyttinä prosessissa toimi 1 M suolahappo. Tässä voimakkaasti eksotermisessä hydrolyysireaktiossa reaktiossa syntyy piidioksidia ja etanolia.

Sooli valmistettiin 250 ml:n dekanterilasissa, yhden erän tilavuuden ollessa 100 ml. Sekoitus toteutettiin magneettisekoittajalla sekä 25 mm pitkällä, halkaisijaltaan 5 mm:n magneettisauvalla. Sekoittumisen tehostamiseksi lasiin asetettiin virtauseste. (Kuva 6)



Kuva 6. Havainnekuva soolinvalmistuslaitteistosta.

Dekanterilasiin mitattiin ensin vesi, johon lisättiin veden tilavuudesta 1 % suolahappoa. Sekoitus aloitettiin ja samalla aloitettiin TEOS-lisäys. TEOS lisättiin pumpulla nopeudella 2 ml/min. Kaikki reagenssit olivat lähtökohtaisesti huoneenlämpöisiä ja lämpötilan muutosta seurattiin digitaalisella lämpömittarilla koko prosessin ajan. Kun lämpötila saavutti huippuarvonsa, jatkettiin sekoitusta vielä kymmenen minuutin ajan, jonka aikana sooli kirkastui. (Liite 4)

Hydrolyysireaktiossa muodostuvaa etanolia vähennettiin soolista osittaisella tislauksella. Sooliin lisättiin 15 ml vettä ja kuumennettiin, kunnes soolin lämpötila oli +60 °C. Kun haluttu lämpötila saavutettiin, jatkettiin veden lisäystä 3 ml:n erissä, jolloin pystyttiin muuttamaan aineiden välisiä tasapainotiloja ja tehosta-

maan etanolin poistumista. Yhteensä vettä lisättiin 30 ml, ennen lämmitystä 15 ml ja lämmityksen aikana 15 ml. Etanolin haihdutusta jatkettiin n. 60 min ajan. Tällä tavalla etanolia ei pystytä saamaan kokonaan soolista pois, mutta sen pitoisuutta pystytään laskemaan sille tasolle, ettei solujen selviytyminen häiriinny. (Liite 5)

Haihdutuksen jälkeen sooli jäädytettiin jäähauteessa nopeasti huoneenlämpöiseksi, tarkastettiin tilavuus mittalasilla ja tarvittaessa tasattiin alkuperäiseen tilavuuteen ultrapuhtaalla vedellä. Valmis sooli säilytettiin 50 ml:n sentrifugiputkissa + 6 °C:ssa. Ennen solukasvatuskäyttöä sooli suodatettiin 0,2 µm:n ruis-kusuodattimella luokan ISO 7 puhdastiloissa laminaarivirtauskaapissa.

Tutkimuskäyttöä varten soolista valmistettiin vaahdotettu hydrogeeli, jonka tilavuutta ja huokoskokoa kasvatettiin lisäämällä sooliin ilmaa homogenisaattorilla ennen geelin muodostumista. Soolin neutralointia ja vaahdotusta varten valmistettiin medium-emäs -liuos, jonka avulla soolin pH saatiin nostettua neutraaliksi, ja jonka pinta-aktiiviset aineet helpottivat vaahdotusta laskemalla seoksen pintajännitystä ja tätä kautta helpottamalla ilmakuplien siirtymistä aineeseen. Medium-emäs -liuos koostui RPMI-1640:stä, naudan sikiön seerumista (FBS) sekä natriumhydroksidista. Seerumia käytettiin 10 % RPMI-1640:n tilavuudesta ja natriumhydroksidin tilavuus laskettiin kulloinkin käytettävän laimennussuhteen mukaan riittäväksi neutraloimaan soolin valmistusvaiheessa lisätty suolahappo.

Lähtökohtana materiaalien (Taulukko 2) valmistuksessa käytettiin 2:1 laimennosta (v/v). Kahta osaa soolia kohti lisättiin yksi osa medium-emäs -liuosta. Lisätty medium-emäs -liuos huomioitiin vetenä lopullista R-arvoa laskettaessa.

Taulukko 2. Valmistetut materiaalit.

Materiaali	Valmistusaika		Koostumus			Lopullinen R-arvo	Soluja
	Odotus	Vaahdotus	Sooli		medium-emäs -liuos		
	min	min	R-arvo	ml	ml		kpl
Hydrogeelivaahto 1	1	3:30	50	4	1,8	78	990 000
Hydrogeelivaahto 2	1	3:30	50	4	1,8	78	990 000
Hydrogeelivaahto 3	1	3:45	50	4	1,8	78	1 000 000
Hydrogeelivaahto 4	1	3:45	50	20	10	81	6 300 000
Hydrogeelivaahto 5	1	7:30	70	8	4	111	4 500 000
Geeli	X	X	50	15	6,5	77	4 950 000

Ennen vaahdotusta testattiin materiaalin geelitymisaika, eli aika, jona sooli, johon on lisätty medium-emäs -liuos, muodostaa geelin liuksen lisäyksen jälkeen. Lähtökohtana pidettiin, että vaahdotus kestäisi noin puolet materiaalin geelitymisajasta, jolloin sekoittamisella lisätty ilma pysyisi suuremmalla todennäköisyydellä materiaalin sisällä. Liian pitkälle geelitymisprosessissa jatkuva vaahdotus rikkoo jo muodostuneita ilmakuplia sekä silikarakennetta ja vähentää huokosten määrää materiaalissa. Vaahdotuksessa käytettiin homogenisaattoria (Ultra Turrax T25) 18 mm:n sekoituspäällä, sekä 25 ml:n ja 50 ml:n dekantterilaseja vaahdotettavan erän koosta riippuen. Nopeutena laitteessa käytettiin 8000 rpm.

Vaahdotus aloitettiin pipetoimalla sooli dekantterilasiin (Liite 6). Soolin joukkoon pipetoitiin medium-emäs -liuos, ja käynnistettiin ajanotto. Minuutin odotuksen jälkeen aloitettiin vaahdotus, jota kesti lähtömateriaalista riippuen 3 min 30 s – 7 min 30 s. Vaahdotuksen aikana materiaalin tilavuus noin kaksinkertaistui. Vaahdotuksen loputtua materiaali kaadettiin solukasvatukseen tarkoitetulle petrimaljalle. Materiaalin lopullinen halkaisija maljalle kaadettuna oli n. 40 mm ja korkeus 2-3 mm (Kuva 7). Isommassa erässä, hydrogeelivaahto 4, materiaali peitti kasvatusaljan koko pohjan (\varnothing 95 mm) n. 3 mm:n paksuudelta. Hydrogeelivaahto 4:n tarkoituksena oli tutkia valmistuserän suurentamisen mahdollisia vaikutuksia tuloksiin.



Kuva 7. Hydrogeelivaaho (R80).

7.2 Solujen kasvatus ja lisääminen materiaaliin

Solujen kasvatus ja lisäys materiaaleihin suoritettiin luokan ISO 7 puhdastiloissa laminaarivirtauskaapissa. Tutkimusta varten kasvatettiin WEHI-164 -fibrosarkoomasoluja. Soluja varastoitettiin nestetyössä (-196 °C) ennen tutkimuskäyttöön ottoa.

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) -1640 medium kehitettiin alun perin ihmisen leukemiasolujen tutkimiseen, mutta sitä käytetään nykyään useiden eri nisäkässolujen kasvatuksessa. RPMI-1640 -medium sisältää HEPES:a, L-glutamiinia, biotiinia, B12-vitamiinia, para-aminobentsoahappoa, inositolia, sekä koliinia. HEPES:n (4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiini-etaanisulfonihappo) tehtävä on toimia puskurina RPMI-1640:ssä. L-glutamiini on aminohappo, joka osallistuu puriini- ja pyrimidiininukleotidien, aminosokerien, glutatiinin, L-glutamaatin sekä muiden aminohappojen muodostumiseen, sekä proteiinisynteesiin ja glukoosin valmistukseen. (Lifetechnologies 2015)

FBS (Fetal Bovine Serum) on naudun sikiöstä saatava seerumi, jota käytetään yleisesti nisäkässoluviljelyssä ja sisältää runsaasti kasvua edistäviä aineita. (Sigma-Aldrich 2015) Antibioottina kasvatusmediumissa käytettiin laajakirjoista

penisilliini-streptomysiini -yhdistelmää, joka on tehokas niin gram-positiivisille, kuin gram-negatiivisillekin bakteereille (Lonza 2015).

Soluampulli sulatettiin +37 °C lämminvesihauteessa heti nestetypestä poiston jälkeen. Ampulli suihkutettiin huolellisesti 70 % etanolilla ja siirrettiin laminaari-virtauskaappiin. Ampullin sisältö pipetoitiin 50 ml:n sentrifugiputkeen ja päälle lisättiin 45 ml puhdistusmediumia (45 ml RPMI + 450 µl Pen-Strep). Pesuvaiheen tarkoituksena on päästä eroon soluja pakastuksen aikana suojaavasta DMSO:sta. Puhdistusmediumin lisäyksen jälkeen suspensiota sentrifugoitiin 10 min (210 g, huoneenlämpö). Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti poistettiin, lietettiin solupelletti 5 ml:aan kasvumediumia (RPMI+FBS+Pen-Strep), siirrettiin T25-kasvatuspulloon ja inkuboitiin (+37 °C, 5 % CO₂). Soluviljelyssä käytettiin RPMI-mediumia, johon lisättiin 10 vol- % FBS:ää, sekä 1 vol- % antibioottia.

Tutkimuskäyttöä varten solut irrotettiin kasvatuspullosta niiden peittäessä pullon pohjasta n. 80–90 %. Soluja peittänyt kasvumedium (RPMI+FBS+Pen-Strep) poistettiin ja pulloon pipetoitiin 7,5 ml huoneenlämpöistä PBS:ää. Puskuriliuoksen annettiin vaikuttaa noin 2 min ajan kasvupulloa varovaisesti keinuttaen. Puskuriliuoksen tarkoituksena on pestä kasvumediumissa oleva seerumi pois, koska se häiritsee solujen irrotuksessa käytettävän trypsiinin toimintaa.

PBS-huuhtelun jälkeen puskuriliuos kaadettiin pois ja lisättiin soluille 1 ml trypsin-EDTA:ta (+37 °C). Trypsiinin tehtävänä on irrottaa solut kasvualustastaan. Trypsiinin vaikutusta tehostettiin inkuboimalla kasvatuspulloa noin 2 min ajan (+37 °C). Inkuboinnin jälkeen solujen irrotuksen onnistuminen varmistettiin visuaalisesti käänteismikroskoopilla.

Solususpension päälle pipetoitiin 5 ml kasvumediumia (+37 °C) ja siirrettiin suspensio 15 ml:n sentrifugiputkeen. Solususpensiota sentrifugoitiin 5 min (210 g, huoneenlämpö), poistettiin supernatantti ja resuspensoitiin solupelletti 5 ml:aan kasvumediumia. Ennen materiaaliin lisäystä solut laskettiin bürker-kammion avulla.

Tutkimusmateriaaleihin solut lisättiin pipetoimalla solususpensio valmiin vaahdon kiinteälle pinnalle, jolloin sen sisältämä vesi ei vaikuttanut materiaalin R-arvoon. Solujen lisäyksen jälkeen hydrogeelivahto peitettiin kauttaaltaan kasvumediumilla (RPMI+FBS+Pen-Strep, +37 °C) ja inkuboitiin (+37 °C, 5 % CO₂). (Liite 7)

Vertailua varten valmistettiin myös vaahdottomaton hydrogeeli. Petrimaljan pohjalle (Ø 95 mm) pipetoitiin 15,0 ml R50-soolia, johon lisättiin 6,5 ml medium-emäs -liuosta. 43 s kuluttua medium-emäs -liuoksen lisäämisestä maljalle pipetoitiin 1,0 ml solususpensiota. Maljaa liikuteltiin solujen lisäyksen jälkeen hitaasti kahdeksikon muodossa laminaarikaapin pohjaa vasten n. 2 min ajan, jonka jälkeen odotettiin geeliytymistä vielä 8 minuuttia. Geelin pinta peitettiin 25 ml:lla kasvumediumia (RPMI+FBS+Pen-Strep, + 37 °) ja siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °, 5 % CO₂)

7.3 Näytteiden tutkiminen

Solujen viabiliteettia tutkittiin kahdella eri menetelmällä. Ensisijaisena tutkimusmenetelmänä käytettiin kaupallista reagenssia Alamar Blueta. Toissijaisena ja lähinnä aiempia tuloksia tukemassa käytettiin prototyypivaiheessa olevaa akustista sensoria.

Fluoresenssituloksia analysoitaessa käytettiin toteamisrajana taustan keskiarvoa lisättynä kolminkertaisella taustan keskihajonnalla (Mittatekniikan keskus 2011). Tätä vastaava signaali/tausta -suhde on 1,5. Tämän rajan ylittäviä signaaleja voidaan siis matemaattisesti pitää luotettavina.

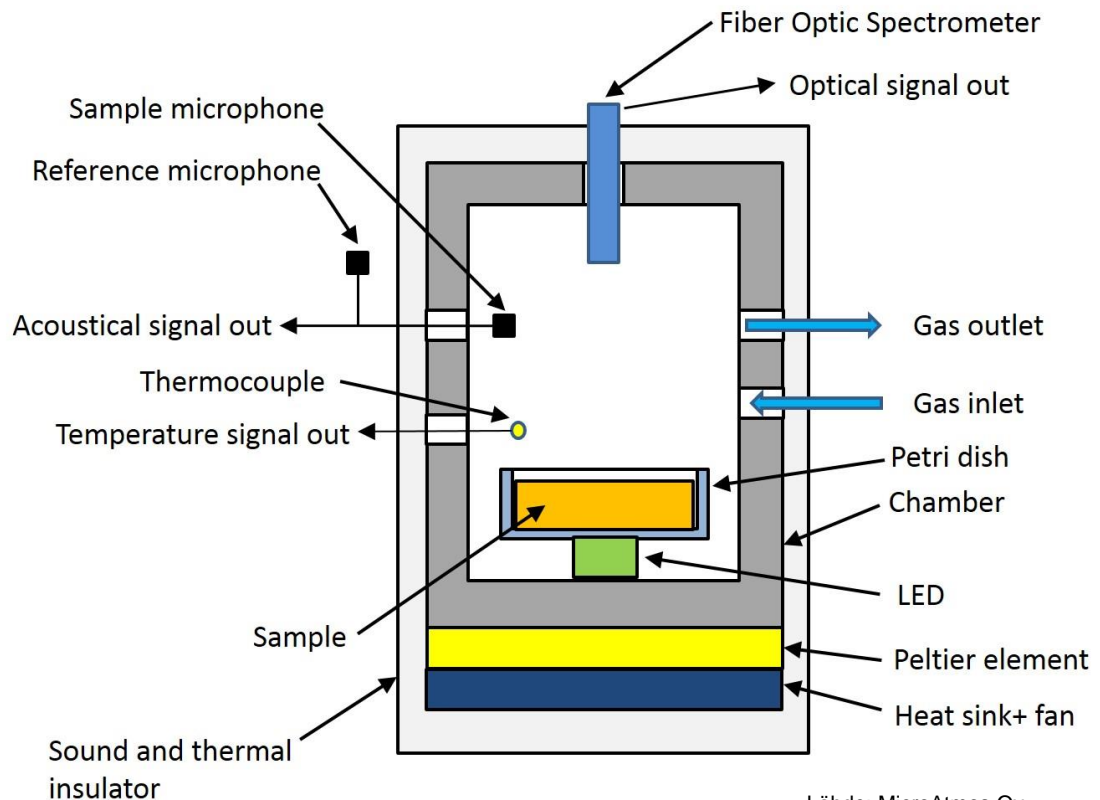
Alamar Blue

Alamar Blue on kaupallinen reagenssi, jota käytetään solujen viabiliteetin ja sytotoksisuuden määrittämiseen. Vaikuttavana aineena Alamar Bluessa on resatsuriini, joka pelkistyy elävissä soluissa resorufiiniksi. Ennen pelkistymistä Alamar Blue on väriltään sinistä, eikä fluoresoi, mutta pelkistyttyään resorufiiniksi, väri muuttuu kirkkaan pinkiksi ja reagenssi voimakkaan fluo-

resoivaksi. Fluoresenssisignaalia mitattaessa aallonpituuksina käytetään eksitaatioissa 570 nm ja emissiossa 595 nm. (Munshi *et al.* 2014; O'Brien *et al.* 2000; ThermoFisher 2008)

Akustinen sensori

Solujen selviytymistä tutkimusmateriaaleissa selvitettiin myös prototyyppivaiheessa olevalla akustisella sensorilla. Laite koostuu tutkimuskammioista, Peltier-elementistä, antureista, sekä tietokoneesta (Kuva 8). Tutkimuskammioon pystytään luomaan erilaisia mikroympäristöjä vaihtelemalla käytettyjä kaasuja, sekä niiden suhteita, lämpötilaa, kosteutta ja painetta, sekä lisäämällä led-valoja. Luotu ympäristö voidaan säilyttää suljettuna, tai sitä voidaan "huuhdella" antamalla kaasujen virrata vapaasti. Tutkimuksen aikana näytteestä voidaan mitata reaaliaikaisesti valon absorptiota tai emissiota, sekä ottaa näytteitä massaspektrometriä varten. (MicroAtmos 2015)



Kuva 8. Akustisen sensorin kaaviokuva. Lähde: MicroAtmos Oy.

Testejä varten näytteet valmisteltiin luokan ISO 7 puhdastiloissa laminaarivirtauskaapissa, mutta itse testit ajettiin normaalissa laboratorioympäristössä. Näyte asetettiin petrimaljassa (Ø 30 mm) tutkimuskammioon, joka suljettiin tiiviisti. Kammioon kiinnitettiin akustinen sensori sekä lämpötilaa tarkkailevat anturit. Kammion ulkopuolelle asennettiin mikrofoni taltioimaan ympäristöstä tulevia ääniä, jotta mahdollinen häirintä pystytään tulosten analysointivaiheessa todentamaan. Laite rekisteröi näytteestä aiheutuneet paineen vaihtelut, jotka pystyttiin näkemään tietokoneen näytöltä audiokäyränä.

Laitteella tehtiin kolme viiden vuorokauden mittaista testiajkoa. Ensimmäisessä ajossa mitattiin pelkkien WEHI-164 solujen aiheuttamaa ääntä, toisessa pelkkää materiaalin tuottamaa ääntä ja kolmannessa materiaalin ja solujen yhdistelmää.

Pelkkiä WEHI-164 -soluja kuunneltaessa laitteeseen asetettiin maljalla n. 800 000 solua 5 ml:ssa kasvatusmediumia. Laitteen lämpötilaksi asetettiin +37 °C. Tutkimuksen aikana kammioon ei lisätty hiilidioksidia.

Tutkittavaksi materiaaliksi valikoitui R50-soolin pohjalta tehty 2:1 (v/v) hydrogeelivaahdo, jonka lopullinen R-arvo oli noin 81. Näytettä varten vaahdotettiin 4,0 ml R50-soolia ja 2,0 ml medium-emäs -liuosta (RPMI+FBS+NaOH). Vaahdotusta edelsi 1 min odotusaika, ja varsinainen vaahdotus kesti 5 min 50 s. Valmis materiaali jaettiin kahdelle halkaisijaltaan 30 mm:n petrimaljalle, joista molemmat peitettiin 10 min kuluttua vaahdotuksesta 3 ml:lla kasvumediumia. 20 min kuluttua vaahdotuksen loppumisesta toinen näytemaljoista asetettiin kuuntelukammioon (+37 °C, normaali huoneilma).

Kolmatta tutkimusta varten yhdistettiin WEHI-164 -solut, sekä vastaava hydrogeelivaahdo kuin toisessa mittauksessa. Hydrogeelivaahdo valmistettiin aiempaa isompi erä: 10 ml R50-soolia yhdistettiin 5 ml medium-emäs -liuosta (RPMI+FBS+NaOH). Materiaalin valmistusaika koostui 1 min odotuksesta ja 5 min 30 s vaahdotuksesta. Valmis materiaali jaettiin yhdelle halkaisijaltaan 30 mm:n petrimaljalle, sekä yhdelle halkaisijaltaan 50 mm:n petrimaljalle. Molemmat petrimaljat siirrettiin lämpökaappiin (+37 °C, 5 % CO₂) kuuden minuutin kuluttua vaahdotuksesta. 2 h 42 min kuluttua inkuboinnin aloituksesta 30 mm:n

petrimaljalle lisättiin 35 000 WEHI-164 -solua, peitettiin hydrogeelivaaho sekä solut 2 ml:lla kasvumediumia ja jatkettiin inkubointia. 1 h 20 min kuluttua solujen lisäyksestä näyte siirrettiin kuuntelukammioon (+37 °C, normaali huoneilma).

Näytteenotto

Materiaalien tutkimista varten hydrogeelivaahdoista otettiin näytteitä, joita inkuboiitiin Alamar Bluen kanssa. Näytteet otettiin laminaarivirtauskaapissa luokan ISO 7 puhdastiloissa.

Näytteenottoa varten tutkittavan materiaalin päältä pipetoitiin kasvumedium (RPMI+FBS+Pen-Strep) pois. 1 ml pipetinkärjestä katkaistiin kapeneva kärkiosa pois ja jäljelle jäänyt suora osa painettiin materiaaliin maljan pohjaan asti. Näin saatu näyte siirrettiin varovasti kuoppalevylle ja peitettiin jälleen kasvumediumilla (RPMI+FBS+Pen-Strep). Jokaisella näytteenottokerralla materiaaleista otettiin rinnakkaiset näytteet. Näytteiden päälle kasvumediumin joukkoon pipetoitiin Alamar Blueta 10 % kasvumediumin tilavuudesta. Näytteitä inkuboiitiin solukasvatuskaapissa (+37 °C, 5 % CO₂).

Jotta fluoresenssimittauksia varten olisi saatu mahdollisimman homogeeninen näyte, jokaisesta näytekuopasta pipetoitiin kaksi rinnakkaista näytettä uudelle kuoppalevylle. Alkuperäisen kuoppalevyn inkubointia jatkettiin. Uudelta kuoppalevyltä mitattiin fluoresenssisignaali 570 nm:n eksitaatiolla ja 595 nm:n emissiolilla.

Reologia

Reologisia mittauksia varten materiaaleista otettiin näytteet kasvatuksen viimeisenä päivänä. Näytteenottoon asti materiaaleja säilytettiin solukasvatusolosuhteissa. Oskillaatiomittaukset suoritettiin Anton Paar MCR 102 -reometrillä ja tulokset käsiteltiin Rheoplus-ohjelmalla. Mittapäänä käytettiin halkaisijaltaan 15 mm:n levy-levy -mittapäätä, jonka mittausetäisyydeksi alustaan nähden säädettiin 1 mm. Arvoja mitattiin kymmenestä eri mittapistestä eri kulmataajuuksilla. Mittauksissa käytetty venymä (strain) valittiin amplitudimittausten perusteella tulosten lineaariselta viskoelastiselta alueelta, jolloin arvoksi valikoitui 5 %.

8 TULOKSET

Seuraavassa kappaleessa on käyty läpi opinnäytetyön käytännön vaiheen aikana saadut tärkeimmät tulokset materiaaleittain. Ensimmäiseksi on esitetty Alamar Blue -käsittelyllä saadut fluoresenssitulokset, jonka jälkeen materiaaleista 3, 4 ja 5 saatuja reologisia arvoja. Viimeisessä kappaleessa on esitetty prototyyppivaiheessa olevan akustisen sensorin antamat tulokset.

8.1 Solujen viabiliteetti materiaaleissa

Solujen säilymistä tutkittiin viidessä eri hydrogeelivaahdossa ja yhdessä geelissä (Taulukko 3). Ensisijainen viabiliteetin määrittämiseen käytetty menetelmä oli näytteiden altistaminen Alamar Blueille ja inkuboinnin jälkeinen fluoresenssisignaalin mittaaminen monileimalaskimella. Signaalin mittaamisen rinnalla seurattiin Alamar Bluen värireaktiota. Hydrogeelivaahdoille 3, 4 ja 5 tehtiin myös reologisia mittauksia materiaalin rakenteen selvittämiseksi.

Taulukko 3. Solututkimuksessa käytetyt materiaalit.

Materiaali	Valmistusaika		Koostumus			Lopullinen R-arvo	Soluja kpl	Seuranta-aika vrk
	Odotus	Vaahdotus	Sooli		medium-emäs-liuos			
	min	min	R-arvo	ml	ml			
Hydrogeelivaahto 1	1	3:30	50	4	1,8	78	990 000	13
Hydrogeelivaahto 2	1	3:30	50	4	1,8	78	990 000	13
Hydrogeelivaahto 3	1	3:45	50	4	1,8	78	1 000 000	39
Hydrogeelivaahto 4	1	3:45	50	20	10	81	6 300 000	35
Hydrogeelivaahto 5	1	7:30	70	8	4	111	4 500 000	30
Geeli	X	X	50	15	6,5	77	4 950 000	33

Solujen viabiliteettia materiaaleissa seurattiin näytteestä riippuen 13–39 vuorokauden ajan.

Hydrogeelivaahdot 1 ja 2 valmistettiin peräkkäin mahdollisimman identtisiksi. Valmistuksessa pyrittiin saamaan materiaalin osien suhteeksi 2:1 (v/v), joten medium-emäs -liuoksen määrässä huomioitiin solususpensiossa materiaaliin lisättävä 200 µl. Hydrogeelivaahdon pinta ehti kuitenkin jähmettyä ennen solujen lisäystä, joten solususpension tilavuutta ei huomioitu R-arvoa laskettaessa. Hydrogeelivaahdot 3 valmistettiin samoin kuin materiaalit 1 ja 2, mutta eri kerralla. Prosessin skaalausta kokeiltiin hydrogeelivaahdolla 4, jonka lähtöaineiden tilavuus on viisinkertainen materiaaleihin 1-3 nähden.

Hydrogeelivaahdot 5 valmistettiin lähtöarvoltaan R70-soolista, mutta samalla 2:1 (v/v) -suhteella kuin aiemmat neljä materiaalia. Tällöin materiaalin lopulliseksi R-arvoksi muodostui n. 111. R-arvon kasvaessa hydrogeelivaahdon kiintoaineen osuus laskee, mikä vaikuttaa materiaalin rakenteeseen sekä reologisiin ominaisuuksiin. Tarkoituksena oli tutkia R-arvon muutoksen vaikutusta solujen selviytymiseen.

Vaahdottoman hydrogeeli valmistettiin samalla kerralla kuin hydrogeelivaahdot 1 ja 2. Suhdeluvuksi (v/v) pyrittiin saamaan sama arvo kuin hydrogeelivaahdoilla 1 ja 2.

Hydrogeelivaahdot 1

Hydrogeelivaahdot 1:n seuranta kesti 13 vrk, jonka aikana siitä otettiin kaksi näytettä. Materiaalin rakenne säilyi silmämääräisesti arvioituna hyvänä seuranta-jakson ajan.

Näyte 1 otettiin katkaistulla 300 µl:n pipetinkärjellä ja inkuboitui 2000 µl:ssa kasvatustalviumia ja 200 µl:ssa Alamar Blueta. Näytettä inkuboitui 2 vrk ennen ensimmäistä mittausta, ja jatkettiin 13 vuorokauden ajan. Seurannan aikana (Taulukko 4) ei tapahtunut fluoresenssisignaalin kasvua tai solujen selviytymisestä kertovaa värimuutosta.

Taulukko 4. Fluoresenssi, hydrogeelivaaho 1, näyte 1.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
2	698	0,15
5	714	0,08
9	196	0,013
13	505	0,032

Näyte 2 otettiin kärjestään katkaistulla 1 ml:n pipetinkärjellä ja inkuboitii 400 µl:ssa kasvatusmediumia ja 40 µl:ssa Alamar Blueta 1 vrk ennen mittausta. Kahden rinnakkaisen näytteen fluoresenssisignaali on nähtävillä ero, joka selittyy solujen epätasaisella jakautumisella materiaalissa (Taulukko 5). Signaali/tausta -suhde ensimmäisessä rinnakkaisessa näytteessä antaa kuitenkin viitteitä solujen säilymisestä hengissä.

Taulukko 5. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 1, näyte 2.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
7	7946	1,36
	-175	-0,03

Hydrogeelivaaho 2

Hydrogeelivaaho 2 oli identtisestä valmistustavastaan huolimatta silmämääräisesti arvioituna rakenteeltaan tiukempaa kuin hydrogeelivaaho 1. Hydrogeelivaaho 2:n seuranta kesti 13 vrk, jonka aikana siitä otettiin kaksi näytettä. Materiaalin rakenne säilyi silmämääräisesti arvioituna hyvänä seurannan ajan.

Hydrogeelivaaho 2:n ensimmäinen näyte otettiin samoin kuin hydrogeelivaaho 1:n ensimmäinen näyte, kärjestään katkaistulla 300 µl:n pipetinkärjellä. Näytettä inkuboitii 2000 µl:ssa kasvatusmediumia ja 200 µl:ssa Alamar Blueta kaksi vuorokautta ennen ensimmäistä mittausta.

Näytteen antaman fluoresenssisignaalin voidaan nähdä kasvavan tasaisesti seurantajakson ajan (Taulukko 6). Signaali-tausta -suhde jää kuitenkin liian matalaksi, jotta tuloksia voitaisiin pitää luotettavina.

Taulukko 6. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 2, näyte 1.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
2	-3	-0,001
5	801	0,087
9	2076	0,134
13	3315	0,212

Näyte 2 otettiin samoin kuin hydrogeelivaaho 1:n toinen näyte, kärjestään katkaistulla 1 ml:n pipetinkärjellä. Näytettä inkuboitettiin 400 µl:ssa kasvatusmediumia ja 40 µl:ssa Alamar Blueta 1 vrk ennen mittausta. Ensimmäistä näytettä isompi näytemäärä ja pienempi kasvatusmediumin tilavuus saattoivat vaikuttaa fluoresenssisignaalin selvään eroon näytteeseen 1 verrattuna. Näytteen 2 signaali/tausta -suhteen perusteella (Taulukko 7) voidaan luotettavasti todeta solujen säilyneen materiaalissa hengissä seitsemän vuorokauden ajan.

Taulukko 7. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 2, näyte 2.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
7	24 088	4,11
	13 588	2,32

Hydrogeelivaaho 3

Hydrogeelivaaho 3:sta otettiin ensimmäinen näyte 2 vuorokauden kuluttua valmistuksesta ja seuranta jatkettiin 39 vuorokauden ajan. Seurannan aikana materiaalista otettiin neljä näytettä, joista osaa inkuboitettiin ja mitattiin useamman kerran samoilla parametreilla.

Ensimmäisessä näytteessä kahden vuorokauden kuluttua materiaalin valmistuksesta (Taulukko 8) ei ole vielä nähtävillä solujen vointia indikoivaa signaalia.

Taulukko 8. Fluoresenssi: hydrogeelivaahdo 3, näyte 1.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
2	1133	0,19
	-534	-0,09

Seitsemän vuorokauden kuluttua vaahdotuksesta, maljalla hydrogeelivaahdon peittävä kasvatusmedium oli vaihtanut väriä punaisesta keltaiseksi, osoittaen solujen olevan elossa. Materiaalista otettu näyte (Taulukko 9) 11 vrk:n kohdalla näyttää toisessa rinnakkaisessa taustasta kohonneen signaalin, joka osaltaan tukee mediumin värin muutosta. Sama muutos on edelleen nähtävissä 15 vuorokauden kohdalla.

Taulukko 9. Fluoresenssi: hydrogeelivaahdo 3, näyte 2.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
11	-247	-0,02
	12681	1,08
15	1536	0,10
	15507	1,05
22	1565,9	0,07
28	4	0,00
	-16075	-0,53

Seurannan toisen näytteen rinnalle otettiin järjestyksessään kolmas näyte (Taulukko 10). Poikkeamat näiden kahden näytteen tuloksissa ovat pieniä ja selitettävissä näytteiden heterogeenisyydellä.

Vaikka signaali-tausta -suhde fluoresenssia mitattaessa jää pieneksi, oli näytteiden väri muuttunut sinisestä kirkkaan pinkiksi vahvistaen solujen hengissä olemisen.

Taulukko 10. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 3, näyte 3.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
22	10030	0,86
	2303	0,20
28	5553	0,27
	911	0,04

Neljäs ja viimeinen näyte vaahdosta 3 otettiin 39 vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Tuloksista on nähtävissä selvä signaali/tausta -suhteen kasvu, mikä selittyy solujen onnistuneella levittäytymisellä ja kasvulla materiaalissa (Taulukko 11).

Taulukko 11. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 3, näyte 4.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
39	12356	3,74
	14636	4,43
	8452	2,56
	8905	2,69

Seurannan aikana hydrogeelivaaho 3:n kasvumediumin tunnisteväri muuttui useasti punaisesta keltaiseksi, vahvistaen Alamar Blue värjäyksellä saadut tulokset.

Hydrogeelivaaho 4

Hydrogeelivaaho 4:n seuranta kesti 35 vuorokautta, jonka aikana siitä otettiin kolme eri näytettä. Kahdesta ensimmäisestä näytteestä otettiin näyte fluoresenssimittauksia varten useampia kertoja. Mitattavien näytteiden oton väliset ajat näytteitä inkuboitiiin samoin kuin varsinaisia tutkittavia materiaaleja. Näytteet otettiin kärjestään katkaistulla 1 ml:n pipetinkärjellä 24-kuoppalevyille.

Ensimmäisen näytteenoton aikaan materiaali oli kolme vuorokautta vanhaa. Näytteenoton ja ensimmäisen mittauksen välillä näytettä inkuboitiin neljän vuorokauden ajan, mutta signaalit jäivät silti pieniksi (Taulukko 12).

Taulukko 12. Fluoresenssi: hydrogeelivaahdo 4, näyte 1.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
7	520	0,04
	2347	0,20
11	852	0,06
	2497	0,17
18	1025	0,05
24	-711	-0,02
	-4042	-0,13

Toisesta näytteestä saadut fluoresenssitulokset näyttävät 18 vuorokauden kohdalla näytteen antaman signaali/tausta -suhteen olevan heikko, mutta näytteen väri oli muuttunut väriltään vaaleanpunaiseksi osoittaen näytteessä olevan eläviä soluja (Taulukko 13). 24 vuorokauden kohdalla signaali/tausta -suhde on selvästi laskenut aiemmasta.

Taulukko 13. Fluoresenssi: hydrogeelivaahdo 4, näyte 2.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
18	10212	0,88
	8951	0,77
24	4560	0,22
	10882	0,54

Kolmas näyte otettiin hydrogeelivaahdon ollessa 35 vuorokauden ikäistä. Materiaalia ympäröivän kasvumediumin väri oli muuttunut punaisesta keltaiseksi, jota voidaan pitää merkinä elävistä soluista. Myös fluoresenssimittauksesta saatu signaali/tausta -suhde osoittaa solujen olevan hengissä (Taulukko 14).

Taulukko 14. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 4, näyte 3.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
35	4283	1,3
	4668	1,4
	4398	1,3
	3994	1,2

Hydrogeelivaaho 5

Hydrogeelivaaho 5:n seuranta kesti 30 vrk, jonka aikana siitä otettiin yksi näyte. Materiaalin rakenne säilyi tarkkailujakson aikana hyvänä, näytteen antama fluoresenssisignaali ei osoita materiaalissa olevan eläviä soluja (Taulukko 15). Kasvumediumin väri säilyi koko seurannan ajan muuttumattomana.

Taulukko 15. Fluoresenssi: hydrogeelivaaho 5.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
30	364	0,1
	251	0,1
	192	0,1
	241	0,1

Näyte otettiin kärjestään katkaistulla 1 ml:n pipetinkärjellä ja sitä inkuboitiin so-luviljelyolosuhteissa vuorokausi ennen mittausta.

Geeli

Solujen selviytymistä geelissä seurattiin 13 vuorokauden ajan, jonka aikana geelistä otettiin kaksi eri näytettä. Ensimmäinen näyte otettiin kärjestään katkaistulla 300 µl:n pipetinkärjellä 24-kuoppalevylle, josta pipetoitiin 200 µl:n näyt-teitä 96-kuoppalevylle fluoresenssimittauksia varten neljä kertaa. Ensimmäises-

tä näytteestä saadut signaalit eivät anna viitteitä materiaalissa olevista elävistä soluista (Taulukko 16).

Taulukko 16. Fluoresenssi: geeli, näyte 1.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
2	888	0,193
5	396	0,043
9	658	0,042
13	4859	0,311

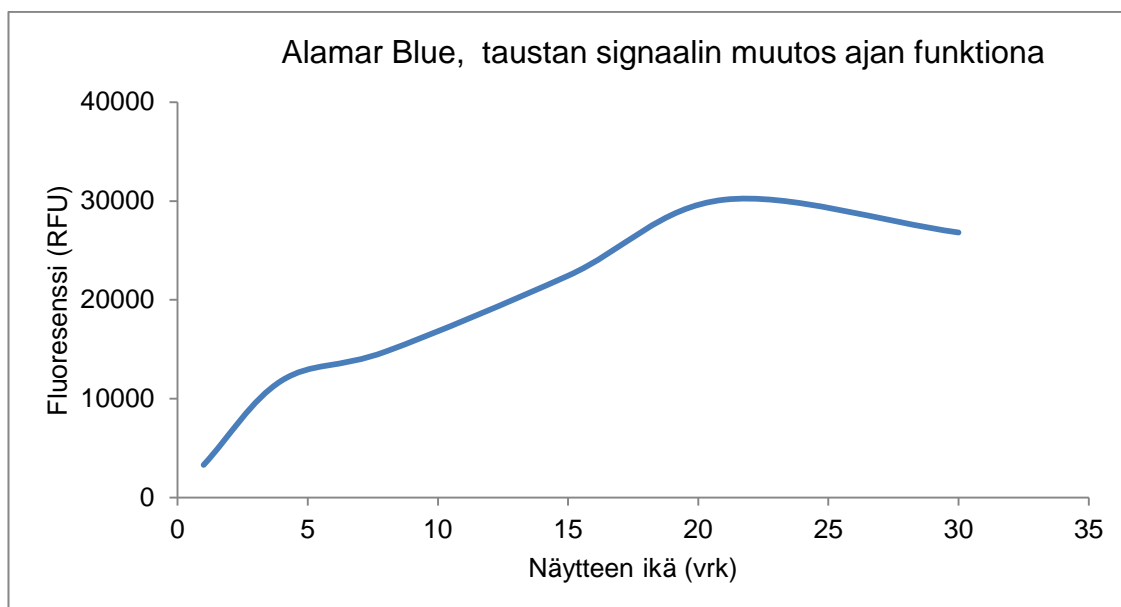
Toinen näyte geelistä otettiin kuuden vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Näyte otettiin edellistä isommalla katkaistulla pipetinkärjellä (1 ml) 96-kuoppalevyille.

Aiempaa suurempi näytemäärä pienemmässä reagenssilavuudessa ei kuitenkaan tuottanut riittävää signaalia, jotta voitaisiin todeta solujen selvinneen materiaalissa (Taulukko 17).

Taulukko 17. Fluoresenssi: geeli, näyte 2.

Materiaalin ikä (vrk)	Signaali (RFU)	Signaali/tausta -suhde
7	-1363	-0,23
	2029	0,35

Seurannan aikana huomattiin näytteiden signaali/tausta -suhteen laskua, vaikka Alamar Blue antoi värimuutoksella positiivisen signaalin solujen viabiliteetista. Tulosten tarkastelussa pystyttiin huomaamaan, että vaikka varsinaisten näytteiden antamat signaalit kasvoivat ajan kuluessa, kasvoi myös taustan antama signaali (Kuvio 1). Kuten kuvioista voidaan nähdä, pelkän taustan antama fluoresenssisignaali kasvaa jyrkästi 20 ensimmäisen vuorokauden aikana.



Kuvio 1. Taustan signaalin muutos ajan funktiona.

Koska varsinkin nuorista materiaaleista otetuissa näytteissä solumäärät olivat hyvin pieniä, vaativat näytteet pitkiä inkubointeja, jolloin taustan signaalin kasvu vääristi tuloksia tehden niistä epäluotettavia.

Materiaalien ikääntyessä ja solujen lisääntyessä sekä levittäytyessä laajemmalti koko materiaalin alalle, saatiin vuorokauden inkubointiajoilla joitakin luotettavia tuloksia.

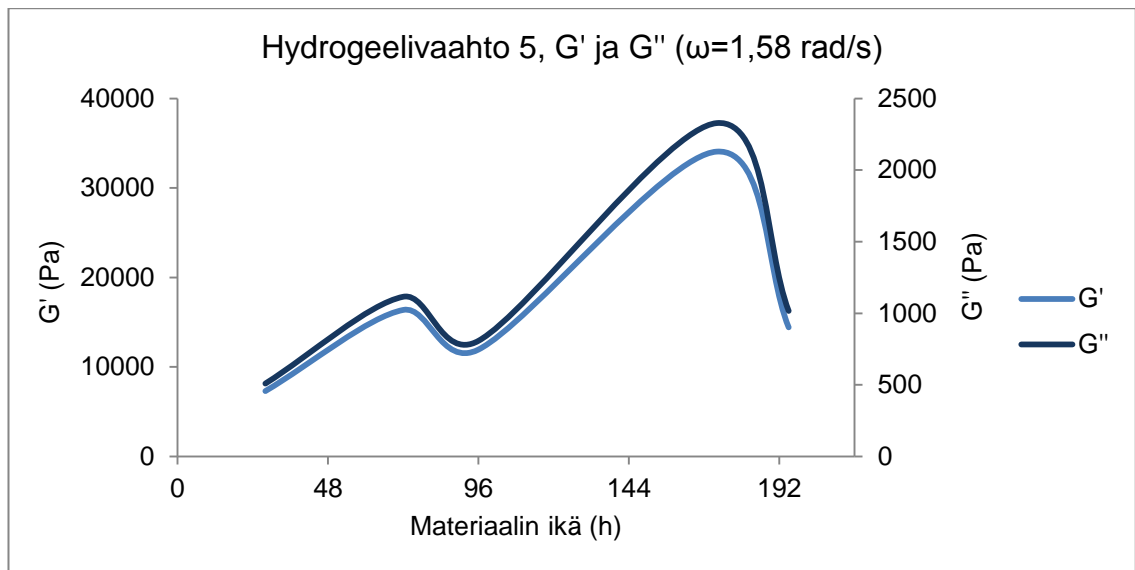
Päätelmät solujen hengissä pysymisestä tehtiin fluoresenssimittausten lisäksi seuraamalla Alamar Bluen värireaktioita, sekä materiaaleja peittävän kasvumediumin sisältämän fenolipunaisen värimuutoksia.

8.2 Reologia

Kolmesta hydrogeelivaahdosta tehtiin opinnäytetyön aikana myös reologisia mittauksia. Hydrogeelivaahdoista 3 ja 4 mittaukset tehtiin solukasvatuksen lopussa, kun taas hydrogeelivaahdoista 5:n reologisia arvoja seurattiin ensin kahdeksan vuorokauden ajan heti materiaalin valmistuksen jälkeen, ja lopuksi yhden aikapisteen mittaukset materiaalin ollessa 30 vuorokauden ikäistä.

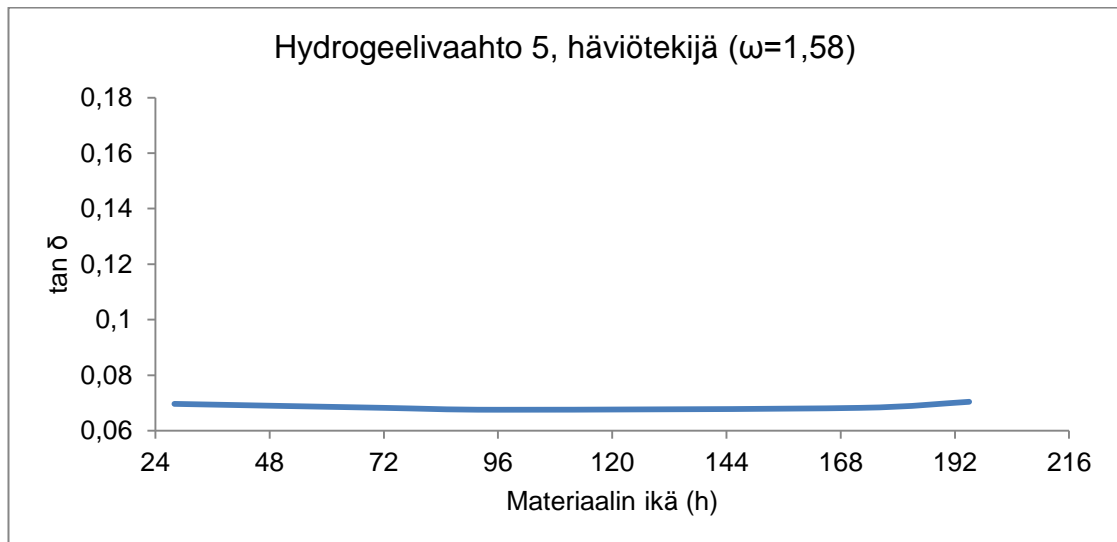
Näytteistä mitattiin varasto- ja häviömoduulit ja laskettiin näiden perusteella materiaalin viskoosisista ja elastisista ominaisuuksista kertova häviötekijä. Kaikissa mittauksissa käytettiin 5 % venymää.

Hydrogeelivaaho 5:n ominaisuuksien kehittymistä seurattiin ensimmäisen kahdeksan vuorokauden ajan. Sekä varasto-, että häviömoduuli kehittyvät lähes identtisesti saavuttaen huippunsa 172 tunnin kohdalla (Kuvio 2).



Kuvio 2. Hydrogeelivaaho 5, reologisten arvojen seuranta (195 h).

Materiaalin viskoelastisten ominaisuuksien suhdetta kuvaava häviötekijä sen sijaan kasvaa seurannasta viimeiseen mittaukseen nousten seurannan n. 0,07:stä (Kuvio 3) viimeisen aikapisteen n. 0,1:een (Kuvio 6).



Kuvio 3. Hydrogeelivaaho 5, häviötekijän seuranta (195 h).

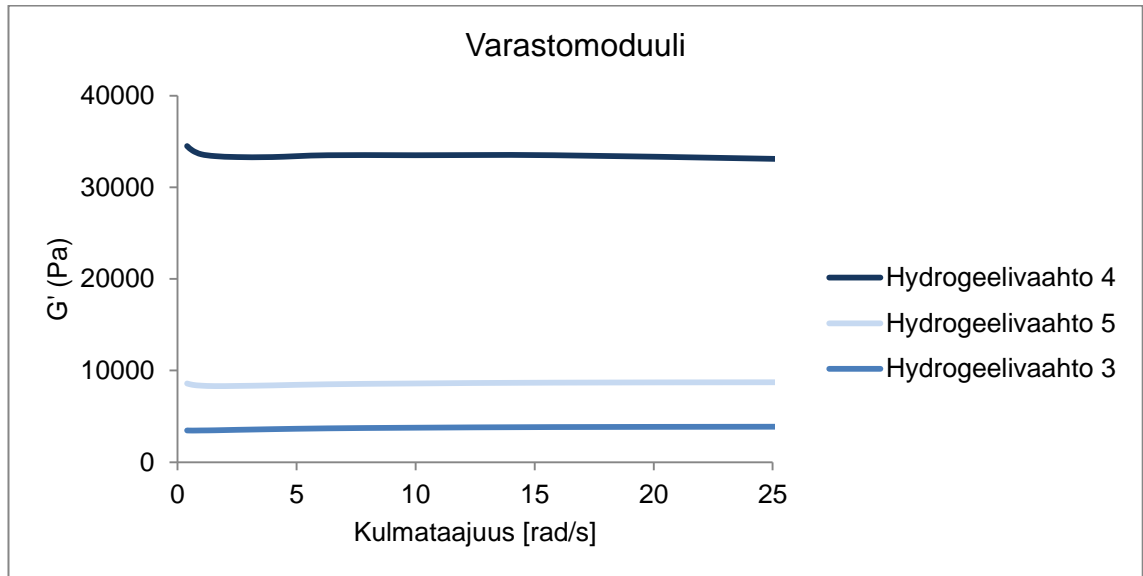
Kun vertaa saatuja arvoja viimeiseen materiaalista tehtyyn mittaukseen (Kuvio 4 ja Kuvio 5), voidaan nähdä sekä varasto- että häviömoduulin laskun jatkuvan. Materiaalin häviötekijä ($\tan \delta$) pysyy vakaana koko seurantajakson ajan (Kuvio 3).

Kaikki kolme materiaalia mitattiin solukasvatuksen lopussa.

Materiaalien iät mittausten aikana:

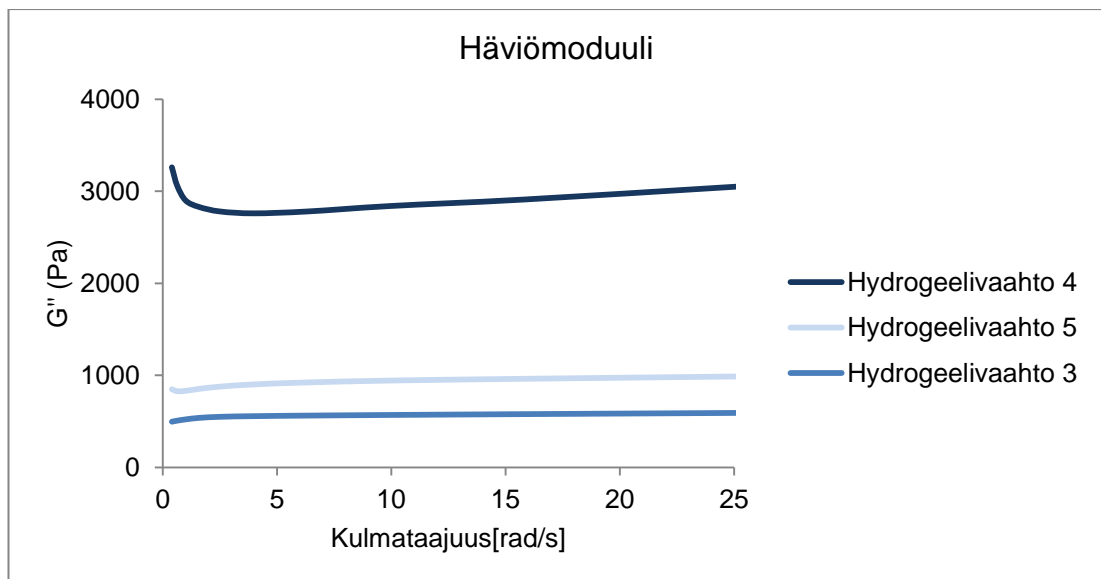
- Hydrogeelivaaho 3: 30 vrk,
- Hydrogeelivaaho 4: 33 vrk,
- Hydrogeelivaaho 5: 30 vrk.

Kaikista kolmesta materiaalista mitattiin varastomoduulit ja verrattiin niitä keskenään (Kuvio 4). Varastomoduuli kuvaa aineen elastisia ominaisuuksia. Hydrogeelivaahdo 4:n varastomoduuli on selvästi korkeampi kuin kahden muun.



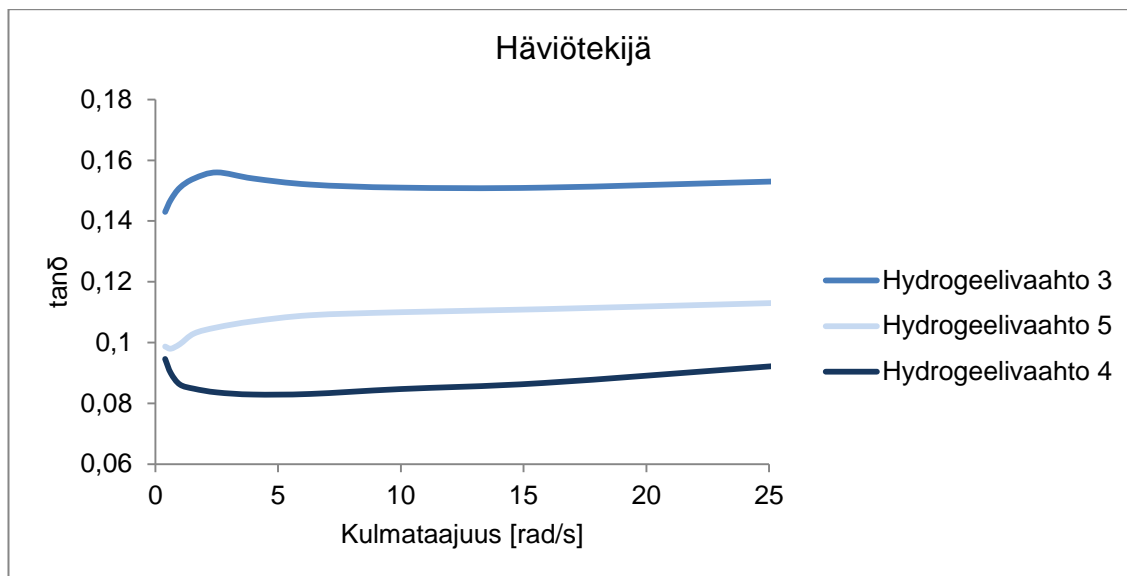
Kuvio 4. Varastomoduuli, hydrogeelivaahdot 3, 4 ja 5.

Myös materiaalien häviömoduulit mitattiin. Samoin kuin varastomoduulin kohdalla, häviömoduuli on hydrogeelivaahdo 4:llä selvästi muita korkeampi (Kuvio 5). Häviömoduuli kuvaa aineen viskoosisia ominaisuuksia.



Kuvio 5. Häviömoduuli, hydrogeelivaahdot 3, 4 ja 5.

Varasto- ja häviömoduuleista laskettiin moduuleiden suhdeluku, häviötekijä. Häviötekijä jää kaikilla materiaaleilla selvästi alle yhden, mikä tarkoittaa, että niissä vallitsevat kiinteät ominaisuudet. Vaikka hydrogeelivaahto 4:n sekä varasto-, että häviömoduuli olivat selvästi muita korkeampia, jää materiaalin häviötekijä matalimmaksi. Korkein häviötekijä on hydrogeelivaahto 3:lla, noin puolet suurempi kuin materiaalilla 4. (Kuvio 6)



Kuvio 6. Häviötekijä, hydrogeelivaahdot 3, 4 ja 5.

8.3 Akustinen sensori

Akustisella sensorilla seurattiin kolmea eri näytettä, jokaista viiden vuorokauden ajan.

Solut

Pelkistä soluista saatu signaali oli voimakasta tutkimuksen ensimmäisen 30 tunnin ajan. Laitteen mittausherkkyyks oli säädetty alussa herkimmilleen, mutta sitä jouduttiin säätämään noin puoleen seurannan aikana.

Mittauksen jälkeen maljalla oli nähtävillä runsaasti soluja ja kasvumediumin väri oli vaihtunut punaisesta aniliininpunaiseksi.

Hydrogeelivaaho

Mitatut signaalit olivat ensimmäisen kuuden tunnin ajan hyvin voimakkaita, jonka jälkeen tilanne rauhoittui seuraavaksi kuudeksi tunniksi. 12 tunnin kohdalla signaalit kasvoivat jälleen, sekä taustakohinana että kohinasta erottuvina piikkeinä, mitä jatkui kolmannen kuuden tunnin jakson ajan. 18 tunnin kohdalla signaalipiikit loppuivat, mutta taustakohina kasvaa tasaisesti aina n. 26 tunnin kohdalle asti. 30 tunnin kohdalla signaaliin tulee selvä kasvuvaihe, joka kestää noin kuuden tunnin ajan.

Materiaali kutistui selvästi mittauksen aikana, näytteen halkaisija pieneni n. 2 mm. Myös kasvumediumin väri muuttui punaisesta aniliininpunaiseksi.

Solut ja hydrogeelivaaho

Audiokäyrässä oli havaittavissa selviä signaalipiikkejä 20–24 tunnin, 30–36 tunnin, ja 54–60 tunnin kohdalla sekä 72. tunnista eteenpäin.

Solu-hydrogeelivaaho -yhdistelmä kutistui tutkimuksen aikana samoin kuin aiemmat näytteet, materiaalin halkaisija pieneni 2-3 mm. Kasvumediumin väri muuttui aniliininpunaiseksi. (Kuva 9)

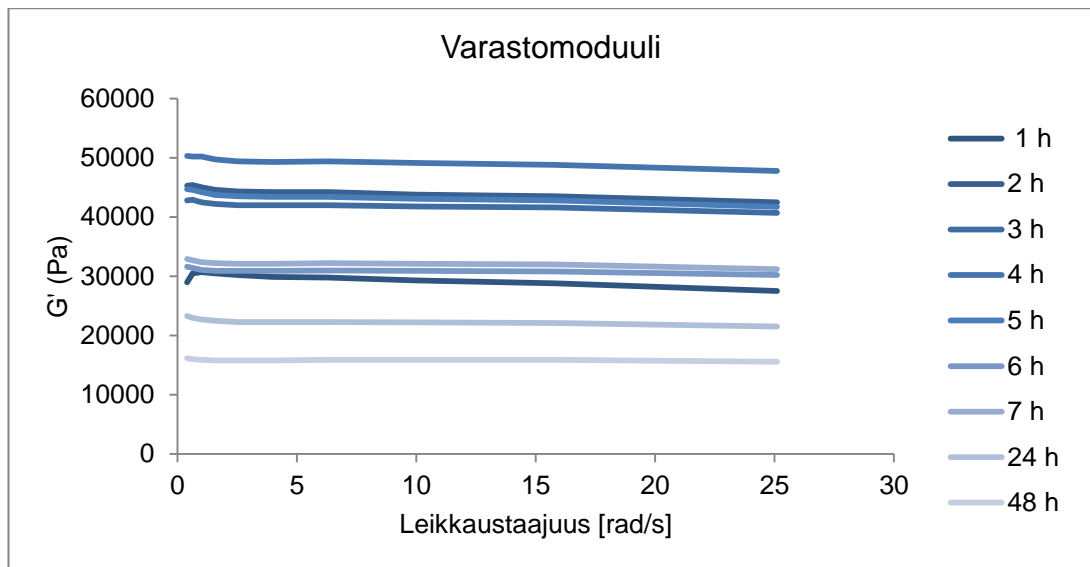


Kuva 9. Solu-hydrogeelivaaho -yhdistelmä mittauksen jälkeen.

Reologia

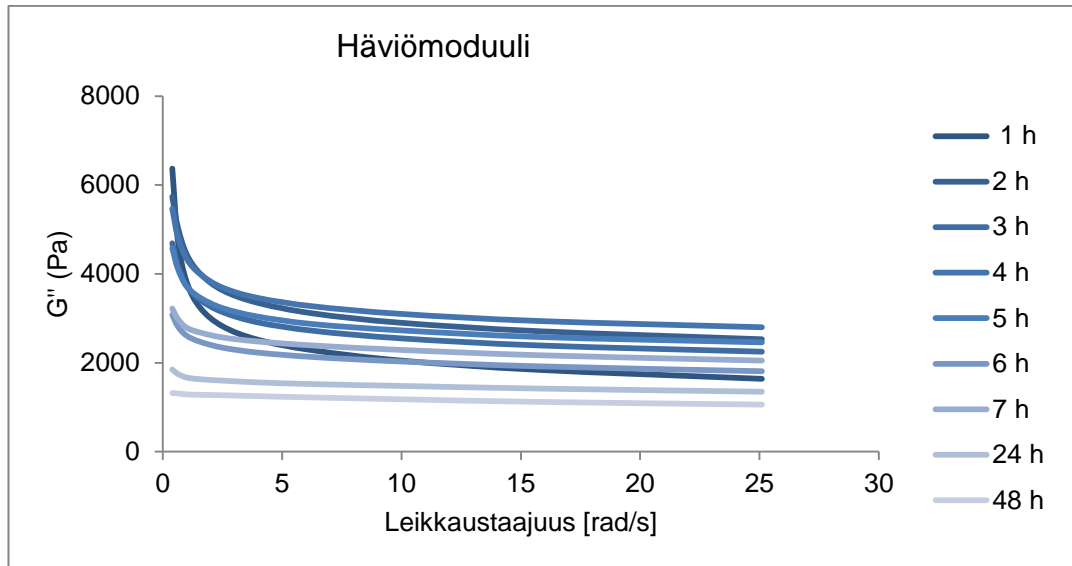
Akustisessa sensorissa tutkittua hydrogeelivaahtoa vastaavaa materiaalia analysoitiin myös reometrilla, jotta nähtäisiin materiaalin elastiset ja viskoosiset muutokset. Tästä materiaalista käytetään työssä nimitystä replikamateriaali.

Replikamateriaalin varastomoduuli laskee korkeimmillaan vajaasta 50 000 Pa:sta noin 16 000 Pa:iin kahden vuorokauden seurannan aikana (Kuvio 7).



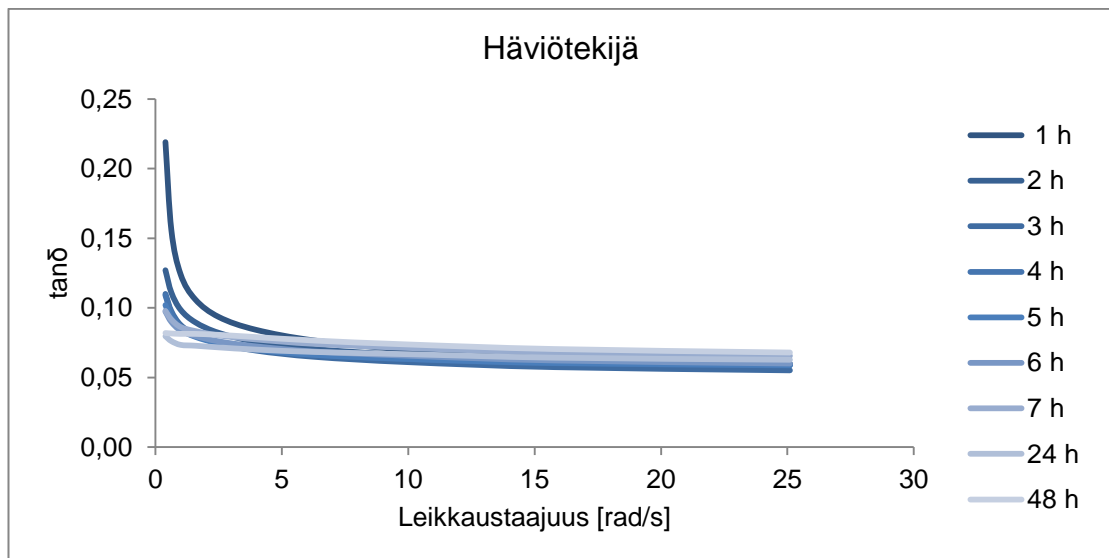
Kuvio 7. Replikamateriaali, varastomoduuli.

Sekä varasto- että häviömoduulit (Kuvio 7, Kuvio 8) laskevat seurannan aikana noin kolmannekseen, mikä selittää akustisen sensorin antamat signaalit.



Kuvio 8. Replikamateriaali, häviömoduuli.

Replikamateriaalin häviötekijä laskee jyrkästi pienillä leikkaustaajuuksilla materiaalin ollessa tunnin vanhaa. Muutos kuitenkin tasoittuu jo toisen tunnin kohdalla. Leikkaustaajuuden kasvaessa kaikissa aikapisteissä häviötekijä tasaantuu noin 0,06:een. 24 ja 48 tunnin kohdalla häviötekijä pysyy lähes vakiona riippumatta leikkaustaajuudesta. (Kuvio 9)



Kuvio 9. Replikamateriaali, häviötekijä.

9 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada kapseloitua WEHI-164 -soluja vaahdotettuun hydrogeeliin ja seurata niiden selviytymistä vähintään kahden viikon ajan. Vertailua varten soluja istutettiin myös vaahdottomaan hydrogeeliin. Materiaalin valmistuksessa ja vaahdotuksessa käytettiin koko työn ajan samoja reagensseja, mutta soolin ja medium-emäs -liuoksen tilavuussuhteita muuteltiin, mikä johti eroihin sekä R-arvoissa että kuiva-ainepitoisuuksissa materiaalien välillä. Soolin valmistus saatiin vakioitua opinnäytetyön aikana. Vaahdotettaessa eroja ilmeni mm. vaahdotusajoissa, sekä materiaalin lopullisessa rakenteessa. Vaahdotusprosessin huomattiin olevan erityisen herkkä muutoksille, kuten lämpötiloille ja ilmankosteudelle.

Eri pehmytkudosten varastomoduuleita verrattaessa voidaan huomata, että kudosteknologiassa on tarvetta hyvinkin erilaisille materiaaleille. Kudoksilla, jotka joutuvat kestäämään kovaa rasitusta, varastomoduuli on selvästi korkeampi kuin vähemmälle rasitukselle joutuvilla kudoksilla. Hydrogeelien mekaaniset ominaisuudet jäävät usein heikoiksi ja varastomoduuli tätä kautta alhaiseksi. (Levental *et al.* 2007) Työssä mitattujen materiaalien reologisten tulosten perusteella materiaalit vastaavat elastisilta ominaisuuksiltaan lähinnä elimistön pehmeitä kudoksia, kuten sydänlihasta tai sisäelimiä. Tämänkaltaisen rakenteen voidaan katsoa siis tukevan työssä käytetyn solulinjan kasvua ja levittäytymistä jäljittelemällä solujen alkuperäistä kasvuympäristöä.

Mitä suurempi materiaalin R-arvo on, sitä vähemmän se sisältää silikaa, joka muodostaa materiaalin tukirangan. Silikapitoisuuden kasvun on todettu nostavan materiaalin elastisia ominaisuuksia (Kylä-Vehka 2014). Tämän nojalla hydrogeelivaahto 5:n (lopullinen R-arvo 111) pitäisi antaa kahta muuta materiaalia pienempi varastomoduulin arvo, mutta materiaali 3:n (lopullinen R-arvo 78) arvo on hydrogeelivaahto 5:n arvoa matalampi. Solujen kiinnittymisen ja lisääntymisen on niin ikään huomattu osaltaan vaikuttavat hydrogeelien rakenteeseen (Lutolf *et al.* 2003). Eroja materiaalien 3,4 ja 5 välillä saattaa siis selittää materi-

aalien ikä, jolloin pitkä inkubointi soluviljelyolosuhteissa, sekä hydrogeelivaahdoilla 3 ja 4 solujen lisääntyminen, voivat vaikuttaa materiaalien reologisiin ominaisuuksiin. Hydrogeelivaahdoilla 3 ja 4 tutkittu vaahdotuserän koon skaalaaminen ylöspäin onnistui solukasvatuksen näkökulmasta, mutta erien reologiset arvot vaihtelivat. Kahden erän välinen ero varastomodulin osalta oli noin yhdeksänkertainen, hydrogeelivaahdo 3:n saadessa n. 30 000 Pa hydrogeelivaahdo 4 matalamman arvon. Häviömodulin osalta ero oli pienempi, noin viisinkertainen, hydrogeelivaahdo 3:n tuottaessa n. 2 000 Pa pienemmän tuloksen. Vaikka hydrogeelivaahdo 3 sai molemmissa mittauksissa hydrogeelivaahdo 4 pienemmät arvot, nousi sen häviötekijä silti liki kaksinkertaiseksi hydrogeelivaahdoon 4 verrattuna. Molemmissa materiaaleissa solut saatiin kuitenkin pysymään elossa ja lisääntymään, kun taas hydrogeelivaahdossa 5, jonka reologiset arvot osuivat lähelle hydrogeelivaahdo 3:n arvoja, solut eivät selvinneet. Myöskään materiaalien häviötekijät eivät riitä selittämään eroja solujen viabiliteetissa hydrogeelivaahdojen 3,4 ja 5 välillä. Kaikkien kolmen materiaalin häviötekijä asettuu välille 0,08-0,150 samoilla mittausparametreilla. Materiaaleissa 3 ja 4, joissa solut saatiin säilymään hengissä, häviötekijä asettuu edellä mainitun asteikon ääripäihin, kun taas materiaalissa 5, jossa solut eivät selvinneet, häviötekijä asettui saman asteikon keskivaiheille. Hydrogeelivaahdon 5 tuloksia viabiliteetin suhteen ei voida kuitenkaan pitää täysin aukottomina, koska muita materiaaleja korkeampi R-arvo saavutettiin lähtökohtaisesti korkeamman R-arvon soolilla (R70), eikä materiaalille valmistettu rinnakkaista versiota. Solujen selviytymiseen materiaalissa on siis saattanut vaikuttaa paitsi materiaalin mekaaniset ominaisuudet ja rakenne myös esimerkiksi soolin valmistusprosessi.

Hydrogeelivaahdo 5 (lopullinen R-arvo 111) oli ainoa työn materiaaleista, jolle tehtiin reologiset mittaukset sekä heti solujen lisäyksen jälkeen, että seurannan lopussa. Tuloksista nähdään, että molemmat moduulit muuttuvat lähes identtisesti ja saavuttavat maksimiarvonsa 172 tunnin kohdalla, jonka jälkeen ne lähtevät laskemaan jyrkästi. Sen sijaan häviötekijä säilyi vakiona. Seurannan aikana solujen viabiliteettia hydrogeelivaahdossa 5 tutkittiin seuraamalla kasvumediumin väriä sekä käsittelemällä materiaalista otettu näyte Alamar Bluella. Koska solujen kiinnittymisen ja levittäytymisen on tutkimuksissa huomattu muutta-

van materiaalin rakennetta (Lutolf *et al.* 2003), eikä hydrogeelivaahdossa 5 todettu olevan eläviä soluja, voidaan kaikkien esiin tulleiden muutosten katsoa johtuvan ainoastaan materiaalissa itsessään tapahtuvista muutoksista.

Kaikissa opinnäytetyön aikana tutkituissa materiaaleissa, joiden lopullinen R-arvo oli n. 80, saatiin solut pysymään hengissä koko seuranta-ajan. Työn aikana huomattiin viabiliteetin määrittämisessä käytetyn reagenssin, Alamar Bluen, vääristävän fluoresenssisignaaleja pitkissä, yli 24 h inkuboinneissa. Alamar Bluen tahatonta reagoitua kasvumediumin kanssa on tutkittu aiemmin käyttämällä DMEM ja Opti-MEM -pohjaisia kasvumediumia. Näissä tutkimuksissa havaittiin Alamar Bluen tuottavan vääriä positiivisia tuloksia pitkissä inkuboinneissa. (Munshi *et al.* 2014) Vaikka opinnäytetyössä käytettiin eri kasvumediumia kuin aiemmissa tutkimuksissa, voidaan tuloksista huomata samanlaista vääristymää. Alamar Bluen tahaton reagointi osoittautui haasteeksi varsinkin kasvatuksen alkuvaiheessa, jolloin soluja oli materiaaleissa määrällisesti vähän, ja ne olivat epätasaisesti jakaantuneet. Jatkossa ylipitkiä inkubointeja pystytettiin mahdollisesti välttämään käyttämällä lähtökohtaisesti suurempia solumääriä ja sekoittamalla solut materiaalin sisään, jolloin jakaantuminen saattaisi olla tasaisempaa. Nyt käytetty lisäystapa, jossa solususpensio pipetoitiin hydrogeelivaahdon pinnalle saattoi johtaa solujen epätasaiseen jakautumiseen materiaalissa.

Solujen viabiliteettia silikapohjaisessa vaahdottomassa hydrogeelissä on tutkittu myös aiemmin. Materiaali huomattiin solujen hengissä pysymistä tukevaksi, mutta solujen metabolinen aktiivisuus jäi alhaiseksi, eikä kiinnittymistä tapahtunut. Syyksi epäiltiin kiinnittymispisteiden vähyyttä, sekä perusrakenteeltaan kokoonpuristuvaa materiaalia, mikä rajoitti solujen levittäytymismahdollisuuksia. (Nieto *et al.* 2009) Opinnäytetyössä soluja istutettiin vaahdotettujen materiaalien lisäksi myös pelkkään hydrogeeliin. Vaikka R-arvoltaan vastaavissa vaahdotetuissa materiaaleissa solut selvisivät pitkiäkin aikoja, geeliin kapseloiduista soluista ei saatu positiivista, elävistä soluista kertovaa signaalia.

Vaikka tulokset osoittavat, että solut säilyvät hengissä tutkituissa materiaaleissa, ei käytetyn näytteenottotavan perusteella pystytä sanomaan, missä osissa

hydrogeelivaahtoa elossa olevat solut sijaittivat. Aiemmissä tutkimuksissa on pystytty kuitenkin todistamaan, että fibroblastit selviävät, lisääntyvät ja levittäytyvät vaahdotetussa hydrogeelissä. Kyseessä oli α -elastiinihydrogeeli, johon oli vaahdotuksessa syötetty hiilidioksidia korkealla paineella (60 bar). Tutkimuksessa todistetaan, että materiaalin huokoskoon kasvattaminen paransi fibroblastien levittäytymistä ja kasvua koko matriisin alueella. (Annabi *et al.* 2009) Vaikka tutkimuksessa käytetyn hydrogeelin valmistustapa poikkeaa opinnäytetyössä käytetyn hydrogeelivaahdon valmistuksesta, voidaan silti johtopäätöksenä todeta, että hydrogeelin vaahdottaminen lisää solujen mahdollisuuksia selviää materiaaliin kapseloinnista, sekä parantaa solujen jakautumista ja levittäytymistä. Toisaalta, opinnäytetyössä saadut tulokset solujen kuolemista vaahdottomassa hydrogeelissä eivät ole luotettavia, koska ne pohjautuvat vain yhdestä soolierästä valmistettuun yhteen hydrogeeliin ilman rinnakkaista näytettä. Jotta tuloksista voitaisiin tehdä pitäviä päätelmiä jatkoa ajatellen, vaatii solujen kasvatus hydrogeelissä lisää tutkimusta.

Opinnäytetyössä valmistettujen materiaalien tarkkaa rakennetta ei pystytty määrittämään tarkoitukseen sopivien välineiden puuttuessa. Verrattaessa työn aikana saatuja tuloksia ja havaintoja kirjallisuuteen, voidaan vaahdotettujen hydrogeelien rakenteen olettaa olevan jatkuva- ja mikrohuokoinen, epäjärjestäytynyt, sekä mekaanisilta ominaisuuksiltaan, huokoskooltaan ja -jakaumaltaan sopiva juuri fibroblastien kasvatukseen. (Melchels *et al.* 2010; Cansizoglu *et al.* 2008; Queheillalt & Wadley 2005) Tarkasteltaessa reologisten mittausten tuloksia, nähdään, miten eri materiaaleista saadut arvot vaihtelevat, vaikka lähtöaineet, sekä valmistusmenetelmät ovat samoja. Tästä voidaan päätellä erityisesti vaahdotettujen materiaalien valmistusprosessin vaativan vielä kehittämistä, jotta lopputuotteista saadaan toistettavasti samanlaisia. Toisaalta erot häviö- ja varastomodulleissa ovat ilmeisesti niin pieniä, etteivät ne vaikuta solujen kiinnittymiseen ja kasvuun.

Akustisen sensorin antamat tulokset korreloivat muista mittauksista saatujen tulosten kanssa. Sensori raportoi voimakkaista painevaihteluista ensimmäisen 30 h ajan, jolloin solut kiinnittyvät, kasvavat, valmistautuvat jakaantumaan ja

lopulta jakaantuvat. Erityisesti G1-vaiheessa ja mitoosissa voimakkaat paineenvaihtelut ovat todennäköisiä solujen koon ja määrän muuttuessa. Koska soluja tutkittiin sensorin kammiossa ilman hiilidioksidilisää, kasvumediumin pH nousi yli kahdeksaan muuttaen mediumin värin punaisesta aniliininpunaiseksi. Kasvuolosuhteiden muuttuminen voimakkaan emäksiseksi aiheutti solujen kuoleman, joka saattoi osaltaan synnyttää havaittuja painevaihteluita kasvatuksen loppuvaiheessa. Kasvumediumin pH mitattiin pH-paperilla (6.0–8.1) kasvatuksen jälkeen. Sekä akustinen sensori, että reologiset mittaukset vahvistavat, että vaahdotettu hydrogeeli kehittyy vielä 6-7 h geelipisteen jälkeen. Muutokset johtuvat geelin kondensoitumisesta, sekä vaahdossa olevien ilmakuplien puhkeamisesta. 7 tunnin jälkeen muutokset vähenevät.

10 JOHTOPÄÄTÖKSET

Solut saatiin säilymään hengissä 39 vuorokauden ajan sooli-geeli -menetelmällä valmistetussa vaahdotetussa silikapohjaisessa hydrogeelissä. 39 vuorokauden kasvatuksen tuloksia tukevat useat vastaavassa materiaalissa tehdyt lyhyemmät seurannat. Solut säilyivät materiaaleissa, joiden lopullinen R-arvo oli n. 80. Tuloksista voidaan päätellä, että työssä käytetyillä materiaaleilla ja valmistusmenetelmillä pystytään luomaan jatkuva- ja mikrohuokoinen materiaali kolmiulotteiseen solukasvatukseen.

Viabiliteetti pystyttiin määrittämään ottamalla materiaaleista koepaloja, altistamalla ne Alamar Bluelle, ja mittaamalla näytteen fluoresenssisignaali monileimalaskimella. Luotettavimmat tulokset saatiin näytteen ensimmäisestä mittauksesta noin vuorokauden inkuboinnilla, pidemmän inkuboinnin aiheuttaessa Alamar Bluen tahatonta reagointia kasvumediumin kanssa.

Akustista sensoria pystytään käyttämään solujen kasvun ja materiaalin kehittymisen tutkintaan. Mittauksissa huomattiin pelkästä materiaalista saatavien signaalien korreloivan aiemman, materiaalin kehittymisestä kertovan reologisen tiedon kanssa. Solukasvatuksesta saadut tulokset puolestaan näyttävät solujen kasvun ja lisääntymisen aiheuttavan riittävää paineenvaihtelua laitteen rekisteröitäväksi.

LÄHTEET

Allcock, H. 2008. Introduction to Materials Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Annabi, N., Mitthieux, S., Boughton, E., Ruys, A., Weiss, A. & Dehghani, F. 2009. Synthesis of porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts *in vitro*. Biomaterials, volume 30, Issue 27.

Balani, K., Verma, V., Agarwal, A. & Narayan, R. 2015. Biosurfaces: A Materials Science and Engineering Perspective. The American Ceramic Society. Wiley.

Breslin, S. & O'Driscoll, L. 2013. Three-dimensional Cell Culture: The Missing Link in Drug Discovery. Drug Discovery Today, volume 18.

Brinker, C. & Scherer G. 1990. Sol-gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. San Diego: Academic Press, Inc.

Bryant, S. & Anseth, K. 2002. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels, Journal of Biomedical Materials Research, volume 59.

Cansizoglu, O., Harrysson, O., Cormier, D., West, H. & Mahale, T. 2008. Properties of Ti-6Al-4V non-stochastic lattice structures fabricated via electron beam melting. Materials Science and Engineering A, 492.

Carletti, E., Motta, A. & 2011. Miqliaresi C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture, Methods in Molecular Biology, volume 695.

Carlsson, J. & Yuhas, J.M. 1984. Liquid-Overlay Culture of Cellular Spheroids, Recent Results in Cancer Research, vol 95. Springer.

Drury, J. & Mooney, D. 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. Biomaterials 24 (2003).

European Collection of Cell Cultures 2015. Fundamental Techniques in Cell Culture, Laboratory Handbook, 2nd Edition.

Encyclopedia Britannica 2015. Fibroblast. Viitattu 18.9.2015
global.britannica.com > science > fibroblast

Encyclopedia Britannica 2015. Lymphoblast. Viitattu 18.9.2015.
global.britannica.com > science > lymphoblast

Foty R. 2011. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids, Journal of Visualized Experiments.

Guoqing, H & Dongqing L. 2007. Three-dimensional modeling of transport of nutrients for multicellular tumor spheroid culture in a microchannel, Biomed Microdevices.

Heino, J. & Vuento, M. 2014. Biokemian ja solubiologian perusteet. 3., uudistettu painos. Helsinki: Sanoma Pro

Ivascu, A. & Kubies M. 2006. Rapid generation of single-tumor spheroids for high throughput cell function and toxicity analysis. Journal of Biomolecular Screening.

Jokinen, M., Györvary, E., Rosenholm J. 1998. Viscoelastic characterization of three different sol-gel derived silica gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*

Jones, J. 2015. Reprint of: Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids. *Acta Biomaterialia*, volume 23.

Jokinen, M., Jalonen, H., Forsback, A., Koskinen, M. 2010. Method for preparing silica compositions, silica compositions and uses thereof. Patentnumero: US 2010/0119500 A1

Kelm J., Timmins, N., Brown, C., Fussenegger, M. & Nielsen, L. 2003. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types, *Biotechnology and Bioengineering*, volume 83.

Khademhosseini, A. & Langer, R. 2007. Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, Volume 28, Issue 34.

Kunze, A., Bertsch, A., Giugliano, M. & Renaud, P. 2009. Microfluidic hydrogel layers with multiple gradients to stimulate and perfuse three-dimensional neuronal cell cultures, *Procedia Chemistry*, volume 1.

Kylä-Vehka, J. 2014. Silikapohjaiset biomateriaalit solukapselointiin. Opinnäytetyö, Turun Ammattikorkeakoulu.

Levental, I., Georges, P. & Janmey, P. 2007. Soft biological materials and their impact on cell function, *Soft Matter*.

Li, Y., Ma, T., Yang, S. & Kniss, D. 2001. Thermal compression and characterization of three-dimensional nonwoven PET matrices as tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 22 (2001)

Life technologies > Subculturing Suspension Cells > Cells Grown in Spinner Flasks. Viitattu 1.8.2015. www.lifetechnologies.com

Lin, R. & Chang, H. 2008. Recent Advances in Three-dimensional Multicellular Spheroid Culture for Biomedical Research. *Biotechnology Journal*.

Lonza > Products and Services > Cell Culture Products > Reagents > Antibiotics and Antimicrobials > Penicillin-Streptomycin. Viitattu 26.7.2015. www.lonza.com

Lutolf, M.P., Lauer-Fields, J.L., Schmoekel, H.G., Metters, A.T., Weber, F.E., Fields, G.B. & Hubbell, J.A. 2003. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *PNAS*, Volume 100, No. 9.

Martin, K R. 2007. The chemistry of silica and its potential health benefits. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*.

Melchels, F., Barradas, A., van Blitterswijk, C., de Boer, J., Feijen, J. & Grijpma, D. 2010. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culture. *Acta Biomaterialia*, 6(2010).

Mezger, T. 2011. *The Rheology Handbook*, 3rd Revised Edition.

Mittatekniikan keskus. 2005. *Metrologia, Kemian metrologian opas. Metrologian neuvottelukunta, Kemian ja mikrobiologian jaosto, Kemian työryhmä, Toimittanut Tapio Ehder. Helsinki*

Mitteregger, R., Vogt, G., Rossmanith, E. & Falkenhagen D. 1999. Rotary cell culture system (RCCS): a new method for cultivating hepatocytes on microcarriers. *The International Journal of Artificial Organs*.

Munshi, S., Twining, R. & Dahl, R. 2014. Alamar Blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, volume 70.

Muoviteollisuus > Muovitieto > Muovit > Komposiitit. Viitattu 26.11.2015. www.muoviteollisuus.fi

National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. 2013. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.

O'Brien F. 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials today* 14(3).

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *European Journal of Biochemistry*, volume 267.

Ong, S., Zhang, C. Toh, Y., Kim, S., Loong Foo, H., Hong Tan, C., van Noort, D., Park, S. & Yu, H. 2008. A gel-free 3D microfluidic cell culture system, *Biomaterials*, volume 29.

Paakinaho, K. & Kellomäki, M. 2011. Kudostekniikan biomateriaalit – Rääätälöidyistä materiaaleista ihmisen varaosiksi. *Fimea, Sic!*

Park, J. & Bronzino J. 2002. *Biomaterials: Principles and Applications*. CRC Press.

Queheillalt, D. & Wadley, H. 2005. Cellular metal lattices with hollow trusses. *Acta Materialia*, 53 (2005).

Raghavan, S., Ward, MR., Rowley, KR., Wold, RM., Takayama, S., Buckanovich, RJ. & Mehta, G. 2015. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. *Gynecologic Oncology*.

Ren, K., He, C., Xiao, C., Li, G. & Chen, X. 2015. Injectable glycopolymer hydrogels as biomimetic scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, volume 51.

Romano, P., Manniello, A., Aresu, O., Armento, M., Cesaro & M., Parodi, B. 2009. Cell Line Data Base: Structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic Acids Research*.

Shi, S.F.E., Guo, Z.G. & Kium W.M. 2015. The recent progress of tribological biomaterials. *Bio-surface and Biotribology*, Volume 1, Issue 2.

Sigma-Aldrich 2015. WEHI 164 Cell Line from mouse. Viitattu 19.7.2015. www.sigmaaldrich.com/Products/Cell Culture/WEHI 164

Solunetti 2015. Fibroblasti (Fibroblastus). Viitattu 16.9.2015. www.solunetti.fi > patologia > fibroblasti

Solunetti 2015. Epiteelit. Viitattu 16.9.2015. www.solunetti.fi > histologia > epiteelit > soluliitokset

Sutherland R.M. & Durand R.E. 1984. Growth and Cellular Characteristics of Multicell Spheroids, *Recent Results in Cancer Research*, vol 95. Springer.

Tibbit, M. & Anseth, K. 2010. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture, *Biotechnology and Bioengineering*, volume 103.

ThermoFisher Scientific 2008. AlamarBlue Cell Viability Reagent Protocol Summary

ThermoFisher Scientific 2015. Mammalian Cell Morphology. Viitattu 18.9.2015.
www.thermofisher.com > Cell Culture Basics > Cell Morphology

Törmälä, P. Aho, A., Anderson, Ö., Heikkilä, J., Keränen, J., Kontinen, Y., Lappalainen, R., Lepojärvi, M., Nevalainen, J., Santavirta, S., Salenius, J., Tarvainen, T., Törmälä, P., Vallittu, P., Viljanen, V., Waris & E., Waris, V. 2003. Yleiskatsaus terveydenhuollon laitteissa ja tarvikkeissa käytettyihin biomateriaaleihin. Lääkelaitoksen julkaisusarja 3/2003.

Valvira 2015. Biomateriaalit. Viitattu 20.8.2015.
www.valvira.fi>terveydenhuolto>terveysteknologia>biomateriaalit

Yan, C., Hao, L. Hussein, A. & Raymont, D. 2012. Evaluations of cellular lattice structures manufactured using selective laser melting. International Journal of Machine Tools & Manufacture, 62(2012).

Zhang, Q., Lu, H., Kawazoe, N., Chen, G. 2014. Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. Acta Biomaterialia, vol. 10, Issue 5.

Valmistettujen soolien reseptit

Sooli					
R-arvo	Tilavuus	V(TEOS)	V(H ₂ O)	V(HCl)	V (EtOH)
	ml	ml	ml	ml	ml
50	100	20,0	80,0	1,0	20,9
70	100	15,0	85,0	1,0	15,7

Käytettyjen liuosten koostumukset

Kasvumedium

500 ml RPMI-1640 (1x), Gibco, alkuperä: Iso-Britannia, luettelonumero 52400

50 ml FBS, Gibco, Etelä-Amerikka, alkuperä: Brasilia, luettelonumero: 10270

5 ml Pen-Strep, Lonza, luettelonumero 17-602E

Medium-emäs -liuos (2:1 v/v)

40 ml RPMI-1640 (1x), Gibco, alkuperä: Iso-Britannia, luettelonumero 52400

4 ml FBS, Gibco, Etelä-Amerikka, alkuperä: Brasilia, luettelonumero: 10270

900 µl NaOH, 1 M, Oy FF-Chemicals Ab

R-arvon laskeminen

Esimerkki R-arvon laskemisesta.

Laskuissa HCl, NaOH, FBS, sekä RPMI ovat huomioitu vetenä.

$$M_{\text{TEOS}} = 208,33 \text{ g/mol}$$

$$\rho_{\text{TEOS}} = 0,933 \text{ g/ml}$$

$$V_{\text{TEOS}} = 20,0 \text{ ml}$$

$$M_{\text{H}_2\text{O}} = 18,02 \text{ g/mol}$$

$$\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1,00 \text{ g/ml}$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = 80,0 \text{ ml}$$

$$m_{\text{TEOS}} = \rho_{\text{TEOS}} \cdot V_{\text{TEOS}} = 0,933 \text{ g/ml} \cdot 20,0 \text{ ml} = 18,66 \text{ g}$$

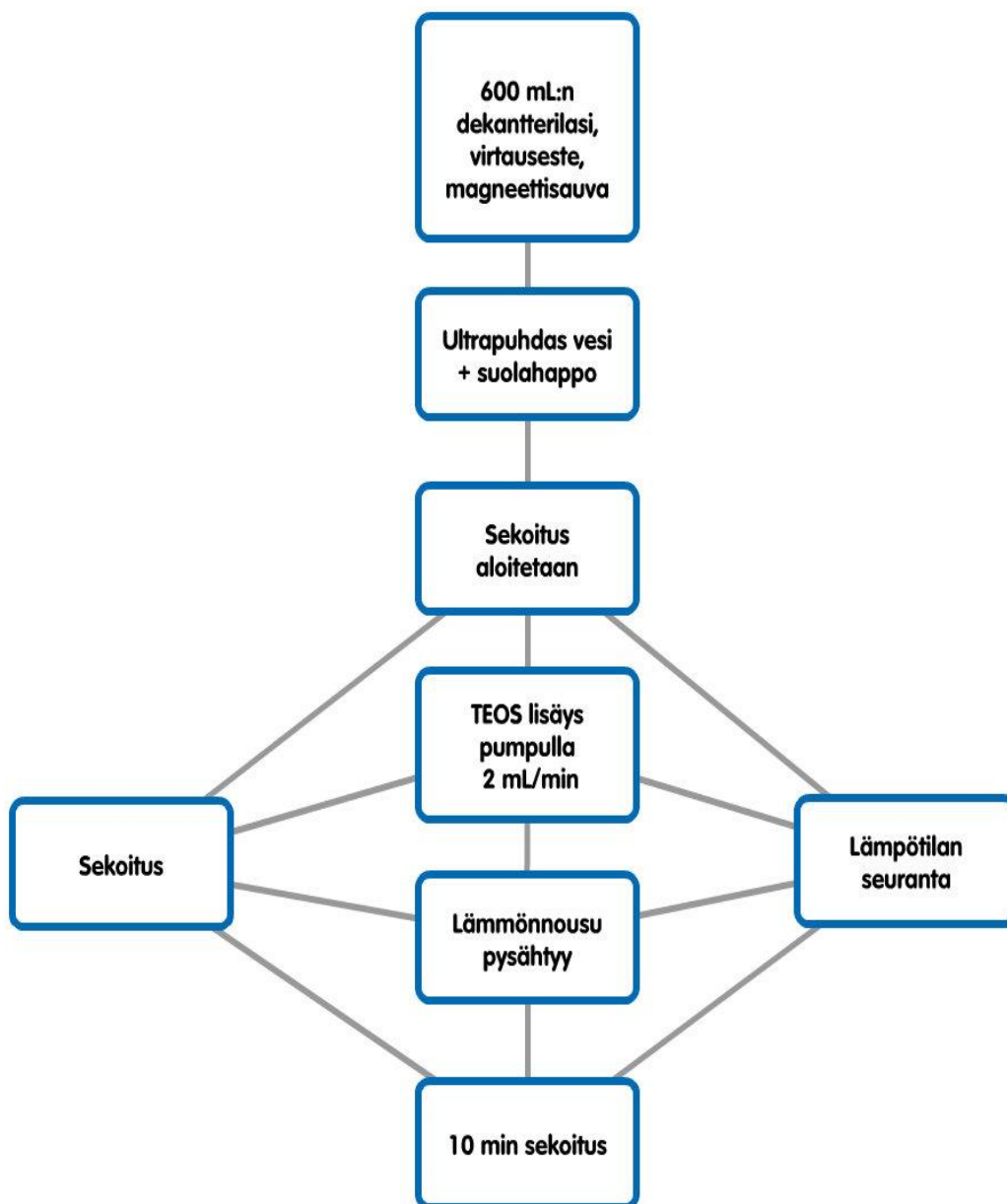
$$m_{\text{H}_2\text{O}} = \rho_{\text{H}_2\text{O}} \cdot V_{\text{H}_2\text{O}} = 1,00 \text{ g/ml} \cdot 80,0 \text{ ml} = 80 \text{ g}$$

$$n_{\text{TEOS}} = \frac{m_{\text{TEOS}}}{M_{\text{TEOS}}} = \frac{18,66 \text{ g}}{208,33 \text{ g/mol}} \approx 0,0896 \text{ mol}$$

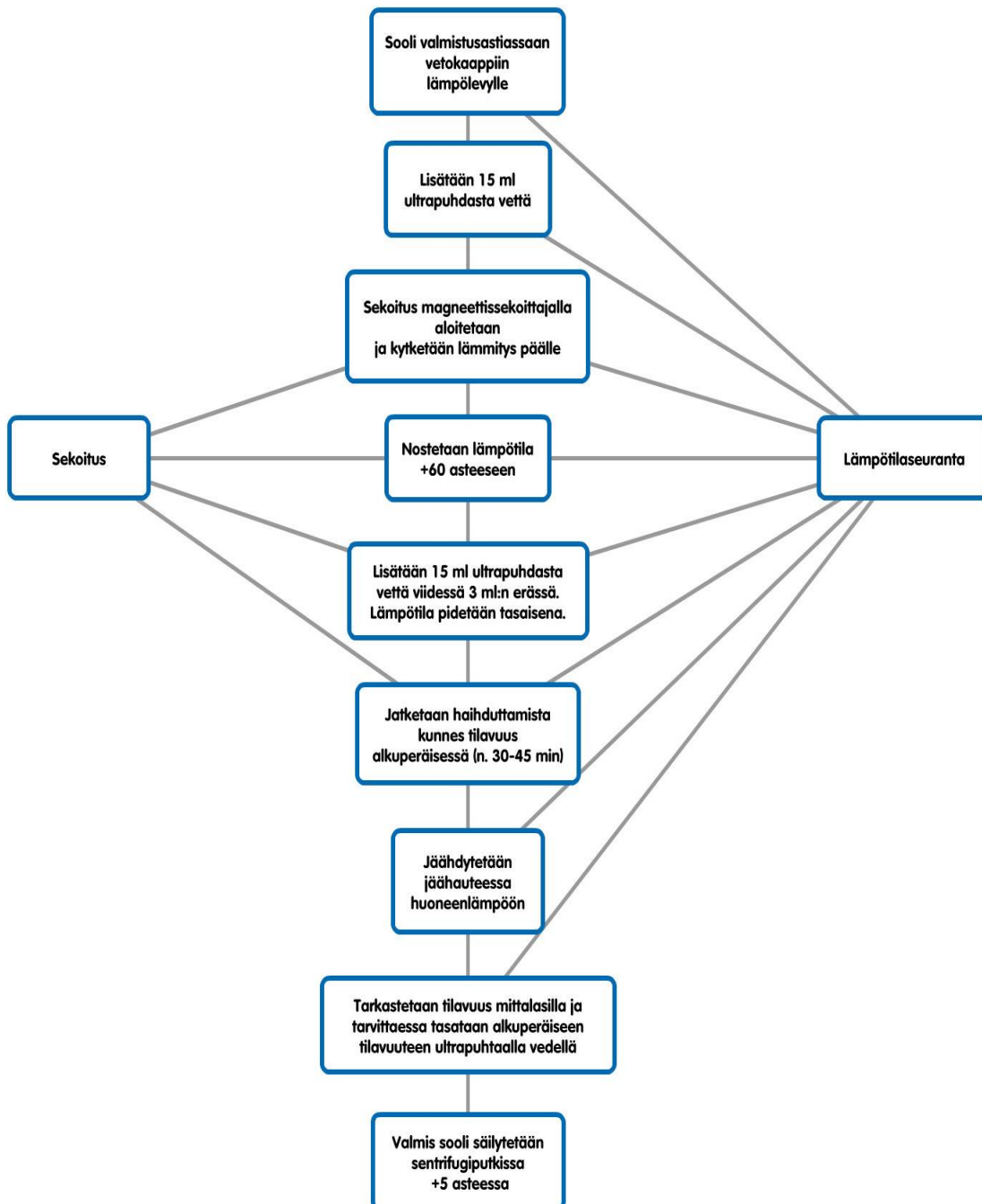
$$n_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{80,0 \text{ g}}{18,02 \text{ g/mol}} \approx 4,44 \text{ mol}$$

$$R = \frac{n_{\text{H}_2\text{O}}}{n_{\text{TEOS}}} = \frac{4,44 \text{ mol}}{0,0896 \text{ mol}} \approx 50$$

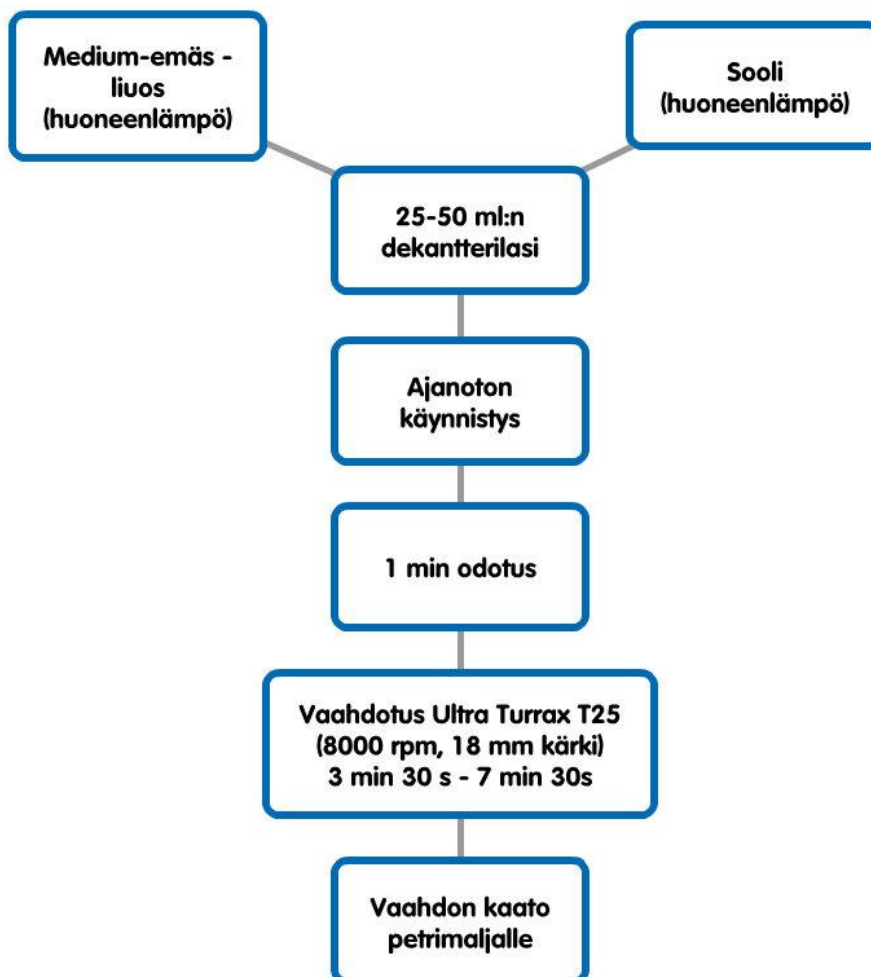
Prosessikaavio, soolin valmistus



Prosessikaavio, etanolin erotus



Prosessikaavio, vaahdotus



Prosessikaavio, solujen lisäys

