

Opinnäytetyö AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

NBIOAS14

2017

Jan Lindström

MDR –PROTOKOLLAN OPTIMOINTI

– Sukusolujen eristys ja keräys hiiren kiveksistä

Jan Lindström

MDR -PROTOKOLLAN OPTIMOINTI

- Sukusolujen eristys hiirten kiveksistä

Miesten hedelmättömyys on länsimaissa kasvava ongelma. Uusimpien tutkimusten mukaan sperman laatu on ollut pitkään laskusuunnassa ja edelleen huonontunut. Spermatogeneesiin ja sen geeninsäätelyn parempi ymmärtäminen auttaa selvittämään hedelmättömyyden syitä.

Spermatogeneesi on kivesten siementiehytputkissa tapahtuva erittäin monimutkainen kolmivaiheinen prosessi, jossa sukusolut mitoottisen sekä meioottisen jakautumisen myötä erilaistuvat kantasolusta siittiöksi. Luotettavaa menetelmää sukusolujen erilaistamiseksi maljalla ei toistaiseksi ole kehitetty, joten sukusoluissa tapahtuvien biologisten mekanismien tutkimiseksi tarvitaan kudoksesta eristettyjä eläviä soluja sekä menetelmiä eri solupopulaatioiden erottelemiseksi.

MDR –protokolla on Turun yliopiston tutkimusryhmän kehittämä menetelmä hiiren sukusolujen tiettyjen kehitysvaiheiden erottelemiseksi sekä keräämiseksi kiveksestä. Pyrkimyksenä oli kehittää edullinen ja yksinkertainen menetelmä tutkijoille, jotka työskentelevät spermatogeneesiin parissa. Menetelmä suunniteltiin niin, että protokollan voi suorittaa ilman investointeja useasti kalliisiin laitteistoihin. Tämän opinnäytetyön tarkoitus on keskittyä kyseisen MDR-menetelmän optimointiin.

ASIASANAT:

Spermatogeneesi, kives, soluerottelu, BSA-gradientti, villityypin hiiri

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme of Biomedical Laboratory Science

December 2017 | 41

Jan Lindström

OPTIMISATION OF MDR -PROTOCOL

- isolation of male germ cells from mouse testes

Male infertility is steadily increasing in western societies. In many recent studies quality and count of sperm has been proven to fall and is still declining. To address the problem of infertility, a better understanding of spermatogenesis and processes related to gene regulation is needed.

Spermatogenesis is very complex process that occurs in the seminiferous tubules of the testes. The process occurs in three phases, where germ cells proliferate through mitotic and meiotic divisions into haploid spermatozoa. At the moment there is no reliable cell culture method for male germ cell differentiation *in vitro*. Hence studying the process of spermatogenesis, living cells freshly isolated from testes as well as methods to separate the different cell populations are needed.

MDR –protocol is a method to isolate and collect germ cells in different phases of maturation from mouse testes. This method is developed by the Turku University's research team. The aim was to develop a simple and inexpensive method for scientists working in the field of spermatogenesis. The main idea was that no investment for expensive apparatus is needed. Only centrifuge and basic lab supplies are needed. The purpose of this thesis is to further optimize the MDR-protocol

KEYWORDS:

Spermatogenesis, Testes, Cell isolation method, BSA gradient, Wild type mouse.

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA	9
2.1 Miesten hedelmättömyys	9
2.2 Kiveksen rakenne	10
2.3 Siementiehytputket (Semineferous tubules)	11
2.4 Spermatogeneesi	13
2.5 Eristysmenetelmät	15
2.5.1 Elutriaatio	15
2.5.2 FACS	16
2.5.3 STA-PUT	16
2.5.4 MDR-menetelmä	17
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	19
4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	20
4.1 Opinnäytetyön toteutus	20
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	20
4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	21
4.4 Tutkimuksen kokeellinen osuus	22
4.4.1 MDR-protokolla	22
4.4.2 Optimointi	24
4.4.3 Gradientin valmistus	25
5 TULOKSET	27
5.1 Siementiehytputkien vapaa sedimentaatio vaihtoehtona sentrifugoinnille	27
5.1.1 Sentrifugoinnin ja sedimentaation vertailu solutyypeittäin	30
5.2 Pidentyvien spermatidien saannon lisäämiseksi tehty sentrifugitesti	31
5.3 Solujen siivilöinti	34
6 POHDINNAT	36
6.1 Tulosten pohdinta	36
6.2 Yleinen pohdinta	37

KUVAT

Kuva 1. Kiveksen rakenne	11
Kuva 2. Osasuurenos siementiehytputken poikkileikkauksesta	12
Kuva 3. 10 ml kärjellä rakennettu BSA-gradientti	26
Kuva 4. Protokollan mukainen sentrifugointi, 10X	28
Kuva 5. Protokollan mukainen sentrifugointi, 40X	28
Kuva 6. Sentrifugointi korvattu 5 minuutin sedimentaatiolla, 10X	29
Kuva 7. Sentrifugointi korvattu 5 minuutin sedimentaatiolla. 40X	29
Kuva 8. Kollagenaasin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 500xG 10X	32
Kuva 9. Kollagenaasin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 500xG 40X	32
Kuva 10. Trypsiinin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 600xG 10X	33
Kuva 11. Trypsiinin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 600xG 40X	33

TAULUKOT

Taulukko 1. Protokollan mukainen sentrifugointi kollagenaasidigestion jälkeen	30
Taulukko 2. Ensimmäinen sentrifugointi korvattu 5 minuutin sedimentaatiolla	30
Taulukko 3. Protokollan mukainen siivilöinti tehty	35
Taulukko 4. MDR tehty ilman siivilöintiä	35

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

BSA	Bovine Serum Albumin, naudan seerumista eristetty albumini
DAPI	4'6 -diamidi-2-fenyyli-indoli, sinisenä havaittava emissio, fluoresenssimikroskopiassa käytetty väriaine
Mitoosi	Perimän jakautuminen, jossa kromosomien määrä ei muutu
Meioosi	Sukusolujen tuotannossa tapahtuva perimän jakautuminen, kromosomien määrä puolittuu ja sisältö sekoittuu
Kreb's buffer	Soluviljelyaine. Suololiuos, joka ylläpitää pH:ta sekä osmoottista painetta
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfaattipuskuroitu natriumkloridiliuos
PFA	Paraformaldehydi, fiksatiivi
Spermatogeneesi	Siementiehytputkissa tapahtuva sukusolujen kehitys, joka johtaa siittiöön
Spermiogeneesi	Spermatogeeniesin ns. kolmas vaihe, jossa siittiö saa muodon ja ominaisuudet
WT	Wild-type, villityypin hiirikanta

1 JOHDANTO

Miesten sperman laatu niin konsentraation kuin määränkin mukaan on viimeisen 50-vuoden aikana laskenut selvästi. Miesten hedelmättömyys on lisääntynyt hälyttävästi niin Suomessa kuin muualla maailmassa. Useasti syynä on sperman laadun tai määrän lasku. (Toppari & Huhtaniemi 1999; Vieira 2013.) Maailman terveysjärjestö (WHO) on huomionnut sperman laadun heikkenemisen omassa siemennesteanalyysin ohjeistuksessaan laskemalla julkaisemiaan referenssiarvoja. (Vieira 2013).

Jotta spermatogeneesiä sekä geeninsäätelyä voidaan ymmärtää, tarvitaan tutkimukseen eri kehitysvaiheen eläviä sukusoluja. Kivesten rakenteellisesta sekä hormonaalisesta vuorovaikutuksesta johtuen sukusolujen erilaistaminen maljalla laboratorioolosuhteissa on erittäin haastavaa. Spermatogeneesi kiveksissä on monimutkainen kehitysprosessi, jossa tapahtuu mitoottisia ja meioottisia jakautumisia tarkasti säädellyllä tavalla. Solujen kehitysvaiheesta riippuen, sukusolut eroavat toisistaan koon ja massan mukaan. Erilaiset sukusolujen eristysmenetelmät pyrkivät näiden eri kehitysvaiheiden mahdollisimman puhtaaseen erotteluun. Sukusolujen eristämiseen ja keräämiseen on kehitetyistä menetelmistä yleisimpiä ovat FACS (virtaus-sytometri), elutriaatio sekä STA-PUT (Bryant 2013). Eri eristysmenetelmät tuottavat myös eri määriä sekä puhtauksia eri solutyypeistä, sekä vaativat eri määriä aloitusmateriaalia. (Bryant 2013; Dores ym. 2012.)

Sukusolujen keräämiseen on siis kehitetty jo joitakin eri menetelmiä, mutta niiden haittapuolena on usein vaadittava laitteisto. Kallit investoinnit voivat täten nousta esteeksi pienille tutkimusryhmille, etenkin jos tarve sukusolujen eristykselle on satunnainen. MDR -protokolla on Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen tutkimusryhmän kehittämä menetelmä hiiren sukusolujen keräämiseksi. Tutkimusryhmän pyrkimyksenä oli kehittää edullinen ja yksinkertainen menetelmä tutkijoille, jotka työskentelevät spermatogeneesin parissa. Tarkoituksena oli erityisesti kehittää menetelmä, jonka käyttämiseen tarvitaan vain laboratoriosta jo löytyviä välineitä, kuten falcon-putkia ja pipettejä, eikä tarpeen olisi siis investoida kallisiin laitteistoihin.

MDR-protokolla toimii erityisen hyvin pyöreiden haploidien spermatidien keräämiseen, mutta toisaalta elongoituvien spermatidien eristyksessä on edelleen ongelmia. Tämän opinnäytetyön aiheena on optimoida tätä menetelmää, painottaen juuri elongoituvien

spermatidien saantia. Tavoitteena on myös selvittää, voiko protokollan pienillä muutoksilla menetelmää muuten tehostaa.

2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Miesten hedelmättömyys

Lapsettomuutta esiintyy noin joka viidennellä pariskunnalla. Syy hedelmättömyyteen löytyy kokonaan tai osittain miehestä noin puolella pariskunnista (Duodecim, 2000). Miesten hedelmättömyydestä ja siemennesteen laadusta on tullut mielenkiinnon kohde viime vuosien aikana ja syystäkin. Vuosikymmenten aikana siemennesteen laatu on heikentynyt huomattavasti: Levine et al. 2017 meta-analyysistä käy ilmi, että länsimaisten miesten siemennesteen laatu on heikentynyt 52.4% vuodesta 1973 vuoteen 2011 eikä asiaan ole näyttänyt tulevan muutosta viime vuosien aikana. Siemennesteen laadun heikkenemisestä on tullut globaali huoli kansanterveyden näkökulmasta sekä merkittävä taloudellinen ja sosiaalinen taakka. Siittiösolujen määrä siemennesteessä on yhteydessä lisääntymiskykyyn ja tärkeä osa miesten hedelmättömyyden tutkimuksissa. Siittiösolujen määrän heikentyminen on todettu ennustavan korkeampaa sairastuvuutta sekä kuolleisuutta. (Jorgensen 2012; Levine 2017.)

Hedelmättömyyden syyt

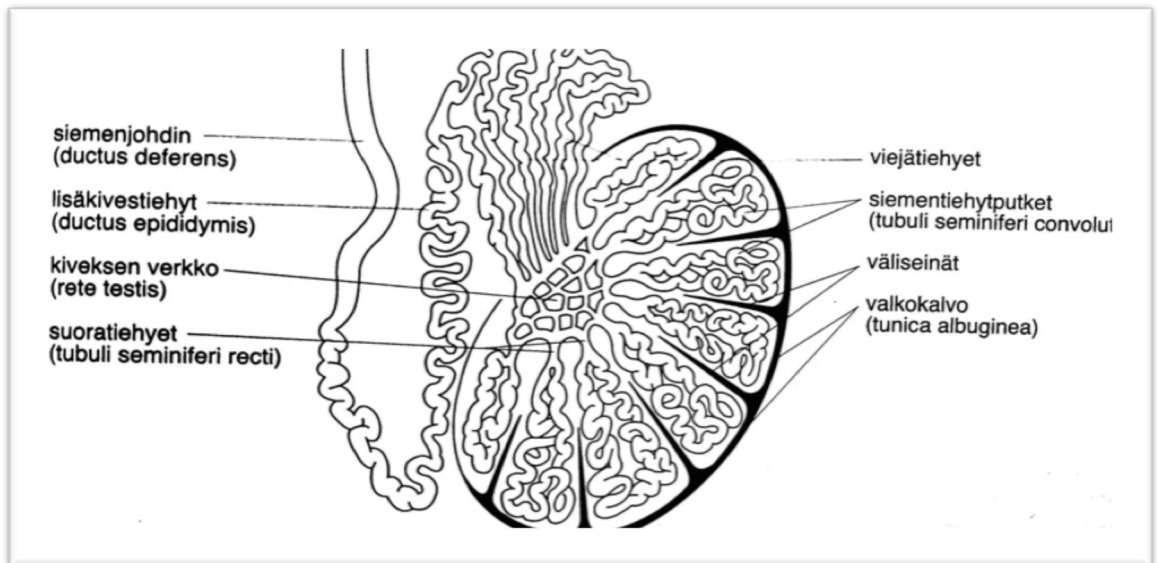
Siemennesteen laatuun vaikuttavat monet tekijät ja hedelmättömyyden syyt voidaan jakaa pääasiassa kahteen osaan: Geneettisiin ja ulkoisiin tekijöihin. Koskimies, (2000) toteaa, että vaikeissa spermahäiriöissä lähes neljäsosalta miehistä löytyy geneettinen syy hedelmättömyyteen. Koskimies (2000) ja Levine (2017) ovat listanneet syitä miesten hedelmättömyyteen sekä siemennesteen laadun heikkenemiseen, joita ovat muun muassa: Ympäristötekijät, torjunta-aineet, lääkeaineet, kuumuus, elämäntavat, tupakointi, fyysinen ja henkinen stressi, lihavuus, akuutit ja krooniset sairaudet, esimerkiksi piilokiveksisyys, kiveskohjut, lisäkivesten ja siemenjohtimien tukkeutuminen ja kivestulehdukset.

Tutkimukset ja hoidot

Hedelmättömyyden tutkimuksissa lähdetään liikkeelle sperma-analyysistä, kliinisten tutkimusten lisäksi käytetään kuvantamismenetelmiä, sekä tarvittaessa otetaan biopsia-näytteitä. Miesten hedelmättömyyshoitoina käytetään mm. lääkehoitoa, esimerkiksi hypogonadotrooppisessa hypogonadismissa on hormonihoidolla saatu hyviä tuloksia (Koskimies, 2000). Vaikeissa tapauksissa hedelmättömyyttä voidaan hoitaa injisoimalla siittiöitä suoraan munasoluun, josta on tullut yleinen menetelmä hedelmöityshoitolaitoksissa.

2.2 Kiveksen rakenne

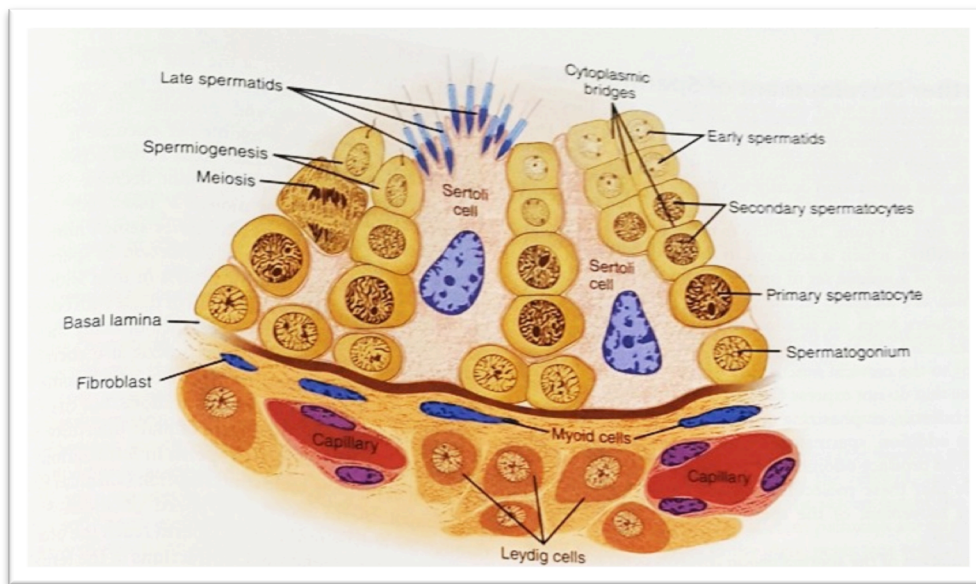
Kiveksiä ympäröi paksu sidekudoksen muodostama valkokalvo (tunica albuginea) ja sidekudoskotelo (tunica vaginalis). Valkokalvosta lähtevät väliseinät jakavat kiveksen kivesliuskoihin (septum), joiden välissä sijaitsevat siementiehytputket. Jokaisessa lohossa on noin 1 – 4 siementiehytputkea. Noin 80% kiveksen rakenteesta muodostuu siementiehytputkista. Siementiehytputket muodostavat lenkin, jotka johtavat suoratiehyen (tubulus rectus) kautta kiveksen verkkoon (rete testis). Tästä viejätiehyet (efferent ducts) johtavat lisäkiveksen (epididymis) puolelle. Pääosin kives jakautuu kahteen osaan: siementiehytputkiin sekä välikudokseen (kuva 1). Välikudos muodostuu löyhästä sidekudoksesta, Leydigin soluista, hermoista sekä veri- ja imusuonista. Välikudoksen tärkeimmät solut ovat Leydigin solut, jotka tuottavat androgeeneja ja vastaavat testosteronin synteesistä. (Hervonen & Virtanen 2013; Ross & Pawlina 2011; Toppari & Huhtaniemi 1999.)



Kuva 1. Kiveksen rakenne. (Hervonen & Virtanen 2013. Duodecim s.33)

2.3 Siementiehytputket (Seminiferous tubules)

Siementiehytputken pituus on noin 50 cm ja läpimitta on noin 0,15 – 0,25 mm. Putken sisäpuoli on siementiehytepiteeliä. Tyvikalvon sisäpuolelle (Basal lamina) kerrostunut siemenepiteeli muodostuu kahdesta solukannasta: somaattisista Sertolin soluista sekä sukusoluista (kuva 2). Siementiehytputken ulkopuolta ympäröi myeloidisolukerros (peritubular contractile cells). Myeloidisolut aikaansaavat siementiehytputkien aaltomaisen supistelun täten mahdollistaen nesteiden sekä siittiöiden liikkumisen. (Hervonen & Virtanen 2013; Ross & Pawlina 2011.)



Kuva 2. Osasuurennos siementiehytputken poikkileikkauksesta. Kuvassa eri kehitysvaiheissa olevien solujen lisäksi huomioitu somaattiset Leydigin ja Sertolin solut, solujen väliset sytoplasmasillat (cytoplasmic bridges), kypsyvien spermatidien spermiogeneesi, sekä meioosi. (Barret ym. 2016. s.419)

Sertolin solu on suuri tukisolu, joka ympäröi kypsyviä sukusoluja ja mahdollistaa vuorovaikutuksen näiden välillä. Solu on muodoltaan pylväsmäinen ja ulottuu siementiehyen tyviosasta (basal lamina) luumeniin (kuva 2). Solu jakaa siementiehyen kahteen osaan (tyvi- ja adluminaalinen osa) tiukoilla soluliitoksilla muodostaen veri-kivesesteen (blood-testis barrier, BTB). Veri-kiveseste suojaa kehittyviä sukusoluja estäen imusolujen sekä suurten molekyylien pääsyn adluminaaliseen osaan. Adluminaalinen osa muodostaa eräänlaisen mikroympäristön, joka eroaa suuresti normaali soluvälineestä ioni-, elektrolyytti- sekä proteiinikonsentraatioiltaan. Tärkein veri-kivesesteen tehtävä on suojata kehittyviä haploideja sukusoluja immuunijärjestelmältä. Kehittyvien spermatoosyytien pitää läpäistä tiukat soluliitokset, joten Sertolin solu muodostaa uuden tiukan soluliitoksen kehittyvän sukusolun alapuolelle ja purkaa soluliitoksen yläpuolelta päästäen näin kehittyvän sukusolun adluminaaliseen tilaan. Sertolin solut myös välittävät kehittyville sukusoluille kasvutekijöitä ja hormoneita, joista tärkein on spermatogeneesille välttämätön testosteroni. (Barret ym. 2016; Cheng & Mruk 2015; Ross & Pawlina 2011; Toppari & Huhtaniemi 1999.)

2.4 Spermatogeneesi

Spermatogeneesi on siementiehytputkissa tapahtuva erittäin monimutkainen prosessi, joka valmistaa miljoonia kromosomistoltaan haploideja siittiöitä päivittäin. Spermatogeneesiä säätelee kaksi aivolisäkkeen erittämää hormonia; follikkelia stimuloiva hormoni (FSH) sekä luteinisoiva hormoni (LH). Aivolisäkkeessä näiden hormonien tuotantoa stimuloi gonadotropiinia vapauttava hormoni (GnRH). FSH vaikuttaa suoraan Sertolin solujen toimintaa, kun taas LH säätelee kivesten Leydigin solujen androgeenin tuotantoa. (Cheng ym. 2016.; Smith ym 2015.)

Spermatogeneesi alkaa murrosiässä hormonien vaikutuksesta ja jatkuu läpi elämän. Spermatogeneesissä sukusolut kehittyvät vaiheittain, samalla siirtyen kohti siementiehytputken lumenia. Spermatogeneesin kesto ihmisellä on noin 70 päivää ja hiirellä noin 35 päivää. Kohtalaisen suuri osa tästä ajasta (hiirellä noin 14 päivää) kuluu haploidien solujen morfologiseen erilaistumiseen, spermioogeneesiin. (Kotaja 2013; Toppari & Huhtaniemi 1999.) Spermatogeneesi voidaan jakaa kolmeen päävaiheeseen:

1 Mitoottinen solujen jakautuminen

Siementiehytputken tyvikalvon yhteydessä ovat spermatogoniot (A ja B), joista osa on spermatogeneesin kantasoluja (SSC). Kantasolujen uusiutumiskyky takaa siittiöiden tuotannon jatkuvuuden. Spermatogoniot käyvät läpi vakiomäärän mitoottisia jakoja. Viimeisen jaon seurauksena B-spermatogoniot erilaistuvat primaarisiksi spermatosyyteiksi ja siirtyvät meioottiseen vaiheeseen. (Hervonen & Virtanen 2013; Toppari & Huhtaniemi 1999.)

2 Meioottinen solujen jakautuminen

Meioosi tapahtuu siementiehytputken adluminaalisessa osassa, jonka aikana tapahtuu haploidien spermatidien muodostus (4 kpl) tetraploidisesta primaarisesta spermatosyytistä. Meioottisen jakautumisen tuloksena muodostuu haploidisen kromosomiston (1n) omaavia sukusoluja. (Knuutila 2002.) Meioosin aikana joko äidiltä tai isältä perityt vas-

tinkromosomit jakautuvat satunnaisesti kahteen eri soluun. Vastinkromosomien välillä vaihdetaan myös DNA-materiaalia. Näiden tapahtumien vuoksi jokaiseen siittiöön tulee erilainen yhdistelmä isovanhempien geeneistä (Toppari & Huhtaniemi 1999).

Primaarit spermatosyytit läpikäyvät ensimmäisen meioottisen jakautumisen (vähennysjakautuminen). Vähennysjakautumisen profaasi kestää runsaat kolme viikkoa, ja se jakautuu useaan eri vaiheeseen:

- a. Preleptoteeni
- b. Leptoteeni (Kromosomit alkavat kondensoitua)
- c. Tsygototeeni (Homologiset kromosomit pariutuvat)
- d. Pakyteeni (Homologisten kromosomien välille muodostuu erityinen rakenne [synaptonemal complex], joka mahdollistaa geenejä sekoittavan tekijäinvaihdon [crossing over])
- e. Diploteeni (Synaptonemal complex purkautuu)

Vähennysjakautumisen seurauksena syntyy sekundaarispermatosyyttejä, joilla on haploidi genomi, mutta edelleen kaksi kromatidia. (Knuutila 2002; Tapana 2010.)

Toinen meioottinen jakautuminen (tasausjako) on nopea, jonka aikana kumpikin sekundaarispermatosyytti tuottaa kaksi pyöreää spermatidia (round spermatids, RS). Syntyy siis haploidi sukusolu, jossa on yksinkertainen kromosomisto. (Kotaja 2013.)

3. Spermiogeneesi

Spermiogeneesissä haploidi spermatidi (RS) ei enää jakaannu, vaan käy läpi dramaattisen muodonmuutoksen valmiiksi siittiöksi. Tämän muodonmuutoksen aikana monet soluorganellit ja proteiinit kierrätetään tai hylätään, jotta saadaan tilaa muuttuvalle rakenteelle. Nämäkin solumuutokset tapahtuvat vielä Sertolin solun poimuissa. Vasta kypsymisen loppuvaiheessa kehittyvien solujen väliset sytoplasmasillat, eli solusitkos (synsytium) purkautuvat. (Hervonen & Virtanen 2013.; Sutovsky & Manandhar 2006.)

Kypsyessään pyöreä spermatidi RS muuttuu soikeammaksi, ja spermatidille muodostuu hedelmöityksen kannalta kriittisiä rakenteita kuten häntä ja akrosomi, joka on munasolun peitteen pilkkomiseen tarvittavia entsyymejä sisältävä rakenne siittiön kärjessä. Tuma tiivistyy huomattavasti, sekä suurin osa sytoplasmosta hylätään, jonka Serto-

lin solu fagosytoi. Spermatoideja, joissa tapahtuu tuman pakkaantumista sekä kromatiinin uudelleenmuokkaantumista kutsutaan pidentyviksi spermatoideiksi (elongating spermatid, ES). Spermatoideja aletaan kutsua siittiöiksi niiden irrottua siemenepiteelistä siementiehytputkien luumeniin. Lopullinen siittiöiden kypsyminen tapahtuu vasta lisäki-veksen puolella. (Kotaja 2013; Ross & Pawlina 2011.)

2.5 Eristysmenetelmät

Spermatogeneesissä tapahtuvan säätelyn sekä solujen eri kehitysasteiden tutkimiseksi pitäisi eri kiveksen sisältämät solutyypit pystyä luotettavasti erottelemaan. Kives on kuitenkin erittäin monimutkainen elin, jossa esiintyy yli 30 eri solutyyppeä sisältäen so-maattisia soluja sekä useita eri kehitysvaiheen sukusoluja. Tämä heterogeenisyys vai-keuttaa huomattavasti spermatogeneesin tutkimista sekä puhtaiden solufraktioiden keräämistä. (Rodriguez-Casuriaga ym. 2014; Mclean Crogan ym. 1981.)

2.5.1 Elutriaatio

Sentrifuuginen elutriaatio erottelee solut hyödyntäen sentrifugaalisen voiman sekä eri-koisroottorin läpi pumpatun nesteen aiheuttaman vastavoiman tasapainoa, joka erotte-lee solut koon, muodon ja tiheyden mukaan. Erottelu tapahtuu erikoisroottorin elutriaa-tiokammiossa, johon solut kulkeutuvat puskuriliuoksen mukana. (Barchi ym. 2009.)

Elutriaation etuina muihin soluerottelu-metodeihin on menetelmän nopeus, hyvä saanto eri soluista sekä menetelmän tapahtuminen soluviljelymediumissa / puskurissa. Koska elutriaatiomenetelmä ei aiheuta fysiologisia muutoksia tai häiriötä solutoimintaan, voi-daan tällä menetelmällä kerättyjä soluja käyttää useisiin jatkotutkimuksiin. (Marracchi-no, ym. 1996.)

Spermatogeenisen tutkimuksen kannalta menetelmä käyttää kohtalaisen pieniä solu-määriä, lähtömateriaalina kuitenkin yleensä usempi hiiri. Protokolla on optimoitu käyt-tämällä kolmea hiirtä (Barchi ym. 2009.) Menetelmää voidaan myös hyödyntää tutki-muksissa, jossa haluttuja genotyyppisiä on muuten vaikea kerätä. Elutriaatiomenetel-män huonona puolena on, että vaikka menetelmä erottelee solut ”ryhmiin”, ei se pysty

erottelemaan soluja, joilla on samankaltainen sedimentaatio-ominaisuus, jolloin solut sekoittuvat. (Chang & Lee-Chang 2011.)

2.5.2 FACS

FACS (fluorescence-activated cell sorting) on yksi virtausytometrian erityismenetelmä. FACS lajittelee heterogeenisen solumassan kahteen tai useampaan lajitteluastiaan, solu kerrallaan, riippuen jokaisen solun fluoresenssiominaisuudesta ja valosironnasta. FACS menetelmä antaa nopean, objektiivisen ja määrällisen taltioinnin yksittäisten solujen fluoresenssi-signaaleista sekä fyysisen erittelyn tutkittavista soluista. FACS –menetelmä on hyödyllinen kaikenlaisten solupopulaatioiden erittelyyn, solunäytteiden laadunvarmistus voidaan tehdä virtausytometrialla ennen varsinaista FACS-lajittelua. FACS –menetelmällä saadaan erittäin puhtaita solupopulaatioita. Sen haittapuolena on vaativa, kallis erityislaitteisto sekä laitteiston käyttöön koulutettava henkilökunta, jolloin tutkimuksesta tulee kallista. Solut on myös värjättävä fluoresenssivärillä, jolloin solut eivät ole enää natiiviolotilassa. Vaikka laitteisto on kallista on sen käyttö suhteellisen edullista. Suurten solumäärien erittely on kuitenkin aikaavievää. (Chang 2014.)

2.5.3 STA-PUT

STA-PUT menetelmän ja –laitteiston ovat kehittäneet Ontarion syöpäinstituutin tohtorit R.G Miller ja R.A Phillips (ProScience, 2017). STA-PUT metodia hyödynnetään monissa eri solututkimuksissa, esim. menetelmä mahdollistaa spermatogeenisten solupopulaatioiden erittelyn koon ja tiheyden mukaan homogenisoidusta solumassasta. STA-PUT-menetelmä perustuu solujen sedimentaatioon liukuvassa BSA-gradientissa (continuous gradient) gravitaation mukaan. Sedimentaationopeus määräytyy pääsääntöisesti solujen koon mukaan, suurempien solujen vajotessa nopeammin kuin pienemmät solut.

Vaikka STA-PUT menetelmä ei tuota täysin puhtaita solutyypin fraktioita, sen etuna on kuitenkin huomattavasti korkeampi solujen kokonaismäärä jokaisessa fraktiossa.

STA-PUT voidaan myös hyödyntää yhdistämällä erottelumenetelmiä, jolloin kokonais-solut voidaan vielä erotella FACSin avulla. Menetelmä edellyttää erikoislasiastiat ja vaatii viileän tilan tai kylmähuoneen. Haittapuolena on, että menetelmä vaatii kerralla useita hiiriä (noin 12 hiirtä). STA-PUT:in etuna on, että sen käyttö on kohtalaisen edullista. Menetelmän ero, verrattuna useimpiin FACS protokolliin on, että se ei vaadi DNA- tai muunlaisia värjäyksiä. (Bryant ym. 2013.)

2.5.4 MDR-menetelmä

MDR-menetelmä on hiiren kivesten eri solutyypin erittelemiseksi sekä keräämiseksi Turun yliopiston tutkimusryhmän kehittämä menetelmä. Tavoitteena on ollut kehittää helppo sekä edullinen menetelmä, joka ei vaadi kalliita laitteistoja, joita moni muu eristysmenetelmä käyttää. MDR-menetelmän etuna on myös pieni vaadittava lähtömateriaali, joten eristys voidaan toteuttaa käyttäen vain yhtä hiirtä. Menetelmä perustuu STA-PUT menetelmään, eli solumassan sedimentaatioon eri pitoisuuksista muodostuvan BSA- (Bovine Serum Albumin) gradientin läpi. STA-PUT menetelmällä BSA-gradientti on liukuva (tiheys kasvaa portaattomasti, Continuous gradient) ja MDR-menetelmä käyttää portaittain kasvavia BSA- pitoisuuksia (Discontinuous gradient) Erona STA-PUT-menetelmään on lisäksi STA-PUT:in vaatima erikoislaitteisto sekä erotteluun vaadittava suuri solumäärä (henkilökohtainen tiedonanto, Kotaja 2017).

MDR-menetelmässä eri kypsyysvaiheen solut jäävät koon ja painon mukaan eri BSA -pitoisuuksiin. Kives dekapseloidaan, ja solut vapautetaan kudoksesta entsyymaattisesti (kollagenaasi, trypsiini). Tämän jälkeen solususpensio pipetoidaan eri tiheyksistä koostuvan BSA -gradientin päälle. Eri solutyypit sedimentoituvat yleensä tiettyihin fraktioihin koon, painon ja tiheyden mukaan. Pohjalle (6% BSA) vajoavat yleensä suurimmat solut sekä solut jotka ovat tarttuneet toisiinsa. Ylemmissä gradienteissa on yleensä spertmatosyytit, sekä sen yläpuolella pyöreät spermatidit. Ylimmässä gradientissa (1% BSA) on yleensä pidentyvät spermatidit sekä suuria ja mahdollisesti rykelmiä toisiinsa tarttuneita siittiöitä/spermaa. Koska MDR -eristys sisältää paljon käsin tehtäviä vaiheita, jokainen MDR- eristyskerta voi poiketa hieman tuloksissa toisistaan. Lähtökohtana kuitenkin on, että pidentyvät spermatidit löytyvät fraktioista 1 ja 2, pyöreät spermatidit fraktioista 4 eteenpäin ja spertmatosyytit fraktioista 8 eteenpäin.

Sedimentaatioajan jälkeen solut kerätään fraktioittain talteen, analysoidaan sekä pakastetaan tarvittaessa jatkotutkimuksia varten. Solut analysoidaan tekemällä DAPI-värjätty näyte kustakin fraktiosta, joka kuvataan fluoresenssimikroskoopilla (lähteenä suullinen ohjeistus, Lehtiniemi 2017.)

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida MDR –protokollaa muuttamalla eri työvaiheen osia.

Tutkimuksen optimoinnilla yritettiin selvittää menetetäänkö eri työvaiheissa joitain tiettyjä solutyyppejä, lähinnä pidentyviä spermatideja (ES), sekä voitaisiinko solujen menettämistä ehkäistä. Optimoinnilla pyrittiin myös selvittämään, voisiko johonkin työvaiheeseen kuluva aika lyhentää solujen saantoa heikentämättä sekä selvittää työvaiheiden muutosten merkitystä solufraktioiden puhtauteen.

Opinnäytetyön tutkimustehtävät ovat:

- Optimoida MDR –protokollaa kokeilemalla solujen digestiovaiheessa eri inkubaatioaikoja, sentrifugointiaikoja ja -nopeuksia, sekä vaihtelemalla soluerotteluvaiheessa sedimentaatioon perustuvan tiheysgradientin pitoisuuksia sekä lukumääriä.
- Selvittää voidaanko pidentyvien spermatidien saantia parantaa.
- Ottaa kaikista fraktioista näytteet lasille sekä suorittaa näiden kiinnitys, värjäys, kuvaaminen ja solupopulaatioiden laskeminen.

4 TUTKIMUKSEN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Tämän opinnäytetyön käytännön osuus suoritettiin tammikuun 2017 ja maaliskuun 2017 välisenä aikana Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella. Opinnäytetyön aihe saatiin Turun Yliopiston tutkimusryhmältä tammikuussa 2017. Tutkimusaineistona käytetään Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksen koe-eläinhiiriä. Aineiston koko määräytyi tutkimuksen etenemisen nopeudesta riippuen. Reagenssit ja työssä tarvittavat välineet saatiin käyttöön Turun Yliopistolta. Lopullinen opinnäytetyö julkaistaan joulukuussa 2017. Työtä varten on tehty toimeksiantosopimus Turun Yliopiston kanssa. Opinnäytetyön tarkoituksena on optimoida tutkimusryhmän kehittämää MDR –menetelmää eri sukusolujen keräämiseksi hiirten kiveksistä

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiiviselle tutkimukselle on keskeistä johtopäätökset aikaisemmista tutkimuksista sekä havaintoaineiston soveltuminen numeeriseen mittaamiseen. Kvantitatiiviseen yhdistetään myös usein empiirinen tutkimusote. Tilastollinen tarkastelu vaatii kvantitatiivisen menetelmän. (Hirsjärvi ym. 2007; Anttila 2014.) Tutkimuksen kvantitatiiviseen puoleen liittyä, että kuvaamisen jälkeen solut lasketaan, data analysoidaan sekä esitetään numeerisesti asteikkojen avulla. Tämä opinnäytetyö on metodologiselta suuntaukseltaan kvantitatiivinen tutkimus.

Aineistonkeruumenetelmän tutkimusstrategiana on kokeellinen tutkimus. Kokeellinen tutkimusmenetelmä valitaan, kun pyritään systemaattiseen havaintojen tekemiseen sekä tutkitaan ilmiöiden kausaliteettia. (Hirsjärvi ym. 2007.) Kokeellinen empiirinen aineistonkeruu valittiin, koska menetelmän vaiheita muunnetaan harkitusti sekä testataan hypoteesin vaikutusta.

4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu huomioida muiden tutkijoiden työ ja saavutukset sekä aikaisempien tutkimustulosten esittäminen asianmukaisella tavalla plagiointia välttäen. Lainaukset on aina osoitettava asianmukaisin merkinnöin. (Hirsjärvi ym. 2007.)

Tässä tutkimuksessa aineistona käytettiin eläimiä. Tutkimuseettinen tarkastelu sekä lainsäädäntö tulee ottaa huomioon myös eläinten osalta. Hiiret preparoi ja lopetti yhdessä tutkijan kanssa koe-eläinkurssin käynyt opinnäytetyön ohjaaja Turun yliopiston Koe-eläinkeskuksen tiloissa. Käytettäviä hiiriä ei koe-eläinlainsäädännön perusteella lasketa koe-eläimiksi, koska hiirillä ei suoriteta minkäänlaisia eläinkokeita eivätkä tässä tutkimuksessa käytettävät hiiret ole muuntogeenisiä. (Laki koe-eläintoiminnasta 2006.)

Tämä opinnäytetyö toteutettiin noudattaen hyvää tieteellistä toimintatapaa sekä noudattaen tarkkuutta, rehellisyyttä ja huolellisuutta. Havainnot esitettiin niin, että tulokset eivät vääristy tai johda harhaan. Tässä opinnäytetyössä ei kerätty potilas- tai henkilötietoja. Tutkimuksen tulosten raportointi on keskeinen osa tutkimusprosessia, ja se on myös tutkijan keskeinen velvollisuus (Kankkunen & Vehviläinen-Julkunen 2013). Opinnäytetyön tekijä käytti eettisesti oikeita tiedonhakumenetelmiä sekä viittaukset lähteisiin esitettiin asianmukaisesti ja huolella (Hirsjärvi ym. 2007; Vilkkä 2005.)

Tutkimuksen sidonnaisuus rahoitukseen tai muihin tutkimukseen suorittamiseen vaikuttaviin tekijöihin tulee raportoida asianmukaisesti. (Hirsjärvi ym. 2007.) Tämä tutkimus ei ole saanut mitään rahoitusta eikä muita sidonnaisuuksia ole.

4.4 Tutkimuksen kokeellinen osuus

Tämän opinnäytetyön protokollan optimointia varten kerättiin kivekset neljäلتätoista villityypin hiireltä. Näistä neljä kivistä käytettiin pidentyvien spermatidien saannin lisäämiseksi sentrifugin nopeuden optimointitestiin ja loput MDR-eristyskertoihin.

4.4.1 MDR-protokolla

Eristyksen nopeuttamiseksi protokollassa tarvittavat gradienttipuskurit (BSA) punnittiin edellisenä päivänä ja säilytettiin kylmässä (+4C). Eristyspäivänä valmistettiin ennen preparointia 1x Kreb'sin puskuri ja sitä asetettiin 34⁰C inkubaattoriin 100 ml/hiiri. Preparoinnissa hiiriltä kerättiin talteen kivekset ja ne asetettiin PBS -liuokseen. Preparoinnissa käytettiin huolellisuutta, jotta lisäkives leikataan tarkasti pois ja näin vältetään lisäkiveksestä siittiöiden/sperman valuminen kiveksen kalvon ulkopuolelle. Koska protokollaan käytetään eläviä soluja, hiiren lopetusajan jälkeen pyrittiin nopeuteen protokollan aloittamiseksi. Sukusolujen eristys pääsi alkamaan yleensä noin 30 minuutin sisään hiirten lopetusajasta.

Siementiehytputkien vapauttamiseksi kives dekapuloitiin, jossa kiveksiä suojaava kalvo (tunica albuginea) poistetaan. Siementiehyet asetettiin petrimaljalle Kreb's puskuriin. Siementiehytputkien rakennetta dissektoitiin mekaanisesti leikkaamalla saksilla tubuksia ristiin 10 x entsymaattisen digestoinnin tehostamiseksi. Siementiehytmassaa inkuboitiin 34⁰C noin 10 minuuttia kollagenaasi 1:n kanssa.

Inkuboinnin aikana aloitettiin kylmähuoneessa BSA-gradientin rakentaminen. Gradientti tehtiin 50 ml falcon-putkeen, johon pipetoitiin eri BSA-pitoisuudet. Alussa mukana oli kuusi eri faasia pitoisuuksilla 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, mutta 5% BSA-faasia ei todettu hyödylliseksi. Protokollan nopeuttamiseksi 5% faasi päätettiin jättää kahden MRD -kerran jälkeen pois gradienteista.

Inkuboinnin jälkeen siementiehytputket sentrifugoitiin huoneenlämmössä 500xG 5 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja solut resuspenoitiin 25 ml 1X Kreb'sn puskuriin lopun kollagenaasin pesemiseksi pois. Tämän jälkeen sentrifugointi toistettiin.

Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kaadettiin pois, kudospelletin päälle lisättiin 15 mg/25 ml trypsiiniä sekä 10 µl DNAasia (5µg/µl) ja inkuboitiin 34°C 10 minuuttia. Tämän jälkeen solumassan koostumusta tarkasteltiin visuaalisesti, lisättiin 10 µl DNAasia (5µg/µl) ja inkuboitiin edelleen 10-15 minuuttia, jonka jälkeen kudoksesta vapautetut solut sentrifugointiin pohjaan 5 minuuttia, +4°C ja 500xG. Tämän jälkeen solut siivilöitiin 100 µm verkkosiivilillä, tarkoituksena saada siementiehytputken jäänteet jäämään filteriin. Soluille toistettiin 2X pesu Kreb'sillä trypsiinin pois pesemiseksi.

Supernatantti kaadettiin pois ja lisättiin n. 3 ml 0,5% BSA:ta, sekä pipetoitiin solususpensiota ylös ja alas huolellisesti sekoittaen. Solususpensio kaadettiin vielä 100 µm verkkosiivilän läpi, jonka jälkeen solususpensio pipetoitiin erittäin varovasti rakennetun BSA-gradientin pinnalle. Solujen annettiin laskeutua 1 tunti 30 minuuttia. Tämän jälkeen, faaseja alettiin kerätä eppendorf -putkiin 1 ml kerrallaan. Jokaisen putken välissä pipetin kärki huuhdottiin Kreb'sin puskurissa solupopulaatioiden sekoittumisen välttämiseksi.

Eppendorf -putket sentrifugoitiin kylmähuoneessa 1000G ja 5 minuuttia. Tämän jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja pestiin lisäämällä noin 1000 µl Kreb'sin puskuria. Putket sentrifugoitiin uudelleen, jonka jälkeen putkiin jätettiin noin 100 µl puskuria, johon solunappi resuspenoitiin. Jokaisesta fraktiosta otettiin näytteet lasille (10 µl kiinnitysainetta ja 2 µl näytettä) ja näytteiden annettiin kuivua yön yli. Mikäli eristyskerta oli muuten teknisesti onnistunut, fraktiot sentrifugoitiin, loppu medium poistettiin, ja näytteet jäädytettiin nestemäisellä typellä ja pakastettiin -80°C pakkaseen.

Seuraavana päivänä lasit peitettiin ja värjättiin. Kaikki fraktiot mikroskoipoitiin fluoressenssimikroskoopilla sekä kuvattiin siihen liitetyllä kameralla. Jokaisesta fraktioista otettiin kuvat 40X optiikalla solujen laskemiseksi, sekä kuva 10X optiikalla näytteen onnistuvuudesta kertovan yleisnäkymän vuoksi. Solujen värjäyksessä käytettiin Vectashield with DAPI 1200 (Vector laboratories) – peitelasien kiinnitysainetta, joka värjää tumassa olevan DNA:n sinisenä näkyvänä emission. Tässä tutkimuksessa fraktioista laskettiin pidentyvät spermatidit (ES), pyöreät spermatidit (RS), sekä spermatoosyytit (SC). Muut solut ryhmitettiin samaan kategoriaan laskemisen sekä esittämisen yksinkertaistamiseksi. Solut laskettiin pääsääntöisesti fraktioista 1 – 20. Jo fraktiosta noin 16 eteenpäin fraktiot muodostuvat epäspesifeiksi. Syynä tähän oli toisiinsa kiinnittyneet solut, esimerkiksi pyöreät spermatidi-tripletit sekä muut soluklusterit. Loppupään frakti-

ot olivat myös kuvaamisen kannalta haastavampia vaikeutuneen tarkentamisen myötä. Fraktiot 20. eteenpäin ei tuota tarpeellista informaatiota tähän opinnäytetyöhön

4.4.2 Optimointi

Optimoinnissa kokeiltiin seuraavia asioita tulosten parantamiseksi:

- tubulusten vapaa sedimentaatio kollagenaasidigestion jälkeen vaihtoehtona sentrifugoinnille
- sentrifugoinnin optimaalinen kierrosnopeus
- solususpension siivilöinti verrattuna yhden siivilöinnin (suodatuksen) poisjättämiseen

Solujen saantoa haluttiin verrata kollagenaasidigestion jälkeen sedimentaatiolla. Tarkoituksena oli, että tubulusten ulkopuoliset väli-tilan solut poistetaan lopullisesta solususpensiosta. Tässä kollagenaasidigestion kestolla oli suuri merkitys optimointiin. MDR-eristys tehtiin niin, että kollagenaasikäsittelyn jälkeinen sentrifugointi korvattiin sedimentaatiolla, jossa solujen (tubulusten) annettiin laskeutua vapaasti pohjaan ja supernatantti kaadettiin pois. Kyseisestä supernatantista otettiin näyte, jota verrattiin kuvaamalla sentrifugoinnin jälkeiseen supernatanttiin. Sedimentaatioaika oli viisi minuuttia, vaikka visuaalisesti kaikki solut olivat laskeutuneet noin kahden minuutin kohdalla. MDR-eristys jatkettiin muuten normaalisti.

Pidentyvien spermatidien saantia haluttiin parantaa ja yritettiin selvittää, missä vaiheessa soluja mahdollisesti menetetään. Vastausta lähdettiin hakemaan sentrifugoinnista ja siitä, olisiko mahdollista, että kaikki solut eivät laskeudu pohjaan asti 500xG:n sentrifugoinnilla. Tätä varten kehitettiin testi, jossa hiiren sukusolut alkukäsittelään protokollan mukaisella tavalla, mutta sentrifugoinnin jälkeen supernatantti otetaan talteen ja sentrifugoidaan aina nostoen 100xG nopeutta. Kuvaamalla sentrifugaation jälkeisen pelletin saimme tietoa siitä, kuinka suuri sentrifugaationopeus tarvitaan pidentyvien spermatidien laskeutumiseen.

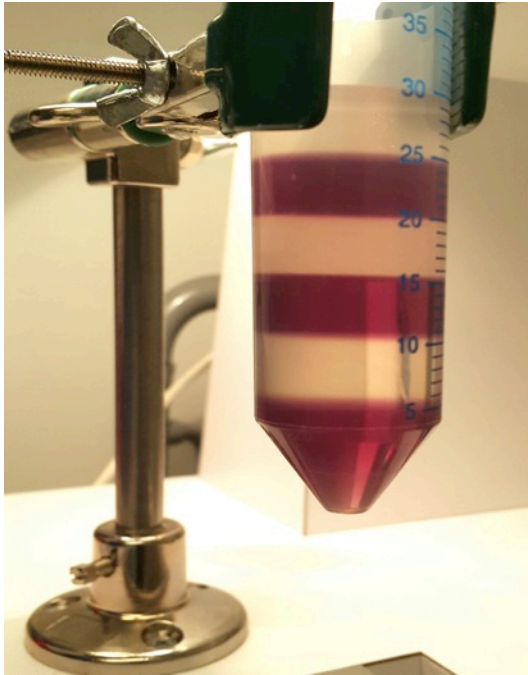
Testi muodostui seuraavasti:

Solujen kollageenaasidigestion jälkeinen sentrifugointi 5 minuuttia 500xG, josta pelletti normaalin protokollan mukaiseen jatkokäsittelyyn aina trypsiinin jälkeiseen sentrifugointiin saakka. Talteen otetun 500xG supernatantin sentrifugointi 600xG. Tästä jälleen pelletin talteenotto sekä pesu, jonka jälkeen pelletti laitettiin jälle odottamaan näytteen lasille laittoa. Sama toistettiin 700X-, 800X- ja 900XG:n nopeuksilla. Sama testi toistettiin myös solujen trypsiinikäsittelyn jälkeen, missä sentrifugin lämpötilaksi vaihdettiin protokollan mukainen +4⁰C.

Yhtenä vaihtoehtona pidentyvien spermatidien menetykseen saattoi olla solususpension suodatus 100 µm nylonverkkosiivilän läpi. Verkkosiivilän tarkoitus olisi päästää läpi yksittäiset solut ja suodattaa siementiehyiden pilkkoutumattomia osia. MDR -kerralla vertailtiin solujen saantia sekä filtterillä että ilman. Ideana oli, että pidentyvät spermatidit jäisivät pidentyneen muotonsa vuoksi kiinni siivilöintiin eivätkä näin päätyisi lopulliseen solususpensioon. Juuri ennen BSA -gradientien päälle tapahtuvaa solususpension pipetointia, solususpensio kaadettiin protokollassa 100 µm nylonverkkosiivilän läpi. Tässä optimoinnissa tämä siivilöinti jätettiin tekemättä.

4.4.3 Gradientin valmistus

BSA -gradientin muodostus tapahtuu pipetoimalla BSA -liuos 50 ml falcon putkeen suurimmasta pitoisuudesta (BSA 6%) pienimpään (BSA 1%) 5 ml per faasi (kuva 3). Sekä gradientin muodostuksessa sekä solujen keräyksessä faaseista tärkeintä on hidas liike faasien sekoittumisen riskin vuoksi. Kerrosten pipetoinnissa käytettiin ensin 1 ml pipettiä, jonka kärkiä oli muokattu leikkaamalla suuntaavuuden vähentämiseksi. Pipetin kärkiä muokattiin eri kohdista ja gradientin muodostamista verrattiin eri muotoisilla kärjillä.



Kuva 3. 10 ml kärjellä rakennettu BSA-gradientti. Gradientit 6%, 4% ja 2% on värjätty paremman erottelun selventämiseksi. Gradientin terävyys ilmenee vain suoraan kerroksen tasalta katsottuna, kuvassa tarkkana pitoisuuksien 4% ja 3% raja.

Koska gradientin muodostus 1 ml pipetillä oli hidasta, sekä faasien sekoittumisen riski oli suurempi, ratkaisua lähdettiin hakemaan eri kokoisista manuaalisista sekä sähköisistä pipeteistä. Parhaimmaksi vaihtoehdoksi koettiin Pipette Boy –sähköinen pipetti 10 ml kärjellä. Tämä nopeutti työskentelyä tarpeeksi, jotta BSA- gradientti pystyttiin rakentamaan trypsiinin inkubaation sekä sentrifugoinnin aikana.

5 TULOKSET

Tässä opinnäytetyössä oli tarkoituksena optimoida MDR-protokollaa nopeuttamalla sitä sekä parantaa pidentyvien spermadien (ES) saantoa solufraktioissa.

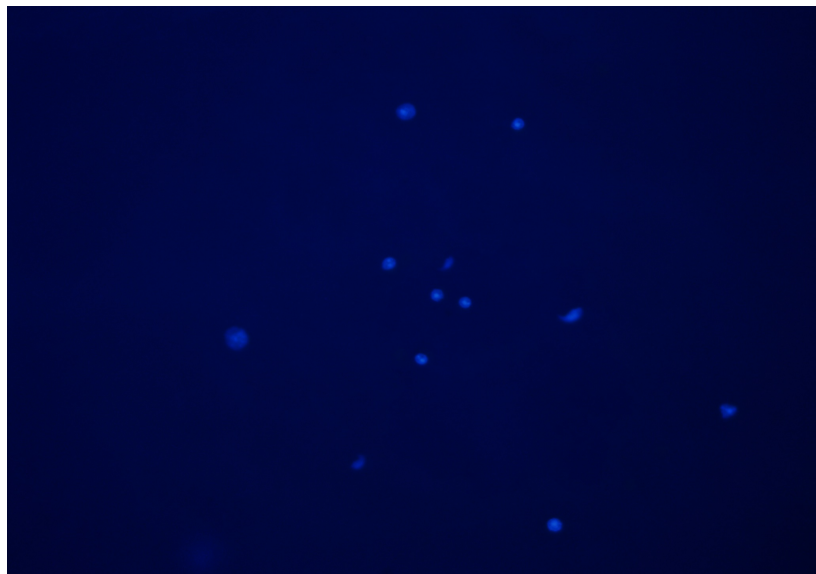
5.1 Siementiehytputkien vapaa sedimentaatio vaihtoehtona sentrifugoinnille

Optimoinnin tarkoituksena oli tutkia mahdollisuutta korvata protokollan kollagenaasidigestion jälkeinen sentrifugointi (5 minuuttia, 500xG) solujen vapaalla sedimentaatiolla (5 minuuttia). Kollagenaasidigestion kestolla oli suuri merkitys tämän vaiheen optimointiin. Solujen vapaa sedimentaatio lisäsi solujen menetystä supernatanttiin. Sedimentaatiossa menetettiin solut, jotka kollagenaasidigestiossa olivat vapautuneet supernatanttiin. Tuloksista voidaan todeta, että kollagenaasikäsittely oli liian pitkä, jolloin siementiehytputkien digestoitua sukusolut vapautuivat solususpensioon liian varhain. Yksittäiset solut sedimentoituvat paljon hitaammin, jolloin sedimentaatioaika (5 minuuttia) ei riittänyt solujen saamiseksi falcon-putken pohjaan ja solut menetettiin supernatantin mukana poiskaadossa. Sentrifugointi tuotti paljon paremman solumäärän pellettiin kaikkien solutyypin osalta. Tulokset mitattiin supernatantista protokollan samasta työvaiheesta.

Kuvissa 4. ja 5. näkyy solumäärä kollageenaasikäsittelyn jälkeisen 5 minuutin sentrifugoinnin jälkeen. Soluja menetettiin supernatantiin vähän.

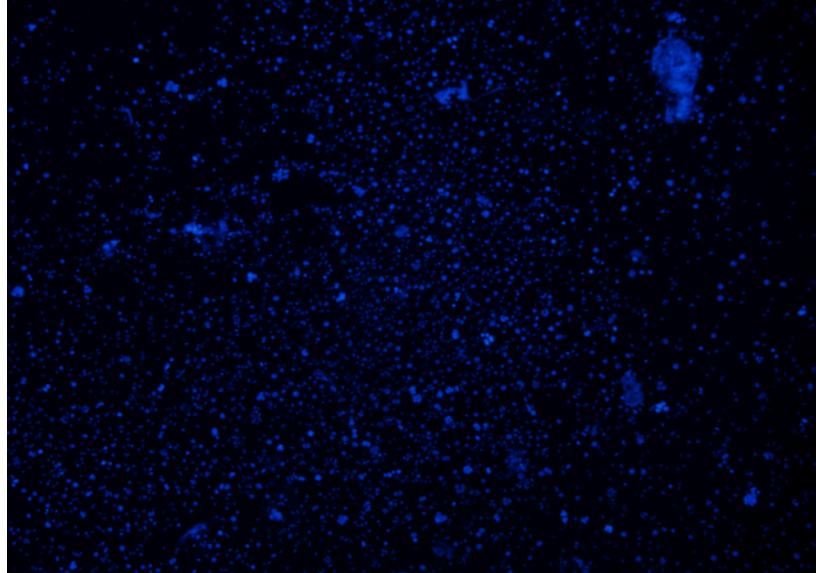


Kuva 4. Objektiivi 10X (ov3). Protokollan mukainen sentrifugointi. Näyte otettu kollageenaasin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantista. Supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia 500xG, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

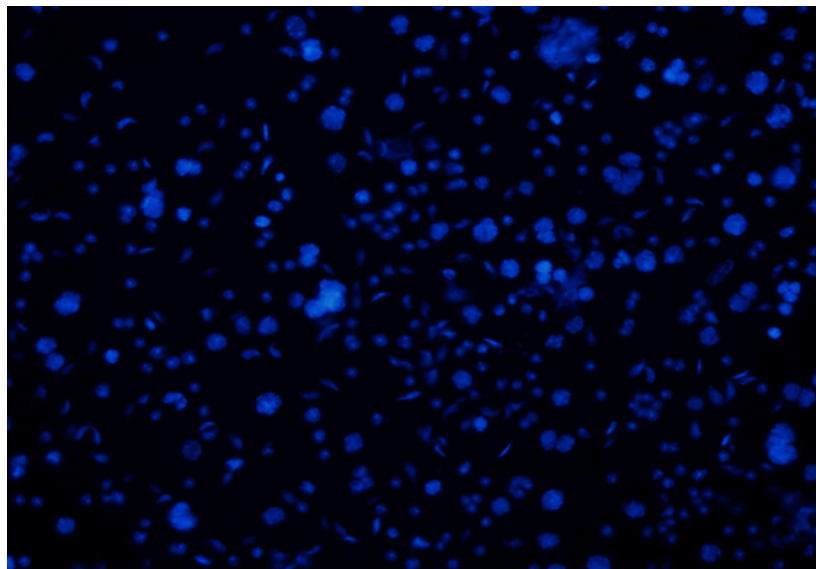


Kuva 5. Objektiivi 40X (3b). Protokollan mukainen sentrifugointi. Näyte otettu kollageenaasin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantista. Supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia 500xG, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

Sedimentaation kuvissa 6. ja 7. näkyy selkeästi suuri solumäärä supernatantissa. Pois kaadetun supernatantin mukana on selkeästi menetetty paljon kollageenaasidigestiossa vapautuneita soluja.



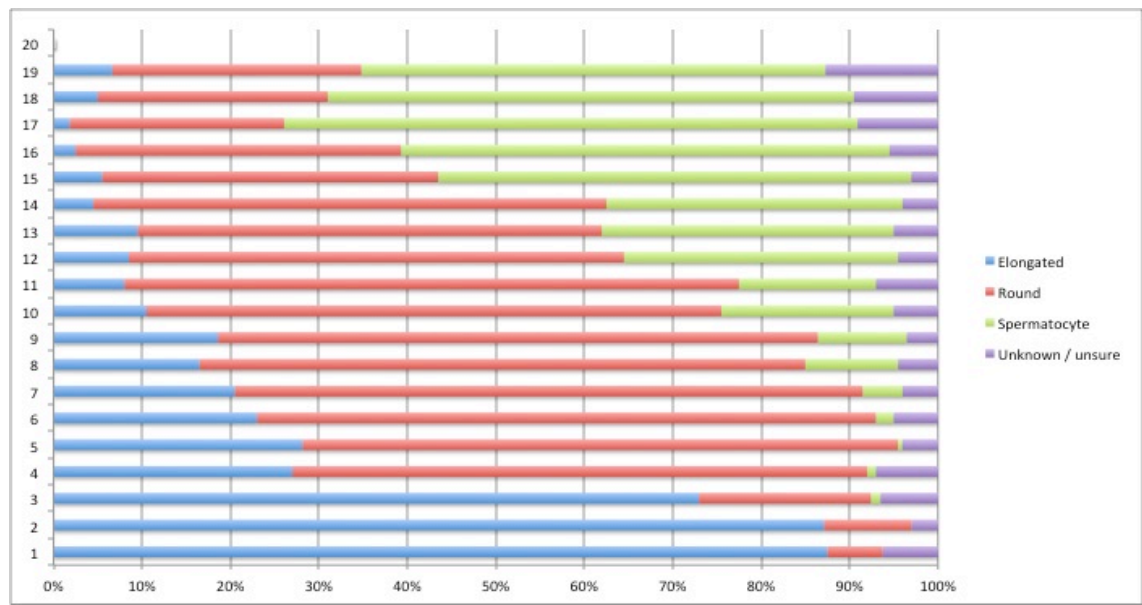
Kuva 6. Objektiivi 10X (ov2). Sentrifugointi korvattu 5 minuutin sedimentaatiolla. Näyte otettu sedimentaation jälkeen supernatantista. Sedimentaation jälkeen supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin 5 minuuttia 500xG, jonka jälkeen näyte otettiin pelletistä.



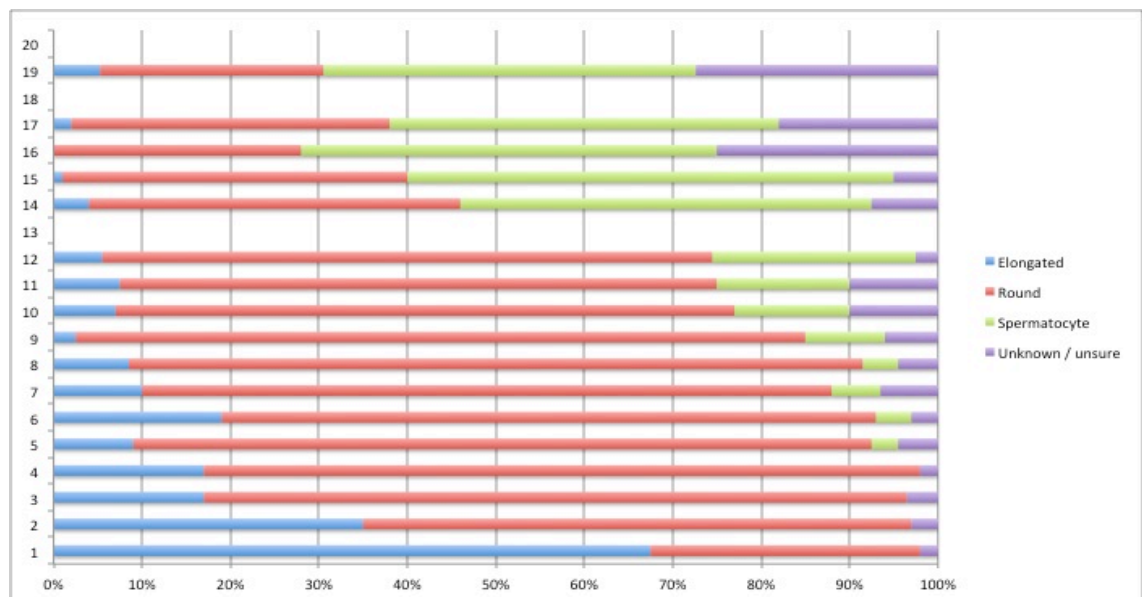
Kuva 7. Objektiivi 40X (ov2a). Sentrifugointi korvattu 5 minuutin sedimentaatiolla. Näyte otettu sedimentaation jälkeen supernatantista. Sedimentaation jälkeen supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin 5 minuuttia 500xG, jonka jälkeen näyte otettiin pelletistä.

5.1.1 Sentrifugoinnin ja sedimentaation vertailu solutyypeittäin

Taulukoissa 1 ja 2 solujen saanti solutyypeittäin. Pidentyvien spermatisidien saanti oli huomattavasti heikompi sedimentaatiassa (fraktiot 1 ja 2). Kaikkia solutyyppiä sedimentaatiassa oli vähemmän, jonka vuoksi soluja per fraktio laskettu 100 kpl.



Taulukko 1. Protokollan mukainen sentrifugointi kollageenaasidigestion jälkeen. Laskettu solumäärä n=200 per fraktio. (poikkeuksena fraktiossa 1 n= 57 ja 2 n=101)



Taulukko 2. Ensimmäinen sentrifugointi korvattu 5 minuutin sedimentaatiolla. Laskettu solumäärä n=100 per fraktio.

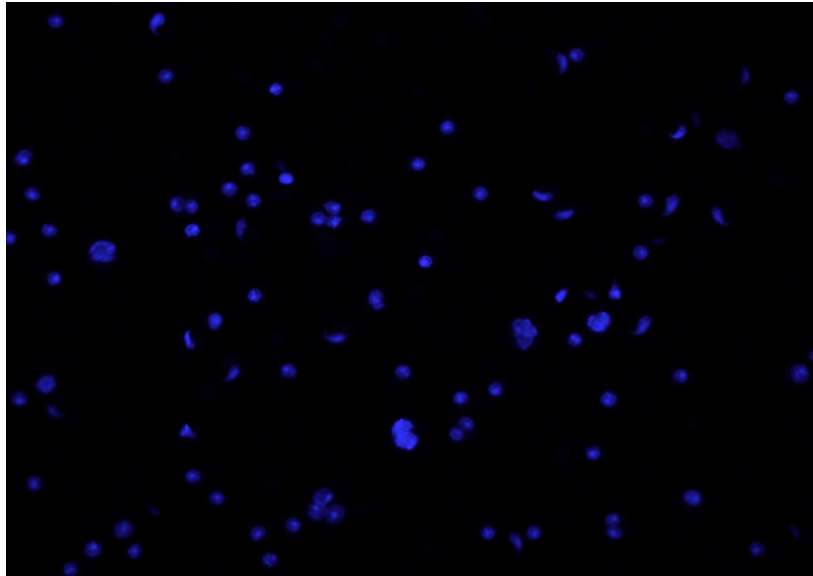
5.2 Pidentyvien spermatidien saannon lisäämiseksi tehty sentrifugitesti

Edellisen digestioprotokollan mukaan sentrifugointi tuotti paremman tuloksen, joten tämän perusteella haluttiin testata sentrifuginopeuksia, joka parantaisi pidentyvien spermatidien saantoa. Testissä tubulusten käsittely eteni normaalin MDR-protokollan mukaisesti, mutta sentrifugionnin jälkeen supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen nostaen aina nopeutta 100xG, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

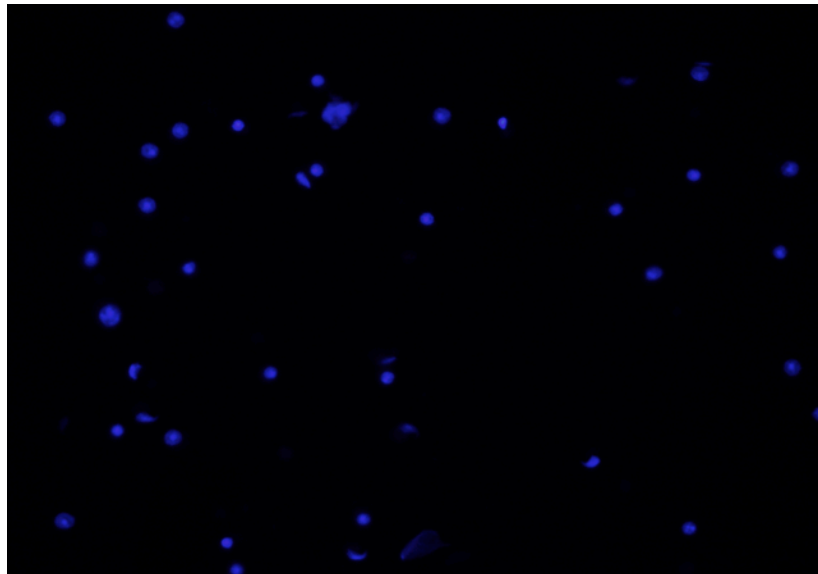
Sentrifugin kierrosnopeuden nostaminen (500xG nostettiin 600xG) ei vaikuttanut ensimmäisen entsyymaattisen käsittelyn (kollagenaasi 1) jälkeen pidentyvien spermatidien saantoon merkittävästi. (kuvat 8. ja 9.). Kuvien perusteella soluja oli suunnilleen yhtä paljon ja pidentyvien spermatidien osuus oli samankaltainen. Korkeampi kierrosnopeus ei vaikuttanut pidentyvien spermatidien saamiseksi pellettiin. Lisää optimointia tarvitaan selvittämään, miksi nostettu kierrosnopeus ei vaikuttanut saantoon. Kuvatut näytteet otettiin supernatantista kollagenaasidigestion jälkeisestä sentrifugoinnista. Tämä supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

Toisen entsyymaattisen käsittelyn (trypsiini) jälkeen, tulokset puolsivat nostettua kierrosnopeutta (600xG) huomattavasti. Nostettu kierrosnopeus lisäsi etenkin pidentyvien spermatidien saantoa, joiden määrä sentrifugaation jälkeisessä supernatantissa oli vähentynyt huomattavasti verrattuna alempaan 500xG kierrosnopeuteen (kuvat 10. ja 11.). Esitettyjen kuvien G-voimat olivat 500xG sekä 600xG. Kuvatut näytteet otettiin supernatantista kollagenaasin sekä trypsiinin jälkeisestä sentrifugoinnista. Tämä supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

Todettiin, että 600xG 5 minuuttia on optimaalinen sentrifugaatio solujen keräämiseen trypsiinidigestion jälkeen.

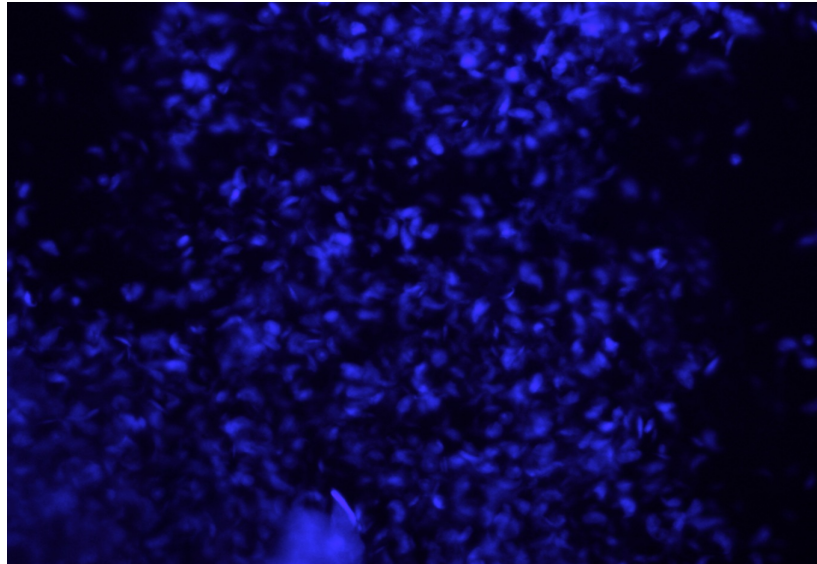


Kuva 8. Kollagenaasin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 500xG, objektiivi 40x. Supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia 500xG, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

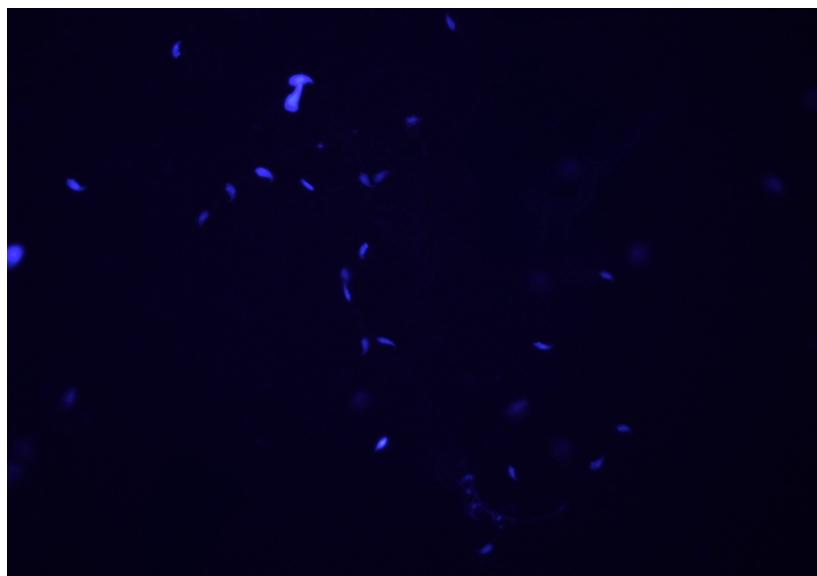


Kuva 9. Kollagenaasin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 600xG, objektiivi 40x. Supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia 600xG, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

Kuvassa 10. ja 11. nähdään solujen määrä supernatantissa protokollan trypsiinikäsitte-
lyn jälkeisen sentrifugoinnin (+4⁰C) jälkeen. Pidentyviä spermatideja on saatu nostetul-
la sentrifugointinopeudella pellettiin merkittävästi enemmän (kuva 7.). Protokollassa
siirryttiin käyttämään trypsiinidigestion jälkeen 600xG sentrifugointinopeutta.



Kuva 10. Trypsiinin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 500xG 40X. Supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia 500xG, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä. Kuvassa nähdään huomattava määrä soluja sekä etenkin pidentyviä spermatideja.



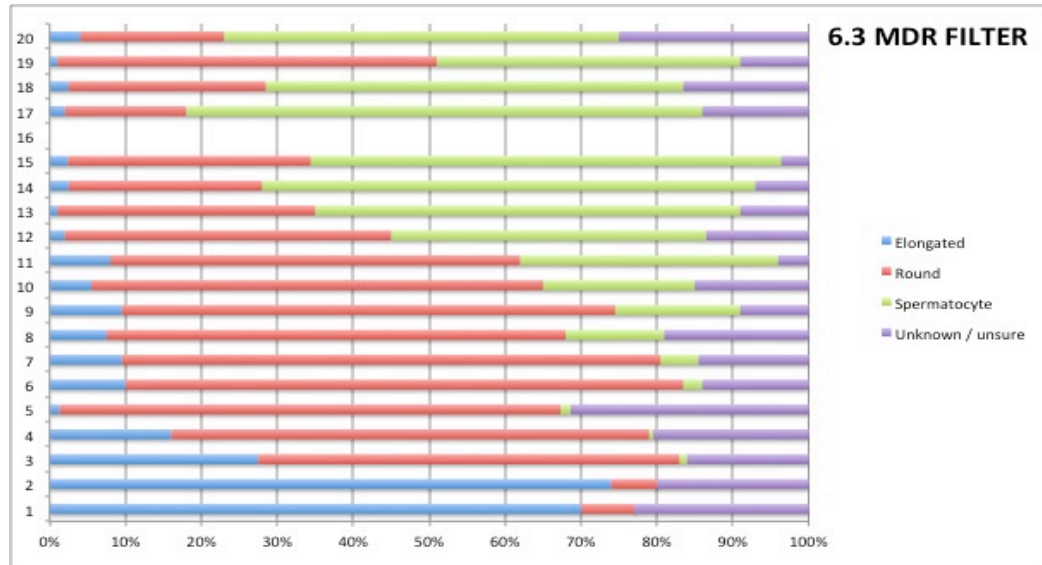
Kuva 11. Trypsiinin jälkeisen sentrifugoinnin supernatantti 600G 40X. Supernatantti otettiin talteen ja sentrifugoitiin uudelleen 5 minuuttia 600xG, jonka jälkeen kuvattu näyte otettiin pelletistä.

te otettiin pelletistä. Kuvassa solujen määrä on vähentynyt, joten sentrifuugin nopeuden nostolla kaikkien solujen sekä pidentyvien spermatidien saanto parani selkeästi.

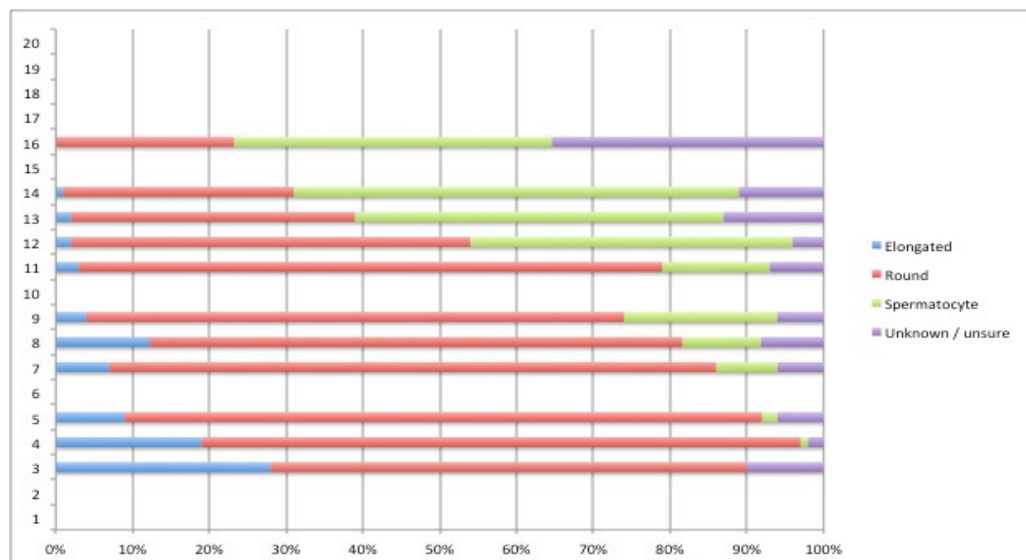
5.3 Solujen siivilöinti

Tällä testillä pyrittiin selvittämään voidaanko pidentyvien spermatidien määrää solususpensiossa kasvattaa, jos solususpension siivilöinti käyttäen 100 µm nylonverkko-siivilää jätetään pois. Tulosten mukaan solususpension siivilöinti oli soluerottelun kannalta tärkeää, eikä tätä vaihetta näin ollen voida jättää pois (taulukko 3). Monet solufraktiot olivat ilman tätä siivilöintiä huonoja ja solujen kokonaissaanti huomattavasti heikompi (taulukko 4). Onnistuneita fraktioita pidentyvistä spermatideista ilman siivilöintiä tehdyssä eristyksessä ei saatu (taulukoiden fraktiot 1 ja 2). Pidentyvien spermatidien puhtaimmat solufraktiot ovat juuri 1 ja 2, joissa ilman siivilöintiä tehdyllä eristyskerralla ei ollut soluja laskettavaksi. Ilman siivilöintiä pyöreiden spermatidien fraktiopuhdistus kuitenkin joissakin fraktioissa parani, esimerkiksi fraktiot 4 ja 5.

Todettiin, että protokollan molemmat siivilöinnit ovat tarpeelliset. Tulokset eivät ole suoraan vertailukelpoisia, sillä huonon solujen saannin vuoksi ilman siivilöintiä tehdyssä eristyskerrassa soluja laskettiin per fraktio vain 100kpl.



Taulukko 3. Protokollan mukainen siivilöinti tehty. Solumäärä per fraktio n=200



Taulukko 4. MDR tehty ilman siivilöintiä. Solumäärä per fraktio n=100

6 POHDINNAT

6.1 Tulosten pohdinta

MDR- eristyskertoja oli yhteensä kymmenen, joista kuusi kertaa oli luotettavia. Ensimmäiset kaksi kertaa olivat epäluotettavia liian suuren fraktioiden keräysnopeuden takia, jolloin fraktiot olivat sekoittuneet. Yksi kerta muodostui epäluotettavaksi eri valmistajan trypsiinierän vuoksi, jolloin soluja saatiin koko eristyskerralta vähäisesti.

Opinnäytetyön tekijä koki aluksi solujen laskemisen ja tunnistamisen vaativaksi. Solujen kuvaaminen sekä laskeminen parantui harjoittelun myötä, mutta solujen parantunut tunnistaminen loppuvaiheessa mahdollisesti vääristäisi tuloksia. Inhimillinen tunnistamisessa tehtävä virhe pyrittiin pitämään samana tutkimuksen ajan. Myös solujen levitys lasille aiheutti eri kerroista aiheutuvaa tahatonta vaihtelua, koska näyte jakautui lasille aina hieman sattumanvaraisesti. Näytettä (2 µl) pyrittiin aina pipetin kärjellä levittämään fiksointipisaraan (8 µl). Näytteiden epätasaisen jakautumisen vuoksi opinnäytetyön tekijä alkoi kuvata solufraktiot 10X optiikalla, joka antoi paremman käsityksen näytteen fiksoinnin onnistumisesta. Yksi näytteen pipetointiin vaihtelua aiheuttava tekijä oli näytteen resuspenointi eppendorf-putkissa. Fraktiot sentrifugoitiin aluksi 1000xG voimalla ja resuspenoitiin ennen näytteen levitystä lasille. Solupelletti oli kuitenkin aina tiukasti kiinni ja sentrifugointinopeutta laskettiin nopeuteen 800xG. Tätä työvaihetta olisi voinut edelleen optimoida lisää.

Sedimentaatio oli pettymys solujen saannin kannalta. Vaikka supernatantin pois kaadossa käytettiin erityistä varovaisuutta, oli eri kerroilla mitatut solujen määrät supernatantissa erittäin korkeat. Syynä tähän oli todennäköisesti kollagenaasidigestion liian pitkä aika, jolloin siementiehytputket hajosivat ja sukusolut vapautuivat supernatanttiin, johtaen solujen menetykseen supernatantin mukana. Solujen menetystä voisi kompensoida kaatamalla pois pienempiä määriä sekä antamalla kaatojen välissä solujen uudelleen laskeutua pohjaan. Tämä kuitenkin lisäisi työvaiheen pituutta kohtuuttomasti, jota elävien solujen kohdalla on myös vältettävä. Tämän vahvistamiseksi lisää optimointia kuitenkin tarvitaan.

Sentrifugoinnissa nostettu kierrosnopeus on ristiriitainen solujen käsittelyn kannalta. Eläville soluille sentrifugointi on aina rasittava ja eräänlaisena rajana nopeudessa on

ollut 500xG:n –arvo. Kierrosnopeuden nostaminen on kuitenkin perusteltua, mikäli solumäärä nousisi kuvista esitettävien arvioiden mukaisesti. Epäselväksi jäi, miksi kollageenaasidigestion jälkeinen sentrifugin nopeuden nosto ei vaikuttanut solujen laskeutumiseen. Tämän osalta lisää optimointia tarvitaan.

Siivilöinnissä ilman suodatusta tehty eristyskerta meni pieleen todennäköisesti isojen toisiinsa tarttuneiden soluklustereiden tai siementiehytputken jäänteiden vuoksi. Nämä isommat kappaleet todennäköisesti sotkivat muut solukerrokset vajotessaan painon ja koon mukaan gradientin pohjalle. Näin tulokset eivät olleet vertailukelpoisia keskenään epäonnistuneiden fraktioiden vuoksi. Lisäoptimointina filtteröintiä olisi voinut kokeilla eri siivilän tiheyksillä.

Menetelmä sisältää paljon käsin pipetointia, jolloin inhimillisen virheen vaara on suuri. Opinnäytetyön tekijä joutui tekemään BSA- gradientin useasti uudestaan eri syistä johtuvien faasien sekoittumisten vuoksi. Ongelmia aiheutti pipetoitaessa esimerkiksi muokatuista pipetin kärjistä tippuvat pisarat sekä pipetoitaessa tapahtunut liike, jotka sotkivat gradientin faasit niin, että sedimentoituminen ei olisi ollut enää luotettava. Myös liian suuri pipetointinopeus faaseja pois kerättäessä aiheutti kahden ensimmäisen eristyskerran epäluotettavuuden.

MDR-menetelmä on kokonaisuutena luotettava menetelmä saada hyviä solufraktiota myös menetelmään perehtymättömän käyttäjän kannalta. MDR-menetelmää ollaan julkaisemassa, joka tulee auttamaan monen spermatogeneesin parissa työskentelevän tutkijan elämää. Tämä opinnäytetyön optimoinnit auttoivat ymmärtämään protokollan vaiheita, ja auttoivat jatkossa hiomaan protokollan viimeiseen julkaistavaan muotoon.

6.2 Yleinen pohdinta

Tämän opinnäytetyön aihe oli opinnäytetyön tekijälle vieras. Teoreettisena lähdemateriaalina toimi pääsääntöisesti englanninkieliset tieteelliset artikkelijulkaisut. Lähdemateriaali etenkin sukusolujen eristysmenetelmistä oli niukkaa ja tästä johtuen osa artikkeleista myöskin vanhoja. Lähteiden asiakieli oli paikoitellen vierasta ja vaati paljon aikaa kääntämiselle asiakokonaisuuden ymmärtämiseksi. Myös kaikkia suomenkielisiä vastineita termeille tai sanoille ei ollut löydettävissä.

Opinnäytetyön tekijä valmisti itse kaikki käytettävät liukset sekä preparoi osan hiiristä, joka lisäsi tekijän vastuuta. Tässä tutkimuksessa kaikki vaiheet suoritettiin hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen. Opinnäytetyön tekijän osuus käytännön suorituksessa oli suuri, ja tekijän kokemattomuus ilmeni ainakin epäonnistuneilla eristyskerroilla. Tutkimuksen suorittamista kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan, tosin jälkikäteen arvioituna muistiinpanot olisivat saaneet olla tarkempia. Kaikkia muuttujia ei aina ollut kirjoitettu kii-reessä muistiin. Tutkimustulokset esitettiin harjoittelun yhteydessä viikkopalaveri-ssä sekä tutkimuksen etenemistä arvioitiin koko tutkimusryhmän tai ohjaajan kanssa.

Jatkotutkimusaiheina voitaisiin tarkastella tarkemmin eri vaiheiden optimaalisinta inkubaatioaikaa, solumassan sedimentaatioaikaa, siementiehytputkien eri asteista mekaanista dissektointia, sekä eri kollagenaasien (kollagenaasi I ja IV eroa) vaikutusta entsymaattisessa homogenisoinnissa.

LÄHTEET

- Anttila, P. 2014. Tutkimisen taito ja tiedon hankinta. Metodix.fi www-sivut. Viitattu 27.10.2017 <https://metodix.fi/2014/05/17/anttila-pirkko-tutkimisen-taito-ja-tiedon-hankinta/#6.4.1%20Laadullinen%20kuvaus>
- Barchi, M.; Geremia, R.; Magliozzi, R.; Bianchi, E. 2009. Isolation and Analyses of Enriched Populations of Male Mouse Germ Cells by Sedimentation Velocity: the Centrifugal Elutriation. Meiosis; vol 2: Cytological Methods, vol 558. 300-302
- Barret, K. et.al. 2016. Ganong's Review of Medical Physiology. 25th edition. Lange. McGraw Hill. 417-419
- Bryant, J.; Meyer-Ficca, M.; Dang, V.; Berger, S.; Meyer, R. 2013. Separation of Spermatogenic Cell Types Using STA-PUT Velocity Sedimentation. Journal of Visualized Experiments, October 2013, pp.1;9.
- Chang, C. 2014. Flow Cytometry 101: the "what, why and how". IMMU7040 - immunological Methodology. www-sivut. Viitattu 23.11.2017.
- Chang, Y.; Chang, Y.; Lee-Chang, J.; Panneerdoss, S.; Maclean, J.; Rao, M. 2011. Isolation of Sertoli, Leydig and spermatogenic cells from the mouse testis. Biotechniques, November 2011. 341-344.
- Cheng, C.; Mruk, D. 2015. Biochemistry of Sertoli cell/germ cell junctions, germ cell transport. Sertoli Cell Biology. Elsevier inc. 2015. 333-339
- De Jonge, C.; Barrat, C. R. L.; 2006. The Sperm Cell; Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge University Press. 7-12.
- Dores, C.; Alpaugh, W.; Dobrinski, I. 2012. From in vitro culture to in vivo models to study testis development and spermatogenesis. Cell tissue, August 2012. 691-693.
- Finlex.fi. Laki koe-eläintoiminnasta 62/2006. Viitattu 28.11.2017
- Grogan W.; Farnham W.; Sabau J. 1981. DNA analysis and sorting of viable mouse testis cells. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. Vol 29. 738-744
- Hirsjärvi, S.; Remes, P.; Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13. Painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 24-26, 118, 130-132, 160.

- Jorgensen N. , et al. 2012. Human Semen quality in the new millenium: a prospective crossectional population-based study of 4867 men. *BMJ Open* 1-7.
- Kankkunen, P.;Vehviläinen-Julkunen, K. 2013. Tutkimus hoitotieteessä. 3. Painos. Sanoma Pro Oy. Helsinki.
- Koskimies, A. 2000. Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim* 2000;116(18):1954-1960
- Kotaja, N. 2013. Spermatogenesis, Mouse. *Brenner's Encyclopedia of Genetics* 2nd edition, Volume 6. Elsevier. 529-53
- Kotaja, N. 2017. Henkilökohtainen tiedonanto.
- Lehtiniemi, T. 2017. Henkilökohtainen tiedonanto.
- Levine, H., et.al. 2017. *Human Reproduction Update*. 1–14. 2017.
- Marraccino R.L., Keng P.C. (1996) Centrifugal Elutriation. In: Pagano M. (eds) *Cell Cycle — Materials and Methods*. Springer Lab Manual. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Proscience, 2017. STA-PUT Velocity Sedimentation Cell Separator for rapid, easy cell separation. http://proscience.com/?page_id=102. Viitattu 29.11.2017
- Rodriguez-Casuriaga, R.; Folle, G.; Santinague, F.; Lopez-Carro, B.; Geisinger, A. 2013. Simple and Efficient Technique for the Preparation of Testicular Cell Suspensions. *Journal of Visualized Experiments*, August 2013. 1-7.
- Rodriguez-Casuriaga, R.; Folle, G.; Santinague, F.; Lopez-Carro, B.; Geisinger, A. 2014. Rapid preparation of rodent testicular cell suspensions and spermatogenic stages purification by flow cytometry using a novel blue-laser-excitabile vital dye. *MethodsX* 1. Elsevier. 240.
- Ross, M. & Pawlina, W. 2011. *Histology, a Text and Atlas*. Sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 787- 802
- Smith L.; Walker, W.; O'Donnell, L. 2015. Hormonal regulation of spermatogenesis trough Sertoli cell by androgens and estrogens. *Sertoli Cell Biology*. Elsevier inc. 2015. 176-179
- Taari, K.; Aaltomaa, S.; Nurmi, M.; Parpala, T.; Tammela, T. (toim.) 2013. *Urologia*. 3. Painos. *Duodecim*. 30-34.
- Tapana, P. 2010. *Elävä solu*. Gaudeamus Helsinki University press. 272-282.
- Toppari, J. & Huhtaniemi, I., 1999. Kives. *Duodecim* 1999, 115: 1853-60. <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo91242.pdf>

- Waugh, A. & Grant, A. 2005. Anatomy & Physiology in Health and Illness. 9.painos. Elsevier: Churchill Livingstone. 448-451.
- Vieira, M. 2013. New World Health Organization reference values for semen analysis: where do we stand? Einstein. 2013;11(2):263-267.
- Vilkka, H. 2005. Tutki ja mittaa: määrällisen tutkimuksen perusteet. Tammi. Helsinki. 90-92

