

Katharina Ven

# Bradykiniini endoteelin ja sileälihassolujen säätelijänä verisuonen tulehdustilassa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööryö

27.10.2016

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Katharina Ven Bradykiniini endoteelin ja sileälihassolujen säätelijänä verisuonen tulehdustilassa 44 sivua + 3 liitettä 27.10.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Tohtorikoulutettava Aino Siltari Professori Riitta Korpela Emeritusprofessori Heikki Vapaatalo Lehtori Tiina Soininen
<p>Sydän- ja verisuonitaudit ovat suurin kuolinsyy länsimaissa. Tautien syntymekanismeja paremmin ymmärtämällä voitaisiin kehittää sairauksien varhaisvaiheiden tunnistamiseen tarvittavia spesifisempiä merkkiaineita, sekä löytää ennaltaehkäiseviä ja parempia hoitomuotoja. Bradykiniinillä on tärkeä rooli verisuonten tonuksen säätelyssä, ja se on perinteisesti tunnettu verisuonia laajentavasta vaikutuksestaan. Tutkimusryhmän aikaisempien eläintutkimusten mukaan bradykiniinillä on myös ikään ja terveydentilaan sidottuja verisuonia supistavia vaikutuksia.</p> <p>Tämän insinööriyön tarkoituksena oli pystyttää soluviljelymallit humaaneille endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassoluille (CASMC), aiheuttaa soluille keinotekoinen tulehdus <i>E.colin</i> endotoksisella lipopolysakkaridilla (LPS) sekä tutkia bradykiniinin mahdollisia erilaisia vaikutusreittejä terveissä ja tulehtuneissa soluissa. Soluja viljeltiin 48-kuoppalevyllä. Niistä tehtiin koesarjat, joissa vertailtiin terveitä ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjä soluja, sekä bradykiniinin annosvasteita. Koesarjojen kasvatusliuoksista mitattiin tulehdusvälittäjäaineiden, prostanoidien ja kokonaistyyppioksidin pitoisuuksia ELISA- ja kolorimetrisellä nitraatti-nitriittimenetelmällä.</p> <p>Soluviljelymallien pystytys onnistui ja soluja onnistuttiin kasvattamaan hallitusti. Tulehdusvälittäjäaineiden mittauksista huomattiin, että LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen kasvatusliuosten pitoisuudet olivat korkeammat kuin terveiden. Prostanoidien mittauksista huomattiin, että terveiden ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen kasvatusliuoksissa oli eroavaisuuksia, sekä bradykiniinillä oli vaikutusta pitoisuuksien tasoihin.</p> <p>Tulosten perusteella soluille aiheutettu keinotekoinen tulehdus lipopolysakkaridilla onnistui. Prostanoidien mittauksien perusteella bradykiniinillä on erilaisia vaikutusreittejä terveissä kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyissä soluissa. Tämän perusteella bradykiniinillä voi olla myös verisuonia supistavia vaikutuksia. Tutkimusta vaatii myös ikääntymisen merkityksen selvittäminen bradykiniinin vaikutusreiteissä.</p>	
Avainsanat	HUVEC, CASMC, LPS, bradykiniini, soluviljely

Author Title Number of Pages Date	Katharina Ven Role of bradykinin as endothelium and smooth muscle cell regulator during vascular inflammation 44 pages + 3 appendices 27 October 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Aino Siltari, PhD Student Riitta Korpela, Professor Heikki Vapaatalo, Emeritus Professor Tiina Soininen, Lecturer
<p>Cardiovascular diseases are one of the most common causes of death in Western countries. By understanding the mechanisms of disease development, more specific indicators for identifying early stages of the diseases, and preventive and better treatments could be developed. Bradykinin has an important role in the regulation of vascular tone and is traditionally known of its vasodilating effects. According to earlier studies, bradykinin has an age- and health-dependent vasoconstriction pathway.</p> <p>The purpose of this study was to set up a cell culture model for human endothelium (HUVEC) and smooth muscle cells (CASMC), to cause an artificial inflammation to the cells by using <i>E. coli</i>'s endotoxin lipopolysaccharide (LPS) and to study bradykinin's possible different pathways on healthy and inflamed cells. Cells were cultured on 48 well plates, and test series were conducted on them. Healthy and LPS treated cells were compared. The cells were also treated with bradykinin. Cytokines, prostanoids and total nitrate-nitrite concentrations reflecting nitric oxide status were measured from culture media using ELISA and colorimetric method.</p> <p>The setups for the cell culture models were successful, and it was possible to cultivate the cells in a controlled way. The cytokine concentrations from the LPS-treated culture media were higher than those from the healthy cells. The prostanoid concentrations were different between the healthy and LPS-treated culture media. Bradykinin effected on the prostanoid concentrations.</p> <p>Results show that, LPS caused inflammation to the cells. According to the prostanoid measurements, bradykinin had different effects on healthy cells compared to LPS-treated cells. Furthermore, it seems that bradykinin could also have vasoconstrictive effects. The influence of aging on the bradykinin effects is yet to be studied.</p>	
Keywords	HUVEC, CASMC, LPS, bradykinin, cell culture

## Kiitokset

Haluaisin kiittää Helsingin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastolla suoritetun insinööriyöni ohjaajia tohtorikoulutettava Aino Siltaria, tutkimusryhmän johtaja professori Riitta Korpelaa, sekä emeritusprofessori Heikki Vapaataloa työn kokeellisen laboratorio-osuuden ohjaamisesta, neuvoista ja tuesta. Kiitän Tampereen yliopiston BioMediTech-instituuttia ja yliopistolehtori Jarkko Valjakkaa yhteistyöprojektista, jonka tutkimusapuraha mahdollisti osaltaan tämän tutkimuksen käynnistyksen. Haluaisin myös kiittää soluviljelytöiden ohjaamisesta farmakologian osaston tutkijatohtori Veera Kainulaista sekä laboratoriomestareita Lahja Eurajokea ja Nada Bechara-Hirvosta korvaamattomista neuvoista ja tiedoista.

Kiitokset solulinjojen lahjoittamisesta kuuluvat Turun yliopiston farmakologian osaston tohtorikoulutettava Anna Huhtiselle, sekä Helsingin yliopiston Kari Alitalon tutkimusryhmän tohtori Riikka Kivelälle. Haluaisin myös kiittää Metropolia Ammattikorkeakoulun lehtoria Tiina Soinista insinööriyön ohjaamisesta ja kirjallisen työn kokoamisen avusta.

Helsingissä 13.8.2016

Katharina Ven

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Verenpaineen säätely	2
2.1	Verenkiertojärjestelmä	2
2.2	Verisuonten tehtävät ja rakenne	4
2.3	Verenpaine ja sitä säätelevät tekijät	6
2.3.1	Minuuttitilavuuden säätely	8
2.3.2	Verisuonten ääreisvastuksen säätely	9
2.3.3	Korkea verenpaine	12
3	Tulehdus verisuonissa	17
3.1	Syklo-oksigenaasi	18
3.2	Prostanoidit	18
3.2.1	Prostanoidien synty	19
3.2.2	Prostanoidien vaikutusmekanismit	20
3.3	Bradykiniini	22
3.3.1	Kallikreiini-kiniini-järjestelmä	22
3.3.2	Bradykiniinin vaikutusmekanismit	23
4	Työn tausta ja tarkoitus	25
5	Materiaalit ja menetelmät	26
5.1	Soluviljelylaboratorion pystytys	26
5.2	Soluviljelmien ylläpito	27
5.2.1	HUVEC-endoteelisolut	27
5.2.2	CASMC-sileälihassolut	28
5.3	Näyttemateriaalit	29
5.3.1	Kasvatusliuos	29
5.3.2	Solut	29
5.4	Tulehduksen mittaus	30
5.5	Kasvatusliuosnäytteiden mittaus	30
5.6	Tilastolliset analyysit	31
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	32

6.1	Soluviljelymallien pystytys	32
6.2	Tulehdusvälittäjänaineiden mittaaminen	33
6.3	Prostanoidien mittaaminen	34
6.3.1	Prostasykliini	34
6.3.2	Prostaglandiini E2	35
6.3.3	Prostaglandiini F2 $\alpha$	36
6.4	Muut mittaukset	38
6.4.1	Kokonaistyyppioksidin (NO $x$ )	38
6.4.2	Syklinen guanosiinimonofosfaatti	39
7	Yhteenveto ja pohdinta	39
	Lähteet	41
	Liitteet	
	Liite 1. Reagenssit ja laitteet	
	Liite 2. CASMC-solujen kasvatusliuoksen valmistusohje	
	Liite 3. Astioiden päällystys 0,1-prosenttisellä gelatiiniliuoksella	

## Lyhenteet

B1	Bradykiniinireseptori B1.
B2	Bradykiniinireseptori B2.
BK	Bradykiniini.
CASMC	Ihmisen sepelvaltimon sileälihassoluja.
cGMP	Syklinen guanosiinimonofosfaatti. Rengasmainen nukleotidi.
COX-1	Syklo-oksigenaasi 1-entsyymi.
COX-2	Syklo-oksigenaasi 2-entsyymi.
eNOS	Endoteelin typpioksidisyntaasientsyymi. Tuottaa typpioksidia.
FBS	Kasvutekijä. Lisätään solujen kasvatusliuokseen.
GS	Guanylaattisyklaasientsyymi.
GTP	Guanosiinitrifosfaatti. Puriininukleotidi.
HUVEC	Ihmisen napanuoran laskimon endoteelisoluja.
IFN	Interferoni. Tulehdusvälittäjäaine.
IL	Interleukiini. Tulehdusvälittäjäaine.
<i>In vitro</i>	Tutkimustekniikka, solujen kasvatusta maljalla elävän organismin ulkopuolella.
LPS	Lipopolysakkaridi. Rasvan ja hiilihydraatin muodostama endotoksiininen molekyyli, jota esiintyy varsinkin gram-negatiivisten bakteerien ulkokalvolla.

NO	Typpioksidi.
NO <sub>x</sub>	Kokonaistyyppioksidi.
P	Pasaasi, solujen siirrostuskertojen lukumäärä (esim. P3).
PBS	Fosfaattisuolaliuos.
PG	Prostaglandiini. Tyydyttymättömiä rasvahappoja, jotka kuuluvat prostanoideihin.
PGI <sub>2</sub>	Prostasykliini. Rasvahappo, joka kuuluu prostanoideihin.
PLA2/FLA2	Fosfolipaasi-A <sub>2</sub> -entsyymi. Tuottaa fosfolipideistä arakidonihappoa.
TNF	Tuumorinekroositekijä. Tulehdusvälittäjäaine.
TX	Tromboksaani. Rasvahappo, joka kuuluu prostanoideihin.



## 1 Johdanto

Sydän- ja verisuonisairaudet ovat suurin yksittäisten kuolinsyiden ryhmä länsimaissa. Vuonna 2008 sydän- ja verisuonisairaudet käsittivät noin 30 % kuolemista eli kaiken kaikkiaan 17,3 miljoonan ihmisen kuoleman; jopa 40 % yli 25-vuotiaista aikuisista kärsii korkeasta verenpaineesta. Sydän- ja verisuonisairauksien taustalla olevia syntymekanismeja paremmin ymmärtämällä voitaisiin kehittää spesifisempiä merkkiaineita sairauksien tunnistamiseen jo varhaisvaiheessa sekä mahdollisesti löytää parempia hoitoja niiden ehkäisemiseen ja parantamiseen. (Control Your Blood Pressure 2013, Kansantaudit; sydän- ja verisuonitaudit 2014.)

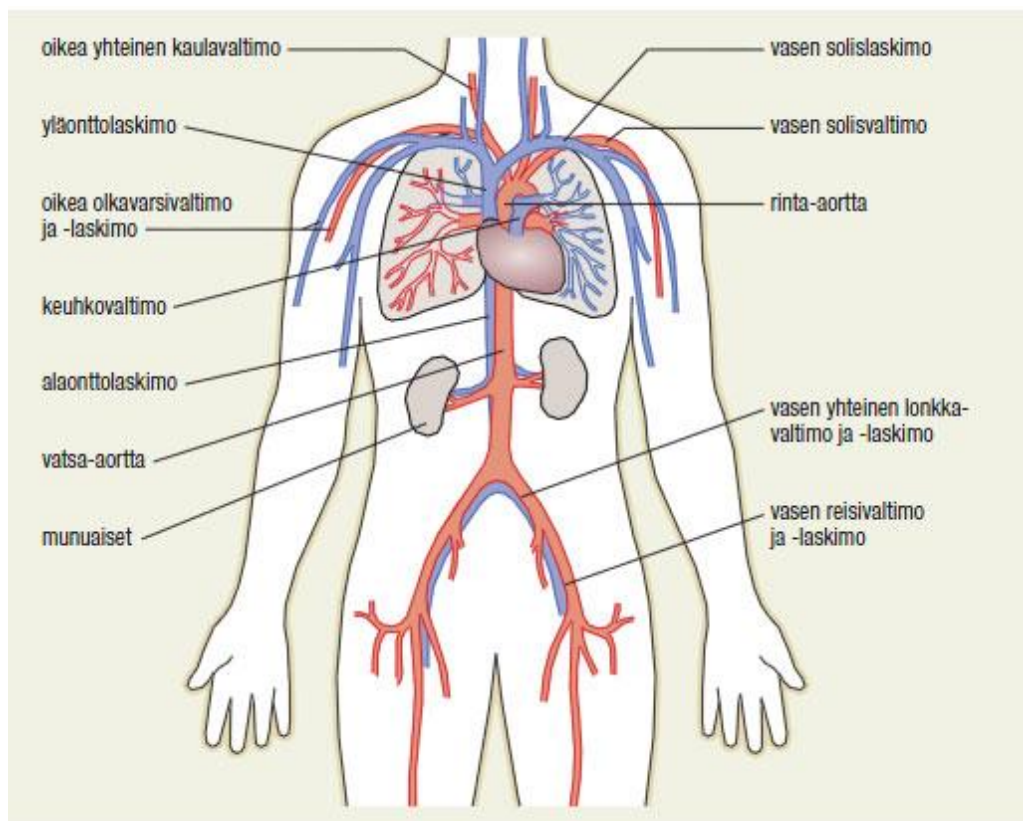
Bradykiniini on kiniineihin kuuluva muun muassa tulehdustilan aikana lisääntyvä peptidi, joka osallistuu moniin fysiologisiin tapahtumiin. Bradykiniini aiheuttaa verisuonten sileälihaksessa rentoutumista tai supistusta, mutta sen osuus verisuonten tonuksen säätelijänä on kuitenkin vielä osittain selvittämättä. Bradykiniinin vaikutusten uskotaan välittyvän bradykiniinin reseptoreiden tyyppi 1:n (B1) ja tyyppi 2:n (B2) kautta. Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että tulehdustila ja ikääntyminen muokkaavat bradykiniinin vaikutusta verisuonissa laajentavasta supistavaksi. Tulehduksellisten tilojen tiedetään olevan mukana sydän- ja verisuonitautien synnyssä. (Erol ym. 2012: 420–423; More ym. 2014: 209–2013; Siltari ym. 2016 julkaistava)

Tämän insinööriyön tarkoituksena oli selvittää bradykiniinin vaikutusreittejä kahden eri solumallin, ihmisen endoteeli- ja sileälihassolujen, avulla terveissä ja tulehtuneissa soluissa. Kokeet suoritettiin erikseen kummallakin solumallilla kuoppalevyillä. Solujen tulehduksellinen tila aiheutettiin keinotekoisesti enterobakteereihin kuuluvasta *Escherichia colista* peräisin olevalla lipopolysakkaridilla (LPS). Kokeellinen osuus työstä suoritettiin keväällä 2016 Helsingin yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa farmakologian osastolla Meilahden Biomedicumissa. Lähiohjaajana toimi tohtorikoulutettava Aino Siltari, ja ohjausryhmässä olivat tutkimusryhmän johtaja professori Riitta Korpela, emeritusprofessori Heikki Vapaatalo sekä yliopistolehtori Jarkko Valjakka.

## 2 Verenpaineen säätely

### 2.1 Verenkiertojärjestelmä

Sydän, valtimot, laskimot ja hiussuonet ovat verenkiertojärjestelmän keskeisimmät osat (kuva 1) (Kettunen 2014b). Sydän pumpkaa vasemmasta kammiosta rinta-aortan kautta keuhkoverenkierrossa hapetetun veren ja muut ravintoaineet suuriin valtimoihin ja hiussuoniin kaasujen vaihtoa sekä muita veren tehtäviä varten. Hiilidioksidipitoinen veri ja soluaineenvaihdunnan tuotteet kerätään ylä- ja alaonttolaskimoihin, jotka palauttavat veren takaisin sydämeen. Jätteitä poistetaan keuhkojen kautta hengitysilmaan ja munuaisten välityksellä virtsaan. Luustolihasien supistumisliikkeet saavat veren virtaamaan laskimoissa eteenpäin ja laskimoiden sulkeutuvat läpät estävät verta virtaamasta väärään suuntaan (Mader 2005: 237–242). Imunestekierto palauttaa verestä kudoksiin tihkuneita nesteitä takaisin laskimoihin. Tätä verenkiertoa kutsutaan suureksi verenkiertoiksi eli ääreisverenkiertoiksi. (Kettunen 2014b.)



Kuva 1. Verenkiertoelimestön keskeiset osat, jossa valtimot on kuvattu punaisella ja laskimot sinisellä (Kettunen 2014b).

Sydän pumppaa ylä- ja alaonttolaskimoista tulleen veren sydämen oikean eteisen ja oikean kammion kautta keuhkovaltimoa pitkin pieneen verenkiertoon eli keuhkoverenkiertoon. Veri kiertää keuhkovaltimoista keuhkorakkuloiden pinnalla olevien hiussuonten kautta keuhkolaskimoihin ja sieltä sydämen vasempaan eteiseen. Keuhkoverenkierrrossa tapahtuu kaasujen vaihto, jossa hiilidioksidi vaihdetaan happeen diffuusion avulla. Keuhkojen kautta hapetta saadaan hengittämällä sisään ja hiilidioksidia poistetaan hengittämällä ulos. (Mader 2005: 242.) Vasen eteinen ja vasen kammiopalaavat veren sitten aortan kautta takaisin ääreisverenkiertoon (Kettunen 2014b).

Veren päätehtävänä on kuljettaa kaasuja ja ravintotekijöitä, sekä suojata elimistöä. Veri osallistuu myös elimistön lämmönsäätelyyn, vesi-suolatasapainon ja pH:n ylläpitämiseen. Veri koostuu 55 % veriplasmasta ja 45 % verisoluista ja -hiutaleista. (Mader 2005: 208–209.) Veren komponentit ja niiden tehtävät löytyvät taulukosta 1.

Taulukko 1. Veren komponentit, tehtävät ja lähteet. (mukaillen Mader 2005: 208.)

Veren komponentti %	Tehtävä	Lähde
Vesi 50 %	Veren määrä, kuljetus	Imeytynyt suolistosta
Plasmaproteiinit <4 % (albumiini, globuliini, fibrinogeeni)	Osmootinen paine, pH, veren määrä, kuljetus, vastustuskyky, hyytyminen	Maksasta
Suolat <1 %	Osmootinen paine, pH	Imeytynyt suolistosta
Kaasut (O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> )	Soluhengitys	Keuhkoista, kudoksista
Ravintoaineet	Ravintoa soluille	Imeytynyt suolistosta
Typpijätteet (virtsa-aine)	Munuaiset erittävät pois	Maksasta
Muut (hormonit, vitamiinit)	Metabolian avustus	Monimuotoisesti kudoksien tuottamaa ja imeytynyt suolistosta
Punasolut 42 %	O <sub>2</sub> kuljetus, CO <sub>2</sub> poiston avustus	Luuydin
Valkosolut <1 % (granulo-, lymfo- ja monosyytit)	Immuunipuolustus	Luuydin
Verihiutaleet <2 % (trombosyytit)	Verenvuodon tyrehtytys	Luuydin

Plasma on valkuaispitoinen neste, joka koostuu lähinnä vedestä, sekä plasmaproteiineista, suoloista, kaasuista, ravintoaineista, typpijätteistä, hormoneista ja vitamiineista (Mader 2005: 208–209; Mustajoki & Kaukua 2008). Plasmaan on liuennut kaikki veren muut aineet, verisoluja lukuun ottamatta, eli satoja aineita, joita voidaan tutkia laboratorionkokeiden. Nykyään verimittaukset tehdään yleensä veriplasmasta tai seerumista. (Mustajoki & Kaukua 2008.)

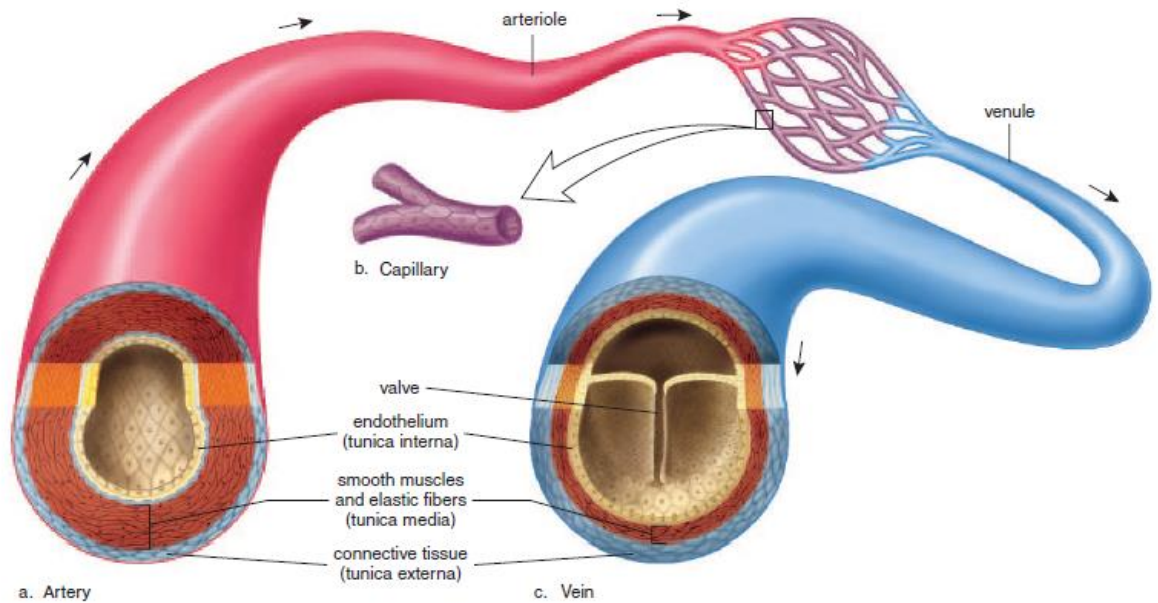
Verisoluja on kolme eri pääryhmää, puna- ja valkosolut sekä verihiutaleet. Näitä verisolulinjoja tuotetaan luuytimeistä hematopoeettisista eli erikoistumattomista kantasoluista. Punasolut kuljettavat valtimoja pitkin happirikasta verta kudoksille ja laskimot kuljettavat hiilidioksidia pois. Veren puolustusmekanismeista vastaavat valkosolut, joita ovat granulositytit, lymfosyytit ja monosyytit. Veri suojaa ja puolustaa elimistöä patogeenejä vastaan verisolujen avulla. Ne pystyvät tuhoamaan patogeenejä muun muassa fagosytoosin eli solusyönnin ja vasta-aineiden muodostuksen avulla. Vasta-aineet lamauttavat patogeenejä ja houkuttelevat veren valkosoluja tuhoamaan niitä. Verihiutaleet vastaavat verenvuotojen tyrehtyttämistä, pikkuverisuonten paikkauksesta sekä veren hyytymisestä yhdessä hyytymistekijöiden kanssa. (Mader 2005: 208–209.)

## 2.2 Verisuonten tehtävät ja rakenne

Verisuoniin kuuluvat valtimot, hiusverisuonet ja laskimot. Verisuonten tehtävänä on kuljettaa verta ja sen komponentteja, suorittaa kaasujen ja ravintoaineiden vaihtoa kudoksissa sekä säädellä verenpainetta ja lämpötilaa. Valtimot kuljettavat verta sydäimestä pikkuvaltioiden kautta hiusverisuoniin, jotka hoitavat kaasujen ja muiden aineiden vaihdon soluille. Pikkulaskimot keräävät veren hiusverisuonista laskimoihin, jotka kuljettavat veren takaisin sydämeen. (Silverthorn 2014: 563–567.)

Verisuonten seinämät koostuvat kolmesta kerroksesta (kuva 2). Sisin kerros koostuu yhdestä kerroksesta endoteelisoluja ja tyvikalvosta. Paksu keskikerros koostuu useista kerroksista sileälihassoluja sekä sitä ympäröivästä sisemmästä ja uloimmasta elastisen säikeiden kalvokerroksesta. Uloin kerros on sidekudosta, joka koostuu tukikudosten proteiineista eli kollageeni- ja elastiinisäikeistä. (Mader 2005: 234–235.) Poikkeuksena hiusverisuonet koostuvat pelkästään verisuonten sisimmästä kerroksesta, jolloin kaasujen ja ravinteiden vaihto kudoksissa onnistuu helpommin (Alberts ym. 2002).

Verisuonten säteen säätelijänä toimiva keskimäinen eli sileälihaskerros on valtimoilla paksumpi kuin laskimoilla. Sen tehtävänä on pitää veren virtaus tasaisena laajentamalla suonia sydämen supistuessa ja supistamalla suonia sydämen levätessä diastolen aikana. Veren kuljetus laskimoissa tapahtuu lähinnä luustolihasten supistumisten ansiosta. Laskimoissa on lisäksi läppiä, jotka takaavat veren kuljetuksen sydämeen päin ja estävät veren virtauksen väärään suuntaan. (Mader 2005: 234–235.)



Kuva 2. Lämpileikkaus verisuonistosta, jossa punaisella on esitetty valtimo (artery), sinisellä laskimo (vein) ja laskimon läppi (valve), sekä niiden kerrokset: sisä- (tunica interna), keski- (tunica media) ja ulkokerros (tunica externa) (Mader 2005: 234).

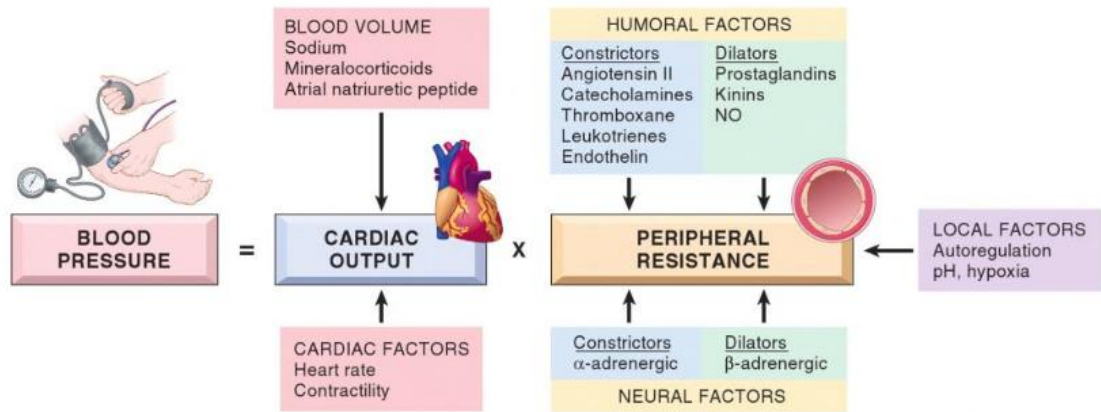
Endoteelisolut säätelevät verisuonten toimintaa ja rakennetta. Reseptorien avulla ne pystyvät havaitsemaan verisuoneen kohdistuvan virtausvoiman (shear stress) ja mukauttamaan verisuonen halkaisijaa ja seinämien paksuutta sopivaksi veren virtaukseen. Endoteelisolut pystyvät myös kontrolloimaan verisuonten halkaisijaa vapauttamalla sileälihassoluja rentouttavaa typpioksidia (NO) ja muita laajentavia tekijöitä kuten prostasykliinia (PGI<sub>2</sub>) ja endoteeliperäistä hyperpolarisoivaa tekijää (EDHF). Endoteelissä muodostuu myös supistavia tekijöitä, kuten muun muassa endoteliiniä, endoperoksidia ja angiotensiini-II-proteiinia. (Alberts ym. 2002.) Ennen endoteelin ajateltiin olevan vain passiivinen osa verisuonia. Se kuitenkin kätkee monia parakriinisiä viestejä ja on merkittävä tekijä verenpaineen säätelyssä, verisuonten kasvattamisessa ja aineiden imeytymisessä. Jotkut tutkijat ovat jopa ehdottaneet endoteelin olevan oma erillinen fysiologinen elinjärjestelmä. (Silverthorn 2014: 564.)

Sileälihas on nimetty lihasten aktiini- ja myosiinisäikeiden sukkulamaisen järjestäytymisen vuoksi, ja niillä on yksi tuma solun keskellä. Se on tahdosta riippumaton, ja sitä on verisuonten lisäksi suolistossa, mahassa, kohdussa ja virtsarakossa. Sileälihas supistuu hitaammin kuin luustolihas, mutta ne voivat ylläpitää supistumistilaa pidempään eikä väsy niin helposti kuin luustolihakset. (Mader 2005: 63.) Useimmissa verisuonissa sileälihassolut ylläpitävät jatkuvaa jännitystilaa luoden tilan, jota kutsutaan lihaksen tonukseksi. Jännitystila riippuu kalsiumionien sisään virtauksesta kalsiumkanavien läpi solun sisään. (Silverthorn 2014: 564–565.) Sympaattinen adrenerginen hermotus ja veressä kiertävä adrenaliini säätelevät sileälihaksen supistumisastetta. Sileälihaksen supistuminen verisuonessa aiheuttaa verisuonen supistumisen, joka nostattaa verenpainetta. (Mader 2005: 63.)

### 2.3 Verenpaine ja sitä säätelevät tekijät

Verenpaine syntyy sydämen supistumisen takia valtimoihin aiheutuvan paineaallon avulla ja se on voima, joka kohdistaa veren verisuontenseinämiä vastaan ja mahdollistaa veren kulun eteenpäin (Klaukka & Olkinuora 1995: 14–16; Ezzati ym. 2002: 284). Sydämen supistumisvaiheessa paine on korkeimmillaan ja tätä kutsutaan yläpaineeksi eli systoliseksi verenpaineeksi. Lepovaiheessa paine on alimmillaan, mitä kutsutaan alapaineeksi eli diastoliseksi verenpaineeksi. (Klaukka & Olkinuora 1995: 14–16.) Systolinen verenpaine vastaa painetta valtimoissa vasemman kammion supistuessa ja diastolinen verenpaine vasemman kammion rentoutuessa (Mader 2005: 239).

Verenpaineen taso muodostuu sydämen minuuttitiheyden ja verisuonten ääreisvastuksen tulona (kuva 3) (Kumar ym 2015: 488). Minuuttitiheyden säätelyyn osallistuu verimäärä ja muita tekijöitä. Verisuonten ääreisvastuksen säätelyyn osallistuu paikallinen, neuraalinen ja humoraalinen säätely. Säätelyn tavoitteena on pitää verenpaine normaalilla tasolla. (Kumar ym. 2015: 488–489.)



Kuva 3. Verenpaineeseen vaikuttaa sydämen minuuttitulavuuden (cardiac output) ja verisuonten ääreisvastuksen (peripheral resistance) tulo. Minuuttitulavuuteen vaikuttaa veren määrä (blood volume) ja muita tekijöitä (cardiac factors). Ääreisvastukseen vaikuttaa humoraalinen (humoral), neuraalinen (neural) ja paikallinen (local) säätely. (Kumar ym. 2015: 488).

Verenpaine ilmaistaan elohopeamillimetreinä (mmHg), joka ilmoittaa valtimoiden painetta vastaavan yhden millimetrin korkuisen elohopeapatsaan aiheuttamaa painetta verenpainemittarin putkessa (Ezzati ym. 2002). Verenpainelukemassa ensin ilmoitetaan systolinen ja sitten diastolinen verenpaine (Klaukka & Olkinuora 1995: 15). Verenpaineen optimaalinen taso on alle 120/80 mmHg (Silverthorn 2014: 567-568). Verenpaineen arvoja luokitellaan uuden potilaan ensimmäiseltä mittauskerralta, johon liittyy sen luokituksen mukaiset toimenpiteet kuten alla olevasta taulukosta näkyy (taulukko 2) (Käypä hoito-suositus 2014).

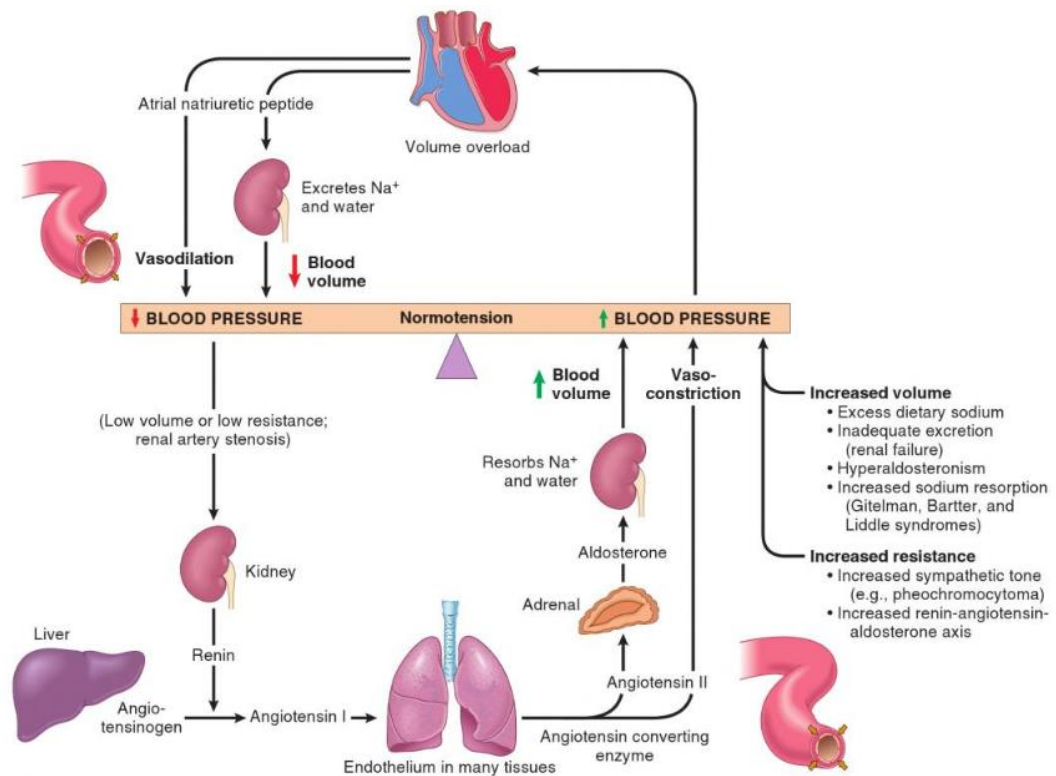
Taulukko 2. Verenpaineen luokittelu uudella potilaalla ensimmäisellä mittauskerralla (Käypä hoito-suositus 2014).

Luokka	SVP (mmHg)		DVP (mmHg)	Toimenpiteet
Optimaalinen	< 120	ja	< 80	Tarkistusmittaus 5 vuoden välein
"Normaali"	120–129	tai <sup>1</sup>	80–84	Elintapaohjeet Tarkistusmittaus 2 vuoden välein
"Tyydyttävä" ("korkea normaali")	130–139	tai <sup>1</sup>	85–89	Elintapaohjeet Verenpainetason <sup>2</sup> arviointi 4 kuukauden aikana Verenpaineen tarkempi luokittelu kotiverenpaineen tai pitkäaikaisrekisteröinnin avulla, jos vastaanottopainetaso on "korkea normaali"

<sup>1</sup> Kumpikaan painearvo ei oikeuta korkeampaan verenpaineluokkaan  
<sup>2</sup> Vastaanotolla vähintään neljänä eri päivänä tehdyn kaksoismittauksen keskiarvo

### 2.3.1 Minuuttitilavuuden säätely

Sydämen minuuttitilavuutta säätelevät verenmäärä ja muut tekijät (cardiac factors). Verimäärää säätelevät natrium, mineralokortikoidit sekä natriueettinen peptidi (ANP) (kuva 4). Muita tekijöitä säätelevät syke ja supistumiskyky. (Kumar ym. 488-489.)



Kuva 4. Verenpainetta nostavia ja laskevia tekijöitä. Verenpainetta alennetaan erittämällä natriueettista peptidiä (ANP), joka laajentaa verisuonia sekä lisää natriumin ja veden poistoa munuaisten (kidney) kautta. Verenpainetta nostetaan maksan (liver) angiotensinogeeniä pilkkomalla munuaisten reniinillä angiotensiini I-proteiiniksi, joka konvertoidaan entsyymiin (ACE) kautta angiotensiini II-proteiiniksi, jolla on verisuonia supistavia vaikutuksia, sekä se lisää lisämunuaisten (adrenal) aldosteronihormonin tuottoa. Aldosteroni tehostaa veden ja natriumin takaisinimeytymistä kehoon. (Kumar ym. 2015: 489.)

Lisämunuaiskuori valmistaa kolesterolista steroidihormoneja, kortikoideja. Mineraaliaineenvaihduntaan osallistuviin mineralokortikoideihin kuuluva aldosteroni lisää natrium-kalium-pumpun toimintaa munuaistiehyissä, jolloin natriumin-ionien takaisin imeytyminen tehostuu. Lisääntynyt natriumin määrä kohottaa verenpainetta nostamalla elimistössä olevan veden määrää eli nostamalla myös verimäärää. (Kumar ym. 2015: 488–490.) Aldosteronin tuotantoa säätelee keskeisesti angiotensiini II-proteiini (Ang II), jota tuotetaan reniini-angiotensiinijärjestelmällä. Munuaisten tuottama reniini pilkkoo maksan tuottamaa angiotensinogeeniä angiotensiiniä I:ksi (Ang I).



Keuhkoissa syntyvä angiotensiiniä konvertoivan entsyymi (ACE) pilkkoo angiotensiini I-entsyymiä verisuonten sileälihassoluja vahvasti supistavaksi angiotensiini II-entsyymiksi. (Mader 2005: 238.)

Verenpaineen noustessa liikaa sydämen eteisestä erittyvä venytys- ja painevasteen stimuloimana natriureettista sydänpeptidiä (ANP). Peptidi kulkeutuu verenkierron kautta munuaisiin ja verisuonten seinämiin, joiden pinnalla on guanylaattisyklaasientsyymi, jota ANP stimuloi lisäten syklisen GMP:n tuottoa, jolloin sileälihas laajenee ja verenpaine laskee. Peptidi lisää myös suolan ja veden eritystä virtsaan, jolloin verenpaine laskee. (Kettunen 2014a.)

Sydämen sykettä ja supistumiskykyä säätelee autonominen hermosto, jota käsitellään tarkemmin verisuonten ääreisvastuksen säätelyn yhteydessä. Sykkeeseen ja supistumiskykyyn vaikuttavat myös muitakin tekijöitä, kuten kehon lämpötila ja elektrolyyttien eli mineraalisuolojen pitoisuus. Alentunut kehon lämpötila alentaa sydämen sykettä hetkellisesti. Mineraalisuolapitoisuus lisää sileälihaksen kykyä supistua. (Mader 2005: 233.)

### 2.3.2 Verisuonten ääreisvastuksen säätely

Verisuonten ääreisvastusta säätelevät paikallinen, neuraalinen ja humoraalinen säätely (Kumar ym. 2015: 488). Verenpainetta voidaan säädellä paikallisesti autoregulaation eli itsesäätelyn avulla. Pikkuvaltimot reagoivat supistavasti tai laajentavasti muun muassa venytykseen, kudosten lämpötilan vaihteluun sekä kudoksissa oleviin eri aineisiin. Verenvirtauksen säätelyyn osallistuvat myös prekapillaarisfinkkerit eli hiussuonien sulkijat, jotka voivat supistuessaan ja laajetessaan säädellä verenvirtauksen määrää hiussuonissa. Verenpainetta paikallisesti säätelevät myös erilaiset parakriiniset tekijät, joiden muuttuvat pitoisuudet aiheuttavat verisuonten laajenemista ja supistumista. Tunnetuimpia niistä ovat happi (O<sub>2</sub>) ja hiilidioksidi (CO<sub>2</sub>). (Silverthorn 2014: 573–576.)

Verenpainetta voidaan säädellä myös neuraalisesti autonomisen hermoston eli tahdosta riippumattoman hermoston kautta. Aortankaarella ja kaulavaltimossa sijaitsevat baro- ja kemoreseptorit valvovat verenpainetta valtimoissa ja lähettävät signaaleja sen muutoksista ydinjatkeessa sijaitsevalle vasomotoriselle keskukselle. (Mader 2005: 237; Silverthorn 2014: 576–579.) Baro- eli aistireseptorit ovat tärkeitä

nopean verenpaineen muutoksen säätelijöitä ja aktivoituvat venytyksestä aiheutuvasta verenpaineen muutoksesta (Kettunen 2014a). Kemoreseptorit taas reagoivat veren pH:n sekä hapen ja hiilidioksidin pitoisuuksien muutoksiin (Silverthorn 2014: 582). Keskuksesta lähtee signaali autonomiseen hermostoon kuuluville sympaattisille tai parasympaattisille hermosäikeille, joiden avulla säädellään sydämen sykkeen tiheyttä sekä valtimoiden supistumista ja laajentumista, aiheuttaen hetkellistä verenpaineen kohoamista tai laskua. (Mader 2005: 237; Silverthorn 2014: 576–579.) Sympaattinen hermosto nostaa sydämen sykettä ja supistaa verisuonia adrenaliinin ja noradrenaliinin avulla, jotka johtavat verenpaineen kohoamiseen. Parasympaattinen hermosto laskee sydämen sykettä asetyylikoliinin avulla, mikä johtaa verenpaineen alenemiseen. Asetyylikoliini saa aikaan koeolosuhteissa (*in vitro*) verisuonia laajentavan typpioksidin tuotannon kasvua muskariini reseptorin (M3) välityksellä. (Silverthorn 2014: 576.) Adrenaliinin ja noradrenaliinin aiheuttavat vaikutuksensa aktivoimalla kohdesolujensa adrenoseptoreita. Reseptorit jaetaan kolmeen pääluokkaan,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - ja  $\beta$ -reseptoreihin, jotka jakaantuvat kukin kolmeen eri alaluokkaansa. (Koulu & Mervaala 2013: 231–235.)

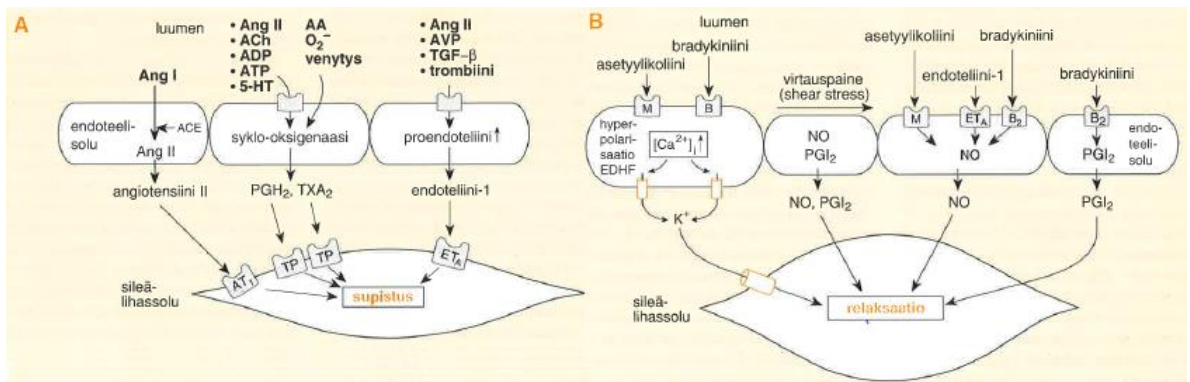
Verenpaineen säätelyyn osallistuu myös humoraalinen järjestelmä, joka kierrättää verenkierrossa verisuonia laajentavia ja supistavia peptidejä (Kumar ym. 2015: 488). Supistavia peptidejä ovat muun muassa aldosteroniin ja reniini-angiotensiini järjestelmään läheisesti liittyvä angiotensiini II, noradrenaliini, adrenaliini ja prostanoideihin kuuluva tromboksaani. Laajentavia tekijöitä ovat muun muassa typpioksidi, prostasykliini ja sydänpeptidit. Taulukkoon 3 on koottu vasoaktiivisia tekijöitä ja niiden vaikutukset verisuonessa, kohdereseptorit sekä niihin liittyviä verisuonia laajentavia lääkkeitä (Koulu & Mervaala 2013: 574.)

Taulukko 3. Verisuonia laajentavia ja supistavia tekijöitä, niiden reseptorit tai kohde-entsyymit sekä reseptoreihin sitoutuvia aineita, jotka laajentavat verisuonia (Koulu & Mervaala 2013: 574).

Supistavia tekijöitä	Reseptori tai kohde-entsyymi	Vasodilatoivia esimerkkiaineita
Noradrenaliini ja adrenaliini	$\alpha_1$	Alfasalpaajat – Pratsosiini – Labetaloli (myös $\beta$ -salpaaja)
Angiotensiini II	$AT_1$	ACE:n estäjät – Kaptopriili $AT_1$ -reseptorin salpaajat – Losartaani
Tromboksaani ( $TXA_2$ )	TP	
Serotoniini (5-HT)	5-HT <sub>2A</sub>	Ketanseriini
Endoteliini	ET <sub>A</sub>	Bosentaani
Kalsiumin soluunvirtaus		Kalsiumkanavan salpaajat – Nifedipiini – Felodipiini
Vasopressiini	V <sub>1</sub> -reseptori	
Laajentavia tekijöitä	Reseptori tai kohde-entsyymi	Vasodilatoivia esimerkkiaineita
Typpioksidi	Liukoinen guanylaattisyklaasi	Typpioksidin luovuttajat – Glyseerylitrinitraatti – Nitroprussidi – Molsidomiini Endoteelin NO-tuotantoa lisäävät myös – endoteliini (ET <sub>B</sub> -reseptori) – bradykiniini (B <sub>2</sub> -reseptori) – serotoniini – substanssi P (NK <sub>1</sub> -reseptori) – asettylikoliini (M <sub>3</sub> reseptori)
Adrenaliini	$\beta_2$	$\beta$ -agonistit – Adrenaliini – Dobutamidi Partiaaliset $\beta$ -agonistit – Pindololi – Seliprololi ( $\beta_2$ ) – Dilevaloli ( $\beta_2$ )
	Adenylaattisyklaasi	Adenylaatti- ja guanylaattisyklaasin estäjät – Papaveriini – Metyylikantiinit
Prostasykliini (PGI <sub>2</sub> )	IP	Iloprosti
Sydänpeptidit (ANP, BNP, CNP)	Solukalvon guanylaattisyklaasi	Nesiritidi
Kaliumin virtaus solusta		Kaliumkanavan avaaajat – Minoksidili
Adenosiini	Adenosiinireseptori (A <sub>2</sub> )	

Endoteelin typpioksidisyntaasientsyymi (eNOS) muodostaa arginiini-aminohaposta typpioksidia ja sitrulliiniaminohappoa. Syntaasi aktivoituu muun muassa kalsiumpitoisuuden kasvusta. Kalsiumin pitoisuuden kasvua voi aiheuttaa myös veren virtauksen aiheuttama virtausvoima (shear stress) tai säätelyaineiden, kuten bradykiniinin reseptorien, stimulaatio. Kaasumainen typpioksidi kulkeutuu solukalvojen

läpi endoteelista sileälihassoluihin. Siellä se aktivoi guanylaattisykloasientsyymiä (GS), joka valmistaa guanosiinitrifosfaattia (GTP) syklistä guanosiinimonofosfaattia (cGMP). Lopputuloksena syklinen GMP aiheuttaa sileälihassolun relaksaation ja verenpaineen laskun (kuva 5) (Koulu & Mervaala 2013: 573–577.) Kuvasta 5 nähdään myös supistavien ja laajentavien tekijöiden vaikutukset reseptorien välityksellä sekä niiden vaikutukset sileän lihaksen supistumiseen ja relaksaatioon. Supistuvat tekijät suurentavat solunsisäistä kalsiuminpitoisuutta ja laajentavat pienentävät. (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 246-253.)



Kuva 5. Verisuonen sileälihaksen supistuksen (A) ja relaksaation (B) säätely endoteeliperäisten tekijöiden vaikutuksesta. Erilaiset tekijät (mm. Ang I, Ang II, ACh) lisäävät endoteelivälitteisiä sileälihassoluja supistavien tuotteita, kuten tromboksaania (TXA<sub>2</sub>) ja endoperoksiedeja (PGH<sub>2</sub>). Toiset tekijät (mm. bradykiniini, ACh) lisäävät endoteelivälitteisiä sileälihassoluja relaksoivia tuotteita, kuten typpioksidia (NO) ja prostasykliiniä (PGI<sub>2</sub>). (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 247.)

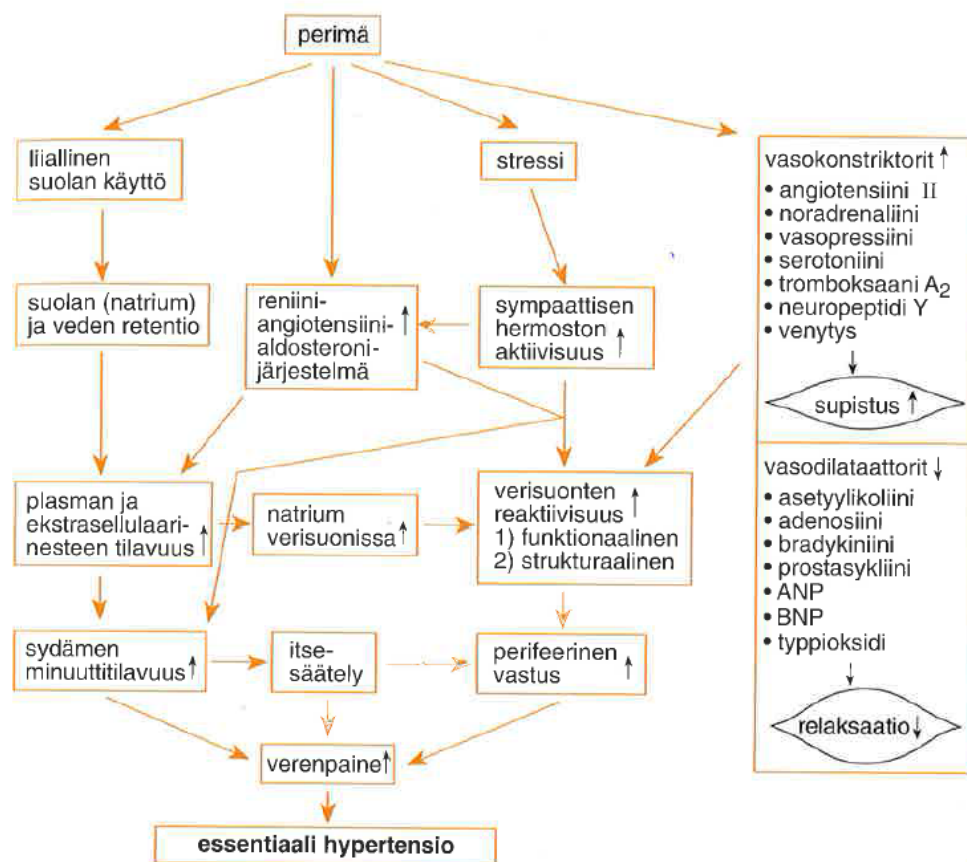
Pitkällä aikavälillä verenpaineen tasoon vaikuttavat elämäntavat, ikä ja geneettinen perimä, jota käsitellään tarkemmin seuraavassa luvussa (Perustietoa verenpaineesta 2009).

### 2.3.3 Korkea verenpaine

Sydänsairaudet ja jatkuvasti kohonnut verenpaine ovat suuri kansanterveydellinen ja -taloudellinen haitta niin maailmanlaajuisesti kuin erityisesti Suomessa (Karppanen 1995: 7–9). Sydän- ja verisuonisairauksista pelkästään kohonnut verenpaine on merkittävä terveitä elinvuosia vähentävä riskitekijä, joka johtaa arviolta 9,4 miljoonaan ennenaikaiseen kuolemaan vuosittain. Suomalaisista noin kahdella miljoonalla on kohonnut verenpaine, ja heistä noin joka toisella on verenpainetta alentavat lääkkeet käytössä. (Käypä hoito-suositus 2014.) Korkea verenpaine altistaa sairastumista

tappaville sydän- ja verisuonitauteihin, ja sitä kutsutaan ”hiljaiseksi tappajaksi”, koska sitä ei yleensä huomata ennen kuin vasta halvauksen tai sydänkohtauksen yhteydessä (Mader 2005: 239).

Korkea verenpaine jaotellaan primaariseen ja sekundaariseen hypertensioon. Noin 5 % korkeasta verenpaineesta on sekundaarista hypertensiota, jonka selväksi syyksi on osoitettu muun muassa munuaissairaudet, uniapnea sekä munuaisvaltimoiden ja aortan ahtaumat. Loput 95 % korkeasta verenpaineesta on primaarista eli essentiaalista hypertensiota, jonka syntymekanismi on vielä epäselvä. Siihen vaikuttavia tekijöitä ovat kuitenkin perintötekijät ja elintavat. Primaariseen kohonneeseen verenpaineeseen liittyy monia tekijöitä (kuva 6). Tärkeimpiä tekijöitä ovat kuitenkin sydämen minuuttitulavuuden ja verisuonten ääreisvastuksen kasvu, johtuen munuaisten toiminnasta, sympaattisen hermoston aktiivisuudesta, reniini-angiotensiini-aldosteroni-järjestelmästä sekä verisuonten supistumisesta. (Koulu & Mervaala 2013: 623–624.)



Kuva 6. Essentiaalisen hypertensioon vaikuttavia tekijöitä (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 281).

Verenpainetaso ja verenpaineen luokittelu tarkistetaan elintapahoidon aikana kotimittauksilla tai pitkäaikaisrekisteröinnillä, jos vastaanotolla mitattu verenpaine on ollut toistuvasti yli 140/90 mmHg. Kohonnut verenpaine eli hypertensio luokitellaan vastaanottomittauksista ja vastaanoton ulkopuolella tehtyihin verenpainemittausten mukaan eri tasoihin (taulukko 4). (Käypä hoito-suositus 2014.)

Taulukko 4. Kohonneen verenpaineen luokitukset, jossa on ilmoitettu systolinen (SVP) ja diastolinen(DVP) verenpaine, sekä toimenpidekaavio (Käypä hoito-suositus 2014).

Kohonnut verenpaine	SVP (mmHg)		DVP (mmHg)	Toimenpiteet
Lievästi kohonnut	140–159	tai <sup>1</sup>	90–99	Elintapaohjeet Verenpainetason <sup>2</sup> arviointi 2 kuukauden aikana Verenpaineen tarkempi luokittelu kotiverenpaineen tai pitkäaikaisrekisteröinnin avulla, jos vastaanottopainetason perusteella kohonnut verenpaine
Kohtalaisesti kohonnut	160–179	tai <sup>1</sup>	100–109	Elintapaohjeet Verenpainetason <sup>2</sup> arviointi ja tarkempi luokittelu kuten yllä
Huomattavasti kohonnut	≥ 180	tai	≥ 110	Elintapaohjeet Verenpainetason <sup>2</sup> arviointi ja tarkempi luokittelu kuten yllä 1–2 viikon aikana
Hypertensiivinen kriisi	≥ 200	tai	≥ 130	Välitön hoito
Isoloitunut systolinen hypertensio	≥ 140	ja	< 90	Elintapaohjeet Verenpainetason <sup>2</sup> arviointi ja tarkempi luokittelu kuten yllä
<sup>1</sup> Kumpikaan painearvo ei oikeuta korkeampaan verenpaineluokkaan				
<sup>2</sup> Vastaanotolla vähintään neljänä eri päivänä tehdyn kaksoismittauksen keskiarvo				

Ravinnosta suolan kautta saatava natrium on yksittäinen merkittävä tekijä, joka nostaa verenpainetta (Karppanen 1995: 7–8). Sen saanti on jopa 12–16 kertaa suurempi, kuin ihmisen fysiologiset tarpeet ovat eli 230 mg päivässä. Vähimmäissaannin alarajaksi on kuitenkin arvioitu 575 mg päivässä fyysisen aktiivisuuden ja lämmöstä aiheutuvan menetyslisän huomioon ottaen. (Jula 2006.) Samaan aikaan jos kalsiumin ja magnesiumin saanti on vähentynyt, natriumin verenpainetta kohottava vaikutus kasvaa (Karppanen 1995: 7–8). Kun munuaisten erityskyky ylitetään ja natriumia alkaa kertyä verenkiertoon, se alkaa sitoa nestettä elimistöön nostaen kiertävän veren määrää ja samalla verenpainetta. Verenpaineen nousu saa aikaan sydänpeptidin (ANP) määrän lisääntymisen, joka laajentaa verisuonia ja samalla lisää natriumin sekä nesteiden eritystä virtsaan. (Jula 2003.) Natriumin verenpainetta kohottavaa vaikutusta lisää

kalsiumin ja magnesiumin vähentynyt määrä, sekä muun muassa ylipaino, suuri alkoholin kulutus, veren korkea insuliinitaso sekä kovien eläinrasvojen käyttö (Karppanen 1995: 8; Mader 2005: 240–241). Kaikille korkean verenpaineen potilaille suositellaan elämäntapamuutoksia (taulukko 5) (Käypä hoito-suositus 2014).

Taulukko 5. Elämäntapamuutoksia korkean verenpaineen hoitoon (Käypä hoito-suositus 2014).

<b>Tekijä</b>	<b>Tavoite</b>
Natriumin saanti, mg/vrk	< 2 000 (vastaa < 5 g:aa NaCl/vrk) <sup>1</sup>
Kaliumin saanti, mg/vrk	Naiset ≥ 3 100 <sup>2</sup> Miehet ≥ 3 500 <sup>2</sup>
Kalsiumin saanti, mg/vrk	≥ 800
Tyydyttyneet <sup>3</sup> ja trans-rasvahapot <sup>4</sup> , E % <sup>5</sup>	< 10
n-3-sarjan monitydyttymättömät rasvahapot <sup>6</sup> , E% <sup>5</sup>	≥ 1
Alkoholin käyttö, g viikossa (annosta viikossa)	Naiset < 100 (< 9) Miehet < 160 (< 14)
Liikapaino ja lihavuus	Liikapainoisilla (painoindeksi 25–29,9 kg/m <sup>2</sup> ) ja lihavilla (painoindeksi vähintään 30 kg/m <sup>2</sup> ) 5–10 %:n suuruisen painon väheneminen
Vyötärölihavuus	Vyötärön ympärysmitta miehillä < 102 cm ja naisilla < 88 cm
Fyysinen aktiivisuus	Vähintään viidesti viikossa vähintään 30 minuuttia kerralla (yhtenä tai useampana jaksiona) kohtalaisen kuormittavaa liikuntaa, esimerkiksi reipasta kävelyä
Tupakointi	Tupakoinnin lopettaminen
<sup>1</sup> Vastaa natriummäärää 87 mmol <sup>2</sup> Vastaa naisilla kaliummäärää 79 mmol ja miehillä 90 mmol <sup>3</sup> Tärkein lähde kovat maito- ja muut eläinrasvat <sup>4</sup> Tärkeimmät lähteet rasvaiset maitovalmisteet ja voi, rasvaiset leivonnaiset ja rasvaiset liharuoat <sup>5</sup> Osuus energiansaannista <sup>6</sup> Tärkeimmät lähteet kala (eikosapentaeeni- ja dokosaheksaeenihappo) ja rypsiöljy (alfa-linoleenihappo)	

Ikääntyminen aiheuttaa muutoksia verenkiertojärjestelmässä, kuten sydänläpät paksunevat ja jäykistyvät, sydänlihaskudos menettää supistumiskykyään ja kykyä rentoutua, lepo- ja maksimisyke laskevat, verisuonet jäykistyvät ja kalkkeutuvat. Muutokset altistavat sairastumista sepelvaltimotukokseen, sydäninfarktiin ja korkeaan verenpaineeseen. Korkean verenpaineen on huomattu liittyvän kalkkeutumisen lisäksi myös munuaissairauksiin. Myös mahdollisesti kohtalokkaita suonikohjuja ja veritulppia voi esiintyä. (Mader 2005: 248.)

Perimä voi vaikuttaa myös korkean verenpaineen syntyyn. Sen uskotaan olevan polygeneettinen sairaus eli johtuvan monen eri perityn geenin sekä monien eri ympäristötekijöiden yhteisvaikutuksesta. Korkeaan verenpaineeseen liittyvien geenien määrää, välittymismekanismeja ja niiden vaikutuksia verenpaineeseen ei vielä kunnolla tunneta vaikean monitahoisen tutkittavuuden takia, mutta tutkimusten perusteella on löydetty hyviä geeniehdokkaita lisätarkasteluja varten. Näiden avulla yritetään löytää parempi ymmärrys korkean verenpaineen syntymiseen, vaikutusreitteihin ja mekanismeihin. (Rupper ym. 2003: 655–659; Kraja ym. 2011: 46–54.)

Jatkuvasti koholla oleva verenpaine kuormittaa sydäntä ja verisuonistoa sekä altistaa monille sydän- ja verisuonitaudeille. Se toimii ilmaisimena varsinaisesti hypertensiolle, mutta ei voi yksinään luokitella hypertension taso. Saman korkean verenpaineen omaavilla potilailla voi olla eri luokituksen hypertensiot eli verenpainetaudin taso, joten verenpaine pitäisi arvioida myös muiden riskitekijöiden kanssa todellisen hypertensioluokituksen selvittämiseksi. Hypertension kehittymiseen liitetään myös muun muassa sydän- ja aivoviat sekä häiriöt verenkierrossa ja munuaisissa. (Giles ym. 2009: 611–614.) Kohonnut verenpaine saa aikaan muutoksia, jotka verisuonissa lisäävät verenkierron ääreisvastusta. Verisuonten läpimitta pienenee jatkuvan supistumisen takia, ja verisuonten seinämät paksunevat. Tämä lisää sydämen työmäärää, joka saa aikaan sydämen vasemman kammion seinämän liikakasvun eli hypertrofian. Verenpaineen kohoaminen lisää myös verisuonten ääreisvastusta venyttämällä valtimoita ja vahingoittaen endoteelikerrosta. Vahingoittunut endoteelikerros vetää puoleensa enemmän huonoa LDL-kolesterolia, joka kasaantuessaan aiheuttaa rasvakertymiä, jotka myöhemmin kalkkiutuessaan kasvattavat aivohalvauksen, sepelvaltimotaudin ja sydäninfarktin riskiä sekä saattavat aiheuttaa munuaisten vaurioitumista. (Klaukka & Olkinuora 1995: 17; Steinbaum 2014.)

Lieväasteisen kohonneen verenpaineen hoitoon käytetään ensisijaisesti pitkäaikaisia elämäntapamuutoksia. Jos tästä huolimatta verenpaine pysyy jatkuvasti koholla ( $\geq 140$  mmHg/ 90 mmHg), on suositeltavaa aloittaa lääkehoito. (Käypä hoito-suositus 2014.) Hoidolla pyritään alentamaan verenpaine mahdollisimman normaalille tasolle ilman, että siitä aiheutuu merkittäviä haittoja. Verenpainelääkkeet voidaan jaotella vaikutusmekanismien ja pääasiallisten vaikutuskohteiden mukaan (taulukko 6). Ensisijaisia verenpainetta alentavina lääkkeitä ovat ACE-estäjät, angiotensiiniireseptorin salpaajat,  $\beta$ -salpaajat, diureetit ja kalsiumkanavasalpaajat. (Koulu & Mervaala 2013: 624–662) Nesteenoistolääkkeitä eli diureetteja käytetään



lisäämään natriumin eritystä virtsaan ja siten poistoon elimistöstä (Koulu & Mervaala 2013: 630).

Taulukko 6. Verenpainetaudin hoidossa käytettäviä lääkkeitä (Koulu & Mervaala 2013: 625)

Diureetit	
Sympaattiset hermoston toimintaa vaimentavat lääkkeaineet	
	$\alpha$ 1-reseptorin salpaajat
	$\beta$ -reseptorin salpaajat
	$\alpha$ - ja $\beta$ -reseptorien salpaajat
	$\alpha$ 2-reseptorin agonistit
	I2-imidatsoliinireseptorin agonistit
	Reserpiini*
Reniini-angiotensiinijärjestelmää estävät lääkkeaineet	
	ACE:n estäjät
	AT1-reseptorin salpaajat
	Reniinin estäjät
	Aldosteroniantagonistit
Kalsiumkanavan salpaajat	
Muut verisuonia laajentavat lääkkeet	
	Dihydralatsiini*
	Minoksidili*
	Nitroprussidi**
* Ei käytössä Suomessa verenpainelääkkeenä	
** Ainoastaan infuusiona erityistilanteessa	

### 3 Tulehdus verisuonissa

Tulehdus on immuunijärjestelmän vaste infektiioon tai vaurioon, joka on osoitettu muun muassa syövän sekä sydän- ja verisuonitautien patogeneesissä eli synnyssä. Tulehdus itsessään on hyödyllinen tapahtuma, joka johtaa hyökkäävien tekijöiden poistoon sekä kudusrakenteen ja fysiologisten toimintojen korjaamiseen. Akuutissa tulehduksessa veren granulosityytit ja makrofagit tulevat nopeasti paikalle aiheuttaen samalla tulehduksen oireita kuten punotusta, kuumotusta, turvotusta ja kipua. Kun haitallinen ärsyke on poistettu fagotsytoosin avulla, tulehdusreaktio alkaa vaimentua ja hävitä. Muuan muassa korkea verenpaine aiheuttaa verisuonissa jatkuvaa lievää tulehdustilaa, joka suurentaa riskiä sairastua vakavampiin sydän- ja verisuonitauteihin. (Ricciotti ym. 2011: 1.)

### 3.1 Syklo-oksigenaasi

Elimistössä esiintyy monityydyttymätöntä rasvahappoa, arakidonihappoa, jota saadaan suoraan eläinperäisestä ruokavaliosta tai muodostamalla sitä kasviöljyistä saatavasta linohaposta. Sitä varastoituu soluihin fosfolipideihin, joista fosfolipaasi-A2-entsyymi vapauttaa sitä. Arakidonihaposta voidaan metabolisoida verisuonia laajentavia tai supistavia yhdisteitä monien polkujen, kuten syklo-oksigenaasi 1- ja 2-entsyymien kautta. Syklo-oksigenaasi 1-entsyymi (COX-1) ilmentyy jatkuvasti monissa kudoksissa ja syklo-oksigenaasi 2-entsyymi (COX-2) ilmentyy tilapäisesti voimakkaasti esimerkiksi tulehduksen aikana. Syklo-oksigenaasi hapettaa arakidonihapon endoperoksiedeiksi PGG<sub>2</sub> ja PGH<sub>2</sub>, jotka muutetaan eteenpäin prostaglandiineiksi ja tromboksaaniksi. (More ym. 2014: 214.) Vähemmän tunnettuna on syklo-oksigenaasi 3-entsyymien (COX-3) toiminta, jonka ilmeneminen aivoissa on todennäköisempää, mutta sen fysiologista merkitystä ei vielä kunnolla tunneta (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 217).

Syklo-oksigenaasi 1-entsyymi tuottaa prostanoideja, kuten prostasykliiniä esimerkiksi verisuonten endoteelissä ja mahalaukun limakalvoa suojaavaa prostaglandiini E<sub>2</sub>. Syklo-oksigenaasi 2-entsyymi tuottaa tulehdusta välittäviä prostanoideja ja tromboksaania. Useimmiten normaalisoluisissa ei esiinny COX-2-entsyymiä, mutta se aktivoituu muun muassa tulehduksessa lisääntyvien sytokiinien, bakteerien metaboliatuotteiden ja kasvutekijöiden vaikutuksesta. (Koulu & Mervaala 2013: 308–309.)

Perinteiset tulehduskipulääkkeet estävät sekä COX-1- ja COX-2-entsyymien toimintaa, vähentäen tulehdukseen osallistuvien prostanoidien synteesiä, mutta samalla myös mahalaukun ja pohjukaissuolen limakalvoja suojaavaa prostaglandiinia ei pääse syntymään. Haittavaikutusten minimoimiseksi on kehitetty COX-2-entsyymien selektiivisiä tulehduskipulääkkeitä, jotka pyrkivät estämään vain COX-2-entsyymien toimintaa. (Koulu & Mervaala 2013: 309–310.)

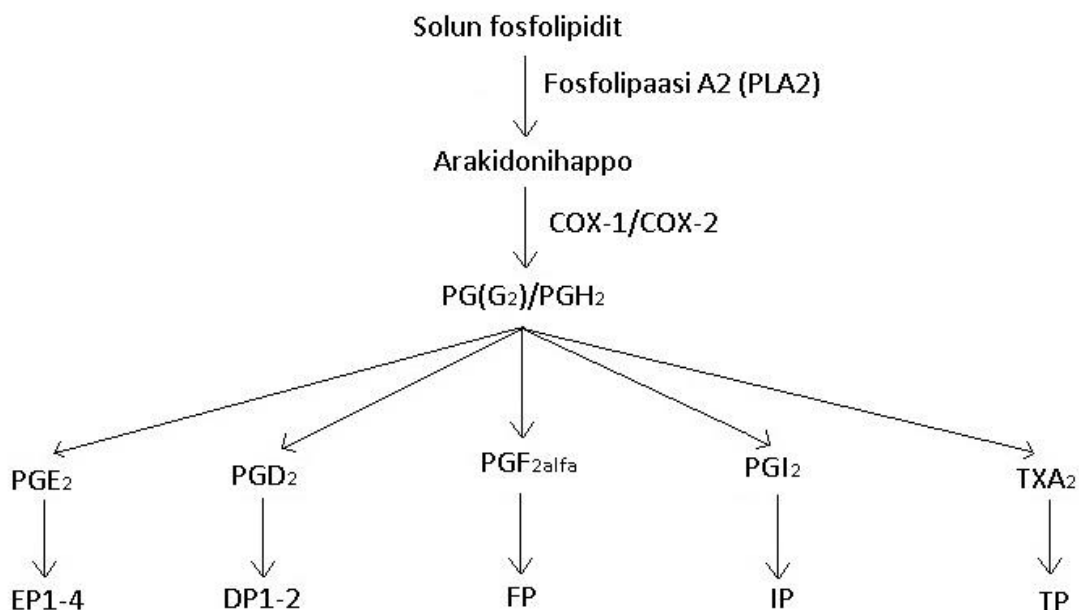
### 3.2 Prostanoidit

Eikosanoidit ovat 20 hiiltä sisältäviä monityydyttymättömiä rasvahappoja. Sitä käytetään yhteisnimityksenä prostanoideista ja leukotrieeneistä. Niiden tärkein esiaste ihmisoluissa on arakidonihappo. (Koulu & Mervaala 2013: 307.) Prostanoideihin

kuuluvat prostasykliini, tromboksaani ja prostaglandiinit. Prostanoideilla on merkittävä rooli erityisesti tulehdusvasteen aikaansaamisessa. Niiden syntetisoiminen kasvaa merkittävästi tulehtuneessa kudoksessa, ja ne vaikuttavat tulehduksen pääoireiden syntyyn. Vaikka yksittäisten prostanooidien ominaisuudet tunnetaan hyvin akuutin tulehduksen aikana, niiden merkitys tulehduksen päättyessä on yhä kiisteltyä. (Ricotti & FitzGerald 2011: 1.)

### 3.2.1 Prostanoidien synty

Elimistö pystyy tuottamaan ravinnosta saatavasta tai linolihaposta muodostetusta arakidonihaposta prostanoideja prostaglandiinisyntetaasin eli syklo-oksigenaasi 1 ja 2 (COX-1, COX-2) entsyymien kautta (kuva 7). Prostanoideja pystyvät syntetisoimaan lähes kaikki elimistön solut ja niiden syntymistä säätelee arakidonihapon vapautuminen, joka tapahtuu entsyymaattisesti fosfolipaasien katalysoimana solukalvojen fosfolipideistä. (More ym. 2014: 214; Pelkonen & Ruskoaho 2003: 215.) Syklo-oksigenaasi hapettaa arakidonihapon lyhytikäiseksi endoperoksidiksi PGG<sub>2</sub>, joka muokataan edelleen endoperoksidi PGH<sub>2</sub>:ksi. Tämä endoperoksidi metaboloituu edelleen useiksi prostanoideiksi kuten prostaglandiini E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandiini D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), prostaglandiini F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), sekä prostasykliini (PGI<sub>2</sub>) ja tromboksaani (TXA<sub>2</sub>). (More ym. 2014: 214.) Prostanoideihin kuuluvilla aineilla on tärkeitä tehtäviä elimistössä, kuten muun muassa sileälihaksen tonuksen säätely ja veren hyytyminen. (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 218-9.)



Kuva 7. Solun fosfolipideistä fosfolipaasi-A2-entsyymin (PLA2) avulla saadusta arakidonihaposta tuotetaan syklo-oksigenaasi-entsyymien (COX-1/COX-2) välityksellä endoperoksiedeja (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>), josta metabolisoituu prostanoideja (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>alfa, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>). Kuvaan on myös merkitty prostanoidien vaikutusreseptorit (EP1-4, DP1-4, FP, IP, TP). (mukaillen Koulu & Mervaala 2013: 308–313.)

### 3.2.2 Prostanoidien vaikutusmekanismit

Prostanoidien vaikutukset välittyvät kohdesoluihin spesifisten G-proteiinikytkentäisten solukalvoreseptorien kautta, jota on viittä eri päätyyppiä EP1-4, DP1-2, FP, IP ja TP. EP-reseptorit on jaettu neljään eri alaryhmään ja DP-reseptorit kahteen eri alaryhmään. Reseptorit eivät ole spesifisiä tietyille prostanoideille, vaan suurempi pitoisuus muuta prostanoidia voi aiheuttaa reseptorin aktivaation. Reseptoreiden välittämät erilaiset vaikutukset ovat taulukossa 7. (Koulu & Mervaala 2013: 310–311.)

Taulukko 7. Prostanoidien reseptorityypit, niiden agonistit eli aktivoijat, reseptorien esiintyminen, transduktio- eli solutasomekanismit ja niiden kautta välittyvät vaikutukset (Koulu & Mervaala 311).

Reseptori-tyyppi	Agonisti	Esiintyminen	Transduktio-mekanismi	Vaikutus
DP	PGD <sub>2</sub>	ileum, keuhkot, maha, kohtu	cAMP ↑	keuhkoputkien supistus, verisuonten laajeneminen, verihytaleiden aggregaation esto
EP <sub>1</sub>	PGE <sub>2</sub> sulprostoni	munuaiset, keuhkot	Ca <sup>2+</sup> ↑, PKC ↑	sileän lihaksen supistus
EP <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> misoprostoli	keuhkot, istukka, kohtu, maksa, ileum, maha, tyymus, perna	cAMP ↑	sileän lihaksen relaksaatio, valkosolujen aktivaation esto
EP <sub>3</sub>	PGE <sub>2</sub> enprostiliili, misoprostoli, sulprostoni	munuaiset, kohtu, maha, aivot, keuhkot, tyymus, perna	cAMP ↓, Ca <sup>2+</sup> ↑, PKC ↑	sileän lihaksen supistus, mahahapon erityksen esto, lipolyysin esto, noradrenaliinin vapautumisen esto
EP <sub>4</sub>	PGE <sub>2</sub>	ileum, maha, tyymus, perna, keuhkot, sydän, kohtu	cAMP ↑	sileän lihaksen relaksaatio
FP	PGF <sub>2α</sub> fluprostenoli, kloprostenoli, latanoprosti	munasarjat, ohutsuoli, paksusuoli, eturauhanen, kivekset, tyymus, perna	Ca <sup>2+</sup> ↑, PKC ↑	sileän lihaksen supistus, luteolyysi
IP	PGI <sub>2</sub> >> PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , sisaprosti, iloprosti	verisuonet, verihytaleet, sydän, munuaiset	Ca <sup>2+</sup> ↑, PKC ↑, cAMP ↑	valtimon sileän lihaksen relaksaatio, verihytaleiden aggregaation esto
TP	TXA <sub>2</sub>	tyymus, perna, keuhkot, munuaiset, sydän, kohtu, verihytaleet	Ca <sup>2+</sup> ↑, PKC ↑	sileän lihaksen supistus, verihytalaiden aggregaatio

Reseptorien toisiohettijärjestelmät vaihtelevat reseptorityypeittäin, joka osittain selittää prostanoidien vaihtelevat vaikutukset (Koulu & Mervaala 2013: 311). Prostanoidit ovat paikallisvaikuttavia välittäjäaineita, ja niiden metabolia on hyvin nopeaa. Verenkierrossa monien prostanoidien puoliintumisaika on vain alle minuutti, ja niitä hajottavia entsyymejä syntyy kaikissa kudoksissa. (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 217-8.)

Prostanoideilla on monia vaikutuksia verisuonissa, mutta yleisesti ottaen prostaglandiini E<sub>2</sub>, prostasykliini ja useimmiten prostaglandiini D<sub>2</sub> ovat verisuonia laajentavia (Koulu & Mervaala 2013: 311–312). Prostasykliinia uskotaan syntyvän verisuonten endoteelisoluissa COX-2-entsyymien kautta, ja sillä on verisuonia laajentavia ominaisuuksia, sekä se estää trombosittejä eli verihytaleita tarttumasta toisiinsa (Partanen 2013: 1424–1426). Prostasykliini hydrolysoituu kolmen minuutin puoliintumisajalla inaktiiviseen muotoon 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 218). Tromboksaania uskotaan syntyvän verihytaleissa COX-1-entsyymien kautta, ja sillä on verisuonia supistavia ominaisuuksia, sekä se lisää trombositien tarttumista toisiinsa eli niiden aggregaatiota (Partanen 2013: 1424–1426). Tromboksaani metaboloituu 30 sekunnin puoliintumisajalla inaktiiviseen muotoon TXB<sub>2</sub> (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 218).

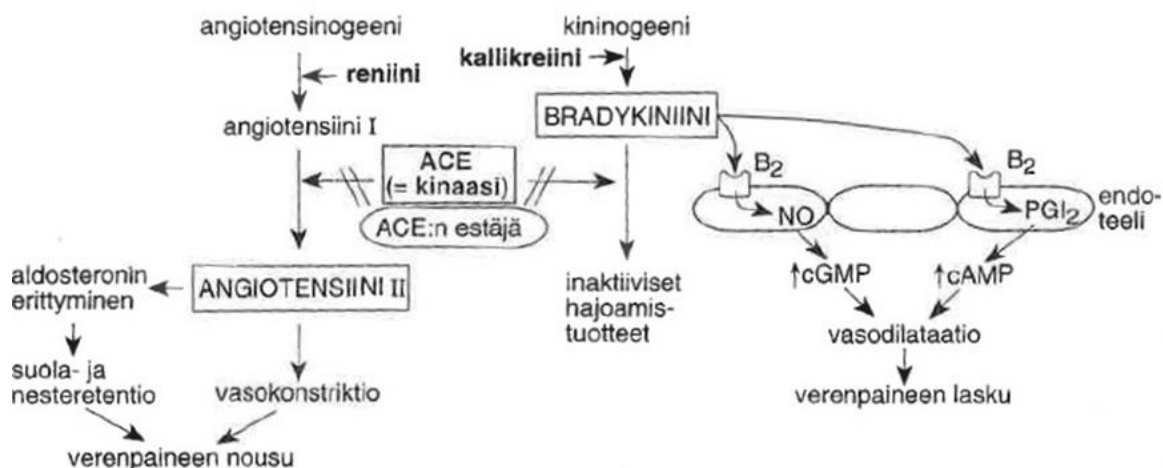


ulkoisilta tekijöiltä kuten hydrofiilisilta antibiooteilta, sappihapolta ja solukalvon hajoamiselta. Lipopolysakkaridi koostuu hydrofobisesta lipidi-A:sta, hydrofiilisestä ydinoligosakkaridista ja O-polysakkaridista eli O-antigeenistä. Sen endotoksiiniset vaikutukset perustuvat rasvaliukoiseen lipidi-A:han, ja sen vesiliukoinen polysakkaridiosa lisää sen toksisuutta. Lipopolysakkaridi antaa gram-negatiivisille bakteereille paremman resistenssin joitakin lääkkeitä kohtaan kuin gram-positiivisilla on. Kiniinejä voidaan muodostaa myös muissa kudoksissa ja elimissä olevien seriiniproteaasien avulla. (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 225-6, More ym. 2014: 226-4.)

Plasman kiniinit hajoavat nopeasti, ja niiden puoliintumisaika on alle yksi minuutti. Kininaasit hajottavat bradykiniinin inaktiiviseen peptidimuotoon. Kininaasi-II-entsyymi on sama kuin angiotensiiniä konvertoiva entsyymi 1 (ACE-1) (kuva 8), joka muuttaa reniini-angiotensiinijärjestelmässä angiotensiini I verisuonia supistavaan angiotensiini-II muotoon, mutta pilkkoo myös bradykiniinin inaktiivisiksi fragmenteiksi. (Pelkonen & Ruskoaho 2003: 227.)

### 3.3.2 Bradykiniinin vaikutusmekanismit

Yleisesti bradykiniiniä on pidetty verisuonia laajentavana tekijänä, joka vapauttaa prostasykliiniä ja typpioksidia endoteelisoluissa (kuva 9) (More ym. 2014: 213). Useiden tutkimusten mukaan tulehdustila kuitenkin muokkaa bradykiniinin vaikutusreittejä. Bradykiniinin tiedetään aiheuttavan verisuonissa laajentumista sekä supistumista, ja sen vaikutus riippuu verisuoni- ja eläinmallista. (Erol ym. 2012: 421.) Eläinkokeilla on osoitettu, että tulehdusta aiheuttava lipopolysakkaridi alentaa bradykiniinin laajentavia vaikutuksia muun muassa rotan ja porsaan aortassa typpioksidin ja syklo-oksigenaasin vaikutusreittien muutoksilla (Erol ym. 2012: 421, More ym. 2014: 209.)



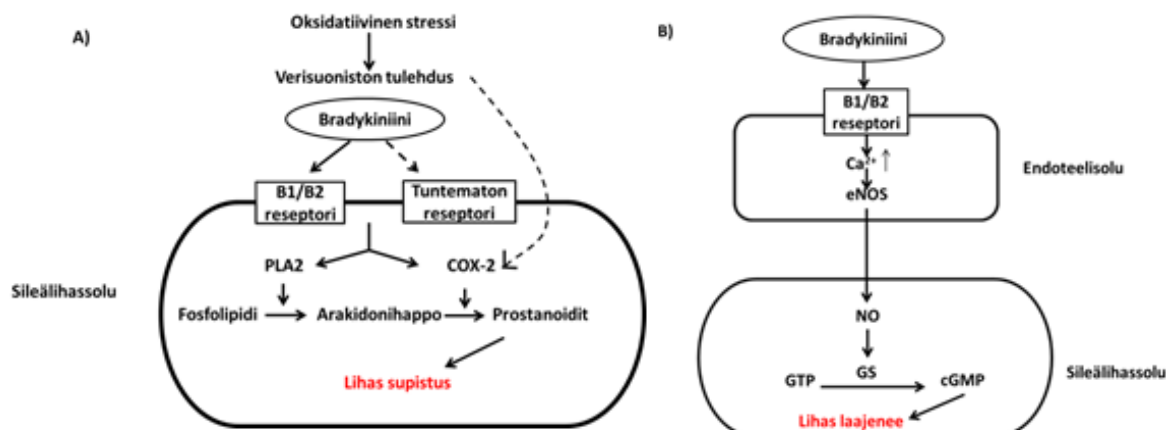
Kuva 9. Bradykiniini verisuonen säätelijänä (Pelkonen & Ruskoaho 1998: 296)

Bradykiniinin vaikutukset välittyvät bradykiniinin reseptorien tyyppi 1:n (B1) ja tyyppi 2:n (B2) kautta. Reseptorityyppi 2 ilmentyy monissa kudoksissa, kun taas reseptorityyppi 1 esiintymisen uskotaan aktivoituvan vasta tulehduksen tai kudonvaurion jälkeen sytokiinin ja endotoksiinien vaikutuksesta. (Erol ym. 2012: 420, More ym. 2014: 209.) Bradykiniinillä on suuri affiniteetti reseptori 2:een, ja sen uskotaan olevan ensisijaisesti bradykiniinin fysiologisten toimintojen välittäjä normaalitilassa (Erol ym. 2012: 420). Bradykiniini tuottaa normaalitilassa B2-reseptorin välityksellä verisuonta laajentavaa typpioksidia ja prostasykliiniä. (More ym. 2014: 213.)

Tulehduksessa solujen COX-2-entsyymien ilmentyminen kasvaa ja bradykiniinin vielä lisää sen toimintaa. Normaalisti COX-2-entsyymi tuottaa verisuonia laajentavaa prostasykliiniä ja typpioksidia, mutta tulehduksessa vaikutusmekanismi näyttäisi muuttuvan tuottamaan verisuonia supistavia prostanoideja. Prostanoidia syntetisoidaan arakidonihaposta COX-2-entsyymien välityksellä. Fosfolipaasi-A2-entsyymi (PLA2) katalysoi fosfolipidien keskimmäisen esterisidoksen pilkkoutumista muodostaen lysofosfolipidiä ja vapaata rasvahappoa, kuten arakidonihappoa. Tämä lisää prostanoidien tuottoa (kuva 10a). (Erol ym. 2012: 421.)

Terveissä soluissa bradykiniini lisää typpioksidin (NO) tuottoa endoteelin typpioksidisyntaasi (eNOS) entsyymien kautta. Typpioksidi lisää sileälihasta laajentavaa syklistä guanosiinimonofosfaatin (cGMP) tuottoa guanosiinitrifosfaatista (GTP) aktivoimalla guanylaattisyklaasientsyymien (GS) (kuva 10b) (Erol ym. 2012: 421).





Kuva 10. Bradykiniinin mahdollisia supistavia (A) ja laajentavia (B) vaikutusmekanismeja sileälihassoluun

#### 4 Työn tausta ja tarkoitus

Tämän insinööriyön tarkoituksena oli pystyttää soluviljelymalli humaaneilla endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassoluilla (CASMIC), aiheuttaa soluille keinotekoinen tulehdus *E. colista* peräisin olevalla LPS-endotoksiinin käsittelyllä ja selvittää bradykiniinin mahdollisia erilaisia vaikutusreittejä terveissä ja tulehtuneissa soluissa. Tutkimus toteutettiin erikseen kahdella primaarilla solumallilla, endoteeli- ja sileälihassoluilla.

Työ oli jatkotutkimus ryhmän aiempien eläintutkimusten jälkeen, joissa tutkittiin eri-ikäisten geneettisesti korkeaverenpaineisten rottien (SHR) verisuonten tonusta. Verrokkeina käytettiin terveitä rottia (WKY) (Siltari ym. 2016 julkaistava).

##### *Tutkimusasetelma*

Tutkimusasetelmassa käytettiin 48-kuoppalevyä, jolla suoritettiin kahdeksan eri muuttujien lisäystä eli koesarjaa kerralla. Jokaiseen kuoppaan siirrostettiin noin 10 000 solua. Solumallista riippuen, soluja inkuboitii 24–72 h (+37 °C 5 % CO<sub>2</sub>). Solujen kasvatusliuos vaihdettiin ja koesarjojen 5–8 kuoppiin lisättiin 200 ng/ml tulehdusta aiheuttavaa lipopolysakkaridia (LPS). Tässä tutkimuksessa käytettiin serotyyppin O111:B4 lipopolysakkaridia, joka oli eristetty fenolin avulla *E.colista*, ja sen aktiivisuus oli 500 000 EU/mg. Solujen inkuboitii 24h. Bradykiniiniä (BK) lisättiin kolmena eri pitoisuutena koesarjoihin 2–4 sekä 6–8 ja inkuboitii 1h. Koesarjojen lipopolysakkaridin ja bradykiniinin lisäykset on esitetty alla olevassa taulukossa (taulukko 8). Tämän

jälkeen jokaisen kuopan kasvatusliuos kerättiin talteen eppendorf-putkiin. Näytteet pakastettiin -80 °C:seen jatkotutkimuksia varten.

Taulukko 8. Koesarjojen lipopolysakkaridin (LPS) ja bradykiniinin (BK) lisäykset.

Koesarja	1	2	3	4	5	6	7	8
LPS (200ng/ml)	-	-	-	-	+	+	+	+
BK (μM)	-	1	3,3	10	-	1	3,3	10

## 5 Materiaalit ja menetelmät

### 5.1 Soluviljelylaboratorion pystytys

Työt tehtiin solulaboratoriossa Helsingin yliopiston Biomedicumien lääketieteellisen tiedekunnan farmakologian osastolla. Laboratorio oli varustettu solutöihin tarvittavilla laitteilla, kuten sentrifuugi, laminaarivirtauskaappi, inkubaattori, käänteismikroskooppi ja lämpövesihaude sekä automaattinen hemosytometri. Tutkimuksessa käytettävien laitteiden, materiaalien ja tarvikkeiden valmistajien tiedot löytyvät erillisestä liitteestä (Liite 1).

Laboratoriossa oli otettava huomioon tarvittavat puhtaustoimenpiteet. Laboratorioon ei saanut viedä ruokaa tai juotavaa, tiloihin sai mennä vain puhtain sisäkengin, laboratoriotakki ja hansikkaat päällä. Kontaminaatoriskien vähentämiseksi laminaarivirtauskaapin UV-valoa pidettiin päällä aina yön yli sekä viikonloppuisin. Kaikki tavara mikä vietiin laminaarivirtauskaappiin, ja millä soluja käsiteltiin, täytyi olla joko autaklavoinnin tai steriilisuodatuksen avulla steriilejä, sekä kaikki tavara tuli suihkuttaa desinfioidulla 70 %:lla etanolilla.

Laboratorion ylläpitoon kuului viikoittainen lämpövesihauteen tyhjennys, huolellinen viinaus 70 %:lla etanolilla ja täyttö ultrapuhtaalla MilliQ-vedellä. Aspiraatton jätettä tyhjennettiin viikoittain, ja siihen lisättiin Rely+On Virkon desinfiointiainetta estämään mahdolliset kontaminaatiot. Kuukausittain suoritettiin inkubaattorin vesiastian tyhjennys ja huolellinen desinfiointi 70 %:lla etanolilla. Seurattiin myös inkubaattorin CO<sub>2</sub>-painepullon täyttöastetta, jottei hiilidioksidi pääse loppumaan inkubaattorista.

Ennen soluviljelytöiden varsinaista aloittamista tehtiin useita esivalmisteluita. Molemmille solulinjoille valmistettiin omat kasvatusliuoksensa. Endoteelisolujen kasvatusliuos oli valmis kaupallinen liuos, johon lisättiin tarvittavat suplementit. Sileälihassolujen kasvatusliuos valmistettiin itse erillisen ohjeen mukaisesti (liite 2). Endoteelisolujen astioiden pinnoitus suoritettiin huoneenlämmössä 0,1-prosenttisella gelatiiniliuoksella, joka valmistettiin liitteen 3 ohjeen mukaisesti. LPS-endotoksiini valmistettiin liuottamalla ja laimentamalla se steriiliin PBS-liuokseen. Kuoppalevyn kuoppiin LPS-endotoksiinin loppupitoisuutena oli 200 ng/ml. Bradykiniini valmistettiin liuottamalla ja laimentamalla se steriiliin PBS-liuokseen. Kuoppalevyn kuopissa bradykiniinin loppupitoisuudet olivat 1  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$  ja 10  $\mu\text{M}$ .

## 5.2 Soluviljelmien ylläpito

### 5.2.1 HUVEC-endoteelisolut

Tutkimusta varten saatiin HUVEC-endoteelisoluja Helsingin yliopiston professori Kari Alitalon tutkimusryhmän tohtori Riikka Kivelältä. Solut oli alun perin eristetty napanuoran laskimosta ja olivat saadessa siirrostusnumerossa P3.

HUVEC-endoteelisolujen kasvatusliuoksena käytettiin kaupallista endoteelisolujen kasvatusliuosta (ECBM MV, PromoCell, C-22220), jota käytettiin valmistajan ohjeen mukaan. Kasvutekijät, jotka oli pakattu valmiiseen supplementtipussiin (PromoCell, C-29220) sulatettiin ja lisättiin kasvatusliuokseen. Lopullinen kasvatusliuos sisälsi 5 % naudan sikiön seerumia (FCS), 0,4 % endoteelisolujen kasvutekijöitä (ECGS), 10 ng/ml ihmisen rekombinanttisia epidermaalisia kasvutekijöitä (EGF), 90  $\mu\text{g/ml}$  hepariinia ja 1  $\mu\text{g/ml}$  hydrokortisonia. Kasvatusliuos vaihdettiin kahden päivän välein tuoreeseen kasvatusliuokseen samalla, kun solut siirrostettiin uuteen siirrostusnumeroon (P, pasaasi) saavutettuaan oikean konfluenssin. Endoteelisolujen viljelyssä kaikki 75  $\text{cm}^2$ :n kasvatuspullot ja 48-kuoppalevyt on päällystetty 0,1-prosenttisellä gelatiinilla, jonka valmistusohje on liitteessä (Liite 3).

Ennen 48-kuoppalevyn koesarjoja, soluja kasvatettiin 75  $\text{cm}^2$ :n kasvatuspulloissa. Solut siirrostettiin viljelmien saavuttaessa 80–90-prosentin konfluentin. Vanha media aspiroitiin pois. Solut pestiin kertaalleen esilämmitetyllä PBS-liuoksella. Solut irrotettiin solujen irrotusliuoksella (HyQTase). Liuoksen annettiin vaikuttaa noin kolme minuuttia

inkubaattorissa (+37 °C 5 % CO<sub>2</sub>), ja irrotusta seurattiin mikroskoopilla. Solut ja tuore kasvatusliuos, jolla oli huuhdottu elatuspullo, kerättiin sentrifugiputkeen ja sentrifugoitii huoneenlämmössä 350 x g:n voimalla neljä minuuttia. Supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin esilämmitettyyn tuoreeseen mediaan. Solut värjättiin Trypan Bluella 1:2-laimennoksella, ja laskettiin automaattisella hemosytometrillä. Soluja pakastettiin eri siirrostuskerroilla -80 °C:een (24h) kautta nestetyyppeen myöhempiä koesarjoja varten. Solut pakastettiin 5 %:ssa DMSO ja 5 %:ssa FBS liuoksessa.

Vaihtoehtoisena menetelmänä solujen siirrostuksessa soluja ei sentrifugoitu, vaan irrotuksen jälkeen solut siirrettiin irrotusliuoksen (HyQTase) kanssa tuoreeseen mediaan, laskettiin automaattisella hemosytometrillä, ja siirrostettiin uudelle alustalle. Irrotusliuos inaktivoituu lämpökaapissa (+37 °C) yhdessä tunnissa. Tämä menetelmä on soluille hellempi irrotusmenetelmä.

### 5.2.2 CASMC-sileälihassolut

Tutkimusta varten saatiin CASMC-sileälihassoluja Turun yliopiston farmakologian osastolta tohtorikoulutettava Anna Huhtiselta. Solut oli alun perin eristetty ihmisen sepelvaltimosta. Solut olivat nestetyypessä ja sisälsivät montaa eri siirrostusnumeroa (P6, P9, ja P10).

CASMC-sileälihassolujen kasvatusliuoksena käytettiin MCDB 131 Mediumia, johon lisättiin kasvutekijöitä, antibiootteja sekä muita solujen tarvitsemia yhdisteitä. Kasvatusliuoksen valmistusohje on liitteessä (Liite 2). Lopullinen kasvatusliuos sisälsi 5 % naudan sikiön seerumia (FBS), 5 µg/ml insuliinia, 0,5 ng/ml epidermaalisia kasvutekijöitä (EGF), 2 ng/ml ihmisen rekombinanttisia fibroblastisia kasvutekijöitä (FGF) ja 50 U/µg/ml penisilliini-streptomysiini-antibioottiyhdistelmää. Solujen kunto tarkastettiin käänteismikroskoopilla 1–2 päivän välein. Kasvatusliuos vaihdettiin kahden päivän välein, ja sen määrää lisättiin solujen konfluenttisuuden kasvaessa. Kasvatusliuosta ei vaihdettu koskaan kokonaan, vaan kasvatusliuoksen vaihdon yhteydessä vanhaa ja uutta kasvatusliuosta lisättiin 1:3-suhteella.

Ennen koesarjoja 48-kuoppalevyllä, soluja kasvatettiin 75 cm<sup>2</sup>:n kasvatuspulloissa. Solut siirrostettiin viljelmien saavuttaessa 70–90 %:n konfluentin. Vanhaa mediaa otettiin talteen, ja loput asiroitiin pois. Solut pestiin kertaalleen huoneenlämpöisellä PBS-liuoksella. Solut irrotettiin solujen irrotusliuoksella (HyQTase). Liuoksen annettiin

vaikuttaa noin 3 minuuttia inkubaattorissa (+37 °C 5 % CO<sub>2</sub>) ja irrotusta seurattiin mikroskoopilla. Solut ja tuore kasvatusliuos, jolla oli huuhdottu elatuspullo, kerättiin sentrifugiputkeen ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä 800 x g:n voimalla kolme minuuttia. Supernatantti poistettiin, ja solut resuspensoitiin tuoreeseen mediaan. Solut värjättiin Trypan Bluella 1:2-laimennoksella ja laskettiin automaattisella hemosytometrillä. Uuden siirrostuksen yhteydessä käytettiin vanhan ja tuoreen median yhdistelmää suhteessa 1:3. Soluja ei pakastettu, mutta niitä olisi voinut pakastaa 10 %:ssa DMSO ja 10 %:ssa FBS liuoksessa.

Vaihtoehtoisena menetelmänä solujen siirrostuksessa soluja ei sentrifugoitu, vaan irrotuksen jälkeen solut siirrettiin irrotusliuoksen (HyQTase) kanssa tuoreeseen mediaan, laskettiin automaattisella hemosytometrillä ja siirrostettiin uudelle alustalle. Irrotusliuos inaktivoituu lämpökaapissa (+37 °C) yhdessä tunnissa. Tämä menetelmä on soluille hellempi irrotusmenetelmä.

### 5.3 Näyttemateriaalit

#### 5.3.1 Kasvatusliuos

Kuoppalevyiltä kerättiin kasvatusliuosta koesarjan päätyttyä. HUVEC-koesarjoissa kasvatusliuoksena käytettiin ECBM MV -mediaa ja CASMC-koesarjoissa MCDB 131M -mediaa. Näytteet kerättiin eppendorf-putkiin ja pakastettiin -80 °C:seen.

Kasvatusliuoksesta oli tarkoituksena tutkia ELISA:n avulla prostasykliinin (PGI<sub>2</sub>) metaboliitin 6-keto-PGI<sub>1α</sub>, prostaglandiinin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandiinin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), ja sykliin guanosiinimonofosfaatin (cGMP) pitoisuus, sekä kolorimetrisellä menetelmällä kokonaistyyppioksidin (NO<sub>x</sub>). Tavoitteena oli tutkia myös tromboksaanin (TXA<sub>2</sub>) metaboliitin TXB<sub>2</sub>:n pitoisuutta, mutta kasvatusliuoksen sisältämä FBS-kasvutekijä häiritsi mittausta.

#### 5.3.2 Solut

48-kuoppalevyissä HUVEC- ja CASMC-solunäytteitä sisältävien kuoppien pinnoille pipetoitiin 150 µl PBS-liuosta, johon oli lisätty proteaasi-inhibiittoria. Solut irrotettiin

mekaanisesti siirrostussilmukkaa käyttäen. Solut ja PBS-liuos pipetoitiin eppendorf-putkiin ja pakastettiin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen tutkimusryhmän myöhempiä jatkotutkimuksia varten.

#### 5.4 Tulehduksen mittaus

Solujen lipopolysakkaridista (LPS) johtuvaa tulehdustilaa tutkittiin Quansynsin Human Cytokine High Sensitive (9-plex) -kitillä valmistajan ohjeiden mukaan. Kitin tarkemmat tiedot löytyvät liitteestä 1. Kitti on uudenlainen multiplex ELISA, jossa voidaan samanaikaisesti mitata monen eri tulehdusvälittäjäaineen eli sytokiinin pitoisuutta. Havaitsemismenetelmänä käytetään kemiluminesenssiä. Kitillä mitattiin interleukiini-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleukiini-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukiini-4 (IL-4), interleukiini-5 (IL-5), interleukiini-6 (IL6), interleukiini-10 (IL-10), interleukiini-17 (IL-17), interferoni gamman (IFN- $\gamma$ ) ja tuumorinekroositekijän alfan (TNF- $\alpha$ ) sytokiinien pitoisuuksia taulukon 9 mittausalueilla.

Taulukko 9. Human Cytokine High Sensitive (9-plex) -sytkiinin mittausalueet

Sytokiini	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-17	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
Mittaus- alue (pg/ml)	1,78– 1300	4,12– 3070	0,03– 23	0,4– 360	0,48– 350	1,03– 950	1,65– 1200	0,11– 80	0,60– 440

#### 5.5 Kasvatusliuosnäytteiden mittaus

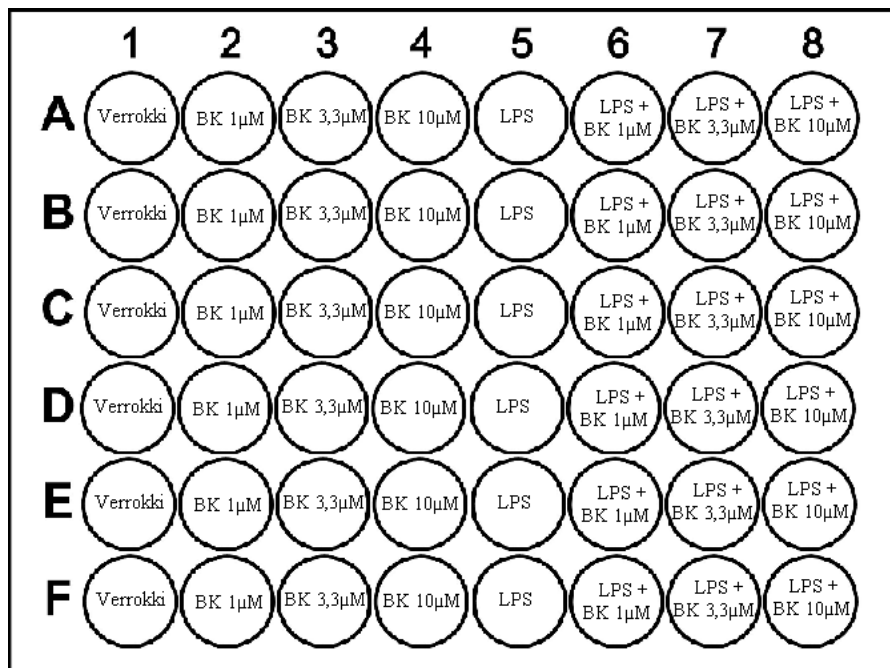
Kasvatusliuosnäytteistä tutkittiin prostanoidien (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), syklisen GMP:n ja kokonaistyppioksidin (NOx) pitoisuuksia kaupallisilla ELISA-kiteillä (6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  EIA Kit, PGE<sub>2</sub> EIA Kit, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  EIA Kit, cGMP EIA Kit) ja kolorimetrisellä nitraattinitriittikiteillä taulukon 10 mittausalueilla. ELISA-kittien tarkemmat tiedot löytyvät liitteestä 1.

Taulukko 10. ELISA- ja nitraatti-nitriittimenetelmän mittausalueet.

Kitti	Mittausalueet
6-keto prostaglandiini F1 $\alpha$ (PGI <sub>2</sub> :n metaboliitti)	1,6 – 1000 pg/ml
PGE <sub>2</sub>	7,8 – 1000 pg/ml
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	3,9 – 500 pg/ml
Nitraatti-nitriitti (NOx)	0 – 35 $\mu$ M
cGMP	0,23 – 30 pmol/ml

### 5.6 Tilastolliset analyysit

Kasvatusliuosnäytteitä tutkittiin tulehdusvälittäjäaineiden, ELISA:n, kokonaistyyppioksidin ja syklisen guanosiinimonofosfaatin määritysten avulla eri pasaaseista endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassoluista (CASMC). Yhdessä tutkimusasetelmassa (taulukko 6, kuva 11) oli kahdeksan eri muuttujien (LPS, BK) lisäystä, joista jokaisesta tehtiin kuusi toistoa (n=6). Kiteillä tutkittiin kaikkia kuutta toistoa, poikkeuksena tulehdusvälittäjäaineiden määrytyksissä kuudesta toistosta valittiin satunnaisesti neljä näytettä tutkittavaksi eli tutkimukset on suoritettu neljällä toistolla (n=4). Kiteillä näytteistä tehtiin yksittäis- sekä rinnakkaismäärytyksiä.



Kuva 11. Tutkimusasetelma eri muuttujien (LPS, BK) lisäyksillä 48-kuoppalevyllä.

Tuloksien kuvat piirrettiin GraphPad Prism 5 -ohjelmalla, analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä ja Tukeyn jälkitestillä, sekä kaksisuuntaisella t-testillä. Yksisuuntaisella varianssianalyysillä tutkittiin koesarjojen keskiarvojen tilastollisesti merkitsevää eroa. Tukeyn jälkitestillä vertailtiin ryhmien keskiarvojen eroja toisiinsa. Kaksisuuntaisella t-testillä tutkittiin tutkimusasetelman kahden koesarjojen arvojen välisiä eroja ja sitä eroavatko ne toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Mahdolliset poikkeamat poistettiin havaittujen määritysten arvoista ala- ja yläkvartiilien sisäaitojen avulla ( $Q1-1,5*IQ$ ,  $Q3+1,5*IQ$ ). P-arvot alle 0,05 oletettiin tilastollisesti merkitseväksi eroiksi.

## 6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

### 6.1 Soluviljelymallien pystytys

Primaarien, endoteeli- (HUVEC) sekä sileälihassolun (CASM), soluviljelymallien pystytys onnistui. Solut saatiin kasvamaan vakaasti ja tasaisesti. Alemmasta lähtöpasaasista (P3) saadut endoteelisolut olivat hyvin nopeakasvuisia ja vaativat siirrostusta kolmen päivän välein. Soluja pystyttiin siirrostamaan jopa pasaasiin 16. Viljelyiden aikana niistä saatiin tuotettua hyvä solubarasto nestetyyppisäilytykseen (-80 °C). Ylemmästä lähtöpasaasista (P6–P10) saadut sileälihassolut olivat hidaskasvuisia ja vaativat siirrostusta kahden tai kolmen viikon välein. Ne eivät kestäneet kovinkaan montaa siirrostusta, eikä niitä pystytty pakastamaan.

Soluviljelmien kuntoa tarkastettiin mikroskopoinnin avulla muutaman päivän välein kasvatusliuosten vaihdon ja siirrostusten yhteydessä, eikä silmämääräisesti kontaminaatioita havaittu. Aika ajoin sileälihassolut vaikuttivat mikroskopoitaessa hieman ”stressaantuneilta”, sekä niiden kasvu oli hitaampaa kuin endoteelisolulla. Siirrostuksien yhteydessä automaattisella hemosytometrillä lasketuilla endoteelisolulla elävien solujen määrä oli tasaisesti yli 90 %. Sileälihassoluilla määrä oli alempi, noin 70 %, mutta se parani 80 %:iin, kun siirrostuksen yhteydessä tapahtuva sentrifugointi jätettiin pois. Näin soluja pystyttiin käsittelemään varovaisemmin.



## 6.2 Tulehdusvälittäjänaineiden mittaust

Endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassolujen (CASMC) kasvatusliuoksista mitattiin tulehdusvälittäjäaineiden eli sytokiinien pitoisuudet (taulukko 11). Mittaukset tehtiin kahdesta eri endoteelisolujen koesarjasta ja kahdesta eri sileälihassolujen koesarjasta. Tuloksissa on vertailtu terveiden ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen kasvatusliuosten sytokiinien pitoisuuksia

Taulukko 11. Tulehdusvälittäjäaineiden mittausten tulokset terveiden ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassolujen (CASMC) kasvatusliuoksista. Tilastollisesti merkitsevä ero on merkitty tähdellä (\*\*\*)

<u>Sytokiini</u>	<u>Endoteelisolut (HUVEC)</u>	<u>Sileälihassolu (CASMC)</u>
IL-1 $\alpha$	Alle määritysrajan	Terveet koholla
IL-1 $\beta$	Alle määritysrajan	Tulehtuneet koholla
IL-4	Alle määritysrajan	Alle määritysrajan
IL-5	Tulehtuneet koholla	Tulehtuneet koholla
IL-6	Tulehtuneet koholla (***)	Yli määritysrajan
IL-10	Alle määritysrajan	Alle määritysrajan
IL-17	Tulehtuneet koholla	Arvot samanlaiset
IFN- $\gamma$	Alle määritysrajan	Alle määritysrajan
TNF- $\alpha$	Alle määritysrajan	Terveet koholla

Onnistuneet mittaukset saatiin tehtyä endoteelisoluilla (HUVEC) sytokiineistä IL-5, IL-6 ja IL-17 sekä sileälihassolun (CASMC) sytokiineistä IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-17 ja TNF- $\alpha$ . Osa tuloksista oli alle tai yli määritysrajan. Näytteitä ei voitu laimentaa, sillä kaikki sytokiinien mittaukset tehtiin samalta kuopalta. Sekä endoteeli- että sileälihassolujen kasvatusliuosten sytokiinien pitoisuudet olivat tasaisia. Tilastollisesti merkitsevä ero oli endoteelisolujen IL-6-sytokiinin tuloksissa terveiden ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen kasvatusliuoksen pitoisuudessa ( $P < 0,001$ ). Eroa oli myös sileälihassolujen bradykiniinin annosvasteissa sytokiineilla IL-1a ( $P < 0,01$ ) ja IL-1b ( $P < 0,01$ ) sekä terveissä että LPS-endotoksiinilla käsitellyissä solujen kasvatusliuoksissa.

Sileälihassolujen kasvatusliuosten sytokiinit IL-1 $\beta$  ja IL-5 näyttivät olevan alemmat terveillä kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla, IL-17:n arvot terveillä ja LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla olivat samaa tasoa ja IL-1 $\alpha$ :n sekä TNF- $\alpha$ :n pitoisuudet olivat korkeammat terveillä kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla.

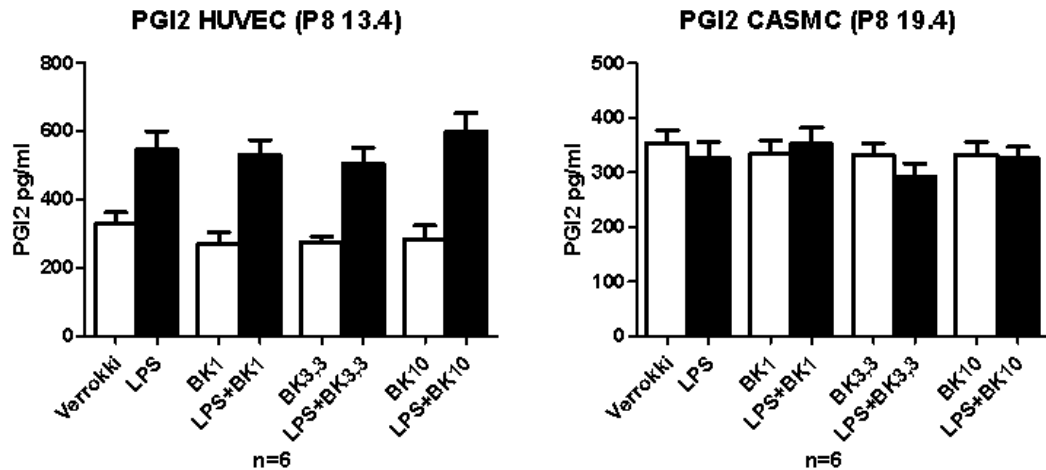
Endoteelisolujen kasvatusliuosten sytokiinien IL-5 ja IL-17 pitoisuudet näyttivät olevan alemmat terveillä kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla.

Endoteelisolujen interleukiini-6-sytokiinin (IL-6) korkea pitoisuus LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen kasvatusliuoksissa oli johdonmukainen ja tulehdukseen viittaava. Aikaisemmassa tutkimuksessa napanuoran laskimon endoteelisolujen tulehdukseen viittaavan IL-6-sytokiinin pitoisuus oli kasvanut, kun soluja oli käsitelty LPS-endotoksiinilla (Chi ym. 2001).

### 6.3 Prostanoidien mittaaminen

#### 6.3.1 Prostasykliini

Prostasykliinin (PGI<sub>2</sub>) metaboliitin 6-keto-PGI<sub>1</sub>α:n mittaustulokset endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassolujen (CASMC) kasvatusliuosnäytteistä on esitetty kuvassa 12. Endoteelisolujen koesarjojen keskiarvojen välillä on tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,001$ ). Endoteelisolujen kasvatusliuosten pitoisuudet olivat tilastollisesti merkitsevästi alempia terveillä kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla ( $P < 0,01$ ). Bradykiniinillä ei ollut vaikutusta terveiden tai LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen prostasykliinin pitoisuuteen. Sileälihassolujen kasvatusliuosten pitoisuudet olivat tasaisia terveillä ja LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla, eikä niiden kesken ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Myöskään bradykiniini ei aiheuttanut muutoksia pitoisuuksiin.



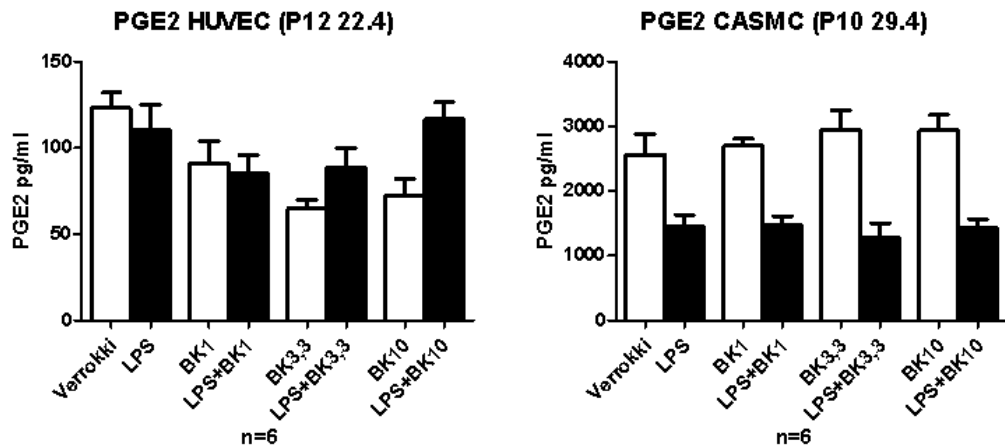
Kuva 12. Prostasykliinin (PGI<sub>2</sub>) metaboliitin 6-keto-PGI<sub>1α</sub>:n pitoisuudet endoteelisolujen (vasen) ja sileälihassolujen (oikea) kasvatusliuoksista. Kuvassa on tutkimusasetelman koesarjat ilman LPS-endotoksiinin käsittelyä (valkoiset palkit) ja 200 ng/ml LPS-endotoksiinin käsittelyn kanssa (mustat palkit), sekä bradykiniinin (BK) lisäykset kolmella 1, 3,3 ja 10 μM pitoisuudella. Endoteelisolujen koesarjojen pitoisuuksien keskiarvoilla oli tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,001$ ).

Verisuonia laajentavan prostasykliinin pitoisuudet endoteelisolujen kasvatusliuoksesta olivat alempia terveillä kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla. Tulokset olivat samankaltaisia kuin aikaisemmassa tutkimuksessa, jossa oli saatu samankaltaisia tuloksia endoteelisolujen prostasykliinin tuoton lisääntymisestä LPS-endotoksiinilla (Kosonen ym. 1998). Sileälihassoluilla prostasykliinin tuotto oli hyvin tasaista. Tulosten perusteella voidaan päätellä, että prostasykliinin tuoton määrää säädellään verisuonessa endoteelisolujen kautta.

### 6.3.2 Prostaglandiini E2

Prostaglandiini E<sub>2</sub>:n (PGE<sub>2</sub>) pitoisuudet endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassolujen (CASMC) kasvatusliuosnäytteistä on esitetty kuvassa 13. Endoteelisolujen koesarjojen keskiarvojen välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,01$ ). Endoteelisolujen pitoisuudet olivat tasaisia terveillä ja LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla. Bradykiniinillä oli terveillä soluilla tilastollisesti merkitsevästi tasoa laskeva vaikutus ( $P < 0,01$ ), muttei vaikutusta LPS-endotoksiinilla käsitelyihin soluihin. Sileälihassolujen koesarjojen keskiarvojen välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,001$ ). Sileälihassolujen pitoisuudet olivat tilastollisesti merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) korkeammat terveillä kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla. Bradykiniini pienensi terveissä

soluissa tilastollisesti merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) PGE2:n pitoisuutta, mutta ei vaikuttanut LPS-endotoksiinilla käsiteltyihin soluihin.



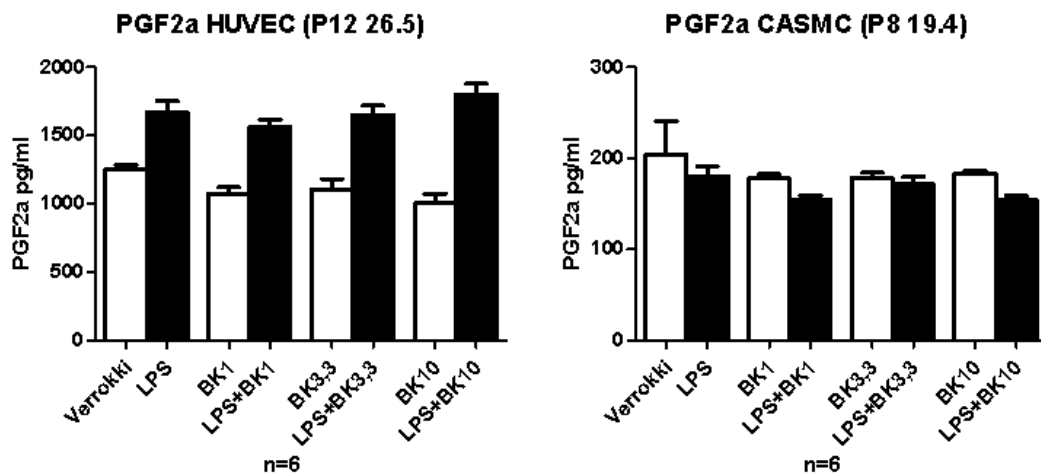
Kuva 13. Prostaglandiini E2:n (PGE2) pitoisuudet endoteelisolujen (vasen) ja sileälihassolujen (oikea) kasvatusliuoksista. Kuvassa on tutkimusasetelman koesarjat ilman LPS-endotoksiinin käsittelyä (valkoiset palkit) ja 200 ng/ml LPS-endotoksiinin käsittelyn kanssa (mustat palkit), sekä bradykiniinin (BK) lisäykset kolmella 1, 3,3 ja 10  $\mu$ M pitoisuudella. Endoteelisolujen koesarjojen pitoisuuksien keskiarvoilla oli tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,01$ ). Sileälihassolujen koesarjojen pitoisuuksien keskiarvoilla oli tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,001$ ).

Verisuonia laajentavan prostaglandiini E2:n (PGE2) pitoisuus laski endoteelisolujen kasvatusliuoksessa bradykiniinin vaikutuksesta. Aikaisemmissa tutkimuksissa bradykiniinin lisäyksellä ei ole saatu prostaglandiini E2:n tuottoon tilastollisesti merkitsevää eroa porsaan endoteelisoluissa tai rotan aortassa (Erol ym. 2012; Islam ym. 2014). Sileälihassolujen kasvatusliuoksessa terveillä oli korkeampi prostaglandiinin pitoisuus kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla, mikä oli odottamatonta, sillä yleensä tulehdus (LPS) stimuloi PGE2:n tuottoa. Tulokset olivat ristiriidassa aikaisempien julkaisujen kanssa, missä PGE2:n tuottoa oli kasvatettu LPS-endotoksiinin avulla (Liu ym. 2007).

### 6.3.3 Prostaglandiini F2 $\alpha$

Prostaglandiini F2 $\alpha$ :n (PGF2 $\alpha$ ) pitoisuudet endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassolujen (C57BL/6J) kasvatusliuosnäytteistä on esitetty kuvassa 14. Endoteelisolujen koesarjojen keskiarvojen välillä oli tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,01$ ). Endoteelisolujen pitoisuudet olivat tilastollisesti merkitsevästi ( $P < 0,01$ ) alempia terveillä kun LPS-

endotoksiinilla käsitellyillä soluilla. Bradykiniinillä ei ollut vaikutusta terveiden tai LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen prostaglandiinin pitoisuuteen. Sileälihassolujen pitoisuudet olivat tasaisia terveillä ja LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla, eikä niiden kesken ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Bradykiniinillä oli LPS-endotoksiinilla käsiteltyihin soluihin tilastollisesti merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) laskeva vaikutus, muttei vaikutusta terveisiin soluihin.



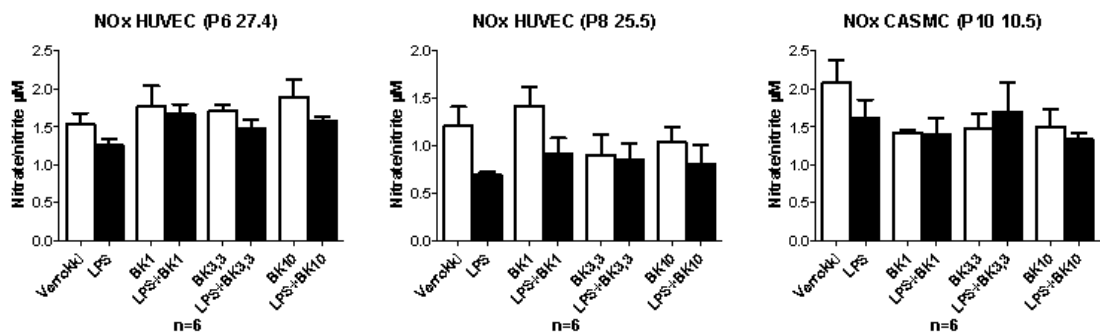
Kuva 14. Prostaglandiini F2 $\alpha$ :n (PGF2 $\alpha$ ) pitoisuudet endoteelisolujen (vasen) ja sileälihassolujen (oikea) kasvatusliuoksista. Kuvassa on tutkimusasetelman koesarjat ilman LPS-endotoksiinin käsittelyä (valkoiset palkit) ja 200 ng/ml LPS-endotoksiinin käsittelyn kanssa (mustat palkit), sekä bradykiniinin (BK) lisäykset kolmella 1, 3,3 ja 10  $\mu$ M pitoisuudella. Endoteelisolujen koesarjojen pitoisuuksien keskiarvoilla oli tilastollisesti merkitseviä eroja ( $P < 0,001$ ).

Prostaglandiini F2 $\alpha$ :n (PGF2 $\alpha$ ) verisuonten tonusta sääteleviä mekanismeja ei vielä tiedetä kunnolla, mutta se vaikuttaa saatujen tulosten perusteella toimivan saman lailla kuin prostasykliini (PGI2). Endoteelisolujen kasvatusliuosten prostaglandiinin pitoisuuksien arvot olivat terveillä alemmat kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla. Tulokset olivat johdonmukaisia aikaisempaan tutkimukseen verrattuna, jossa porsaan keuhkovaltimoa oli käsitelty LPS-endotoksiinilla saaden aikaan PGF2 $\alpha$ :n pitoisuuden nousu (Muzaffar ym. 2004). Sileälihassolujen kasvatusliuosten pitoisuudet olivat melko samanlaisia terveillä ja LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla, eikä bradykiniinillä ollut muutosta pitoisuuksiin. Tulosten perusteella voidaan päätellä, että prostaglandiinin tuoton määrää säädellään verisuonessa endoteelisolujen kautta.

## 6.4 Muut mittaukset

### 6.4.1 Kokonaistyyppioksidin (NO<sub>x</sub>)

Kokonaistyyppioksidin (NO<sub>x</sub>) nitraatti-nitriitin-pitoisuudet endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassolujen (CASMC) kasvatusliuosnäytteistä on esitetty kuvassa 15. Endoteelisolujen kasvatusliuosten NO<sub>x</sub>-pitoisuuksilla pasaasissa 6 (P6) oli tilastollisesti merkitsevä ero ( $P < 0,05$ ) LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla bradykiniinin annosvasteiden välillä. Terveiden tai LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen kokonaistyyppioksidin pitoisuudessa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Endoteelisolujen kasvatusliuosten pitoisuuksilla pasaasissa 8 (P8) oli bradykiniinin vaikutuksesta tilastollisesti merkitsevä ero ( $P < 0,05$ ) terveiden ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen välillä. Bradykiniinillä ei ollut vaikutusta pitoisuuksiin. Sileälihassolujen kasvatusliuosten pitoisuudet olivat tasaisia terveillä ja LPS-endotoksiinilla käsitellyillä soluilla, eikä niiden kesken ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Myöskään bradykiniini ei vaikuttanut pitoisuuksiin.



Kuva 15. Kokonaistyyppioksidin (NO<sub>x</sub>) nitraatti-nitriitti pitoisuudet endoteelisolujen kahdesta eri pasaasista (P6, P8, kaksi vasemman puolelta) ja sileälihassolujen (oikea) kasvatusliuosista. Kuvassa on tutkimusasetelman koesarjat ilman LPS-endotoksiinin käsittelyä (valkoiset palkit) ja 200 ng/ml LPS-endotoksiinin käsittelyn kanssa (mustat palkit), sekä bradykiniinin (BK) lisäykset kolmella 1, 3,3 ja 10 µM pitoisuudella.

Verisuonia laajentavan typpioksidin pitoisuus oli korkeampi terveiden solujen kasvatusliuosessa kuin LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen kasvatusliuosessa. Tämä oli johdonmukaista aikaisempiin tutkimuksiin, jossa oli todettu, että endoteelin typpioksidaasisyntaasi (eNOS) entsyymi alenee LPS-endotoksiinin pitkällä inkubaatioajalla (24h) (Bernardini ym. 2012). Myös endoteelin typpioksidaasisyntaasin aktiivisuus oli korkeampi terveellä kuin tulehtuneella rotan aortalla (Erol ym. 2012).

Endoteelisolujen tulokset osoittivat eri pasaasin välisiä eroja terveiden ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen solujen välillä, sekä bradykiniinin annosvasteissa. Erot voivat johtua kahden eri pasaasin välisestä ikäeroista. Aikaisemman tutkimuksen mukaan endoteelisoluissa bradykiniiniä välittävien B2-reseptorien määrä vähenee huomattavasti pasaasien 3–5 jälkeen (Nurmi ym. 2012). Tämä voi johtaa siihen, että LPS-endotoksiinin ja bradykiniinin vaikutus soluissa muuttaa kokonaistyyppioksidin tuottoa. Sileälihassoluissa LPS-endotoksiinilla tai bradykiniinillä ei ollut vaikuttanut kokonaistyyppioksidin pitoisuuteen.

#### 6.4.2 Syklinen guanosiinimonofosfaatti

Syklisestä guanosiinimonofosfaatista (cGMP) ei saatu tuloksia, sillä sen pitoisuudet olivat alle mittausalueen. Jatkotutkimuksissa näytteitä kerätessä niihin tulisi lisätä selektiivistä syklistä GMP:tä pilkkovan fosfodiesteriäasin estäjää, kuten esimerkiksi Zaprinastia. Tällä tavalla näytteistä voisi saada mitattavia tuloksia.

## 7 Yhteenveto ja pohdinta

Insinöörityön tarkoituksena oli pystyttää soluviljelymalli humaaneille endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassoluille (CASMC), aiheuttaa keinotekoinen tulehdustila soluille endotoksiinisen lipopolysakkaridin (LPS) avulla, sekä tutkia bradykiniinin mahdollisesti erilaisia vaikutusreittejä terveissä ja tulehtuneissa soluissa. Keinotekoisesta tulehdustilaa mitattiin muodostuvien tulehdusvälittäjäaineiden avulla. Bradykiniinin erilaisia vaikutusreittejä selvitettiin prostanooidien, kokonaistyyppioksidin sekä syklisen guanosiinimonofosfaatin mittauksilla.

Soluviljelymallien pystytys onnistui, ja molempia endoteeli- (HUVEC) ja sileälihassoluja (CASMC) saatiin onnistuneesti kasvamaan. Endoteelisolujen kasvatus onnistui varsin mallikkaasti ja kasvatus oli nopeaa. Sileälihassolut kasvoivat hitaammin kuin endoteelisolut, joten soluviljelmien kannalta olisi ollut parempi, jos sileälihassoluilla olisi viljelty useita eri pasaaseilla samanaikaisesti. Kasvatusnopeutta ajatellen, jatkossa sileälihassoluja olisi hyvä saada myös nuoremmassa pasaasissa. Nämä solumallien väliset erot voivat johtua siitä, että endoteelisolut olivat nuoremmasta pasaasista (P3) kuin sileälihassolut (P6–P10), eikä niitä ollut pakastettu toisin kuin sileälihassoluja. Myös solujen erilainen funktionaalinen rakenne verisuonessa voi selittää eroja, sillä

endoteelisolut muodostavat yksikerroksisen solukerroksen verisuonessa, kun taas sileälihassolut muodostavat paksun monikerroksisen solukerroksen.

Suurin osa ”9-plex” menetelmän sytokiinimittauksista oli alle mittausalueen, mutta IL-6-sytokiinin suurentuneet pitoisuudet viittaavat tulehduksen onnistuneen. Tulehdusta tukee myös prostanoidien mittauksista saadut erot verrokinäytteiden ja LPS-endotoksiinilla käsiteltyjen näytteiden välillä. Tulehdusta olisi mahdollista määrittää myös jollain muulla menetelmällä, kuten solujen tuottaman CRP:n tai pelkän IL-6-sytokiinin pitoisuuden mittauksella.

Prostanoidien ja kokonaistyyppioksidin mittausten tulosten perusteella näyttää, että bradykiniini vaikuttaa erilaisilla terveisiin soluihin kuin LPS-endotoksiinilla käsiteltyihin soluihin. Se vaikutti tilastollisesti merkitsevästi vain joko terveeseen tai LPS-endotoksiinilla käsiteltyihin soluihin. Joitakin bradykiniinin vaikutuksia saatiin näkyviin tutkimuksessa käytetyillä annosvasteilla, joita nostamalla bradykiniinin vaikutuksia saataisiin mahdollisesti paremmin esille.

Jatkotutkimuksia varten tutkimusasetelmaa olisi hyvä muokata. Tutkimukset tulisi suorittaa 6-kuoppalevyillä, jolloin kasvatusmedianäytteitä voisi kerätä kerrallaan jopa kolme millilitraa ja solunäytteistä voisi eristää tarpeeksi RNA:ta qPCR-ajoja varten. Näin kaikkia tutkittavia parametrejä voisi tutkia samasta näytteestä, jolloin koesarjojen välisiä eroja pystyttäisiin minimoimaan. Myös bradykiniinin pitoisuuksia voisi nostaa tai inkubaatioaikoja lyhentää, jolloin saataisiin todennäköisesti selviä annosvasteita näkyviin. Tutkimuksissa olisi mielenkiintoista tutkia myös solujen ikääntymisen vaikutuksia, joita huomattiin kokonaistyyppioksidin mittauksista. Koesarjat kannattaisi tehdä nuorista soluista (P2–P3) ja vanhoista soluista (P8–P10) ja vertailla iän merkitystä. Aikaisemmissa tutkimuksissa on löydetty bradykiniinin aiheuttaman verisuonten laajentumisen muuttuminen supistavaksi ikääntyneillä ja sairailta rotilla (Mantelli ym. 1995; Siltari ym. 2016 julkaistava).

Kokonaisuudessaan tässä insinööriyössä saavutettiin työlle annetut tavoitteet eli soluviljelymallien pysytys, tulehduksen aiheuttaminen soluille ja bradykiniinillä havaittiin erilaisia vaikutusreittejä terveissä soluissa kuin LPS-endotoksiinilla käsitellyissä soluissa.



## Lähteet

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. Blood Vessels and Endothelial Cells. Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science.

Bernardini, C., Greco, F., Zannoni, A., Bacci, M., Seren, E. & Forni, M. 2012. Differential expression of nitric oxide synthases in porcine aortic endothelial cells during LPS-induced apoptosis. Journal of Inflammation Vol. (9)47.

Chi, L., Li, Y., Stehno-Bittel, L., Gao, J., Morrison, D.C., Stechschulte, D.J. & Dileepan, K.N. 2001. Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Journal of Interferon and Cytokine Research. Vol. 21, s. 231–240.

Control Your Blood Pressure. 2013. WHO: World Health Day 2013. Verkkojulkaisu. <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2013/en/>>. Luettu 3.2.2016.

Erol, K., Sirmagul, B., Kilic, F., Yigitaslan, S. & Dogan, A. 2012. The role of inflammation and COX-derived prostanoids in the effects of bradykinin on isolated rat aorta and urinary bladder. Inflammation. Vol. 35, s. 420–428

Ezzati, M., Lopez, A., Rodgers, A. & Murray, C. 2004. Comparative Quantification of Health Risks. Global and Regional Burden of Disease Attributable to Selected Major Risk Factors. Volume 1. World Health Organization.

Giles, T., Materson, B., Cohn, J. & Kostis, J. 2009. Definition and Classification of Hypertension: An Update. The Journal of Clinical Hypertension. Vol. 11(11), s. 611–614.

Islam, Z., Miyagi, K., Matsumoto, T., Nguyen, H., Yamazaki-Himeno, E., Shiraishi, M., Miyamoto, A. 2014. Bradykinin induces NO and PGF $2\alpha$  production via B2 receptor activation from cultured porcine basilar arterial endothelial cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. Vol. 387, s. 697–702.

Jula, A. 2006. Miksi suolan liiallinen saanti on vaarallista? *Kansanterveys*. Vol. 2.

Kansantaudit; sydän- ja verisuonitaudit. 2014. THL. Verkkojulkaisu. <<https://www.thl.fi/web/kansantaudit/sydan-ja-verisuonitaudit/sydan-ja-verisuonitautien-yleisyys>>. Luettu 3.2.2016.

Karppanen, H. 1995. Hypertensio ja sydän. Helsingin yliopisto: Gummerus Kirjapaino Oy. S. 7–9.

Kettunen R. 2014b. Verenkiertoelimistön rakenne ja tehtävät. *Duodecim*. Artikkelin tunnus: syd00003 (002.010).

Kettunen, R. 2014a. Sydämen toiminnan säätely. *Duodecim*. Artikkelin tunnus: syd00008 (002.060).

Klaukka, T. & Olkinuora, J. 1995. Sydänlääkeopas. Helsinki: Otava. S. 11–18.

Kosonen, O., Kankaanranta, H., Malo-Ranta, U., Ristimäki, A. & Moilanen, E. 1998. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of prostacyclin production in human endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 125, s. 247–254.

Koulu, M. & Mervaala, E. 2013. *Farmakologia ja toksikologia*. 9., uudistettu painos. *Medicina*. S. 573–610.

Kumar, V., Abbas, A. & Aster, J. 2015. *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. 9., uudistettu painos. Elsevier Saunders.

Käypä hoito-suositus: Kohonnut verenpaine. 2014. Suomalainen Lääkäriseura *Duodecim*.

Liu, Y.P., Wen, J.K., Zheng, B., Zhang, D.Q. & Han, M. 2007. Acetylbritannilactone suppresses lipopolysaccharide-induced vascular smooth muscle cell inflammatory response. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 577, s. 28–34.

Mader, S. 2005. *Understanding Human Anatomy & Physiology*. 5<sup>th</sup> edition. The McGraw-Hill Companies. S. 63; 114–115; 136; 207–252.

Mantelli, L., Amerini, S. & Ladda, F. 1995. Bradykinin-induced vasodilation is changed to a vasoconstrictor response in vessels of aged normotensive and hypertensive rats. *Inflammation Research*. Vol. 44, s. 70–73.

More, A., Kim, H., Zhao, R., Khang, G., Hilgebrandt, T., Bernlöhr, C., Doods, H., Lee, D., Lee, S., Vanhoutte, P. & Wu, D. 2014. COX-2 mediated induction of endothelium-independent contraction to bradykinin in endotoxin-treated porcine coronary artery. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Vol. 64(3), s. 209–217.

Mustajoki, P. & Kaukua, J. 2008. Duodecim Terveyskirjasto. Artikkelin tunnus: snk02011 (022.011)

Nurmi, L., Heikkilä, H.M., Vapaatalo, H., Kovanen, P.T. & Lindstedt, K.A. 2012. Downregulation of bradykinin type 2 receptor expression in cardiac endothelial cells during senescence. *Journal of Vascular Research* 49. 13–23.

Partanen, J. 2013. Tulehduskipulääkkeet lisäävät valtimonkovettumistaudin haittoja. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. Vol. 139(14), s. 1424–1426.

Pelkonen, O. & Ruskoaho, H. 1998. *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. 2., uudistettu painos. Duodecim. S. 208–445.

Pelkonen, O. & Ruskoaho, H. 2003. *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. 3., uudistettu painos. Duodecim. S. 214–493.

Perustietoa verenpaineesta. 2009. Omrom. Verkkojulkaisu. <<http://www.omaomron.fi/omronhealthcare/artikkelit?artikkeli=Perustietoa+verenpaineesta&id=18251005>>. Luettu 11.4.16.

Ricotti, E. & FitzGerald, G. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Atheroscler Thromb Vascular Biology*. Vol. 31(5), s. 986–1000.

Siltari, A., Korpela, R. & Vapaatalo, H. (2016). Bradykinin-induced vasodilatation: Role of age, ACE-inhibition, Mas- and bradykinin receptors. *Peptides*, lähetetty julkaistavaksi.

Silverthorn, D., Johnson, B. & Ober, W. 2014. Human Physiology: An Integrated Approach. 6<sup>th</sup> edition. Prentice Hall College Div.

Steinbaum, S. 2014. Atherosclerosis and high blood pressure. WebMD Medical Reference. Verkkojulkaisu <<http://www.webmd.com/hypertension-high-blood-pressure/atherosclerosis-and-high-blood-pressure>>. Luettu 13.6.2016.

**Liite 1. Reagenssit ja laitteet**

Gelatiini (147116.1210)	AppliChem
Bradykiniini (H-1970.0100) 100mg	Bachem
BSA (P6154) 100 g	Biowest
Rely+On Virkon	DuPont Group
HyQTase (SV30030.01)	HyClone
Trypan Blue (T10282)	Life Technologies
Endothelial Cell Growth Medium MV (C-22220)	PromoCell
Supplement Pack (C-29220)	PromoCell
LPS (L2630) 10 mg	Sigma-Aldrich
MCDB 131 Medium (M8537) 1 l	Sigma-Aldrich
Insuliiniliuos (I9278) 5 ml	Sigma-Aldrich
EGF (E5160) 100 µg	Sigma-Aldrich
FGF (F9786) 1 ml	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (P4333) 100 ml	Sigma-Aldrich
FBS (F0804) 500 ml	Sigma-Aldrich
Etikkahappo 100 % (320099)	Sigma-Aldrich
DMSO (D8418)	Sigma Life Science, Sigma-Aldrich
Natriumvetykarbonaatti (S5761)	Sigma Life Science, Sigma-Aldrich
Pierce Protease Inhibitor Tablets	Thermo Scientific
Lasipipetit (7095B-5X)	Corning Life Sciences
Sterilisuodatus filterit 0,20 µm (431219)	Corning Life Sciences
Cryoputket (430569)	Corning Life Sciences
Eppendorf-putket (0030 121.694)	Eppendorf
Eppendorf-putket (FB74031)	FisherBrand
Sentrifuugiputket (05-539-7) 50 ml	FisherBrand
Mittapipetit 25 ml, 10 ml, 5 ml (13-676-10K/J/H)	FisherBrand
Pipetinkärjet 200µl, 1000µl	Fisher Brand
Laskentakammio (C 10283)	Life Technologies
Ruiskut	Terumo Medical Products
Kuoppalevy 48 (130187)	Thermo Fisher Scientific
Elatuspullo 75 cm <sup>2</sup> (130190)	Thermo Fisher Scientific
Siirrostussilmukat (SL10H)	Thermo Fisher Scientific

Prostaglandin E2 ELISA Kit (514010)	Cayman Chemical
6-keto Prostaglandin F1 $\alpha$ ELISA Kit (515211)	Cayman Chemical
Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (780001)	Cayman Chemical
Cyclic GMP ELISA Kit (581021)	Cayman Chemical
Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub> ELISA Kit (516011)	Cayman Chemical
Human Cytokine High Sensitive (114449HU)	Quansyns
Automaattipipetti Midi Plus	Biohit
Sentrifuugi Centrifuge 5804	Eppendorf
Pipetit	Finnpipette
Lämpövesihaude JB Aqua 12	Grant
Laminaarivirtauskaappi	Kytölä, Muurame, Finland
Automaatti hemosytometri Countess II	Life Technologies
Käänteismikroskooppi CK40	Olympos
Inkubaattori MCO-170AICUVH	Panasonic

**Liite 2. CASMC-solujen kasvatusliuoksen valmistusohje**

MCDB 131 Medium (M8537) 1 l	Sigma-Aldrich
Insuliiniliuos (I9278) 5 ml	Sigma-Aldrich
EGF (E5160) 100 µg	Sigma-Aldrich
FGF (F9786) 1 ml	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (P4333) 100 ml	Sigma-Aldrich
FBS (F0804) 500 ml	Sigma-Aldrich
Etikkahappo 100 % (320099)	Sigma-Aldrich
Natriumvetykarbonaatti (S5761)	Sigma Life Science, Sigma-Aldrich
BSA (P6154)	Biowest

Media valmistettiin lisäämällä media-jauhe 900 millilitraan ultrapuhdasta milli-Q vettä. Liuokseen lisättiin 1,18 grammaa natriumvetykarbonaattia ja pH säädettiin 7,35 1 molaarisella HCl-liuoksella. Lisättiin ultrapuhdasta milli-Q vettä niin, että kokonaistilavuudeksi tuli 1000 millilitraa. Steriili suodatettiin ja jaettiin 190 millilitran pulloihin jääkaappiin.

Insuliini-kantaliuokset valmistettiin lisäämällä 5 millilitraan insuliinia (10,5 mg/ml) 21,25 millilitraa etikkahappoliuosta (tehty ultrapuhdaaseen milli-Q veteen), jonka pH oli 2,69. Liuoksen annettiin liueta jääkaapissa noin 1,5 tuntia. Liuos steriilisuodatettiin ja jaettiin 0,5 millilitran eriin pakkaseen -20 °C:seen.

EGF-kantaliuokset valmistettiin liuottamalla 100 mikrogrammaa EGF-jauhetta steriilisuodatettuun 0,5 millilitraan 0,1-prosenttiseen BSA / 10 millimolaariseen etikkahappoon (tehty ultrapuhdaaseen milli-Q veteen). Jaettiin 10 mikrolitran eriin ja pakastettiin osa -20 °C:seen ja osa -70 °C:seen.

FGF-kantaliuokset valmistettiin jakamalla 1 millilitra FGF 8 mikrolitran eriin ja pakastamalla osa -20 °C:seen ja osa -70 °C:seen.

FBS inaktivoitiin pitämällä sitä +56 °C:n lämpövesihauteessa 30 minuuttia. FBS jaettiin 40 millilitran eriin ja pakastettiin -20 °C:seen.

Penisiilini-Streptomysiini pipetoitiin 1 millilitran eriin ja pakastettiin -20 °C:seen.

EGF-kantaliuoksesta valmistettiin EGF-liuos, ennen sen lisäämistä mediumiin. Liuos valmistettiin lisäämällä 10 mikrolitraan EGF-kantaliuosta 990 mikrolitraa 0,1-prosenttista BSA / 10 millimolaarista etikkahappoa (steriilisuodatettu ja ultrapuhtaaseen milli-Q veteen tehty).

Kasvatusliuos valmistettiin pipetoimalla komponentit seuraavilla suhteilla:

190 ml MCDB 131 medium

10 ml FBS

500 µl insuliinia

50 µl EGF-seos

8 µl FGF

1 ml Pen./Step.

Valmiin kasvatusliuoksen suhteiksi saatiin 200 millilitraan MCDB 131 + 5 % FBS + 5 µg/ml insuliini + 0,5 ng/ml EGF + 2 ng/ml FGF + 50 U/µg/ml Pen./Strep.

Valmis kasvatusliuos säilyy jääkaapissa noin kuukauden.



**Liite 3. Astioiden päällystys 0,1-prosenttisella gelatiiniliuoksella**

HUVEC-endoteelisoluille valmistettiin 0,1-prosenttisella gelatiinilla pinnoitettuja 75 cm<sup>2</sup>:n kasvatuspulloja ja 48-kuoppalevyjä.

0,1-prosenttinen gelatiini valmistettiin punnitsemalla 0,5 grammaa gelatiinia autoklaavattuun 500 millilitraan 1xPBS. Seosta liuotettiin 50 °C:ssa lämpövesihauteessa 30 minuuttia, jonka jälkeen se steriilisuodatettiin heti 0,2 mikrometrinen suodattimien läpi steriileihin 200 millilitran pulloihin. Valmista 0,1-prosenttista gelatiiniliuosta voi säilyttää jääkaapissa jopa kuusi kuukautta.

Astiat eli 75 cm<sup>2</sup>:n kasvatuspullo ja 48-kuoppalevyt pinnoitettiin valmiilla 0,1-prosenttisella gelatiiniliuoksella. Astioihin jaettiin 1 millilitra gelatiiniliuosta 10 cm<sup>2</sup>:a kohti eli kasvatuspulloihin pipetoitiin 7,5 millilitraa gelatiiniliuosta ja kuoppalevyn yhteen kuoppaan 0,075 millilitraa gelatiiniliuosta. Astioiden annettiin pinnoittua yksi tunti huoneenlämmössä laminaarivirtauskaapissa, jonka jälkeen ylimääräinen gelatiiniliuos aspiroitiin pois. Tämän jälkeen astiat olivat valmiita käytettäväksi. Pinnoitettuja astioita voi säilyttää jääkaapissa jopa kuusi kuukautta.