

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

NBIOAS14

2017

Saara Fabritius

# PUSKUREIDEN VAIKUTUS OSTEOKLASTIEN ERILAISTUMISEEN



Saara Fabritius

## PUSKUREIDEN VAIKUTUS OSTEOKLASTIEN ERILAISTUMISEEN

Osteoklasti on yksi neljästä erilaisesta luusolusta. Luun solut voidaan erottaa toisistaan morfologian ja toiminnan perusteella. Osteoklastit ovat peräisin hematopoieettisista kantasoluista ja muodostuvat monosyytti-makrofagilinjasta isoiksi monitumaisiksi soluiksi, joiden tehtävänä on hajottaa luuta. Luu on kokoajan muokkauksen alaisena kun osteoblastit muodostavat uutta luuta ja osteoklastit syövät vanhaa luuainesta. Häiriö tasapainossa johtaa luun määrän ja laadun alenemiseen. Luun määrän aleneminen voi johtaa osteoporoosiin, joka puolestaan aiheuttaa luun murtumia.

Soluviljelyssä käytetään useasti puskuriliuosta ylläpitämään viljelyksen pH:ta. Puskuriliuokset vastustavat pH:n muutosta lisättäessä pieniä määriä happoa tai emästä. Tutkimusta ei ole kuitenkaan tehty siitä, miten hyvin puskuriliuokset soveltuvat osteoklastien viljelemiselle. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia, miten eri puskurit ja niiden pitoisuudet vaikuttavat kypsien osteoklastien muodostumiseen, ja miten solun ulkoinen pH:n säätely eri puskureiden avulla vaikuttaa osteoklastien erilaistumiseen. Tavoitteena oli selvittää, kannattaako puskureita jatkossa käyttää osteoklastien soluviljelyssä. Opinnäytetyössä viljeltiin osteoklasteja erilaisissa puskuriliuoksissa ja niiden pitoisuuksissa. Viljelmistä laskettiin myöhemmin kypsien osteoklastien määrät. Lukumääriä verrattiin kontrolliin, joka ei sisältänyt puskuriliuosta. Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella.

Tulosten tarkastelu osoitti, että osteoklastien solumäärät vähenivät, kun puskuripitoisuus suureni. Näistä tutkimustuloksista voitaisiin päätellä, että puskureiden käyttö soluviljelyssä haittaa osteoklastien muodostumista ja erilaistumista.

### ASIASANAT:

Osteoklasti, puskurit, pH, soluviljely

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science

2017 | 38 pages

Saara Fabritius

# THE EFFECT OF BUFFERS IN OSTEOCLAST DIFFERENTIATION

Osteoclast is one of four different bone cells. The bone cells can be separated from each other by their morphology and function. Osteoclasts are derived from hematopoietic stem cells and form through monocyte-macrophage lineage to multinuclear cells. Their function is to dissolve bone. The bone is constantly under reconstruction when osteoclasts dissolve old bone and osteoblasts form new bone. Disturbance in their balance leads to decline of quantity and quality of bone material. Loss of bone quantity can lead to osteoporosis, which in turn exposes to bone fractures.

Buffer solutions are often used in cell culture to sustain the culture's pH. Buffer solutions resist pH changes when added little amounts acid or base. However, no research has been done, how well buffers suit to osteoclast culture. In this thesis the purpose was to study how buffers and their different concentrations influence on the formation and the number of mature osteoclasts. The goal in this thesis was to find out if it's beneficial to use buffers in the future, when culturing osteoclasts. The study was conducted at the University of Turku, Institute of Biomedicine.

When looking at results, it appeared that the number of osteoclasts declined the higher the buffer concentration was. From these results it can be concluded that the use of buffers in osteoclast culture is a disadvantage in osteoclast differentiation and formation.

## KEYWORDS:

Osteoclast, buffer, pH, cell culture

# SISÄLTÖ

<b>SANASTO JA LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT</b>	<b>10</b>
2.1 Luun rakenne	10
2.2 Luun solut	10
2.3 Osteoklasti	12
2.4 Puskuriliuos	14
2.5 pH	16
2.6 Soluviljely	17
2.7 TRACP-värjäys	18
2.8 Hoechst-värjäys	18
<b>3 TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT</b>	<b>19</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>20</b>
4.1 Toteutussuunnitelma	20
4.2 Toteutus	20
4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	26
4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	27
<b>5 TULOKSET</b>	<b>28</b>
<b>6 POHDINTA</b>	<b>35</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>37</b>

## KAAVAT

Kaava 1. Henderson Hasselbalchin yhtälö, jolla voidaan määrittää liuoksen pH (Po & Senozan 2011).	15
Kaava 2. PH:n laskukaava (Lodish ym. 2003).	16
Kaava 3. Solujen laskentakaavio Bürkerin kammiossa (Grigoryev 2014).	22

## KUVAT

Kuva 1. Luun uusiutumisen rakenne ja vaiheet (mukaillen Pallardy 2010).	11
Kuva 2. RANKL:n vaikutus osteoklastien erilaistumiseen (mukaillen Dufresne ym. 2012).	13
Kuva 3. Osteoklastin solukalvon alueet (mukaillen Itzstein ym. 2011).	14
Kuva 4. Ficollin toimintaperiaate solujen erottelussa (mukaillen Lin ym. 2014).	21
Kuva 5. TRACP-värijäys ZEN lite microscopy ohjelmalla tarkasteltuna.	25
Kuva 6. Hoechst-värijäys ZEN lite microscopy ohjelmalla tarkasteltuna.	26
Kuva 7. Hepes A:n vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen.	29
Kuva 8. Hepes B:n vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen.	30
Kuva 9. Hepes C:n vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen.	31
Kuva 10. Bessin vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen.	32
Kuva 11. Mopsin vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen.	33
Kuva 12. Tauriinin vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen.	34

## KUVIOT

Kuvio 1. Hepes A:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin.	29
Kuvio 2. Hepes B:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin.	30
Kuvio 3. Hepes C:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin.	31
Kuvio 4. Bes:in pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin.	32
Kuvio 5. Mops:in pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin.	33
Kuvio 6. Tauriinin pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin.	34

## TAULUKOT

Taulukko 1. Esimerkki pietointikaaviosta 24-kuoppalevyille.	22
Taulukko 2. Hepes A, hepes B, hepes C, Mops, Bes puskurilaimennokset.	23
Taulukko 3. Tauriini, Pipes puskurilaimennokset.	23

## SANASTO JA LYHENTEET

Hematopoieesi	Veren solujen muodostus
RANK	Reseptori, joita esiintyy preosteoklasteilla ja osteoklasteilla (receptor activator of nuclear factor kappa B)
RANKL	RANK ligandi, proteiini, joka sitoutuessaan reseptoriinsa RANK:iin aktivoi osteoklasteja ja niiden erilaistumista
M-CSF	Hematopoieettinen kasvutekijä (macrophage colony-stimulating factor)
TRACP	Entsyymi, jota esiintyy mm. osteoklasteissa (Tartrate-resistant acid phosphatase)
pKa	Ilmaisee puskurointialueen keskipisteen pH:n. Happo- ja emäskonsentraatiot ovat tässä pisteessä yhtä suuret
PFA	Käytetään solujen fiksoimiseen (paraformaldehyde)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (phosphate buffered saline)

# 1 JOHDANTO

Osteoklasti on yksi neljästä erilaisesta luusolusta. Luun solut voidaan erottaa toisistaan morfologian ja toiminnan perusteella. Muita luusoluja ovat osteoblastit, osteosyytit ja luun pintasolut. (Solunetti 2017a.) Osteoklastit ovat peräisin hematopoieettisista kantasoluista ja muodostuvat monosyytti-makrofaagilinjasta isoiksi monitumaisiksi soluiksi, joiden tehtävänä on hajottaa luuta. Luu on koko ajan muokkauksen alaisena, kun osteoblastit muodostavat uutta luuta ja osteoklastit syövät vanhaa luuainesta. Häiriö tasapainossa johtaa luun määrän ja laadun alenemiseen, joka voi johtaa puolestaan murtumiin. (Miyamoto & Suda 2002.) Osteoporoosi eli luukato on Suomessa kasvava ongelma, sillä väestön ikääntyessä myös osteoporoosin aiheuttamat murtumat lisääntyvät (Reumaliitto 2017).

Luu koostuu orgaanisesta ja epäorgaanisesta aineesta. Suurin osa luusta on epäorgaanista ainetta, mineraalia, joka on enimmäkseen kiteistä kalsiumfosfaattia. Orgaaninen aine luussa koostuu tyypin I kollageenista ja proteoglykaaneista. Luun hajotuksessa hävitetään ensin epäorgaaniset suolat, jonka jälkeen voidaan alkaa hajottaa orgaanisia aineita. Osteoklasti muodostaa happaman tilan luun ja poimukalvonsa väliin, joka liuottaa suolat. Hapan pH on avainasemassa, kun osteoklastit hajottavat luuaineksen suoloja. (Blomqvist 2006.)

Soluviljelyssä kasvatetaan soluja kontrolloiduissa olosuhteissa erillään organismista. Soluviljelyssä käytetään useasti puskuria ylläpitämään viljelmän pH:ta. Yleinen soluviljelmissä käytössä oleva puskuri Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) on yksi Goodin puskureista, joka kehitettiin Norman Goodin tutkimusryhmässä vuonna 1966. Hepes ja muut Good:n puskurit ovat monilta ominaisuuksiltaan samanlaisia. Näitä ominaisuuksia on mm. pKa arvo 6-8, korkea liukoisuus, rajattu vaikutus biokemiallisiin reaktioihin ja matala absorbanssi 240-700nm. (Sigma-aldrich 2017a.) Ei ole kuitenkaan tutkittu, millaisia haittavaikutuksia puskureilla voi olla osteoklastiviljelmille.

Tämä opinnäytetyö suoritettiin tutkimusryhmässä Turun yliopiston biolääketieteellisessä laitoksessa. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, tarvitseeko puskureita jatkossa käyttää osteoklastien soluviljelyssä, ja miten solun ulkoinen pH:n säätely eri puskureiden avulla vaikuttaa osteoklastien erilaistumiseen. Alustavissa kokeissa oli huomattu (Pennanen, henkilökohtainen tiedonanto), että puskureista näyttäisi olevan haittaa



osteoklastien viljelemiselle. Opinnäytetyön tarkoituksena oli viljellä osteoklasteja erilaisissa puskureissa ja niiden eri pitoisuuksissa. Näistä viljelmistä laskettiin osteoklastien määrät ja tilastoitiin ne taulukoiksi ja kaavioksi.

## 2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT

### 2.1 Luun rakenne

Luu on dynaamista kudosta, joka on jatkuvan muokkauksen alaisena, jotta se säilyy toimintakykyisenä koko ihmiselämän. Luun kolme tärkeää tehtävää on: tarjota tukea ja kiinnittymispaikkoja lihaksille, suojata elimiä ja toimia kalsium-fosfaattivarastona. (Feng & McDonald 2013.) Aikuisessa ihmisessä on kaiken kaikkiaan 206 erilaista luuta. Luukudosta on kahta erilaista tyyppiä: tiivistä kuoriluuta ja pesusienimäistä hohkaluuta. Kaikkien luiden pintaosat ja pitkien luiden varret ovat kuoriluuta. Luiden päät, pienten luiden sisäosat ja nikamat, ovat puolestaan hohkaluuta. Luuta voi muodostua kasvuvaiheen aikana kahdella eri tavalla: rustokudoksesta kehittymällä tai sidekudoksen luutumisen kautta. Suurin osa luukudoksesta on muodostunut rustokudoksesta. (Luustoliitto 2016.) Pitkien luiden pituuskasvu tapahtuu luiden päissä sijaitsevien kasvulevyjen eli epifyysilevyjen avulla. Pitkien luiden päitä kutsutaan epifyyseiksi ja keskiosia diafyyseiksi. (Leppäluoto ym. 2017.)

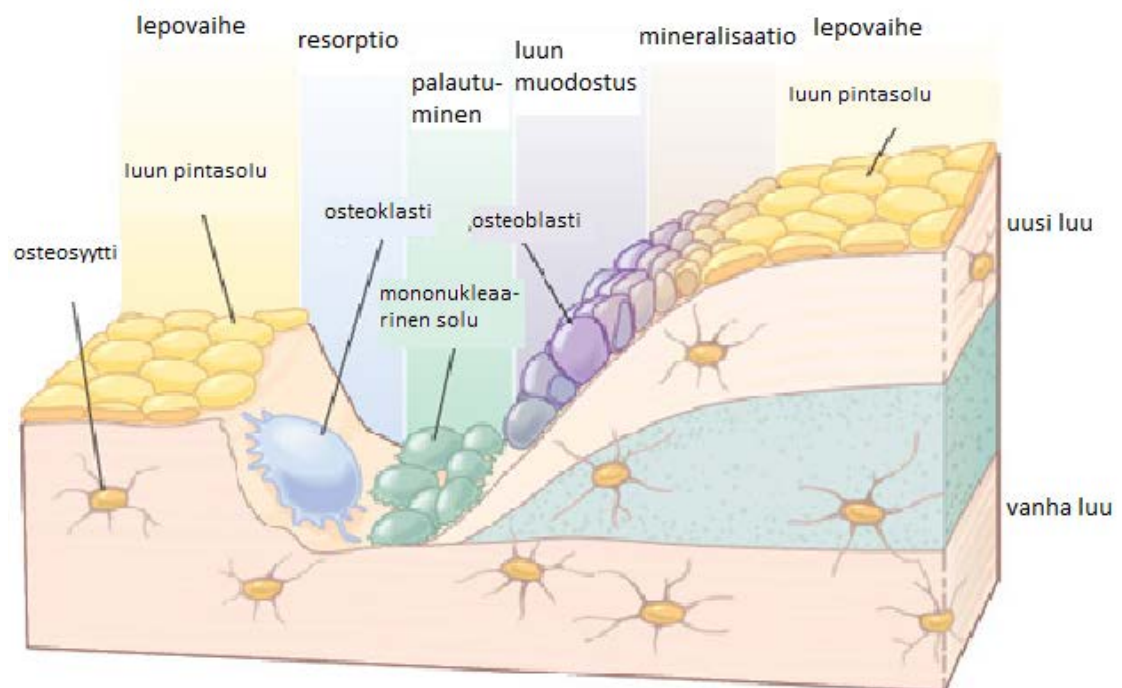
Luiden pintoja verhoaa sidekudoksinen luukalvo periosteum, johon lihakset, sidekalvot, jänteet ja nivelten rustopinnat voivat kiinnittyä. Luukalvon avulla luu kasvaa paksuutta ja korjautuu muodostamalla alleen tiivistä luuta. Luukudoksessa tapahtuu jatkuvasti vilkasta aineenvaihduntaa. Luukudos uusiutuu noin prosentin verran kuukaudessa. Luukudos sisältää paljon verisuonia, joiden avulla luun solut saavat ravintonsa. Pitkien luiden diafysin keskellä sijaitsee yleensä luuydinontelo, jonka sisässä on sidekudoksista luuydintä. (Leppäluoto ym. 2017.) Luuytimessä tuotetaan verisoluja prosessissa, jota kutsutaan hematopoieesiksi. Hematopoieesin aikana hematopoieettiset kantasolut (HSC) jakautuvat ja yksi tytär solu pysyy koko ajan luuytimessä jatkaakseen HSC-poolin uusi- mista. Muut tytär solut käyvät läpi useita kehitysvaiheita muodostuakseen kypsiksi verisoluiksi. Kypsymisen jälkeen verisolut lähtevät luuytimestä ja kulkeutuvat verenkiertoon. (British society of immunology 2017.)

### 2.2 Luun solut

Luusta noin 10 % on soluja, 60 % mineraalitekiteitä ja 30 % orgaanista matriksia (Feng & McDonald 2013). Luun soluaines koostuu neljästä erilaisesta luusolutyypistä: osteoblas- teista, osteosyyteistä, luun pintasoluista ja osteoklasteista (Florencio-Silva ym. 2015).

Osteoblastit ovat yksitumaisia soluja, jotka tuottavat uutta luuta. Osteoblastit sijaitsevat luun pinnalla ja käsittävät noin 4 -6 % luusolukosta. Osteoblastit valmistavat ensin orgaanista matriksia eli luun soluväliainetta, erittämällä tyypin 1 kollageenia, glykosaminoglykaaneja ja proteoglykaaneja. Tämän jälkeen tapahtuu matriksin mineraalisaatio, jossa hydroksyapatiittikiteet sakkautuvat kollageenisäikeiden sekaan. Mineraalisaation valmistuttua osteoblastit joko hautautuvat matriksiin, jolloin niistä tulee osteosyyttejä tai ne muodostuvat luun pintasoluiksi. Osteosyytit ovat kypsiä luusoluja ja niitä on määrällisesti kaikkein eniten luiden soluista noin 95 %. Osteosyytit ovat pitkäikäisiä soluja, joiden elinaika on jopa 25 vuotta. Osteosyytit sijaitsevat lukuunsa mineralisoituneen matriksin ympäröimänä. Osteosyyttien morfologia riippuu niiden iästä, aktiivisuudesta ja siitä, mikälaisessa luussa ne sijaitsevat. Luun pintasolut ovat yksitumaisia litteitä soluja, jotka verhoavat luun pintaa. Luun pintasolujen alueella ei tapahdu luun resorptiota tai uuden luun muodostusta. (Florencio-Silva ym. 2015.) Ne säätelevät kalsiumin ja fosfaatin kulkeutumista luun sisälle ja ovat osallisena osteoklastien aktivoinnissa (Solunetti 2017b). Osteoklastit ovat monitumaisia soluja, joiden tehtävä on hajottaa luuta (Solunetti 2017a). Kuvassa 1. on esitetty luun uusiutumisen vaiheet ja luun solujen sijoittuminen luussa.

#### Luun uusiutuminen



Kuva 1. Luun uusiutumisen rakenne ja vaiheet (mukaillen Pallardy 2010).

Normaalissa luun uudistumisessa täytyy vallita tasapaino osteoklastien luun hajotuksen ja osteoblastien luun muodostuksen välillä. Luun uudistuminen on tarkoin säädelty ja sen

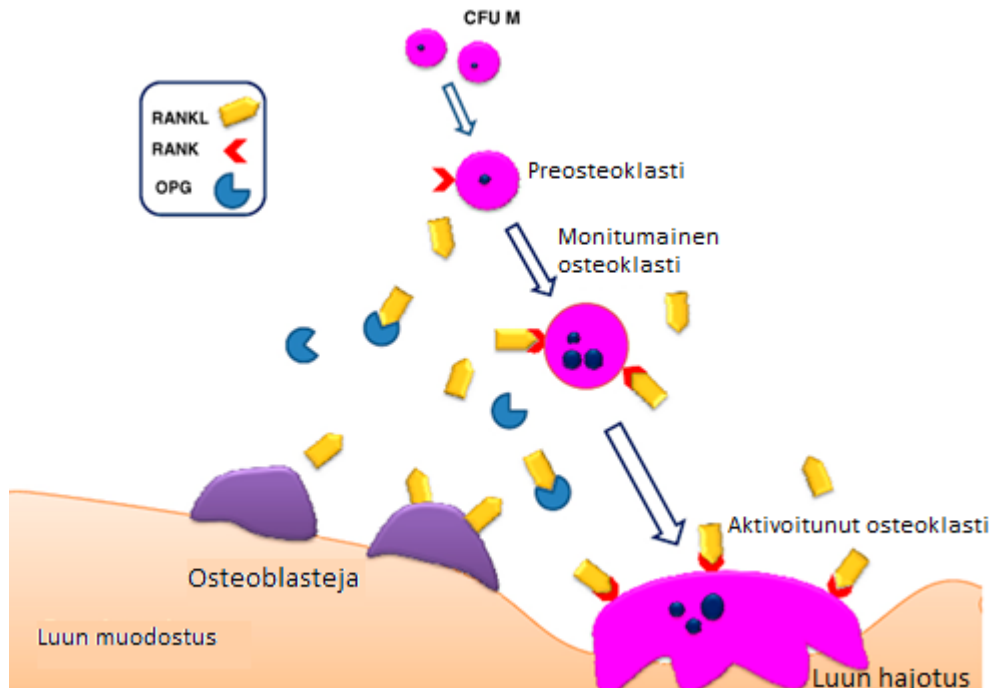
tulee säilyä tasapainossa, jottei luun nettopainossa tai luun mekaanisessa lujuudessa tapahdu suuria muutoksia. Jos tässä säätelyssä tapahtuu häiriöitä, ja tasapaino uuden luun ja vanhan luun hajotuksen välillä järkkyy, voi syntyä erinäisiä luusairauksia. (Feng & McDonald 2013.) Nämä luun homeostaasin epätasapainon aiheuttamat sairaudet voivat johtua monesta syystä. Osteopetroosi aiheutuu virheellisestä osteoklastien muodostuksesta tai toimivien osteoklastien puuttumisesta, minkä seurauksena luumassaa on liikaa, mikä altistaa luun murtumille (National institutes of health 2017). Osteoporoosi johtuu lisääntyneestä luun hajotuksesta, mikä myös toimii riskitekijänä luiden rikkoutumiselle (Miyamoto & Suda 2002).

### 2.3 Osteoklasti

Osteoklastit ovat luunsyöjäsoluja eli niiden tehtävä on hajottaa luuta. Osteoklasteja on hyvin harvakseltaan luun pinnalla, niitä esiintyy vain 2-3 kpl 1 mm<sup>3</sup> alueella. Osteoklastit saavat alkunsa hematopoieettisista kantasoluista. Ne muodostuvat monosyytti-makrofagilinjan kautta yksitumaisiksi osteoklasteiksi, josta ne jatkavat fuusioitumista monitumaisiksi osteoklasteiksi. Monitumaisuus on yksi osteoklastien tunnusomaisista piirteistä. (Miyamoto & Suda 2002.) Osteoklastien tumien lukumäärä vaihtelee yleensä noin 3 -20 välillä. Joissakin tapauksissa osteoklasteista voi löytyä jopa 100 tumaa. (Boissy 2002.)

Jotta preosteoklastit pystyvät erilaistumaan osteoklasteiksi, tarvitaan macrophage-colony stimulating factor:ia (M-CSF), ja receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand:in (RANKL) sitoutumista reseptoriinsa RANK:iin. Nämä molemmat ovat tärkeässä asemassa osteoklastien muodostumisen ja aktivaation kannalta. Osteoblastit säätelevät RANKL:n ja M-CSF:n tuottoa. (Boyce & Xing 2007.) RANKL on TNF- $\alpha$  sukuun kuuluva signaaliproteiini. RANKL ligandin vastakappale RANK-reseptori sijaitsee osteoklastien pinnalla. Näiden sitoutuminen aikaansaa monien solunsisäisten signaalireittien aktivoinnin, jotka aiheuttavat muutoksia osteoklastien muodossa ja kiinnittymisessä luuhun, sekä luun hajotuksessa. Osteoblastit tuottavat myös liukoista ``houkutusreseptoria`` osteoprotegerinia (OPG). (Lodish ym. 2003.) Luun hajotusta estävä OPG suojelee luuta liialliselta hajotukselta sitomalla RANK-ligandia reseptoreihinsa ja täten estämällä sitä sitoutumasta reseptoriinsa RANK:iin. RANKL/OPG-suhde on tärkeä luumassan ja luuston eheyden määrittäjä. (Boyce & Xing 2007.) Alla olevassa kuvassa 2. on esitetty RANK-ligandin sitoutuminen preosteoklastien pinnalla sijaitsevaan reseptoriinsa

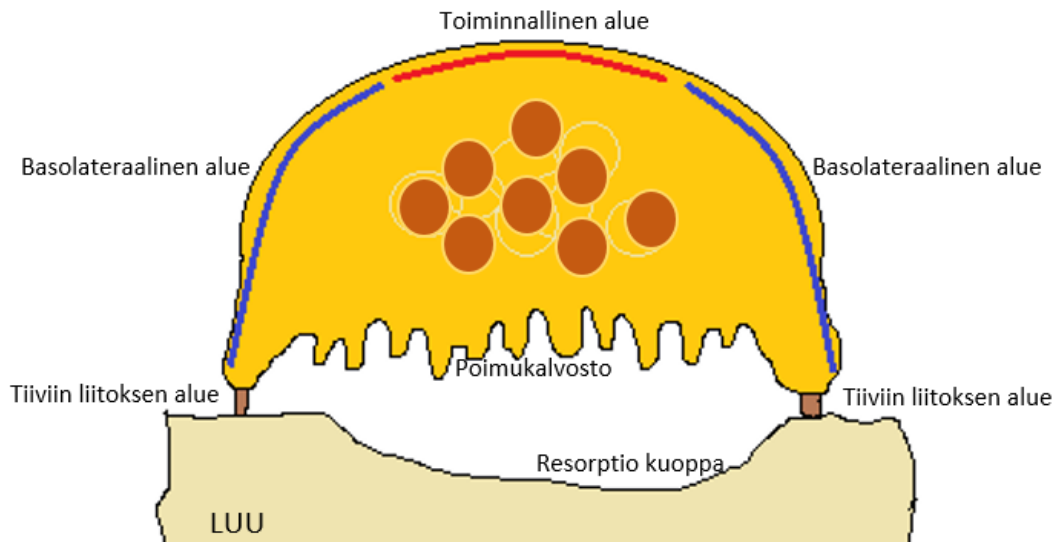
RANK:iin ja osteoklastien aktivoituminen. Kuvasta näkee niin ikään, miten OPG-reseptorit sitovat myös RANK-ligandeja ja täten estävät niiden sitoutumisen RANK-reseptoreihin.



Kuva 2. RANKL:n vaikutus osteoklastien erilaistumiseen (mukaiillen Dufresne ym. 2012).

Osteoklastien solukalvo on rajautunut eri osiin, joilla kullakin on oma tehtävänsä (Blomqvist 2006). Jotta osteoklastit pystyvät hajottamaan luuta, ne kiinnittyvät tiukasti alla olevaan luumassaan. Osteoklastit muodostavat suljetun vyöhykkeen, jossa poimukalvoston avulla pystytään lisäämään solukalvon pinta-alaa ja täten hajottamaan luuta tehokkaasti. (Boyce & Xing 2007.) Osteoklastisolun sivustoilla sijaitsee basolateraalinen alue, jonka päällä on vielä toiminnallinen alue. Osteoklastien hajottaessa luuainesta, hävitetään ensin epäorgaaniset suolat, jonka jälkeen pystytään hajottamaan orgaanista ainesta. Osteoklasti muodostaa happaman pH:n poimureunuksen ja hajotettavan luun välille. Hydroksiapatiittisuolojen liuettua, alkaa orgaanisen aineen hajotus. (Blomqvist 2006.) Poimukalvostosta eritetään suolahappoa ja entsyymiä nimeltä katepsiini K, jotka liuottavat luun mineraalia ja hajottavat luun matriksia. Suljetun alueen ansiosta luuta pystytään hajottamaan todella happamissa olosuhteissa, mutta naapurisolut säästävät hajotukselta. (Boyce & Xing 2007.) Samalla osteoklastit pystyvät ylläpitämään omaa fysiologista pH:taan. Luun hajotuksessa syntyneet jätteet kulkevat rakkuloissa osteoklastien läpi ja

poistuvat toiminnallisen solukalvoalueen kautta pois solusta. (Blomqvist 2006.) Alla olevassa kuvassa 3. on esitetty osteoklastin solukalvon eri alueet.



Kuva 3. Osteoklastin solukalvon alueet (mukaillen Itzstein ym. 2011).

## 2.4 Puskuriliuos

Puskuriliuokset ovat vesipitoisia nesteitä, jotka vastustavat pH:n muutoksia lisättäessä pieniä määriä happoa tai emästä. Puskuriliuokset koostuvat heikosta haposta ja sen konjugaattiemäksestä tai heikosta emäksestä ja sen konjugaattihaposta. (Mohan 2003.) Puskuri pitää liuoksen pH:n vakiona ottamalla vastaan protoneja jotka vapautuvat reaktioiden aikana tai vapauttamalla protonit, kun ne kulutetaan reaktioissa. (Applichem 2008). Puskurointiteho on seurausta kahden reversiibelin reaktion tasapainosta liuoksessa, jossa protonien konsentraatio luovuttajalla ja sen konjugaattiprotonien vastaanottajalla ovat yhtä suuret. Tätä reaktion kohtaa, missä happo- ja emäskonsentraatiot ovat yhtä suuret, kutsutaan yleisesti isoelektriseksi pisteeksi. Isoelektrisessä pisteessä ei ole nettovarausta ja pH on tässä kohtaa yhtä suuri kuin pKa (Kaava 1.). Yleensä heikon

hapon tai heikon emäksen pKa arvo ilmaisee pH:n, joka on puskurointialueen keskipisteessä. Puskurikapasiteetti on 1, kun 1 mol happoa tai emästä lisätään 1 litraan puskuria ja pH muuttuu 1 yksiköllä. (Mohan 2003.)

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Kaava 1. Henderson Hasselbalchin yhtälö, jolla voidaan määrittää liuoksen pH (Po & Senozan 2011).

Biologisten puskureiden tulisi täyttää seuraavat kriteerit: (Mohan 2003; Promega 2017.)

- pKa arvon tulisi olla 6-8, koska suurin osa biokemiallisista reaktioista tapahtuu tällä välillä.
- Puskureiden pitäisi omata korkea vesiliukoisuus ja minimaalinen liukoisuus orgaanisiin yhdisteisiin.
- Puskurit eivät saisi läpäistä solukalvoja tai olla myrkyllisiä soluille.
- Puskurin komponenttien ei tulisi olla vuorovaikutuksessa tai vaikuttaa biokemiallisiin reaktioihin tutkittavaan kohteeseen.
- Lämpötilan tai konsentraation ei tulisi aiheuttaa suuria muutoksia puskuriin.
- Puskurien tulee olla stabiileja.
- Matala absorbanssi.

Norman Good tutkijaryhmineen kehitti vuonna 1966 kaksitoista uudenlaista vetyionipuskuria. Näiden oli tarkoitus olla ominaisuuksiltaan paremmat kuin yleisesti käytössä olleet puskurit, kuten Fosfaatti- ja Tris-puskurit. Puskureita arvioidessa tulisi ottaa huomioon kaksi seikkaa: onko puskurointikapasiteetti halutulla pH-alueella ja millaisia sivuvaikutuksia puskurilla on? Uudet valmistetut puskurit vaikuttivat ominaisuuksiltaan hyviltä ja istuivat puskureille asetettuihin vaatimuksiin. (Good ym. 1966.) Tässä opinnäytetyössä käytettiin osaa Norman Goodin ja hänen tutkijaryhmänsä kehittämiä ionipuskureita.

HEPES on biologinen puskuri ja yksi Goodin puskureista. HEPES pystyy paremmin säilyttämään fysiologisen pH:n soluviljelmässä verrattuna bikarbonaattipuskureihin, huolimatta hiilidioksidipitoisuuden muutoksista. HEPES-puskurin pH-alue on välillä 6,8 - 8,2. (Sigma-aldrich 2017d.) Yleisesti käytetty puskuripitoisuus on 25 mM:a. HEPES:illä ei ole ravitsemuksellista hyötyä soluille. (Thermo fisher 2017.) MOPS:ia käytetään ensisijaisesti puskurina RNA:n erottamiseksi agarosigeelleissä. Yleensä käytetään 20 mM pitoisuutta tai enemmän. Sen pH-alue on välillä 6,5- 7,9. BES-puskurin pH alue on välillä 6,4-7,8. PIPES-puskurissa pKa on lähellä fysiologista pH:ta, mikä tekee siitä käyttökelpoisen soluviljelytyössä ja sen pH-alue on 6,1- 7,5. (Interchim 2017.) Tauriini on sulfonoitu aminohappo. Tauriinin on oletettu olevan tärkeä tekijä biologisille toiminnoille, kuten solunsisäiselle kalsiumin säätelylle ja osmoosille. (Sigma-aldrich 2017e.)

## 2.5 pH

Kaikki solun sisäiset ja ulkoiset nesteet sisältävät vettä. Vettä sisältävien liuosten ominainen piirre on positiivisesti varautuneiden vetyionien (H<sup>+</sup>) ja negatiivisesti varautuneiden hydroksyyli-ionien (OH<sup>-</sup>) konsentraatio. Vetyionien konsentraatio liuoksessa ilmoitetaan yleisesti pH:na, joka voidaan määrittää negatiivisena logaritmina vetyionikonsentraatiosta. Puhtaan veden konsentraatio 25 °C on 7. Yhden yksikön ero pH:ssa tarkoittaa kymmenkertaista eroa protonikonsentraatiossa. (Lodish ym. 2003.) Alla olevassa kaavassa 1. on esitetty pH:n laskukaava.

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] = \log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{10^{-7}} = 7$$

Kaava 2. PH:n laskukaava (Lodish ym. 2003).

PH-arvoa 7 pidetään neutraalina, sitä alemmat arvot ovat happamia (omaavat korkeamman vetyionikonsentraation) ja korkeammat arvot taas emäksisiä (matala vetyionikonsentraatio). Logaritmistasta asteikkoa voi olla vaikea hahmottaa, joten yleisesti käytetään pH-arvoja, joiden skaala on 0-14. (Lodish ym. 2003.)

On tärkeää tietää, että pH-mittaus määrittää vain pitoisuuden aktiivisista vetyioneista liuoksessa, eikä vetyionien kokonaispitoisuutta. Tämä tekijä aiheuttaa sen, että puhtaassa



vedessä voidaan havaita pH:n muutos lämpötilan vaihtuessa. Jos lämpötila nousee puhtaassa vedessä, vety- ja hydroksyyli-ionien dissosiaatio lisääntyy. Koska pH liittyy pelkästään dissosioituneiden vetyionien pitoisuuteen, pH-arvo tosiasiallisesti vähenee, vaikka vesi on edelleen neutraali. Dissosiaatiovakion ja lämpötilan välinen suhde on tärkeää ottaa huomioon, sillä liuoksen pH-arvo saattaa olla eri oletetusta, jos lämpötilassa tapahtuu muutosta. (Springer 2014.)

## 2.6 Soluviljely

Soluviljely mahdollistaa solujen käyttäytymisen tutkimisen erillään koko organismista organismista ja soluviljelyiden osuus on merkittävä eri sairauksien tutkimisessa ja uusien lääkkeiden kehityksessä. Soluviljelmän prosessi sisältää solujen poistamisen eläimestä tai kasveista ja sen myöhemmän kasvattamisen. Solut voidaan poistaa suoraan kudoksesta (primäärisolut), tai ne voivat olla peräisin jo vahvistetusta solulinjasta tai solukanasta (linjasolut). (Sigma-aldrich 2017b.) Kun soluja viljellään *in vitro*, kasvuympäristöstä on tärkeää saada mahdollisimman suotuisa ja fysiologisesti samanlainen, kuin kasvu-ympäristö olisi *in vivo*. Tämän toteuttaminen on kuitenkin haastavaa, sillä kaikkia solujen säätelymekanismeja ja solujen välisiä viestejä ei täysin tunneta. Kuitenkin perustiedot, millä keinoin solut kasvavat ja jakautuvat soluviljelyssä, on saavutettu. Jatkuvaa kehitystä tulee kuitenkin tapahtua, jotta ymmärretään erilaisten solujen tarvitsemat kasvutekijät. (Sato & Kan 1998.)

Soluviljelyn olosuhteet pitää olla tarkasti suunniteltu ravintoaineiden, lämpötilan, sekä pH-arvon suhteen, jotta solut onnistuvat kasvamaan. Soluja voidaan kasvattaa suspensiossa tai kiinteällä alustalla. Solut pidetään peitettyinä kasvatusliuoksella, jossa ne muodostavat yksisolukerroksen. (Solunetti 2017c.) Soluviljelyn tärkeimpiä lähtökohtia on valita oikeanlainen medium, joka tukee solujen kasvamista ja jakautumista. Mediumin joukkoon voidaan lisätä seerumia edistämään solujen kasvua. Naudan sikiön seerumi (fetal bovine serum, FBS) on suosituin ja yleisesti saatavilla oleva seerumi. (Yao & Asayama 2017.) Soluviljelmät pidetään yleensä CO<sub>2</sub>-inkubaattorissa, jossa on sopiva lämpötila ja kosteus (Sato & Kan 1998).

Mediumin joukkoon voidaan mikrobikontaminaatioiden välttämiseksi lisätä antibiootteja. Tavallisimpia kontaminaation aiheuttajia ovat bakteerit, hiivat, sienet ja mykoplasmat. Saastuminen johtuu useimmiten ihmisperäisistä virheistä tai epäpuhtauksista me-

diumissa. Soluviljelyssä onkin tärkeää ylläpitää aseptista toimintaa. Työskentely tapahtuu laminaarivirtauskaapissa, jossa on steriili työskentelytila. Käytetyt tarvikkeet ja liuokset tulee olla myös steriilejä. (Sato & Kan 1998.)

## 2.7 TRACP-värjäys

Tartrate resistant acid phosphatase (TRACP) on entsyymi, jota esiintyy luuta hajottavissa osteoklasteissa, makrofageissa ja dendriittisoluisissa. TRACP:lla on kriittinen rooli monissa biologisissa prosesseissa, kuten luuston kehityksessä, kollageenisynteesissä ja hajotuksessa, luun mineraalisaatioissa ja dendriittisolujen kypsymisessä. (Hayman 2008.)

TRACP kuuluu ainutlaatuisen rautaa sitovien proteiinien ryhmään. TRACP:ia voidaan käyttää fenotyypinä markkerina myöhäiselle osteoklastien erilaistumiselle. TRACP-ekspressio on patologisesti lisääntynyt HCL: n, Gaucherin taudissa ja osteoklastoomassa ja toimii entsyymimerkkiaineena näihin sairauksiin. Vaikka TRACP:ia esiintyy monissa kudoksissa, se on silti peräisin soluista, jotka ovat syntyneet luuytimessä eli hematopoiettisista soluista. (Lamp & Drexler 2009.)

## 2.8 Hoechst-värjäys

Hoechst-väriaineet ovat sinisen fluoresoinnin omaavia värejä, joita käytetään useasti solujen DNA:n värjäykseen. Hoechst-värillä voidaan värjätä niin kiinnitettyjä, kuin eläviä soluja. (Sigma-aldrich 2017c.) Hoechst sitoutuu adeniniini-tymiini-rikkaisiin alueisiin tumman DNA:ssa, jolloin tumat fluoresoivat. Hoechst-väriaineet ovat tunnettuja mutageeneja ja niitä tulee käsitellä huolellisesti. Värit pitää hävittää turvallisesti ja voimassa olevien määräysten mukaisesti. (Invitrogen 2005.)

### 3 TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämä opinnäytetyö suoritettiin tutkimusryhmässä Turun yliopiston Biolääketieteellisessä laitoksessa. Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, tarvitseeko puskureita jatkossa käyttää osteoklastien soluviljelyssä, ja miten solun ulkoinen pH:n säätely eri puskureiden avulla vaikuttaa osteoklastien erilaistumiseen. Alustavissa kokeissa oli huomattu (Penanen, henkilökohtainen tiedonanto), että puskureista näyttäisi olevan haittaa osteoklastien viljelemiselle.

Tämän opinnäytetyö tarkoituksena oli viljellä kolmen eri testihenkilön soluja seitsemällä eri puskurilla, seitsemässä eri pitoisuudessa. Viljelyjen jälkeen oli tarkoituksena kuvata solut. Näistä soluviljelmistä laskettiin kypsien osteoklastien lukumäärät. Osteoklastin määritelmänä pidettiin vähintään kolmea tumaa. Puskuria sisältäneiden soluviljelmien osteoklastien lukumäärää verrattiin kontrollin (soluviljelmä, joka ei sisältänyt puskuria) osteoklastien lukumäärään. Osteoklastien solumäärät taulukoitiin ja tehtiin kuvaajat puskureiden ja niiden pitoisuuksien vaikutuksesta kypsien osteoklastien muodostumiselle.

Puskureiden sopivuutta osteoklastiviljelmille on tärkeää tutkia, jotta myöhempiä soluviljelyitä pystyttäisiin suunnittelemaan osteoklastien erilaistumisen kannalta sopiviksi.

## 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

### 4.1 Toteutussuunnitelma

Opinnäytetyön aihe saatiin Turun yliopiston tutkimusryhmältä alkuvuodesta 2017. Tämän opinnäytetyön kokeellinen osuus suoritettiin keväällä 2017 Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksella solubiologian ja anatomian osastolla. Opinnäytetyö aloitettiin alkuvuodesta 2017 syventävän harjoittelun aikana, ja laboratoriotöitä jatkettiin vielä kevään aikana. Työn kokeellinen osuus valmistui toukokuussa 2017. Opinnäytetyön kirjallinen osuus valmistui syksyn 2017 aikana. Tutkimusryhmän kanssa kirjoitettiin toimeksiantosopimus.

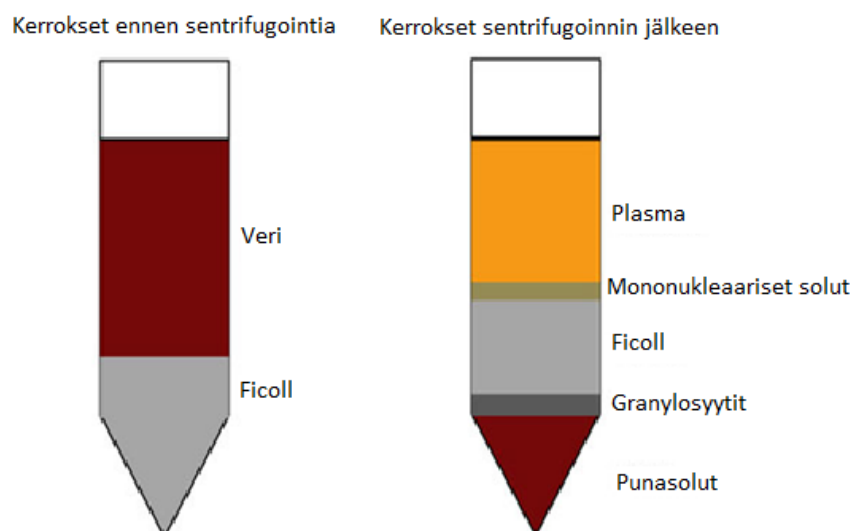
Teoreettisena taustana käytettiin samaan aihepiiriin tai osittain samaan aihepiiriin kuuluvia artikkeleja ja tieteellisiä julkaisuja. Täysin samaa aihetta käsittelevä artikkelia oli hankalaa löytää, sillä aikaisempaa tutkimusta puskureiden vaikutuksesta osteoklastien erilaistumiselle ei löytynyt. Kuitenkin artikkeleja, jotka käsittelivät osteoklasteja tai puskureita yksinään, oli löydettävissä.

### 4.2 Toteutus

Tutkimus tehtiin kolmessa osassa, kolmen eri testihenkilön soluilla. Testihenkilöt olivat solubiologian ja anatomian osastolla työskenteleviä henkilöitä. Testihenkilöltä otettiin 10 (9ml) putkea verta. Verinäytteille suoritettiin Ficoll-eritys mononukleaaristen solujen saamiseksi erilleen muusta verestä.

Apuna solujen erottelussa kerroksiksi tiheydensä perusteella, on yleisesti käytössä ioniton jodioitu Ficoll. Sitä voidaan käyttää mononukleaaristen solujen erottamiseen erytrosyyteistä ja granulosityteistä sekä kuolleiden solujen erottamiseen elävistä. Solujen erotuksessa laimennettu veri kaadetaan kerrokseksi sopivan tiheyden omaavan Ficollin

päälle. Sentrifugoinnin jälkeen mononukleaariset valkosolut sekä trombosyytit ovat muodostaneet kerroksen Ficoll-gradientin yläpuolelle (Kuva 4.). Erytrosyytit ja granulosyytit ovat laskeutuneet Ficollin läpi putken pohjalle. (Esser 1998.)



Kuva 4. Ficollin toimintaperiaate solujen erottelussa (mukailten Lin ym. 2014).

Testihenkilöiltä otettu veri laimennettiin PBS:llä 1:1 ja pipetoitiin Ficoll (GE Healthcare) kerroksen päälle. Putket sentrifugoitiin 301 G 30 min. Mononukleaariset valkosolut kerättiin Ficoll kerroksen päältä pasteur-pipetillä ja siirrettiin uuteen putkeen. Solut pestiin PBS:llä, jonka jälkeen solut laimennettiin perusmediumin joukkoon. Solumediumista suoritettiin solumäärään laskeminen Bürkerin kammiossa. Solumediumia otettiin 10  $\mu$ l ja tehtiin solulaimennos Trypan Bluella 1:20. Burkerin kammiossa laskettiin neljä aluetta, joista otettiin keskiarvo ja laskettiin sen avulla koko liuoksen solumäärä.

Monet biologiset sovellutukset, kuten mikrobiologiset ja soluviljelytyöt edellyttävät solupitoisuuden määrittämistä. Solujen laskeminen on melko yksinkertaista ja vaatii laskentakammiota, jota kutsutaan hemosytometriksi. Hemosytometrissä on yhdeksän neliötä, joista kukin on 1 mm<sup>2</sup>. Isokokoiset solut voidaan yksinkertaisesti laskea neljästä suuresta neliöstä kulmissa. Suspension tulee olla riittävän laimeaa, jotta solut tai muut hiukkaset eivät mene päällekkäin ja solujen tulisi jakautua tasaisesti levyille. Kuolleiden ja elinkelpoisten solujen erottamiseksi toisistaan näyte laimennetaan usein tiettyyn väriaineeseen, kuten Trypanin siniseen (Grigoryev 2014.) Kaavassa 2. on esitetty laskentatapa, jolla saadaan tietää koko liuoksen solumäärä.

$$\text{Total cells/ml} = \frac{\text{Total cells counted} \times \text{dilution factor} \times 10,000 \text{ cells/ml}}{\# \text{ of Squares}}$$

Kaava 3. Solujen laskentakaavio Bürkerin kammiossa (Grigoryev 2014).

Soluviljelyt tehtiin 24-kuoppalevyille 12 mm lasien päälle. Lasit käsiteltiin 24-kuoppalevyllä 70 %:lla etanolilla ennen viljelyn aloittamista, jotta lasit olisivat steriilejä. Perusmedium koostui seuraavista ainesosista: Alfa-MEM (Gibco), iFBS-USA (Gibco, Invitrogen) ja PS (Fisher Scientific). Perusmediumissa liuoksen kokonaistilavuudesta oli Alfa-MEM:iä 89 %, iFBS USA:aa 10 % ja PS:ää 1 %. Solumediumia valmistettiin sen verran, että soluja tuli  $0,5 \times 10^6$ /kuoppa ja solususpensiota 50  $\mu$ l jokaiseen kaivoon. Solumedium jaettiin kuoppiin lasilevyjen päällä ja soluja tartutettiin laseille 2 h lämpökaapissa (+37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Yhteen osaan tarvittiin kahdeksan 24-kuoppalevyä. Alla olevassa pipetointikaaviossa (Taulukko 1.) on esitetty esimerkki pipetointikaaviosta kahdella kuoppalevyllä.

Taulukko 1. Esimerkki pipetointikaaviosta 24-kuoppalevyille.

levy 1

	A	B	C	D
1	CTRL	CTRL	CTRL	CTRL
2	Hepes A 1 mM	Hepes A 1 mM	Hepes A 1 mM	Hepes A 1 mM
3	Hepes A 5 mM	Hepes A 5 mM	Hepes A 5 mM	Hepes A 5 mM
4	Hepes A 10 mM	Hepes A 10 mM	Hepes A 10 mM	Hepes A 10 mM
5	Hepes A 15 mM	Hepes A 15 mM	Hepes A 15 mM	Hepes A 15 mM
6	Hepes A 20 mM	Hepes A 20 mM	Hepes A 20 mM	Hepes A 20 mM

levy 2

	A	B	C	D
1	Hepes A 30 mM	Hepes A 30 mM	Hepes A 30 mM	Hepes A 30 mM
2	Hepes A 40 mM	Hepes A 40 mM	Hepes A 40 mM	Hepes A 40 mM
3	Hepes B 1 mM	Hepes B 1 mM	Hepes B 1 mM	Hepes B 1 mM
4	Hepes B 5 mM	Hepes B 5 mM	Hepes B 5 mM	Hepes B 5 mM
5	Hepes B 10 mM	Hepes B 10 mM	Hepes B 10 mM	Hepes B 10 mM
6	Hepes B 15 mM	Hepes B 15 mM	Hepes B 15 mM	Hepes B 15 mM

Solujenviljelysosuuteen käytettävän mediumin tuli sisältää myös mononukleaarisia soluja erilaistavia tekijöitä: RANKL:ia ja M-CSF:ää. Niitä lisättiin perusmediumiin joukkoon: RANKL:ia (Peprotech) 40 ng/ml ja M-CSF:ää (Peprotech) 20 ng/ml.

Kukin soluviljelysosuus sisälsi kontrollin ja kuusi puskuria: Hepes A (Sigma), Hepes B (Gibco), Hepes C (MP Biomedicals), Bes (Sigma), Mops (Sigma), Tauriini (Sigma). Hepes A-C puskurit olivat samaa puskuria, mutta vain eri valmistajien tekemiä. Ensimmäisessä viljelyssä oli mukana myös Pipes-puskuri, mutta se päätettiin hylätä tutkimuksesta sen epäsovivuuden takia. Puskureista valmistettiin seitsemän eri pitoisuutta: 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30mM ja 40 mM. Jokaisesta pitoisuudesta tehtiin neljä rinnakkaista määritystä.

Puskureista valmistettiin laimennokset pipetointikaavioiden (Taulukko 2. ja 3.) mukaisesti. Hepes A ja Hepes B valmiita nestemäisessä muodossa olevia puskureita. Muut puskurit olivat jauheesta liotettuja. Hepes A, Hepes B, Hepes C, Mops ja Bes kantaliuokset olivat konsentraatioiltaan 1 M. Pipes ja Tauriini puskureiden kantaliuokset olivat konsentraatioiltaan 0,4 M. Puskuriliuoksia lisättiin mediumin joukkoon, niin että pitoisuus vastasi levyllä haluttua pitoisuutta.

Taulukko 2. Hepes A, hepes B, hepes C, Mops, Bes puskurilaimennokset.

pitoisuus levyllä (mM)	medium (µl)	stock-lisäys (µl)	stock-pitoisuus (mM)	valmistettava stock liuos (µl)	mQ (µl)	1 M stockia (µl)
1	3000	120	25	160	156	4
5	3000	120	125	160	140	20
10	3000	120	250	160	120	40
15	3000	120	375	160	100	60
20	3000	120	500	160	80	80
30	3000	120	750	160	40	120
40	3000	120	1000	160	0	160

Taulukko 3. Tauriini, Pipes puskurilaimennokset.

pitoisuus levyllä (mM)	medium (µl)	stock-lisäys (µl)	stock-pitoisuus (mM)	valmistettava stock liuos (µl)	mQ (µl)	0,4 M stockia (µl)
1	3000	120	25	160	150	10
5	3000	120	125	160	110	50
10	3000	120	250	160	60	100
15	3000	120	375	160	10	150
20	3000	150	400	170	0	170
30	3000	225	400	240	0	240
40	3000	300	400	330	0	330

Kun soluja oli tartutettu lasilevyille aikansa, pipetoitiin aikaisemmin valmistetut puskuria sisältäneet mediumit lasilevyjen päälle. Jokaiseen kuoppaan tuli 700 µl mediumia. Soluja viljeltiin 10 vuorokautta lämpökaapissa. Joka 3 -4 vuorokausi vaihdettiin medium. 10 vuorokauden aikana suoritettiin kahteen kertaan mediumien vaihdot. Soluviljelmien mediumien vaihdossa kuopista pipetoitiin 300 µl mediumia pois ja lisättiin uutta mediumia 350 µl. Uusi lisätty medium sisälsi saman määrän puskuria, mitä aikaisemminkin oli käytetty. Soluviljelmiä tarkasteltiin 10. päivän aikana käänteisfaasikontrasti mikroskoopilla tasaisin väliajoin, jotta pystyttiin heti havaitsemaan mahdolliset kontaminaatiot tai muutokset.

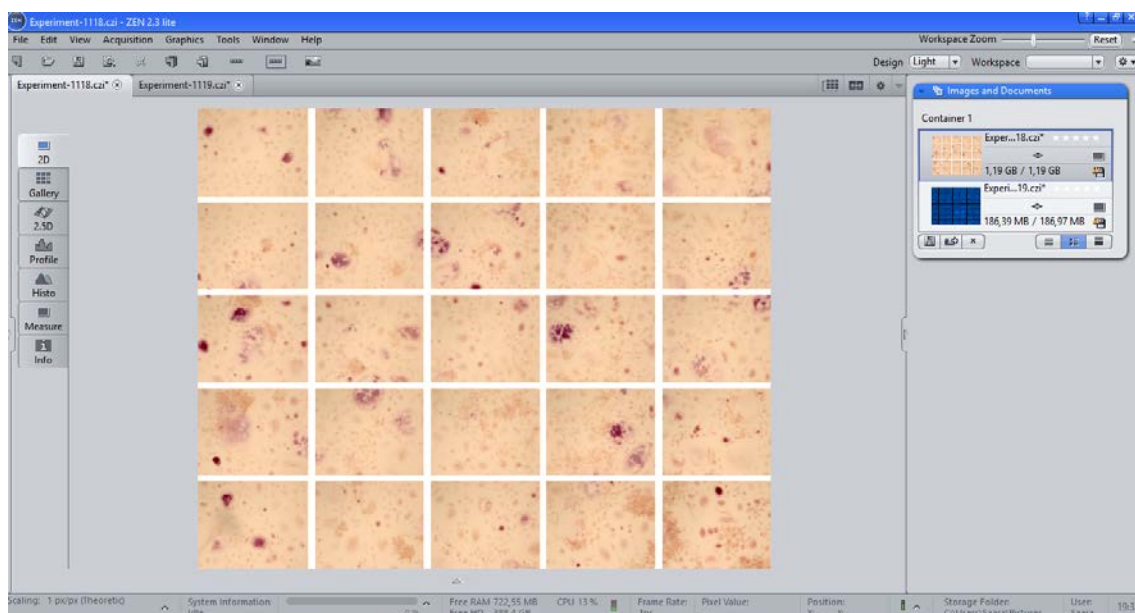
Kymmenentenä päivänä tapahtui soluviljelmien lopetus. Kuoppalevyt otettiin lämpökaapista ja pipetoitiin mediumit pois. Jokaisesta kuopasta otettiin kuitenkin talteen 100 µl mediumia myöhempiä pH:n määrytyksiä varten. Nämä mediumit pipetoitiin 96-kuoppalevyille niille laaditun pipetointikaavion mukaan ja laitettiin -80 °C:seen. Soluviljelmät huuhdeltiin kahteen kertaan PBS:llä, kuolleiden solujen irrottamiseksi ja mediumin saamiseksi pois.

Solujen kiinnittämiseksi laseille soluja fiksoitiin 4 % paraformaldehydillä (PFA) 15 minuuttia. Jokaiseen kuoppaan tuli 200 µl PFA:ta. Tämän jälkeen suoritettiin solujen värjäykset kahdella eri värjäyksellä TRACP:lla ja Hoechst:llä. TRACP-värjäykseen käytettiin TRACP-kittiä (Sigma). TRACP-kitissä olevista liuoksista tehtiin värjäävää liuosta tarvittavan määrän mukaisesti. Jokaiseen kaivon tarvittiin 200 µl värjäävää liuosta. Viljelmät värjättiin kahden levyn satseissa. Liuoksen tarve oli 9,6 ml (48 \* 200 µl), mutta pipetointivaran takia liuosta valmistettiin 9,9 ml. Kitti sisälsi erillisen ohjeen, jonka mukaan liuosten suhteet laskettiin. Sekä Fast Garnet GBC base liuosta että Natriumnitrate liuosta pipetoitiin 100 µl eppendorf-putkeen, liuokset sekoitettiin hyvin sekoittajan avulla 30 sekunnin ajan ja annettiin seistä 2 minuuttia. MQ-vettä mitattiin keitinlasiin 9 ml, johon edellä tehty liuos lisättiin. Seokseen pipetoitiin vielä Naphtol ASBI-liuosta 100 µl, Acetate-liuosta 400 µl ja Tartrate-liuosta 200 µl. Tehtyä liuosta pipetoitiin kiinnitettyjen solujen päälle 200 µl/lasi ja ne laitettiin lämpökaappiin + 37 °C:een 30 minuutiksi. Tämän jälkeen suoritettiin Hoechst-värjäys. Hoechst-väriainetta (Invitrogen) lisättiin 2,5 µl/1 ml PBS:ää. Liuosta pipetoitiin 200 µl jokaiseen kuoppaan. Solujen annettiin värjäytyä 3 min valolta suojattuna. Tämän jälkeen viljelmät huuhdeltiin kolme kertaa PBS:llä ja lopuksi vedellä.

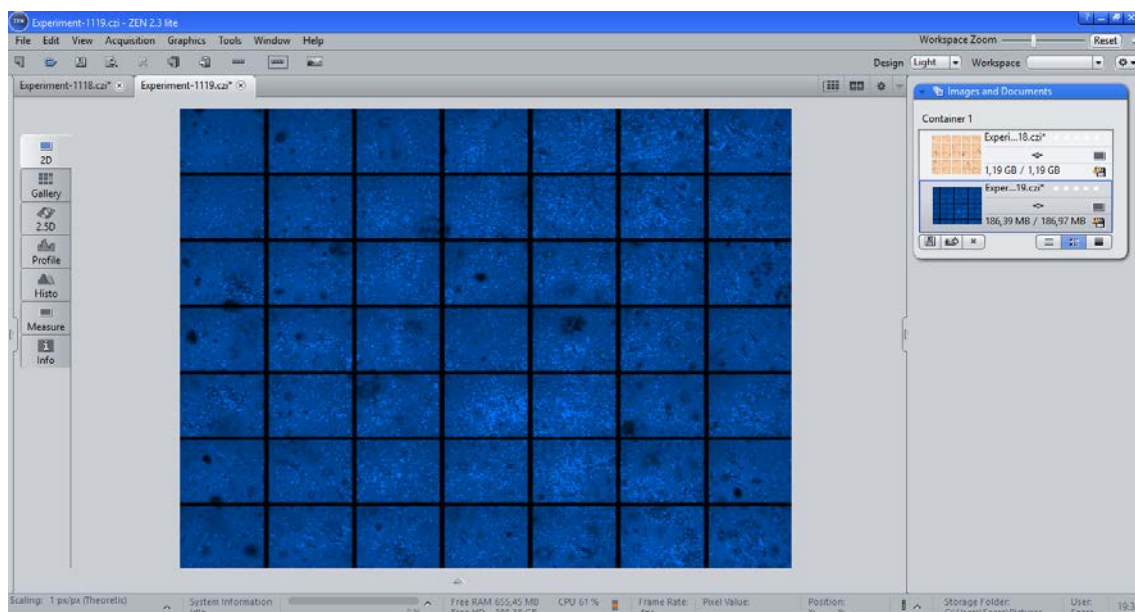


Värjäyksien jälkeen lasit mountattiin mowiolilla hiospäiselle näytelasille. Yhdelle näytelasilille tuli neljä rinnakkaista 12 mm soluviljelylasia. Soluviljelylasit otettiin pois kuoppalevyiltä neulan ja pinsettien avulla ja laitettiin solupuoli alaspäin lasilevyille mowiol pisaroiden päälle. Lasilevyjen annettiin kuivua vuorokauden ajan huoneenlämmössä valolta suojattuna. Tämän jälkeen lasilevyt siirrettiin jääkaappilämpötilaan.

Sekä TRACP että Hoechst värjätyt solut kuvattiin AxioImager Zeiss mikroskoopilla, joka oli liitetty tietokoneeseen. TRACP-värjäys kuvattiin 5\*5 ruudukkona ja Hoechst-värjäys 7\*7 ruudukkona, molemmat 20x suurennoksena. Mikroskoopilla kuvatut kuvat tallennettiin ulkoiselle kovalevyille ja kuvia tarkasteltiin myöhemmin ZEN lite microscopy-ohjelmalla. Kahden värjäyksen kuvia katsottiin vierekkäin ja laskettiin kypsien osteoklastien määrä. Jokaisesta viljelmästä laskettiin viisi ruudukkoaluetta. TRACP-värjäys toi esille osteoklastien muodon ja Hoechst-värjäyksellä pystyttiin varmistamaan osteoklastien tummien määrä. Yhteensä laskettavia alueita kolmesta osasta tuli 2581 kpl. Tässä opinnäytetyössä osteoklastin määritelmänä pidettiin kolmea tumaa. Kuvissa 4. ja 5. on esitetty näkymä yhdeltä viljelmästä molemmilla värjäyksillä.



Kuva 5. TRACP-värjäys ZEN lite microscopy ohjelmalla tarkasteltuna.



Kuva 6. Hoechst-värjäys ZEN lite microscopy ohjelmalla tarkasteltuna.

Solujen lukumäärät lasketuilta alueilta taulukoitiin Exceliin. Jokaisesta osasta laskettiin solumäärien keskiarvot ja keskihajonnat kustakin puskuripitoisuudesta. Kolmen osan arvot koottiin yhteen ja muodostettiin kaaviot kaikista puskureista ja puskurin pitoisuuksien vaikutuksesta solumääriin. Puskureita sisältäneitä soluviljelmiä verrattiin kontrolliin, joka ei sisältänyt puskuriliuosta. Kontrollin tulokset oli normalisoitu 100%:iin ja muita arvoja oltiin verrattu siihen. Exceliin tilastoidusta solumääristä haluttiin määrittää tilastollinen merkittävyys. Tilastollinen merkittävyys testattiin R-ohjelman skriptillä käyttäen yleistettyä lineaarista sekamallia Poisson-jakaumalla. Monivertailukorjaus tehtiin Bonferroni-menetelmällä. Se, kuinka merkitsevinä saatuja tuloksia voidaan pitää, pystytään määrittämään p-arvon avulla. P-arvo kertoo, johtuuko saadut tulokset sattumasta vai onko niillä tilastollista merkittävyyttä. Tuloksia voidaan pitää tilastollisesti merkitsevinä, jos  $p \leq 0,05$ . Tilastollisesti erittäin merkitsevinä voidaan pitää, kun  $p \leq 0,001$ . (Heikkilä 2014.)

#### 4.3 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö on tutkimusotteeltaan enemmän kvantitatiivinen. Kvantitatiivinen tutkimus on määrällistä tutkimusta, jossa tutkittavaa kohdetta kuvaillaan numeerisesti tai tunnuslukujen avulla. Määrällinen tutkimus pyrkii vastaamaan kysymyksiin kuten: kuinka moni, kuinka paljon ja kuinka usein. (Vilkkä 2007.) Kvantitatiivinen tutkimus edellyttää tarpeeksi suurta ja edustavaa tutkimusotosta. Tutkimuksessa saatuja tuloksia voidaan

esittää ja havainnollistaa kaavioin ja taulukoin. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa saadaan yleensä selville tutkittavassa ilmiössä tapahtuneita muutoksia. (Heikkilä 2010.) Tässä opinnäytetyössä haluttiin tietää numeerisesti, miten puskurit vaikuttavat osteoklastien solumääriin. Solumäärät tilastoitiin ja havainnollistettiin taulukoiden avulla. Toisaalta tutkimuksessa on myös kvalitatiivista aspektia sillä tarkastellaan, millaisia laadullisia muutoksia puskurit aiheuttavat soluviljelmiin.

#### 4.4 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Tieteellinen tutkimus tulee olla eettisten periaatteiden mukaan tehty, jotta sen tuloksia voidaan pitää hyväksyttävänä, luotettavana ja uskottavana. Hyvä tieteellinen käytäntö on myös pohjana tutkimusryhmien laatu järjestelmälle. Hyvän tieteellisen tutkimuksen lähtökohtina on mm. rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus, niin tutkimustyössä kuin tulosten arvioinnissa. Tutkimuksessa muiden tutkijoiden työ, saavutukset ja julkaisut merkitään aineistoihin asiamukaisella tavalla. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.)

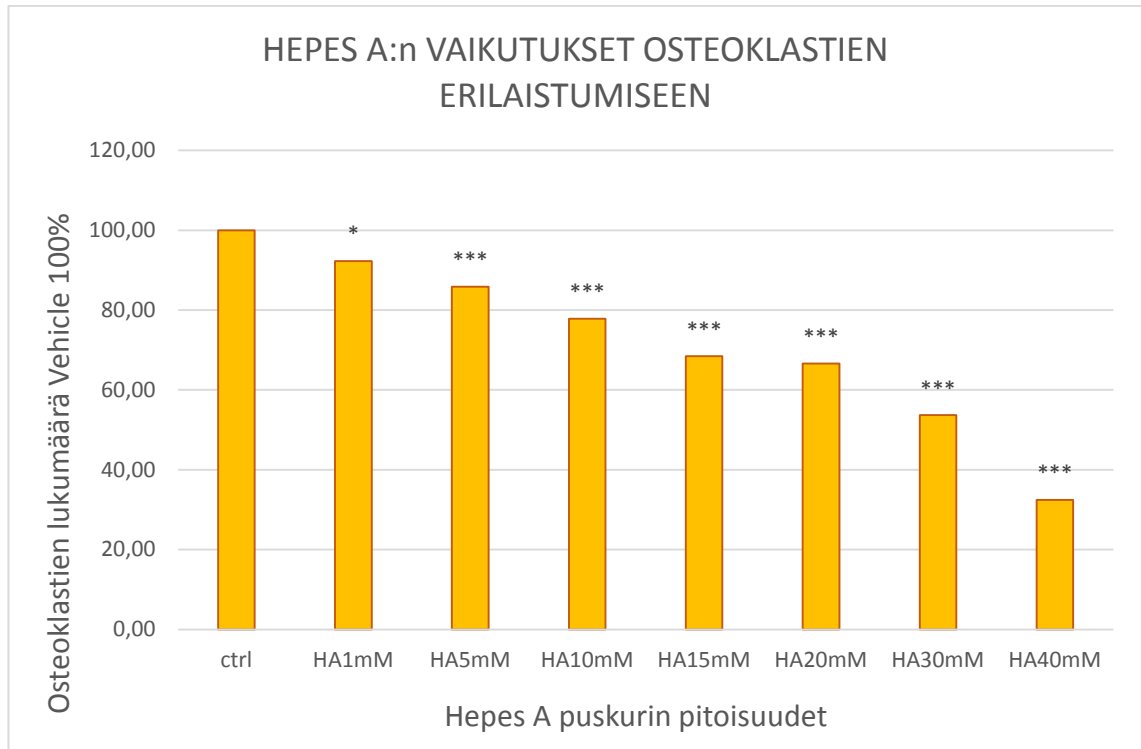
Tämä opinnäytetyö tehdään hyvän tieteellisen käytännön periaatteiden mukaan. Tutkimus suoritetaan rehellisesti, saatuja tuloksia muuntelematta tai kaunistelematta. Opinnäytetyötä varten ei tarvitse hakea erillistä tutkimuslupaa, sillä työ tehdään tutkimusryhmässä, joka on jo saanut luvat tehdä tutkimusta. Tutkimus tehdään Helsingin julistusperiaatteen mukaisesti (the Declaration of Helsinki) ja tutkimukselle on Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirin eettisen toimikunnan lupa (50/180/2009).

## 5 TULOKSET

Tämä opinnäytetyö vahvisti alustavissa tutkimuksissa havaittuja huomioita osteoklastien pH:n ulkoisen säätelyn haitoista. Tutkimuksessa testattiin kuuden eri puskurin vaikutusta osteoklastien viljelemisessä. Puskureiden pitoisuudet valittiin sen mukaan, mitä viljelmissä yleensä tiedetään käytettävän. Tässä opinnäytetyössä saatiin esille odotettuja tuloksia. Oletuksena oli, että puskurit vaikuttavat negatiivisesti kypsien osteoklastien muodostumiseen. Eri valmistajien puskureilla oli osteoklastien erilaistumisen kannalta hyvin samankaltaisia vaikutuksia. Kaikissa puskureissa esiintyi kypsien osteoklastien solumäärän laskua, mitä suurempiin puskuripitoisuuksiin siirryttiin. Puskureiden käyttö osteoklastien viljelemisessä aiheutti muutoksia solujen lukumäärään ja morfologiaan. Suurissa puskuripitoisuuksissa, kuten 30 -40 mM esiintyi paljon solujen atrofiaa eli surkastumista. Suurissa puskuripitoisuuksissa oli myös paljon kuolleita soluja havaittavissa.

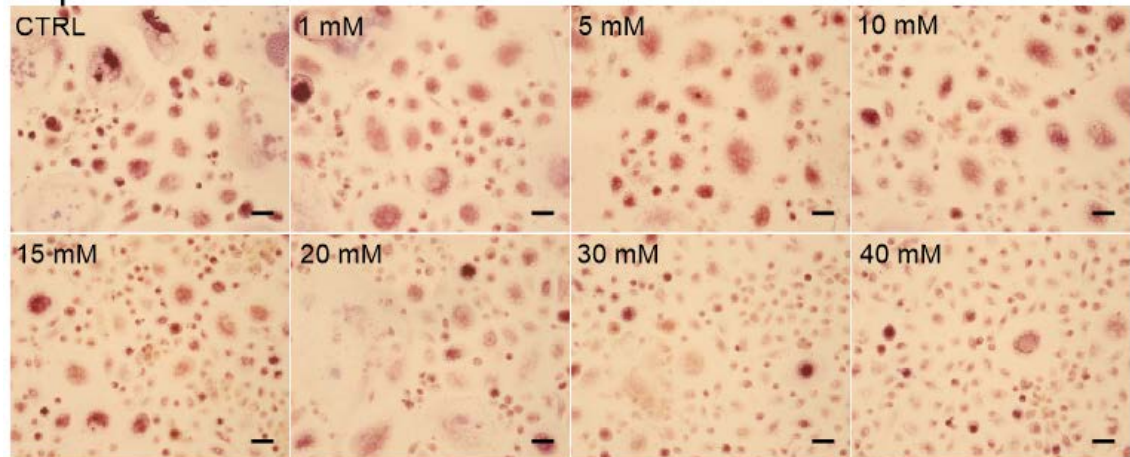
Pipes-puskuri oli mukana ensimmäisessä osassa, mutta siinä havaittiin heti ensimmäisen vuorokauden jälkeen sakkautumista, jonka arveltiin johtuvan homeesta. Myöhemmin koitettiin tehdä uudet soluviljelmät sisältäen Pipes-puskuria, mutta niissä ilmeni myös sakkaantumista, joten tämä puskuri päätettiin jättää muista osista pois.

Alla olevissa kuvioissa (1 -6) ja kuvissa (7 -12) on esitetty kunkin puskurin vaikutukset kypsien osteoklastien muodostumiselle. Kuvioista ja kaavioista voi huomata suhteellisen tasaista laskua solumäärissä annosvasteen noustessa. Puskureita sisältäneitä soluviljelmiä verrattiin kontrolliin, joka ei sisältänyt puskuriliuosta. Kontrollin tulokset oli normalisoitu 100%:iin ja muita arvoja oltiin verrattu siihen. Saatujen p-arvojen perusteella tuloksia voidaan pitää tilastollisesti merkitseväinä. Pienissä puskuripitoisuuksissa tulokset eivät olleet niin merkittäviä, mutta siirryttäessä suurempiin pitoisuuksiin tulokset ovat kaikissa puskureissa erittäin merkittäviä.

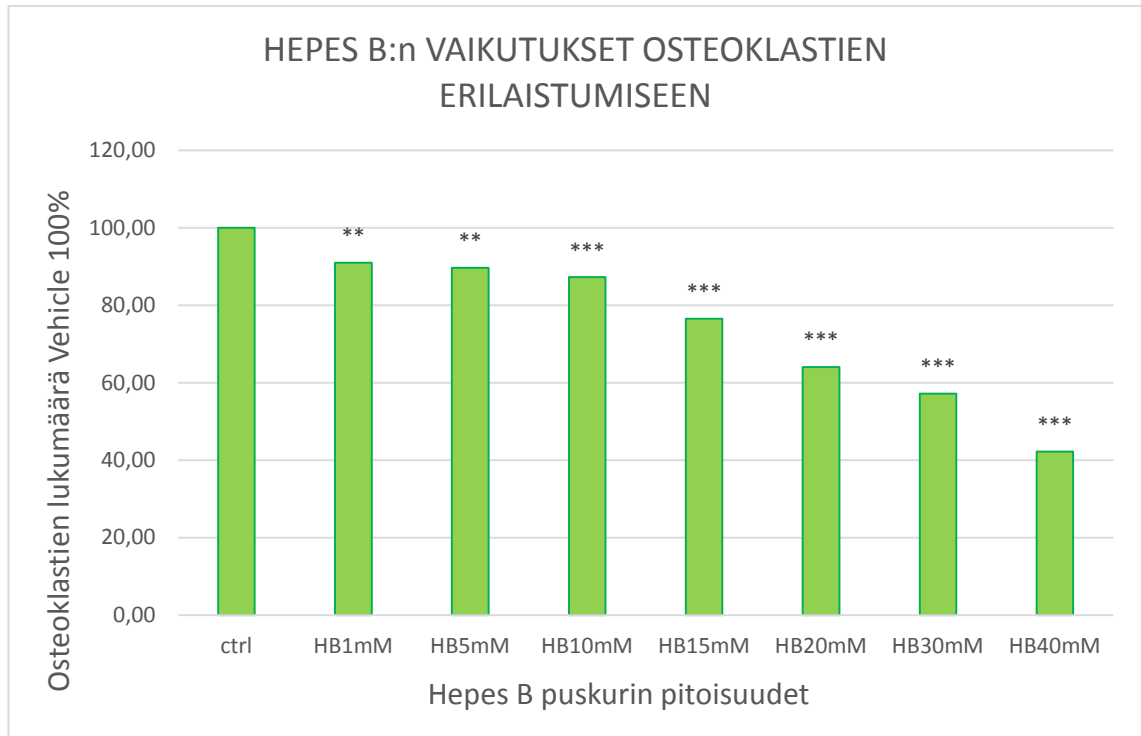


Kuvio 1. Hepes A:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin. Hepes A:n pitoisuuksilla 5mM-40mM oli merkittävä vaikutus osteoklastien erilaistumisen vähentymiseen. Arvot on normalisoitu suhteessa kontrolliin. Asteriskit kuvaavat tilastollista merkittävyyttä ctrl:n ja kunkin puskuripitoisuuden välillä. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

### Hepes A

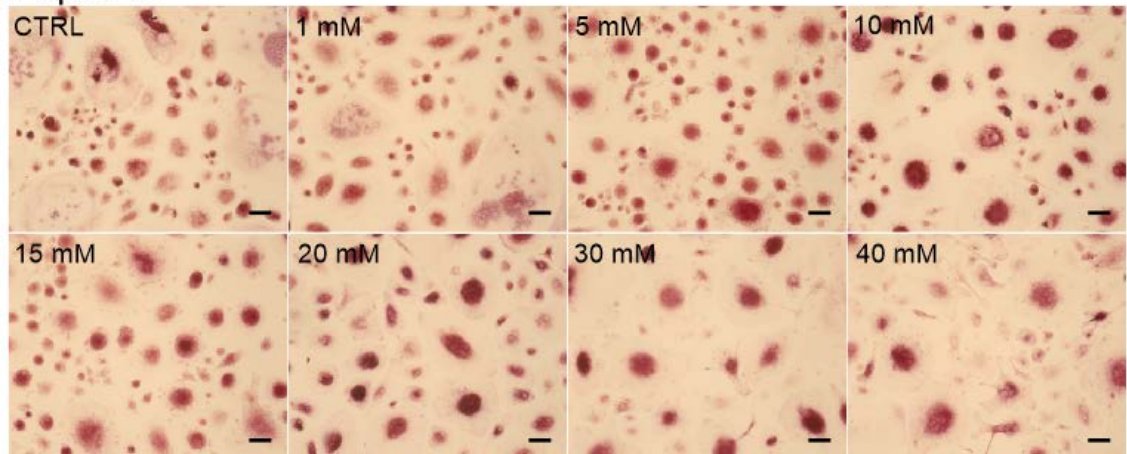


Kuva 7. Hepes A:n vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen. Solujen morfologiassa ilmenee muutoksia puskuripitoisuuksista riippuen. Suurissa puskuripitoisuuksissa esiintyy atrofisia soluja ja vähemmän kypsiä osteoklasteja. Kuvat 20x suurennoksena (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ).

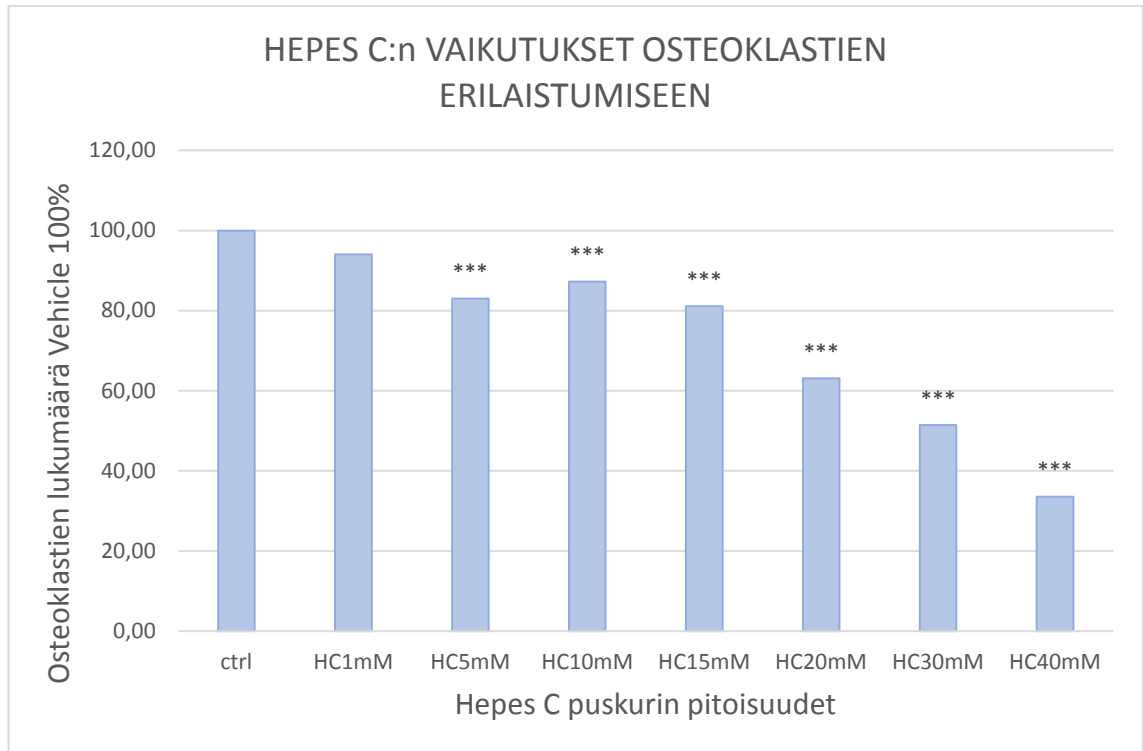


Kuvio 2. Hepes B:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin. Hepes B:n pitoisuuksilla 10mM-40mM oli merkittävä vaikutus osteoklastien erilaistumisen vähentymiseen. Arvot on normalisoitu suhteessa kontrolliin. Asteriskit kuvaavat tilastollista merkittävyyttä ctrl:n ja kunkin puskuripitoisuuden välillä. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

### Hepes B

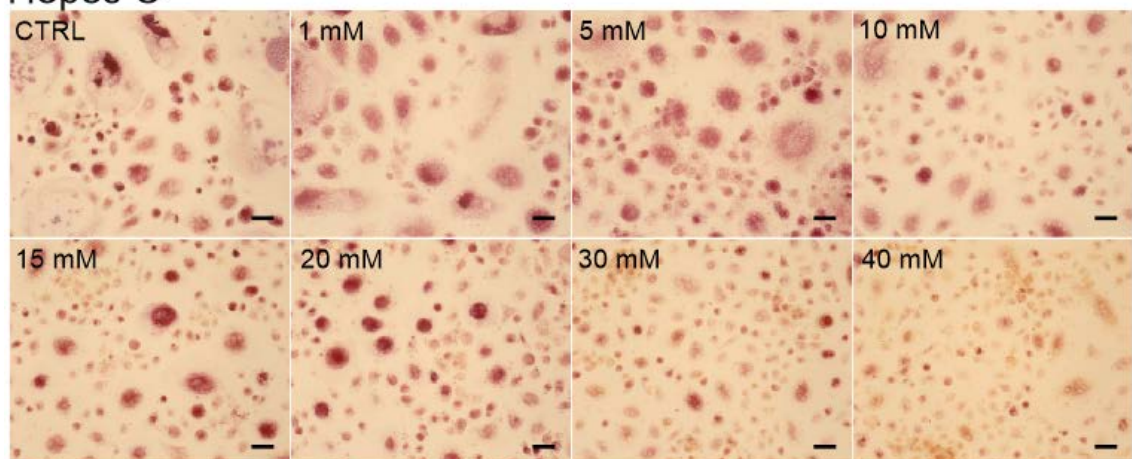


Kuva 8. Hepes B:n vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen. Solujen morfologiassa ilmenee muutoksia puskuripitoisuuksista riippuen. Suurissa puskuripitoisuuksissa esiintyy atrofisia soluja ja vähemmän kypsiä osteoklasteja. Kuvat 20x suurennoksena (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ).

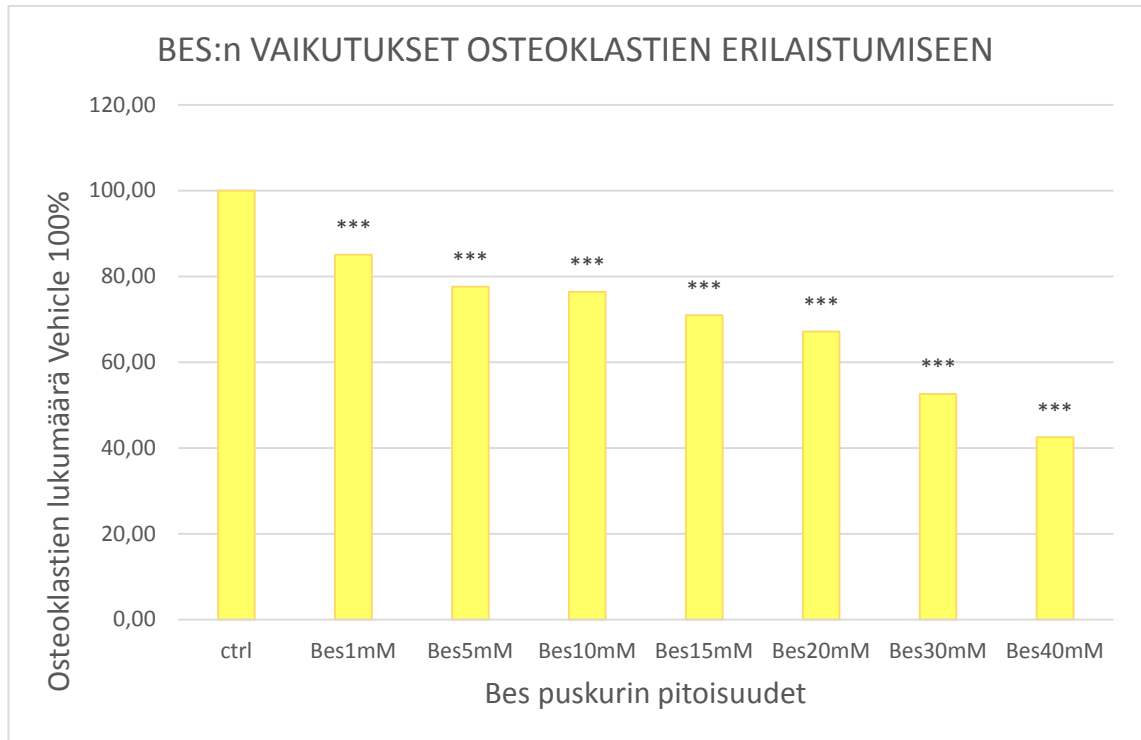


Kuvio 3. Hepes C:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin. Hepes C:n pitoisuuksilla 5mM-40mM oli merkittävä vaikutus osteoklastien erilaistumisen vähentymiseen. Arvot on normalisoitu suhteessa kontrolliin. Asteriskit kuvaavat tilastollista merkittävyyttä ctrl:n ja kunkin puskuripitoisuuden välillä. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

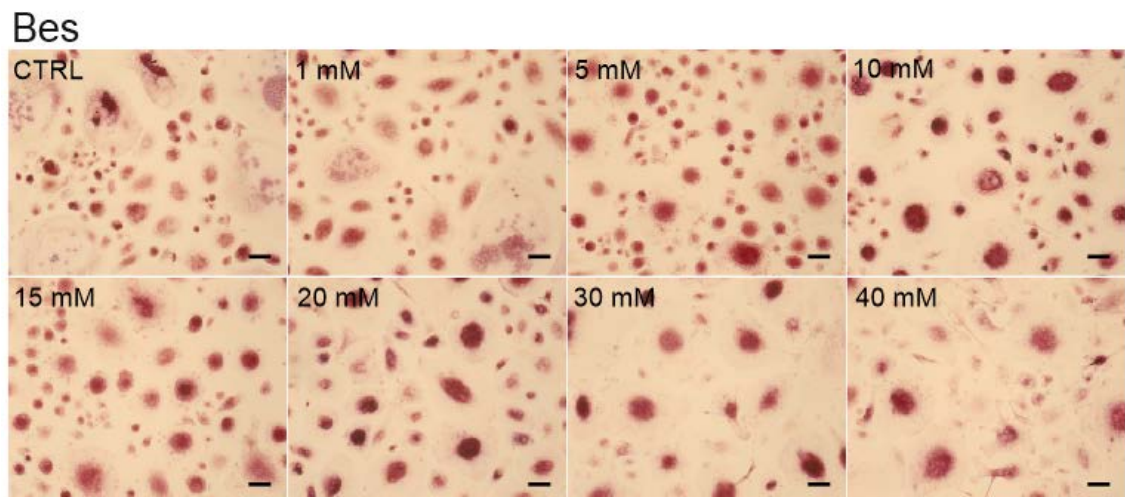
### Hepes C



Kuva 9. Hepes C:n vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen. Solujen morfologiassa ilmenee muutoksia puskuripitoisuuksista riippuen. Suurissa puskuripitoisuuksissa esiintyy atrofisia soluja ja vähemmän kypsiä osteoklasteja. Kuvat 20x suurennoksena (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ).

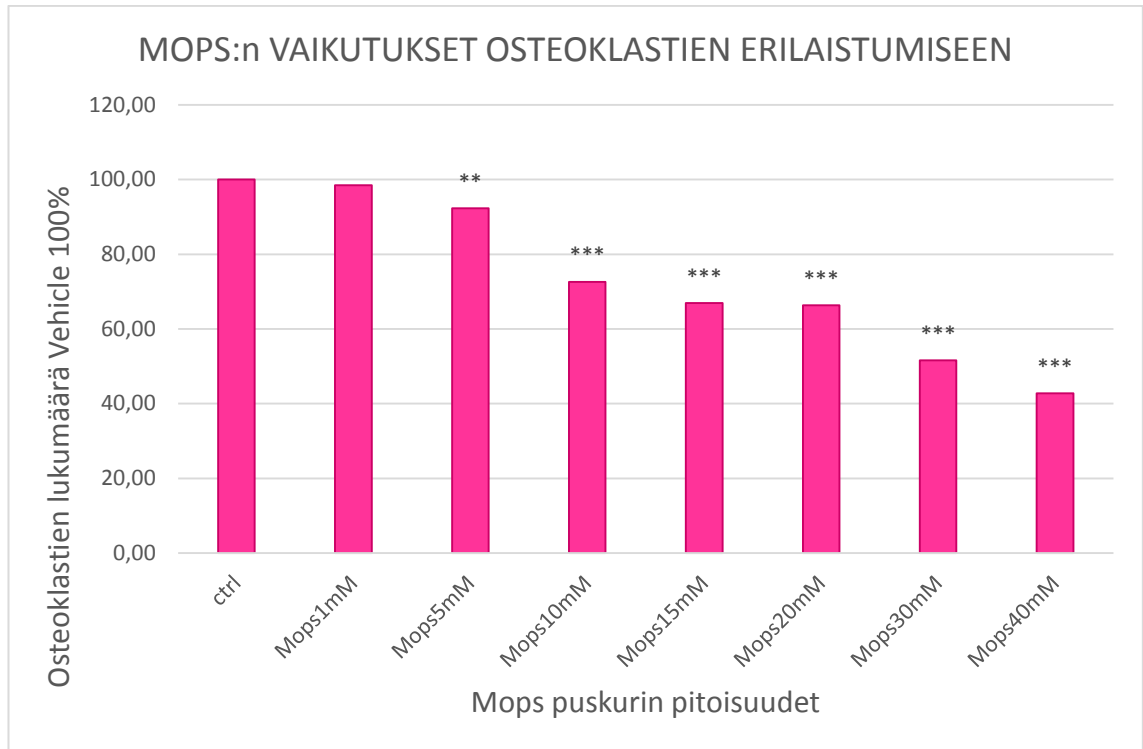


Kuvio 4. Bes:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin. Bes:n pitoisuuksilla 1mM-40mM oli merkittävä vaikutus osteoklastien erilaistumisen vähentymiseen. Arvot on normalisoitu suhteessa kontrolliin. Asteriskit kuvaavat tilastollista merkittävyyttä ctrl:n ja kunkin puskuripitoisuuden välillä. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

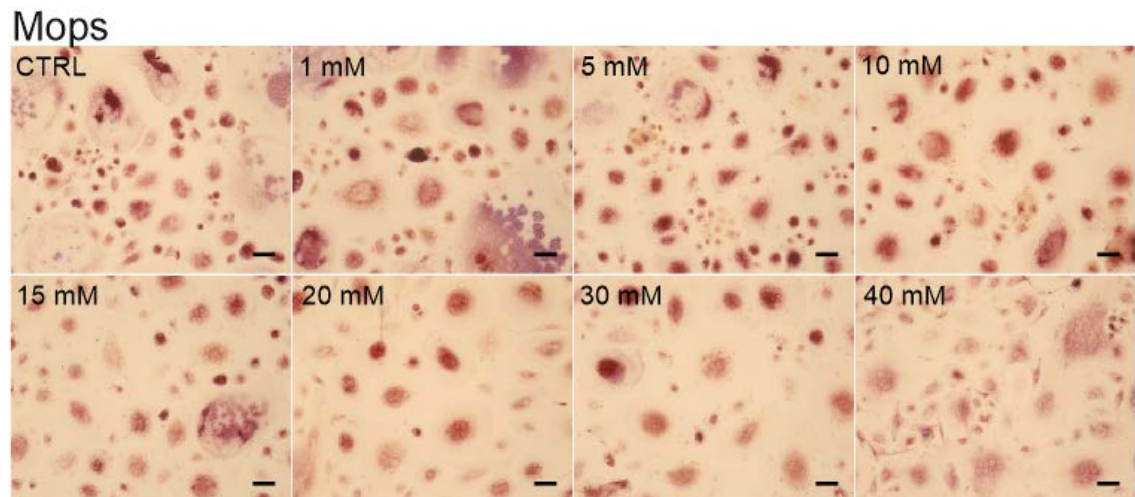


Kuva 10. Bessin vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen. Solujen morfologiassa ilmenee muutoksia puskuripitoisuuksista riippuen. Suurissa puskuripitoisuuksissa esiintyy atrofisia soluja ja vähemmän kypsiä osteoklasteja. Kuvat 20x suurennoksena (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ).

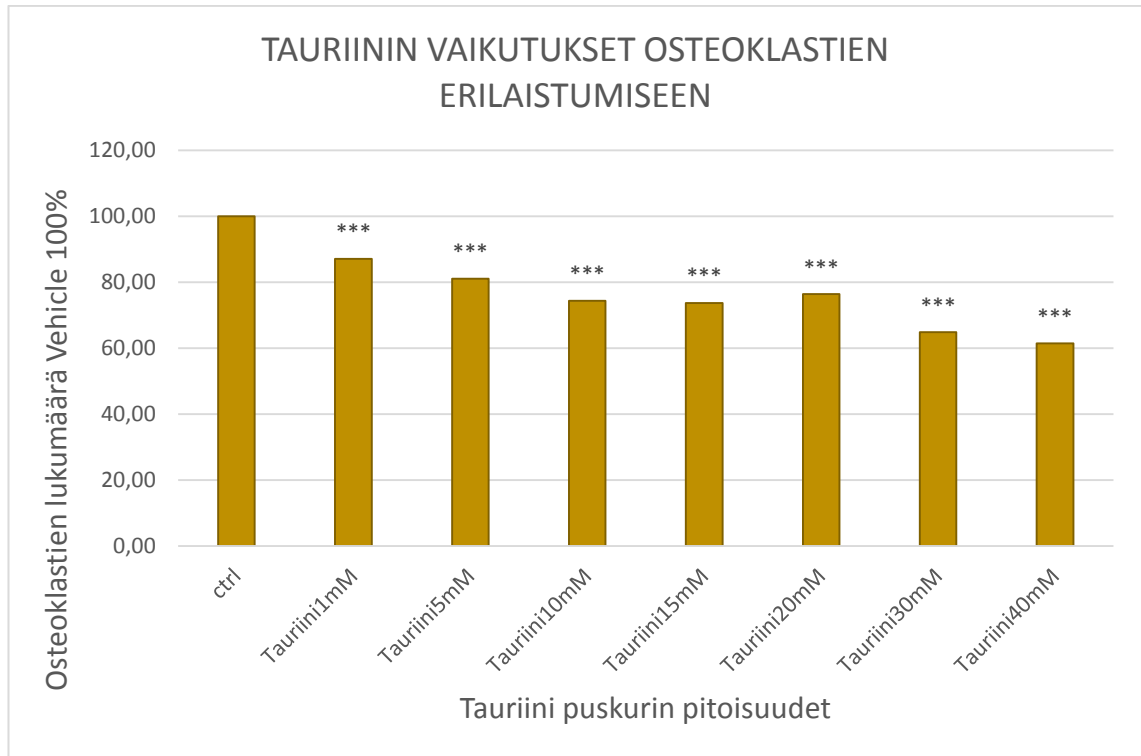




Kuvio 5. Mops:n pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin. Mops:n pitoisuuksilla 10mM-40mM oli merkittävä vaikutus osteoklastien erilaistumisen vähentymiseen. Arvot on normalisoitu suhteessa kontrolliin. Asteriskit kuvaavat tilastollista merkittävyyttä ctrl:n ja kunkin puskuripitoisuuden välillä. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

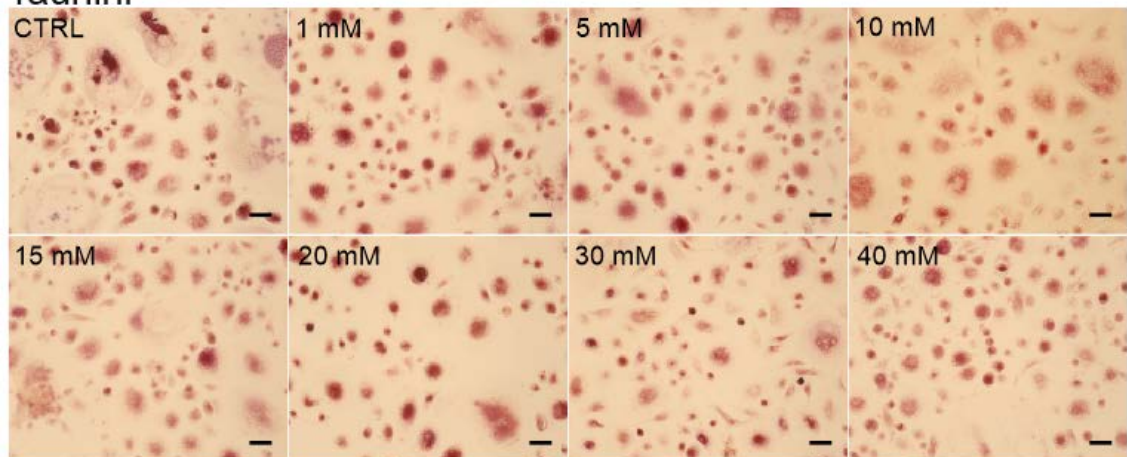


Kuva 11. Mopsin vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen. Solujen morfologiassa ilmenee muutoksia puskuripitoisuuksista riippuen. Suurissa puskuripitoisuuksissa esiintyy atrofisia soluja ja vähemmän kypsiä osteoklasteja. Kuvat 20x suurennoksena (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ).



Kuvio 6. Tauriinin pitoisuuksien vaikutus osteoklastien solumääriin. Tauriinin pitoisuuksilla 1mM-40mM oli merkittävä vaikutus osteoklastien erilaistumisen vähentymiseen. Arvot on normalisoitu suhteessa kontrolliin. Asteriskit kuvaavat tilastollista merkittävyyttä ctrl:n ja kunkin puskuripitoisuuden välillä. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

### Tauriini



Kuva 12. Tauriinin vaikutus kypsien osteoklastien muodostumiseen. Solujen morfologiassa ilmenee muutoksia puskuripitoisuuksista riippuen. Suurissa puskuripitoisuuksissa esiintyy atrofisia soluja ja vähemmän kypsiä osteoklasteja. Kuvat 20x suurennoksena (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ).

## 6 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön aihepiiri oli entuudestaan tuntematon, joten aiheeseen syventyminen ja ymmärtäminen veivät aikaa. Suurin osa lähteistä oli englanninkielisiä, jonka kääntäminen oli omalta osaltaan haastavaa. Lähteiksi koitettiin valita mahdollisimman uusia julkaisuja ja luotettavista lähteistä. Opinnäytetyön tekeminen antoi kuitenkin paljon uutta ja mielenkiintoista tietoa ja syvensi osaamista solu- ja molekyylibiologian aihealueeseen. Opinnäytetyön myötä oppi hakemaan ja arvioimaan tieteellisiä artikkeleita. Soluviljelyn perusteet tulivat tämän opinnäytetyön myötä tutuiksi. Opinnäytetyötä tehdessä oppi myös, millaista on tutkimusryhmässä työskentely.

Tutkimuksen reliabiliteetilla eli luotettavuudella tarkoitetaan tulosten tarkkuutta ja sitä, etteivät tulokset ole sattumanvaraisia (Heikkilä 2010). Tässä opinnäytetyössä käytettiin useampaa puskuria todistamaan, että puskureiden käytöstä on haittaa osteoklastien soluviljelyssä. Jokaisesta puskuripitoisuudesta tehtiin neljä rinnakkaista, joka toi lisää luotettavuutta tutkimukselle ja vähensi sattumasta johtuvia tuloksia. Vinoumaa on saattanut aiheuttaa yksilön vaihtelu solutasolla, harjoittelijan kokemattomuus ja pieni otanta. Reliabiliteettia lisää kuitenkin se, että kaikki saadut tulokset ovat samansuuntaisia. Tutkimuksen validiteetilla eli pätevyydellä mitataan sitä, että tutkimuksessa on selvitetty niitä asioita, mitä on ollut tarkoituskin selvittää (Heikkilä 2010). Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kannattaako puskureita käyttää jatkossa osteoklastien soluviljelyssä. Tähän tavoitteeseen päästiin, ja saadut tulokset osoittavat puskureista olevan haittaa osteoklastien viljelemiselle.

Tätä opinnäytetyötä tehdessä pidettiin koko ajan laboratoriopäiväkirjaa, minne kukin työvaihe kirjoitettiin ylös. Näin myöhemmin voidaan tarkastaa tehdyt työvaiheet ja työ tarvittaessa toistaa. Pipetoinnit tehtiin tarkkuutta noudattaen ja virheiden sattuessa työvaihe tehtiin uudestaan. Toisaalta opinnäytetyöntekijän kokemattomuus soluviljelystä ja rutiininomaisesta pipetoinnista on saattanut aiheuttaa enemmän hajontaa tehtyjen rinnakkaisten välillä. Soluviljelyosuus suoritettiin vetokaapissa, ja työskennellessä toimittiin mahdollisimman aseptisesti. Soluviljelyssä käytettiin sinne varattua laboratoriotakkia, ja kumihanskat suihkutettiin 70 %:lla etanolilla aina ennen laminaarikaapissa työskentelyä. Soluviljelmiä tarkasteltiin tasaisin väliajoin, jottei viljelyssä ilmennyt hometta tai muita epäpuhtauksia, mikä olisi kontaminoinut myös muut lämpökaapissa olevat viljelykset.

Tutkimusta jatketaan vielä tutkimusryhmässä, siellä tarkastellaan solun ulkoista pH:n muutosta mediumista. Tutkimusta tehdään myös katsomalla onko osteoklastien differentiaatiossa yleisesti käytetyllä RAW264.7- solulinjamallilla vastaavaa merkitystä puskurien käyttämisellä viljelmässä. Lisätutkimusaiheena voisi tutkimuksen toistaa toisten koehenkilöiden soluilla. Tässä opinnäytetyössä käytettiin kolmen koehenkilön soluja, joten toisaalta otos oli pieni, vaikka testattavia puskureita ja niiden pitoisuuksia oli paljon. Koehenkilöjen osteoklastien välillä oli eroja, joten lisätutkimus suuremmalla otoksella olisi hyödyksi. Koehenkilöiden osteoklastien koossa ilmeni eroja, osalla muodostui paljon pieniä osteoklasteja, joissa oli alle kymmenen tumaa. Toisessa osassa koehenkilön osteoklastit muodostuivat isoiksi ja runsastumaisiksi. Kiinnostavaa olisi tutkia, onko näillä osteoklasteilla jotain eroavaisuuksia ja millaisia ominaisuuksia erikokoisilla osteoklasteilla on.

## LÄHTEET

- Blomqvist R. 2006. Osteoklastien pH-säätelyn merkitys luun hajotukselle. Duodecim-lehti. Vol 122. nro 4. 477–8.
- Boissy P.; Saltel F.; Bouniol C.; Jurdic P. & Machuca-Gayet I. 2002. Transcriptional Activity of Nuclei in Multinucleated Osteoclasts and Its Modulation by Calcitonin. *Endocrinology*. vol. 143. Issue 5. 1913–1921.
- Boyce B. & Xing L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. 9 (Suppl 1). S1.
- British society of immunology www-sivut. Bone marrow. Viitattu 25.9.2017. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/organs-and-tissues/bone-marrow>
- Esser C. 1998. Historical and useful methods preselection and preparative scale sorting. *Cell Separation Methods and Applications*. pages 3-4
- Feng X. & McDonald J.M. 2011. Disorders of bone remodelling. vol 6. 121-145.
- Florencio-Silva R.; Sasso G.R.; Sasso-Cerri E.; Simões M.J. & Cerri P.S. 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 421746.
- Good N.; Winget G.; Winter W.; Connolly T.; Izawa S. & Sing R. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. vol 5. no. 2. 467-477
- Grigoryev Y. 2014. Cell Counting with a Hemocytometer. Viitattu 26.9.2017. <http://bitesize-bio.com/13687/cell-counting-with-a-hemocytometer-easy-as-1-2-3/>
- Hayman A.R. 2008. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. 41(3). 218-23.
- Heikkilä T. 2010. Tilastollinen tutkimus. 7-8 painos. Helsinki. Editan Publishing Oy.
- Heikkilä T. 2014. Muuttujien väliset riippuvuudet- esimerkkejä. Edita Publishing Oy. Viitattu 10.11.2017. <http://www.tilastollinentutkimus.fi/5.SPSS/Riippuvuudet.pdf>
- Helsingin julistus/ Declaration of Helsinki. Viitattu 14.3.2017. <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>
- Interchim. 2017. Good's buffers (biological buffers). Viitattu 15.11.2017. <http://www.interchim.fr/ft/0/062000.pdf>
- Invirogen. 2005. Hoechst Stains. Viitattu 26.10.2017. <http://www.biotech.illinois.edu/sites/biotech.illinois.edu/files/uploads/Hoechst.pdf>
- Lamp E. & Drexler H. 2000. Biology of tartrate-resistant acid phosphatase. *Leukemia & Lymphoma* vol. 39. issue 5-6, 477-484
- Leppäluoto J.; Kettunen R.; Rintamäki H.; Vakkuri O.; Vierimaa H. & Lätti S. 2017. Anatomia ja fysiologia- rakenteesta toimintaan. Sanoma pro.
- Lodish H.; Berk A.; Matsudaira P.; Kaiser C.; Krieger M.; Scott M.; Zipursky S. & Darnell J. 2003. *Molecular cell biology*. Fifth edition. W. H. Freeman and Company.
- Luustoliitto www-sivut. Luustoterveys. Viitattu 14.8.2017. <http://luustoliitto.fi/luustoterveys/luusto>
- Miyamoto & Suda. 2002. Differentiation and function of osteoclasts. 52(1). 1-7.

Mohan C. 2003. Buffers- guide for the preparation and use of buffers in biological systems. Cal-biochem.

National institutes of health www- sivut. 2017. Osteopetrosis. Viitattu 4.12.2017. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/osteopetrosis>

Promega www-sivut. Buffers for biochemical reactions. Viitattu 4.9.2017. <https://fi.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/buffers-for-biochemical-reactions/>

Reumaliitto www-sivut. Osteoporoosi. Viitattu 17.3.2017 <https://www.reumaliitto.fi/fi/reuma-aapi-nen/reumataudit/osteoporoosi>

Sato D. & Kan M. 1998. Media for Culture of Mammalian Cells. Current protocols in cell biology. 20-28. Viitattu 30.8.2017. Saatavissa ositteesta: <https://biotechengineeryuvraj.files.wordpress.com/2008/02/current-protocols-in-cell-biology.pdf>

Sigma-aldrich www-sivut. Good`s buffers. 2017a. Viitattu 12.3.2017. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=14572938>

Sigma-aldrich www-sivut. Hepes. 2017d. Viitattu 12.11.2017. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/hepes-specification.html>

Sigma-aldrich www-sivut. Hoechst stain solution. 2017c. Viitattu 30.8.2017. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h6024?lang=fi&region=FI>

Sigma-aldrich www-sivut. Primary cell culture. 2017b . Viitattu 7.5.2017. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html>

Sigma-aldrich www-sivut. Taurine. 2017e. Viitattu 12.11.2017. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t0625?lang=fi&region=FI>

Solunetti www-sivut. Luusolut. 2017a. Viitattu 12.3.2017. [http://www.solunetti.fi/fi/histologia/luusolut\\_1/](http://www.solunetti.fi/fi/histologia/luusolut_1/)

Solunetti www-sivut. Pintasolut. 2017b. Viitattu 30.8.2017. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/pintasolut/>

Solunetti www-sivut. Soluviljely. 2017c. Viitattu 7.5.2017. [http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely\\_1/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/)

Springer E.K. 2014. PH Measurement guide. Hamilton. <http://separations.co.za/wp-content/uploads/2014/09/pH-Measurement-Guide.pdf>

Thermo fisher www-sivut. Hepes in cell culture. Viitattu 15.11.2017. <https://www.thermo-fisher.com/fi/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/hepes.html>

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen suomessa. Viitattu 10.4.2017. Saatavissa osoitteessa: <http://www.tenk.fi/fi/htk-ohje>

Vilka H. 2007. Tutki ja mittaa - määrällisen tutkimuksen perusteet. Viitattu 10.4.2017. Saatavissa osoitteesta: <http://hanna.vilka.fi/wp-content/uploads/2014/02/Tutki-ja-mittaa.pdf>

Yao T. & Asayama Y. 2017. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Vol. 16. Issue 2. p 99–117.