



HYDROGEELIEN VALMISTUKSEN OPTIMOINTI JA NIIDEN KÄYTTÖ SOLUVILJELYALUSTANA

Outi Väätäinen

Opinnäytetyö
Kevät 2013
Terveysten edistämisen koulutusohjelma
Ikääntyvien ja pitkäaikaisten hoito
Tampereen ammattikorkeakoulu
Ylempi AMK

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Sosiaali- ja terveystieteiden ylempi ammattikorkeakoulututkinto
Terveyden edistämisen koulutusohjelma
Ikääntyvien ja pitkäaikaisten potilaiden hoito

VÄÄTÄINEN, OUTI:

Hydrogeelien valmistuksen optimointi ja niiden käyttö soluviljelyalustana

Opinnäytetyö 78 sivua, joista liitteitä 9 sivua

Kevät 2013

Peptidipohjaiset hydrogeelit ovat tärkeitä biomateriaaleja ruokateollisuudessa, kudosteknologiassa ja lääketieteessä. Soluviljelyssä niitä on käytetty yli vuosikymmenen ajan. Hydrogeeleistä voidaan valmistaa kasvualustoja, jotka tukevat solujen jakaantumista ja erilaistumista sekä ylläpitävät solujen biologisia toimintoja.

Tutkimus tehtiin Biolääketieteellisen teknologian yksikön proteiinidynamiikan tutkimusryhmään. Tutkimuksen tarkoituksena oli optimoida tutkimusryhmän aikaisemmin kehittämän hydrogeelisoluviljelyalustan valmistusmenetelmää tulevia tutkimuksia varten. Tutkimuskysymykset käsittelivät tärkeimpiä ongelmakohtia hydrogeelin valmistusprosessissa, työvaiheiden teknistä toteutusta, hydrogeelien valmistamista isommassa tilavuudessa, lasien ja geelien säilyvyysohjeiden luotettavuuden arviointia ja valmistusprosessin kemiallisten reaktioiden toimivuutta. Tutkimus oli kvalitatiivinen ja aineisto kerättiin laadullisesti osallistuvan ja systemaattisen havainnoinnin avulla sekä mikroskopoimalla. Laboratoriotyöskentelystä pidettiin myös tutkimuspäiväkirjaa, jota hyödynnettiin aineiston keruussa ja analysoinnissa. Havainnoinnin avulla kerätty aineisto analysoitiin aineistolähtöistä sisällönerrittelymenetelmää käyttäen.

Havainnoinnin tuloksena huomattiin, että hydrogeelin valmistusprosessissa ilmeni ongelmia koko prosessin aikana. Ongelmista suurin osa johtui välineongelmista. Prosessin optimoinnin tuloksena työskentelytila muuttui selkeäksi ja toimivaksi sekä työvaiheiden tekninen toteutus parani. Prosessi nopeutui noin 1 h 25 minuuttia. Tilavuudeltaan isompia hydrogeelejä onnistuttiin valmistamaan ja hydrogeelin valmistusohjeen lasien ja geelien säilyvyysohjeisiin voidaan jatkossa luottaa. Prosessin kemialliset reaktiot toimivat halutulla tavalla ja prosessi saatiin rutiinikäyttöön tutkimusryhmän muihin tutkimuksiin.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että prosessi muuttui kustannustehokkaammaksi ja sujuvammaksi sekä geelien tasalaatuisuus parani. Jatkotutkimusideana on N-Hydroksisukkinimidi (NHS)-, polymetyylisiloksaani (PDMS)- ja erimuotoisten geelien valmistaminen sekä geelien jäykkyyksien mittaaminen atomivoimamikroskopiolla.

Asiasanat: hydrogeeli, soluviljelyalusta, soluadheesio, optimointi, biofunktionalisointi

ABSTRACT

Tampere University of Applied Sciences
Master's Degree Programme in Health Promotion

VÄÄTÄINEN, OUTI:

Optimizing the Hydrogel Preparation Protocol and Using Hydrogels As Cell Culture Substrates

Master's thesis 78 pages, appendices 9 pages
Spring 2013

Peptide-based hydrogels are important biomaterials for many applications. In cell culturing hydrogels have been used over a decade.

This thesis was done in the protein dynamics research group in the Institute of Biomedical Technology University of Tampere. The purpose of this thesis was to optimize the current polyacrylamide gel substrate protocol. This research was qualitative. The data was gathered with systematic observation, microscopical imaging and laboratory diary as a support. The main analysis method in this research was contents differentiation.

The analysis revealed problems throughout the whole hydrogel preparation process. After the optimization, the functionality of the workspace increased and the technical aspects of the protocol improved. The preparation of hydrogels with larger surface area was successful and the issues related to the storage of the hydrogels during the hydrogel preparation were solved. In addition, the chemical reactions were proved to work appropriately in the optimized protocol. In summary, the workflow of the optimized protocol became more efficient, quality was increased and execution became more cost effective.

Interesting future and possible future research ideas include development of the N-Hydroxysuccinimide (NHS)- and polydimethylsiloxane (PDMS) gels and gels with different shapes as well as using atomic force microscope for measuring the rigidity of the gels.

Key words: hydrogel, cell culture substrate, celladhesion, optimizing, biofunctionalization

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	KOHDEORGANISAATIO	9
3	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TEHTÄVÄT JA TAVOITE	11
4	TUTKIMUKSEN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT	12
	4.1. Tutkimuksen tausta ja lähtökohdat	12
	4.2. Solukasvualustan jäykkyyden biologinen merkitys.....	12
	4.2.1 Kudossolut tuntevat ja vastaavat kasvualustansa jäykkyyteen	13
	4.2.2 Fokaaliadheesioiden merkitys.....	13
	4.2.3 Kasvualustan jäykkyyden vaikutukset.....	14
	4.3. Hydrogeelit soluviljelyalustana	16
	4.3.1 Soluviljely	18
	4.3.2 MEF-solut	19
	4.4. Hydrogeelin valmistus	20
	4.4.1 PAA-geelit	20
	4.4.2 Jäykkyyden muokkaaminen geelin koostumusta muuttamalla.....	23
	4.4.3 Biofunktionalisointi	23
	4.5. Tiedonhaku	24
	4.6. Prosessit	25
	4.6.1 Prosessin kehittäminen ja jatkuva parantaminen	27
	4.6.2 Prosessin kuvaaminen	28
5	LÄHTÖTILANTEEN PROSESSIKUVAUS	31
6	TUTKIMUKSEN AINEISTO JA MENETELMÄT.....	34
	6.1. Kvalitatiivinen tutkimus	34
	6.1.1 Osallistuva ja systemaattinen havainnointi	35
	6.1.2 Mikroskopointi.....	36
	6.1.3 Tutkimuspäiväkirja	37
	6.2. Aineiston analysointi	37
	6.2.1 Sisällön erittely	38
7	TULOKSET	39
	7.1. Hydrogeelin valmistusprosessiin liittyvät ongelmakohdat ennen prosessin optimointia.....	39
	7.2. Prosessin suorittamiseen käytetty aika ennen prosessin optimointia.....	42
	7.3. Prosessin teknisen toimivuuden lisääminen	43
	7.4. Hydrogeelin valmistaminen isommassa tilavuudessa.....	46
	7.5. Lasien ja geelien säilyvyystutkimus	47
	7.6. Prosessin kemiallisten reaktioiden toimivuus.....	47

7.6.1 Silanoinnin ja glutaraldehydin toimivuustutkimus	48
7.6.2 Sulfo-SANPAH:n ja fibronectiinin toimivuustutkimus.....	48
7.7. Prosessiin liittyvät ongelmakohdat prosessin optimoinnin jälkeen	49
7.8. Prosessin suorittamiseen käytetty aika prosessin optimoinnin jälkeen	51
8 OPTIMOIDUN PROSESSIN KUVAAMINEN	53
9 POHDINTA.....	56
9.1. Tutkimuksen luotettavuuden tarkastelu	56
9.2. Tutkimuksen eettiset kysymykset	59
9.3. Tulosten tarkastelu suhteessa teoreettisiin lähtökohtiin.....	60
9.4. Johtopäätökset ja jatkotutkimusaiheet	63
9.5. Lopuksi	65
LÄHTEET.....	66
LIITTEET	70
Liite 1. Making polyacrylamide gel substrates for cell culture: solutions 1 (2).....	70
Liite 2. HAVAINNOINTILOMAKE.....	72
Liite 3. HAVAINNOINTILOMAKE.....	73
Liite 4. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE	74
Liite 5. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE	75
Liite 6. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE	76
Liite 7. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE	77
Liite 8. Immunostaining cells (e.g. MEFs), according to Marg, Winkler et al. 2010.	78

LYHENTEET JA TERMIT

Adheesio	kahden eri aineen välinen vetovoima
APS	ammonium persulfaatti
APTES	aminopropyltriethoxysilaani
Biofunktionalisointi	biotoiminnallisuus
dH ₂ O	tislattu vesi
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
E	Young's modulus
ECM	soluväliaine
FA	fokaaliadheesio
Fibronectiini	soluväliaineen proteiini
Fosfotyrosiini	fosforyloitu aminohappo
Integriinit	adheesioreseptorien suurin ryhmä
NaOH	natriumhydroksidi
MEF-solut	hiiren alkioista eristettyjä fibroblasteiksi erilaistuneita so- maattisia soluja
Mekanotransduktio	prosessi, jossa solu muuttaa mekaanisen ärsykkeen kemialli- seksi vasteeksi
MSCs	ihmisen mesenkymaaliset kantasolut
PAA	polyakryyliamidi
PBS	phosphate buffered saline
Polymerisoituminen	tapahtuma, jossa useat molekyylit, monomeerit, muodostavat pitkäketjuisen molekyylin eli polymeerin
Ristisilloitus	polymeeriketjujen välille muodostetaan kemiallisia sidoksia
Soluadheesio	solujen kiinnittyminen toisiinsa
TEMED	tetramethylethylenediamiini
Translaatio	lähetti-RNA:n kodonien ohjeen perusteella tapahtuva poly- peptidiketjun muodostuminen

1 JOHDANTO

Peptidipohjaiset hydrogeelit ovat tärkeitä biomateriaaleja, joita käytetään muun muassa ruokateollisuudessa, kudosteknologiassa ja lääketieteellisyydessä. Monet näistä hydrogeeleistä valmistetaan synteettisistä polypeptideistä tai luonnollisesti ilmenevistä proteiineista, kuten kollageenista. (Yan & Pochan 2010, 1.) Hydrogeelejä on käytetty ominaisuuksiensa perusteella myös EEG-elektrodeissa, piilolinsseissä, rintaimplanteissa sekä kertakäyttövaipoissa ja terveystiteissä sitomassa ureaa. (Society for biomaterials 2007.)

Polyakryyliamidi (PAA)-geelit ovat hydrogeelejä, joita on käytetty soluviljelyssä yli vuosikymmenen ajan (Buxboim, Rajagopal, Brown & Discher 2010, 194117). Geelit tarjoavat sopivia tapoja pehmeän kasvualustan kehittämiseen perinteisten laboratoriovälineiden avulla. PAA-kasvualustoja on tähän asti käytetty lukuisissa mekano-transduktio-tutkimuksissa ja ne ovat saaneet jalansijaa myös kasvualustojen tuotekehittämisessä. (Hammarén 2012, 21.)

Käytän tässä tutkimuksessa PAA-kasvualustoja, joiden valmistuksen ja optimoinnin esitän tässä tutkimuksessa. Tutkimus tehdään Biolääketieteellisen teknologian yksikköön (IBT) proteiinidynamiikan (PD) tutkimusryhmään. Tutkimusryhmä on käyttänyt PAA-kasvualustoja aikaisemmin, mutta niiden valmistuksen optimointi helpottaisi rutiinikäyttöä. Tutkimusryhmällä on tarkoitus käyttää PAA-kasvualustoja pääasiassa soluviljelyssä solujen kasvuympäristön mekaanisten ominaisuuksien muuttamiseen sekä mahdollisesti erilaisten solulinjojen käyttäytymisen tutkimisessa.

Prosessin optimoinnin tavoitteena on lisätä muun muassa tuottavuushyötyjä, toistettavuutta, säästää aikaa, kustannuksia ja inhimillisiä voimavaroja. Tässä tutkimuksessa prosessin optimoinnilla tarkoitetaan PAA-kasvualustan valmistusprosessin kehittämistä sujuvaksi ja rutiinomaiseksi prosessiksi. Optimoinnissa huomioin teknisen toteutuksen ja kemiallisten reaktioiden toimivuuden halutulla tavalla.

Hydrogeelin valmistusprosessin optimointi on tärkeää tutkimusten toistettavuuden ja laadukkaan työn kannalta. Laadukas työ on tärkeää tutkimusryhmän toiminnan ja menestymisen kannalta ja laadukkaalla työllä on katsottu olevan merkitystä myös henkilökunnan viihtymiseen ja työmotivaatioon (Hiltunen & Rekunen 1998).

Tutkimuksen aihe tuli tutkimusryhmän aloitteesta. Tutkimuksen taustalla olivat aikaisemmat tutkimukset aiheesta ja Henrik Hammarénin vuoden 2012 Pro-gradu -tutkielma "Setting up methods for the study of intracellular mechanotransduction", joka on tehty Biolääketieteellisen teknologian instituutin proteiinidynamiikan tutkimusryhmään (Hammarén 2012, iii). Tutkimukseni aihealue sijoittuu tutkintomme johtamisen ja kehittämisen opintoihin.

2 KOHDEORGANISAATIO

Tutkimuksen kohdeorganisaationa on Biolääketieteellisen teknologian yksikkö (IBT) ja tarkemmin proteiinidynamiikan (PD) tutkimusryhmä.

Lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT) ja solu- ja kudosteknologiakeskus Regea yhdistyivät Biolääketieteellisen teknologian yksiköksi (IBT) vuoden 2011 alussa. Lääketieteellisen teknologian instituutin tehtävänä on harjoittaa lääketieteellisen teknologian, bioteknologian ja laajemminkin luonnontieteen alan tieteellistä tutkimusta, sekä antaa tieteellistä ja ammatillista jatko- ja täydennyskoulutusta. Solu- ja kudosteknologiakeskus Regeassa tehtävä tutkimustyö keskittyy kliinisiin sovelluksiin tähtäävään solu- ja kudosteknologiaan. (Tampereen yliopisto 2011.)

Biolääketieteellisen teknologian yksikkö toimii osana syksyllä 2011 toimintansa aloittanutta Tampereen yliopiston ja Tampereen teknillisen yliopiston yhteistä BioMediTech (BMT) yksikköä. BioMediTechissä tehdään tutkimusta ja koulutusta biotieteissä ja lääketieteellisen teknologiassa. (BioMediTech 2011.)

IBT:n tavoitteena on luoda biolääketieteen ja teknologian rajapinnalla toimiva poikkitieteellinen kansainvälisesti korkeatasoinen tutkimuksen ja koulutuksen yksikkö, joka pyrkii edesauttamaan innovaatioiden ja uuden liiketoiminnan syntyä (Tampereen yliopisto 2011). Yksikkö koordinoi biolääketieteen ja bioteknologian tutkijakoulutusohjelmaa (BioMediTech 2011).

Biolääketieteellisen teknologian yksikössä toimii 19 tutkimusryhmää, Tampereen teknillisen yliopiston kanssa yhteinen bioteknologian tutkinto-ohjelma sekä Turun yliopiston kanssa yhteinen kansainvälinen bioinformatiikan maisteriohjelma. Henkilökuntaa on yhteensä noin 220. (Tampereen yliopisto 2011.) Tutkimus painottuu bioteknologian, bioinformatiikan, solubiologian, syövän, immunologian, mitokondrioiden sekä solu- ja kudosteknologian tutkimukseen (BioMediTech 2011).

Tutkimukseni tein proteiindynamiikan tutkimusryhmään, joka koostuu akateemisesti eritasoisesti kouluttautuneista henkilöistä. Tutkimusryhmään kuuluvat tutkimusryhmän johtaja, kolme tutkijatohtoria, kolme tohtoriopiskelijaa ja kolme muuta opiskelijaa sekä bioanalyttikko. Proteiindynamiikan tutkimusryhmä käyttää kokeellisia ja laskennallisia menetelmiä mekaanisten voimien aikaansaamien muutoksien tutkimiseen proteiinien rakenteessa ja vuorovaikutuksissa (Tampereen yliopisto 2011). Tutkimusryhmän tavoitteena on tuottaa uutta ymmärrystä proteiinien toiminnasta ja ryhmän ydinosaaminen keskittyy proteiinien toiminnan tuntemiseen ja kokeellisten ja laskennallisten menetelmien hallitsemiseen. Laboratoriotyö on olennainen osa tutkimusryhmän toimintaa.

3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TEHTÄVÄT JA TAVOITE

Tutkimuksen tarkoituksena on optimoida tutkimusryhmän aikaisemmin kehittämän hydrogeelisoluviljelyalustan valmistusmenetelmää tulevia tutkimuksia varten.

Tutkimuskysymykset ovat seuraavat:

1. Mitkä ovat optimoinnin kannalta tärkeimmät ongelmakohdat hydrogeelin valmistusprosessissa?

Tarkentavat kysymykset:

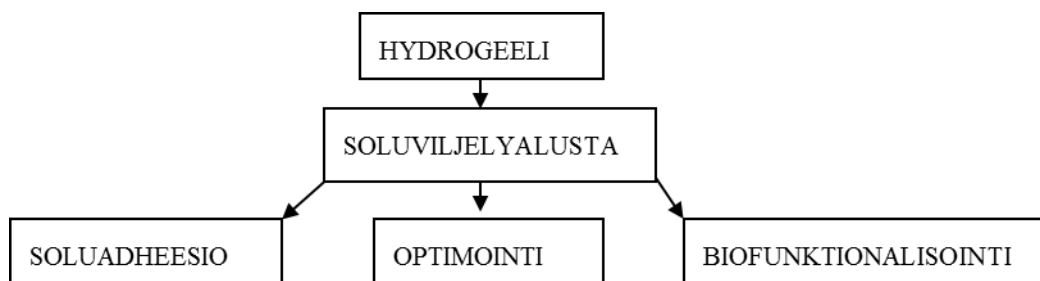
- a) Millä tavalla työvaiheita voidaan optimoida teknisen toteutuksen kannalta toimivammiksi?
 - b) Onko hydrogeelejä mahdollista valmistaa isommassa tilavuudessa?
 - c) Voidaanko lasien ja geelien säilyvyysohjeisiin luottaa hydrogeelin valmistusohjeessa (liite 1)?
2. Toimivatko geelin valmistusprosessin kemialliset reaktiot halutulla tavalla?

Tutkimuksen tavoitteena on hydrogeelien valmistusprosessin optimointi toimivaksi, laadukkaaksi ja kustannustehokkaaksi menetelmäksi. Tavoitteena on, että PAA-geelin valmistusprosessi saadaan tutkimusryhmän rutiinikäyttöön solujen kasvatuksessa ja se, että prosessi saadaan toimivaksi myös muille soluviljelyä tekeville tutkimusryhmille. Proteiindynamiikan tutkimusryhmän tavoitteena on käyttää hydrogeelejä solunsisäisten mekanotransduktio-mekanismien tutkimiseen.

4 TUTKIMUKSEN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT

4.1. Tutkimuksen tausta ja lähtökohdat

Tutkimuksen taustalla oli vuonna 1997 julkaistu artikkeli PAA-pohjaisen hydrogeelin käytöstä soluviljelyalustana (Pelham & Wang 1997, 13662) ja Henrik Hammarénin vuoden 2012 Pro-gradu -tutkielma “Setting up methods for the study of intracellular mechanotransduction”. Tutkimuksen keskeinen lähtökohta on polyakryyliamidi (PAA)-geelin valmistaminen. Tutkimuksen keskeiset käsitteet ovat hydrogeeli, soluviljelyalusta, soluadheesio, optimointi ja biofunktionalisointi (kuvio 1).



KUVIO 1. Viitekehys

4.2. Solukasvualustan jäykkyyden biologinen merkitys

Normaalit kudossolut, kuten fibroblastit, myosyytit ja neuronit ovat kiinnittyviä soluja, jotka tarvitsevat elääkseen kiinnittymistä kiinteään pintaan (Disher, Janmey & Wang 2005, 1139). Kudosten soluille on kehittynyt kyky aistia ympäristönsä biokemiallisia ja mekaanisia ominaisuuksia. Solu voi havaita kovien kohteiden jäykkyyden, vaikkei solu ole suorassa soluyhteydessä objekteihin. (Buxboim ym. 2010, 194116.) Kudossolut pystyvät siis tuntemaan kasvualustansa jäykkyyden ja sillä on suuri merkitys solun toimintaan.

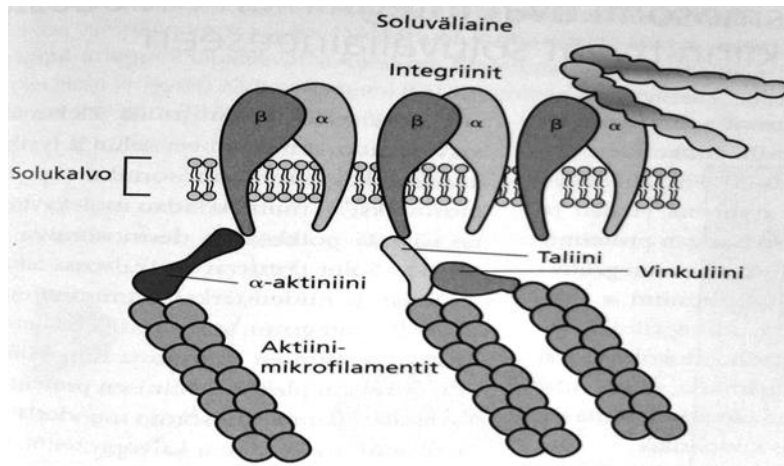
4.2.1 Kudossolut tuntevat ja vastaavat kasvualustansa jäykkyyteen

Kudoksessa solut tunnustelevat jatkuvasti ympäristönsä mekaanisia ominaisuuksia kiinnittymällä ja aktiivisesti vetämällä ympäristöönsä ja aistimalla muodonmuutoksesta aiheutunutta vastetta. Nämä prosessit riippuvat osaltaan solun aktiini-myosiinitukirangan supistumisesta ja soluadheesioista. Solun pinnan reseptoriproteiinit, integriinit, läpäisevät solukalvon ja niiden kautta solun tukirangan aktiini-myosiini -järjestelmässä syntyneet voimat siirtyvät kasvualustaan aiheuttaen solun liikkeen ja leviämisen. Solut eivät siis vain vastaanota aistittua vastetta, vaan mekaaniset signaalit säätelevät myös solun aktiini-myosiinitukirangan supistumista. (Discher ym. 2005, 1139; Fournier, Sauser, Ambrosi, Meister & Verkhovsky 2010, 287.)

4.2.2 Fokaaliadheesioiden merkitys

Soluilla on solukalvoilla erityisiä reseptoreita, adheesioreseptoreita, joiden avulla solut tunnistavat soluväliaineen (ECM) proteiineja, kuten fibronektiinin tai toisten solujen pinnalla olevat vastinreseptorit. Integriinit muodostavat näistä adheesioreseptoreista suurimman ryhmän. Integriinit ankkuroivat soluja soluväliaineeseen ja toisiin soluihin, mahdollistavat solujen liikkeen kudoksissa ja välittävät soluille tietoa niiden ympäristöstä. (Heino & Vuento 2007, 233, 235.)

Soluviljelmässä soluadheesio eli solujen tarttuminen soluväliaineeseen tapahtuu fokaaliadheesioiden (FA) avulla. Fokaaliadheesiot ovat suuria proteiini-komplekseja (kuva 1), joissa integriinejä on kertyneenä yhteen. Solun sisällä useat solun tukirangan proteiinit kertyvät samaan kohtaan liittämään integriinejä aktiinisäikeisiin. (Heino & Vuento 2007, 236.) Fokaaliadheesioiden avulla solut tarttuvat ympäristönsä soluväliaine-proteiineihin liittämällä ne mekaanisesti solunsisäiseen tukirankaansa. Fokaaliadheesioiden avulla solut aistivat myös ympäristönsä mekaanisia ominaisuuksia. (Hammaren 2012, i.)



KUVA 1. Fokaaliadheesion rakenne (Heino & Vuento 2007, 235)

Soluadheesion mekaaninen vahvuus ja siitä aiheutuvat solun erilaistuminen ja leviäminen ovat vahvasti riippuvaisia biomateriaalin fysikaalisista ja kemiallisista tekijöistä. Soluadheesio keinotekoiseen materiaaliin riippuu esimerkiksi materiaalin kemiallisesta rakenteesta, sähköisestä varauksesta, energiasta ja hydrofilisuudesta. (Bacakova, Filova, Parizek, Ruml & Svorcik 2011, 740.)

4.2.3 Kasvualustan jäykkyyden vaikutukset

Kasvualustan jäykkyyden vaikutusta solujen adheesioon, erilaistumiseen ja leviämiseen on tutkittu laajalti (esimerkiksi Pelham & Wang 1997, 13661; Lo, Wang, Dembo, Wang 2000, 144; Engler, Griffin, Sen, Bönnemann, Sweeney & Discher 2004, 877; Engler, Sen, Sweeney & Discher 2006, 677; Buxboim ym. 2010, 194116; Bacakova ym. 2011, 739) ja sillä näyttää olevan suuri merkitys eri solutyypin käyttäytymiseen (Engler, Bacakova, Newman, Hategan, Griffin, Discher 2004, 617).

Kasvualustan jäykkyyden on huomattu olevan tärkeä tekijä solujen erilaistumisen ohjauksessa ja tietyn fenotyypin muodostumisessa. Useamman tutkimuksen mukaan hyvin pehmeillä geeleillä ($E = 0,1\text{--}1\text{ kPa}$), jotka muistuttavat pehmeää aivokudosta, ihmisen mesenkymaaliset kantasolut (MSCs) erilaistuivat kohti hermosolun fenotyyppejä. Lihaskudosta muistuttavilla, kovemmillä geeleillä ($E = 8\text{--}17\text{ kPa}$) tutkimuksessa käytetyt solut huomattiin erilaistuneen lihassoluiksi ja kovimmilla kasvualustoilla ($E = 25\text{--}40\text{ kPa}$) solut erilaistuivat luusoluiksi. (Lo ym. 2000, 144; Engler ym. 2006, 677; Buxboim ym. 2010, 194116; Bacakova ym. 2011, 751.) Kasvualustan fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet näyttävät siis vaikuttavan vahvasti solujen erilaistumiseen.

Vuonna 1997 Pelham ja Wang julkaisivat artikkelin, jossa he tutkivat solujen vastetta kasvualustan mekaanisiin ominaisuuksiin. Pelham ja Wang (1997, 13661) huomasivat, kuten myös muutkin tutkijat myöhemmin, että solut näyttivät morfologisesti erilaisilta ja solukuolemien määrä vaihteli kasvualustoilla, joilla oli samanlaiset kemialliset ominaisuudet, mutta joiden jäykkyys vaihteli. Pehmeillä kasvualustoilla solut levisivät heikommin ja soluilla oli suurempi kuolevuusaste. Fosfotyrosiinin määrä adheesiopaikoissa oli myös vähäisempää ja fokaaliadheesiot olivat epäsäännöllisen muotoisia ja hyvin dynaamisia, kun taas kovilla kasvualustoilla solut näyttivät morfologisesti normaaleilta ja olivat huomattavasti stabiilimpia. (Yeung, Georges, Flanagan, Marg, Ortiz, Funaki, Zahir, Ming, Weaver & Janmey 2005, 24- 25; Engler ym. 2006, 677; Buxboim ym. 2010, 194116; Bacakova ym. 2011, 739.)

Hyvin pehmeät kasvualustat eivät voi vastustaa solujen vetovoimaa soluadheesioaikana ja siten solut eivät pysty tarttumaan, leviämään ja elämään liian pehmeillä kasvualustoilla (Bacakova ym. 2011, 739, 750). Riittävä kasvualustan jäykkyys näyttää olevan erityisen tärkeää kiinteään pintaan kiinnittyville soluille, jotka hyödyntävät kasvualustan vastusta kasvualustan ja solutukirangan välisten voimien synnyttämisessä ja siten mekaanisten signaalien muodostamisessa. Signaalien palautteet vaikuttavat solun adheesioon, jännittyneisyyteen, proteiinien ekspressioon, translaation jälkeiseen muokkaukseen, solutukirangan järjestykseen ja jopa solun elinkelpoisuuteen. (Engler ym. 2004, 877.)

4.3. Hydrogeelit soluviljelyalustana

Hydrogeelit ovat verkkoja hydrofiilisiä polymeeriketjuja, jotka voivat muistuttaa osittain fysikaalisilta ominaisuuksiltaan luontaista soluväliainetta. Ne muodostuvat yleensä hyvin imukykyisistä synteettisistä tai luonnollisista polymeereistä, kuten kollageenista. Hydrogeelit voivat olla joustavuudeltaan lähellä luonnollista kudosta niiden huomattavan vesipitoisuuden takia. (Society for biomaterials 2007; Geckil, Xu, Zhang, Moon & Demirci 2010, 3.)

Biolääketieteen kiinnostuksessa hydrogeelejä kohtaan tapahtui huomattavaa kasvua 90-luvulla kudosteknologia-alan kehittymisen ja hydrogeelien ominaisuuksien ymmärtämisen myötä. Huomattiin, että hydrogeeleillä oli samoja ominaisuuksia luontaisen soluväliaineen kanssa, joka mahdollisti hydrogeelien käytön toiminnallisten kudossiirteiden valmistuksessa. (Geckil ym. 2010, 2.) Hydrogeelien bioyhteensopivuuden, rakenneosien valikoiman, joustavien valmistusmetodien ja haluttujen fysikaalisten ominaisuuksien takia ne ovat olleet haluttuja biomateriaaleja monissa regeneratiivisen lääketieteen menetelmissä.

Hydrogeelejä on käytetty alustoina kudossiirteiden rakennuksessa, lääkeaineiden kontrolloidussa vapautuksessa sekä proteiinien kuljetuksessa kudoksiin ja viljelmiin. Ne voivat toimia myös sideaineena tai esteenä kudoksen ja materiaalin pinnan välillä (Slaughter, Khurshid, Fisher, Khademhosseini & Peppas 2009, 3307.) Hydrogeeleistä voidaan valmistaa myös kasvualustoja, jotka tukevat solujen jakaantumista ja erilaistumista sekä ylläpitävät solujen biologisia toimintoja (Tabata 2009, 312, 316). Ensimmäinen artikkeli PAA-pohjaisen hydrogeelin käytöstä soluviljelyalustana on jo edellä mainittu (Pelham & Wang 1997, 13662).

Hydrogeelit soveltuvat hyvin kudosteknologisiin sovelluksiin, koska ne sallivat helposti hapen, ravintoaineiden ja aineenvaihduntatuotteiden diffundoitumisen. Hydrogeelien avulla solujen kasvua ja lisääntymistä voidaan kontrolloida, sillä hydrogeelit omaavat mekaanisia ja fysiokemiallisia ominaisuuksia, joita voidaan tarpeen mukaan muokata. (Slaughter ym. 2009, 3313, 3315.)

Hydrogeelejä voidaan valmistaa 2D- tai 3D-soluviljelyalustoiksi. Soluja kasvatetaan normaalisti *in vitro* 2D-kasvualustoilla (Tibbit & Anseth 2009, 655), kuten kaupallisten soluviljelypullojen tai petrialjosten avulla. Solujen viljely kaksiulotteisella kasvualustalla ei kuitenkaan vastaa solujen kasvua *in vivo*. Geckil ym. (2010, 496) tutkimuksen mukaan solut eivät ilmennä 2D-kasvualustoilla tiettyjä kudosspesifisiä geenejä ja proteiineja niin kuin 3D-kasvualustoilla. Vaikka 3D-kasvualustat jäljittelevät paremmin luontaista soluväliainetta, sopivat 2D-kasvualustat kuitenkin hyvin solujen toiminnan ja solujen mikroympäristöön kohdistuvan vuorovaikutuksen tutkimiseen (Tibbit & Anseth 2009, 655).

Hydrogeelejä voidaan valmistaa eri menetelmiä käyttäen. Nestevirtaukseen perustuvien mikro- ja nano-teknologioiden avulla hydrogeeleistä voidaan rakentaa monimutkaisia ja hienostuneita rakenteita (Geckil ym. 2010, 8). Bottom-up ja top-down lähestymistavat ovat kudosteknologiassa käytössä, kuten myös emulsifikaatio ja päällystäminen. Bottom-up ja top-down lähestymistavat käyttävät hyväkseen hydrogeelipohjaisia kudorakenteita, joiden avulla saadaan rakennettua ainutlaatuisia kudokomplekseja. Emulsifikaatiossa valmistetaan hydrogeelin mikropartikkeleita ja päällystämisen avulla voidaan kontrolloida geelin heterogeenisyyttä ja kokoa. (Slaughter ym. 2009, 3322-3324.) Tässä tutkimuksessa PAA-hydrogeelit valmistettiin kovalenttisella ristisilloituksella.

Hydrogeelejä valmistettaessa solukasvualustoiksi *in vitro* -soluviljelyyn mikroympäristön tehokas ravinteiden kuljetus, kaasujen vaihto (O_2 ja CO_2) ja kuona-aineiden poisto on tärkeä huomioida solujen kasvun varmistamiseksi (Geckil ym. 2010, 5). Geelin tulee olla myös sopivan paksuinen ja mekaanisilta ominaisuuksiltaan oikeanlainen, jotta solujen toimintaa voidaan tutkia halutulla tavalla. Hydrogeelien valmistusprosessi tulee olla optimoitu niin, että lopputuote tarjoaa solujen kasvua ja haluttua toimintaa tukevan mikroympäristön.

4.3.1 Soluviljely

Soluviljelyllä tarkoitetaan solujen ja niiden toimintojen tarkkaa tutkimista kontrolloiduissa olosuhteissa. Laboratorio-olosuhteissa voidaan kasvatata erilaisia eukaryootti- ja prokaryoottisoluja kiinteällä alustalla tai solususpensiossa *in vitro*. Solujen kasvu ja niiden ravintotarpeet vaihtelevat eri solutyypin mukaan (Qiagen 2012) ja siksi solujen viljelyssä täytyy huomioida solutyypin yksilölliset vaatimukset. Soluviljelyolosuhteissa kasvaakseen solut tarvitsevat tarkasti säädellyn ympäristön lämpötilan, ravintoaineiden, hapen (O₂) ja hiilidioksidin (CO₂) sekä pH-arvon suhteen. (Freshney 2005, 115-119; Philippos, Hughes, Dhawan & Mitry 2012, 2.)

Soluviljelyssä pintaan kiinnittyvillä soluilla käytetään useimmiten kertakäyttöisiä soluviljelymaljoja tai pulloja, joiden pinnat ovat käsitelty solujen tarttumisen mahdollistamiseksi. Soluviljelyt saavuttavat yleensä jossain vaiheessa konfluentin tilan, jolloin solut peittävät koko viljelypinnan ja jolloin solut olisi hyvä siirrostaa uuteen soluviljelyalustaan esimerkiksi trypsiinin avulla. Solut tarvitsevat uutta ravinneliuosta aika-ajoin ja niitä täytyy siirrostaa edelleen, jotta solujen jakaantumiskyky säilyy. (Freshney 2005, 207-208; Qiagen 2012.)

Soluviljelyssä käytetään solujen vaatimusten mukaisia ravinneliuoksia, joista yleisimpiä ovat MEM (Eagle minimal essential medium) ja DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) ja RPMI 1640. Ravinneliuokset sisältävät aminohappoja, glukoosia, suoloja, vitamiineja ja muita ravinteita, jotka mahdollistavat solujen kasvun. Ravinneliuoksiin lisätään useimmiten ensimmäisen käytön yhteydessä seerumia, joka sisältää solujen kasvu- ja kiinnittymistekijöitä. Seerumi on myös muun muassa mineraalien, lipidien ja hormonien lähde. Ravinneliuoksiin lisätään myös L-glutamiinia, joka on elintärkeä aminohappo ja antibiootteja, jotka estävät mikrobikontaminaatiot. Antibioottien käyttöä ei suositella, sillä niiden käyttö saattaa aiheuttaa resistenttien bakteerikantojen syntymisen ja niitä käytettäessä pienet kontaminaatiot soluviljelmässä jäävät huomaamatta, kuten myös mykoplasmakontaminaatiot. (Freshney 2005, 120-125; Qiagen 2012.)

Aseptinen tekniikka ja välineiden oikea käyttö soluviljelyssä ovat erittäin tärkeitä tekijöitä mikrobikontaminaatioiden ehkäisyssä. Soluviljelyssä käytetyt välineet ja reagenssit tulee olla steriileitä, kädet pesty ja työpinnat tulee olla pyyhitty huolellisesti 70% etanolilla. (Qiagen 2012.) Soluja käsitellään laminaari- ilmavirtauskaappissa, jonka avulla saadaan puhdasta ilmaa ja jonka avulla haitallisten partikkelien pääsy prosessiin minimoidaan (Kojair 2009). Solujen inkubointiolosuhteiden tulee olla optimaalisia solujen kasvun varmistamiseksi. Solut tulee kasvattaa inkubaattorissa, jossa on tarkasti säädelty lämpötila ja CO₂-pitoisuus. Useimmat nisäkäsolut kasvatetaan +37°C lämpötilassa ja 5% CO₂-pitoisuudessa saturoidussa ilmankosteudessa (Freshney 2005, 115-119.)

4.3.2 MEF-solut

MEF- (mouse embryonic fibroblast) solut ovat hiiren alkioista eristettyjä fibroblasteiksi erilaistuneita somaattisia soluja (Miettinen 2011, 4) ja niitä käytetään esimerkiksi tukemaan erilaistumattomien hiiren tai ihmisen alkion kantasolujen (ES) ja indusoitujen pluripotenttien kantasolujen (iPS) kasvua. (Protocol online 2012.) Fibroblastisolut selviävät useimmista mekaanisista ja entsyymaattisista tekniikoista ja kasvavat monissa yksinkertaisissa ravintoliuksissa (Freshney 2005, 394), minkä vuoksi ne sopivat myös tutkimuskäyttöön.

Fibroblasteja on eristetty monista eri kudoksista. George Todaro ja Howard Green eristivät 3T3-fibroblastisolulinjan vuonna 1962 sveitsiläisestä hiiren alkioista (Todaro & Green 1960, 299) ja Adamsonin tutkimusryhmä eristi ja karakterisoi MEF-solut vuonna 1997 (Xu, Baribault & Adamson 1998, 327-328, 332).

Tässä tutkimuksessa käytettiin proteiinidynamiikan tutkimusryhmän kasvattamia MEF-soluja, jotka saatiin Wolfgang Zieglerin tutkimusryhmältä Saksasta. Soluja kasvatettiin Sarstedtin Tissue culture flask 75 cm²-viljelypulloissa ja ne jaettiin kaksi kertaa viikossa 1:12 / 1:14 solujen solutiheydestä riippuen. Soluille käytettiin DMEM-ravinneliuosta, johon lisättiin 10% naudan seerumia, 1% L-glutamiinia ja β-mercaptoEtOH:ia.

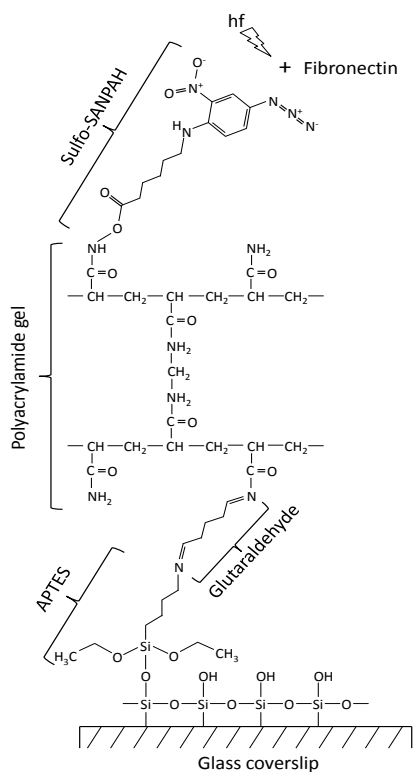
4.4. Hydrogeelin valmistus

4.4.1 PAA-geelit

Soluväliaineen proteiineilla päällystetyt PAA-kasvualustat soveltuvat ominaisuuksiltaan hyvin solujen toiminnan tutkimiseen. Ne mahdollistavat kasvualustan joustavuuden systemaattisen kontrolloinnin muuttamalla akryyliamidi ja bis-akryyliamidin suhteellista konsentraatiota. Kasvualustan loistava optinen laatu ja pieni paksuus sallii sen tarkastelun esimerkiksi immunofluoresenssi-mikroskoopilla korkealla suurennoksella. ECM-proteiinien avulla PAA-kasvualustoja voidaan päällystää, jonka seurauksena kasvualustan ja solujen välinen haluttu vuorovaikutus on mahdollista. (Pelham & Wang 1997, 13664.)

Tässä tutkimuksessa PAA-hydrogeelin valmistuksessa käytettiin proteiinidynamiikan tutkimusryhmän hydrogeelin valmistusohjetta (liite 1). Tutkimusryhmän käyttämä ohje on muokattu Wangin lab (Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA) ohjeesta ”Preparation of polyacrylamide substrates” (The Wang research group 2011).

PAA-hydrogeeli valmistetaan kovalenttisella ristosilloituksella. Valmistukseen liittyy kemiallisia reaktioita, joita esitetään kuvassa 2.



KUVA 2. Geelin valmistamisen kemialliset reaktiot (Hammarén 2012, 22)

4.4.1.1. Peitinlasin pinnan aktivointi

Hydrogeelin valmistus aloitetaan pesemällä peitinlasit. Lasit pestään liekittämällä niitä bunsenpolttimella ja huuhtelemalla niitä 0,1 M NaOH:lla ja dH₂O:lla suolojen kiinnittymisen estämiseksi. Lasit ilmakeivataan ja siirretään yhdelle isolle petrimaljalle ennen aminosilanoitua. Alkoxisilaanin avulla peitinlasit saadaan toiminnallisiksi. Silanointi suoritetaan eksikaattorissa huoneenlämmössä silanointiaineen ja vakuuimun avulla. Silanointiaine on eksikaattorissa pienessä avonaisessa lasipullossa. Laseja inkuboidaan eksikaattorissa 1h.

Silanoinnin jälkeen lasit siirretään 6-kuoppalevyille ja päällystetään 0.5% glutaraldehydi-liuoksella (0,8 ml/lasi), joka edesauttaa polyakryyliamidin sitoutumista (Buxboim ym. 2010, 194117). Laseja inkuboidaan 30 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen glutaraldehydi kerätään liuokselle tarkoitettuun keräysastiaan ja peitinlasit pestään huolellisesti dH₂O:llä.

4.4.1.2. Polyakryyliamidigeelin valmistus

Akryyliamidi / bis-akryyliamidi -seos valmistetaan halutun geelin jäykkyyden mukaan. Akryyliamidi / bis-akryyliamidi / Hepes -liuoksesta poistetaan liuenneet kaasut USB ThermoVac-laitteella. Kaasut poistetaan, jotta ne eivät inhiboisi polyakryyliamidiseoksen polymerisoitumista. Ammonium persulfaatti- (APS) ja tetramethylethylenediamiini- (TEMED) reagenssit lisätään akryyliamidi / bis-akryyliamidi / Hepes -seokseen kaasujen poistamisen jälkeen.

Silanoituille ja glutaraldehydikäsitellyille laselle valetaan 20 µl polyakryyliamidiseosta ja peitinlasit päällystetään toisilla puhdistetuilla peitinlaseilla. Geelin annetaan polymerisoitua 30 minuuttia. Geeli kiinnittyy aminosilanoituille ja glutaraldehydikäsitellyille laselle kovalenttisesti (Buxboim ym. 2010, 194118).

Geelin polymerisoitumisen jälkeen geelit huuhdellaan 50 mM Hepes-puskurilla (pH 8.5) ja ylempi peitinlasi irrotetaan geelistä skalpelin avulla. Geelit huuhdellaan vielä 50 mM Hepes-puskurilla (pH 8.5) ennen Sulfo-SANPAH -käsittelyä. Sulfo-SANPAH -käsittelyn tarkoituksena on kovalenttisesti ristosilloittaa soluväliaineen molekyyliä geelin pintaan (Thermo Scientific 2011, 1).

4.4.1.3. Soluväliaineen proteiinien linkkaaminen PAA-geeliin

Vasta valmistettua Sulfo-SANPAH -liuosta lisätään yhdelle geelille 80 µl. Sulfo-SANPAH aktivoidaan UV-valon avulla 2 x 1.5 minuutin ajan, jolloin liuoksen väri muuttuu oranssista ruskean sävyiseksi. Ensimmäisen UV-valoituksen jälkeen geeleiltä poistetaan ylimääräinen Sulfo-SANPAH -liuos ja UV-valo -käsittely toistetaan. Sulfo-SANPAH reaktiivisuus laskee nopeasti liuoksessa (Thermo Scientific 2011, 1-2) ja siksi geelit pestään Sulfo-SANPAH -käsittelyn jälkeen nopeasti 50 mM Hepes-puskurilla (pH 8.5) ja 1 mg/ml fibronektiini lisätään geeleille mahdollisimman nopeasti. Fibronektiini on soluväliaineen proteiini ja sen avulla solut kiinnittyvät soluväliaineeseen (Heino & Vuento 2007, 233, 235). Fibronektiinillä käsiteltyjä lasia inkuboidaan CO₂-lämpökaapissa +37 °C, 1h.

Fibronektiinikäsittelyn jälkeen geelit siirretään steriileihin olosuhteisiin uudelle 6-kuoppalevyllä laminaari-ilmavirtauskaappiin. Geelit pestään steriilillä PBS:llä ja käsitellään UV-valolla 30 minuutin ajan, jonka jälkeen geelien pesu steriilillä PBS:llä toistetaan. Valmiit substraatit säilyvät viikon jääkaapissa +4°C:ssa.

4.4.1.4. Solujen viljely kasvualustalle ja mikroskopointi

Solut voidaan viljellä polyakryyliamidi-kasvualustoille heti niiden valmistuttua. Soluja kasvatetaan kasvualustoilla 24h, jonka jälkeen ne kiinnitetään ja värjätään. Värjättyjä laseja voidaan katsoa peitinlasin kiinnittämiseen käytetyn petausaineen kuivumisen jälkeen, eli noin 24h kuluttua esimerkiksi immunofluoresenssimikroskoopilla.

4.4.2 Jäykkyyden muokkaaminen geelin koostumusta muuttamalla

Geelin jäykkyyttä voidaan vaihdella muuttamalla akryyliamidin ja bisakryyliamidin välistä suhdetta. Geelin jäykkyys kasvaa geelin bis-akryyliamidin prosentuaalisen osuuden noustessa (Pelham & Wang 1997, 13663). Geelin jäykkyyttä voidaan mitata kimmokerroin, Young's moduluksen, E , (kN/m^2) avulla. Kimmokerroin kasvaa bis-akryyliamidipitoisuuden noustessa ja se vaikuttaa geelin jäykkyyteen. (Pelham & Wang 1997, 13662.)

4.4.3 Biofunktionalisointi

Pinnan biofunktionalisuudella eli biotoiminnallisuudella tarkoitetaan pinnan tekemistä toiminnallisesti aktiiviseksi. Siinä pintamateriaaliin lisätään haluttuja solujen kiinnittymissignaaleita tai biologisia molekyylejä, kuten peptidejä, vasta-aineita ja pienmolekyylejä, jotka muokkaavat solujen ja materiaalin välistä mikroympäristöä. Biofunktionalisoidulla materiaalilla olevat pintaominaisuudet muistuttavat kudoksen rakennetta ja ominaisuuksia ja näin ohjaavat oikeiden solujen kiinnittymistä ja kasvua. (Fu, Wang, Liu, Huang, Kang, Tsai, Shyu & Lin 2011, 38-42.)

Solujen kasvu, kehittyminen ja solusignalointi riippuvat vahvasti siitä, millaisella kasvualustalla solut kasvavat (Ibidi 2012). Markkinoilla on saatavilla useita erilaisia solujen kasvualustoja, kuten muovisia ja lasisia pintoja, joita on muokattu vastaamaan solupohjaisten kokeiden vaatimuksia. Solun kasvualustoja voidaan muokata fyysikaalisen pinnan käsittelyn avulla esimerkiksi hydrofiiliseksi ja adhesiiviseksi ja siten melkein kaikille solutyypeille sopivaksi. Hyvin hydrofobiset, päällystämättömät pinnat eivät mahdollista soluviljelyä suoraan ja siksi niitä päällystetään erilaisten menetelmien avulla esimerkiksi kollageenilla, jota löytyy tyvikalvosta, poly-L-lysiinillä ja poly-D-lysiinillä, jotka ovat aminohappo L- ja D-lysiinin polymeerejä sekä fibronectiinillä, joka on glykoproteiini ja laajasti käytetty pintojen päällyste soluviljelyssä. (Ibidi 2012.)

4.5. Tiedonhaku

Tutkimuksessa käytettiin aikaisempien tutkimusten aineistona pääasiallisesti englanninkielisiä tieteellisiä artikkeleja, koska suomenkielistä aineistoa ei hydrogeeleihin liittyen ollut saatavilla. Muut vieraat kielet rajattiin hausta pois tutkimukseen suunnatun ajan rajallisuuden vuoksi. Tieteellisiä artikkeleja haettiin internetistä Tampereen ammattikorkeakoulun intranetin Nelli-hakuportaalin avulla kirjaston tietokannoista. Aineistoa haettiin myös manuaalisesti.

Hakusanoja käytettiin monipuolisesti ja niitä oli useita. Hakusanayhdistelmistä yleisimpiä olivat polyacrylamide cell culture substrate, hydrogel gel preparation in cell culture, the use of polyacrylamide, the use of hydrogels ja hydrogels mimics. Hakuosumista hyväksyttiin vain englanninkieliset elektronisesti saatavilla olevat aineistot. Haku rajattiin pääasiallisesti viisi vuotta tuoreimpiin julkaisuihin, koska uusinta tietoa aiheesta haluttiin käyttää. Haussa hyväksyttiin kuitenkin myös vanhempia artikkeleita, jos ne vastasivat asetettua tutkimustehtävää. Haku rajattiin myös maksuttomiin koko teksteihin ja aineiston sisällön tuli vastata tutkimuksen aihetta. Tiedon luotettavuutta pyrittiin arvioimaan kriittisesti.

Hakusanoilla haettiin aineistoa tyypeittäin komennolla ”viitteitä artikkeleihin”. Artikkeleita haettiin pääasiallisesti Pubmed-artikkeliviitetietokannasta. Hakusanayhdistelmällä polyacrylamide cell culture substrate löytyi yhteensä 446 artikkelia, joista vain yksi oli relevantti otsikon perusteella. Tätä artikkelia ei kuitenkaan päädytty käyttämään tutkimuksessa, sillä sen sisältö ei vastannut tutkimustehtävää.

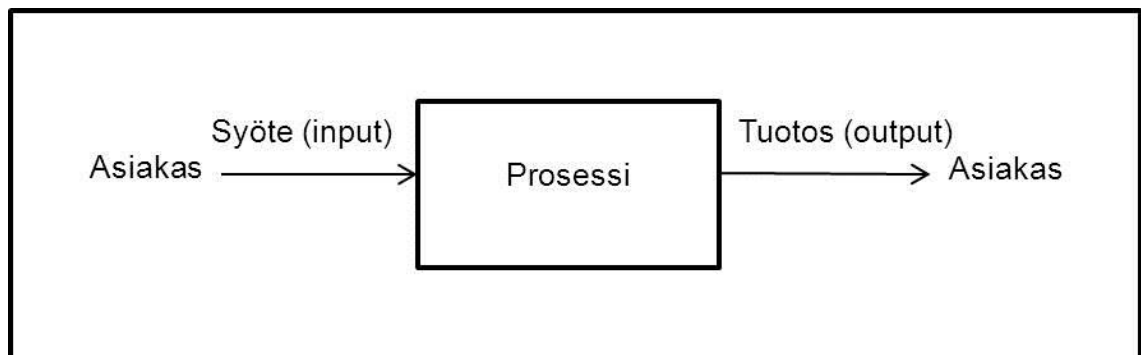
Hydrogel gel preparation in cell culture-hakusanayhdistelmällä löytyi yhteensä 163 hakuosumaa. Artikkelit eivät kuitenkaan vastanneet täysin tutkimustehtävää niiden otsikoiden ja abstraktien perusteella. The use of polyacrylamide-hakusanayhdistelmällä hakuosumia tuli yhteensä 3564, joista 17 oli relevantteja artikkeleiden otsikoiden perusteella. Abstraktien perusteella näistä ei kuitenkaan yksikään ollut tutkimukseen sopiva. The use of hydrogels-hakusanayhdistelmällä löytyi 803 hakuosumaa, joista yksi oli relevantti otsikon ja abstraktin perusteella (Yan & Pochan 2010). Hakusanayhdistelmällä hydrogel mimics löytyi 10 artikkelia, joista kaksi vastasivat asetettua tutkimustehtävää (Tibbit & Anseth 2009; Geckil ym. 2010). Nämä kaksi artikkelia hyväksyttiin tarkempaan tarkasteluun artikkeleiden abstraktien perusteella.

Prosesseihin liittyvää kirjallisuutta haettiin pääasiallisesti manuaalisesti, mutta myös luotettavia verkkojulkaisuja käytettiin. Prosesseihin liittyvää kirjallisuutta haettiin pääasiallisesti suomenkielellä.

4.6. Prosessit

Prosessit ovat organisaatiokohtaisia, ja ne vaihtelevat organisaation koon, tyypin ja kypsyyden mukaan (SFS-EN ISO 9004:2009, 28). Prosessi voi koskea mitä tahansa osaa yrityksen liiketoiminnasta tai muiden organisaatioiden muunlaista hyötyä tavoittelevaa toimintaa, kuten innovaatioiden luomista, järjestelmien ja tuotteiden tuotteistamista, palvelutapahtumia ja tukitoimintoja. Prosessit ovat asiakkaalle lisäarvoa luovia tapahtumaketjuja, joihin resurssit tulevat yritykseltä. (Martinsuo & Blomqvist 2010, 3-4.)

Prosessi tarkoittaa aina asiakkaalta asiakkaalle-ketjua (kuvio 2). Asiakas voi olla tunnettu tai tuntematon, sisäinen tai ulkoinen, mutta se aina kohdistaa vaatimuksia prosessiin. Prosessiin tulee syötteitä, joihin tuotetaan lisäarvo prosessin kautta ja näin syntyy tuotoksia. Lisäarvo liittyy asiakkaan tarpeisiin, odotuksiin tai vaatimuksiin ja tuotoksena se voi merkitä esimerkiksi ratkaisua tai tuotetta. Arvoa lisäävä toiminta prosessissa koostuu useista toisiinsa kytkeytyvistä tapahtumista, toimintaketjuista, jotka voivat olla yksinkertaisia tai monimutkaisia. Prosessit vaativat aina yrityksen resursseja, kuten raaka-aineita, laitteita ja työvoimaa. Resursseja on kohdennettu aina tiettyyn prosessiin rajoitetusti ja ne voivat olla yrityksen omia tai ulkopuoliselta taholta hankittuja. (Martinsuo & Blomqvist 2010, 4.)



KUVIO 2. Kuvio prosessista (Martinsuo & Blomqvist 2010, 4, muokattu)

Prosessit voidaan jakaa ydinprosesseihin ja tukiprosesseihin. Ydinprosessit ovat keskeisiä organisaation toiminnalle ja ne liittyvät ulkoisten asiakkaiden palveluun. Tukiprosessit avustavat ydinprosesseja ja mahdollistavat niiden toiminnan. Tukiprosesseilla on yleensä vain sisäisiä asiakkaita. Tukiprosesseja ovat muun muassa hallinnolliset toiminnot, kuten toimintojen ja osaamisen kehittäminen. (Juhta 2012, 2-3.) Tässä tutkimuksessa hydrogeelien valmistus kuuluu tutkimusryhmän tukiprosesseihin, jonka avulla tutkimusryhmän ydinprosessit, kuten laadukkaan tutkimuksen tuottaminen on mahdollista.

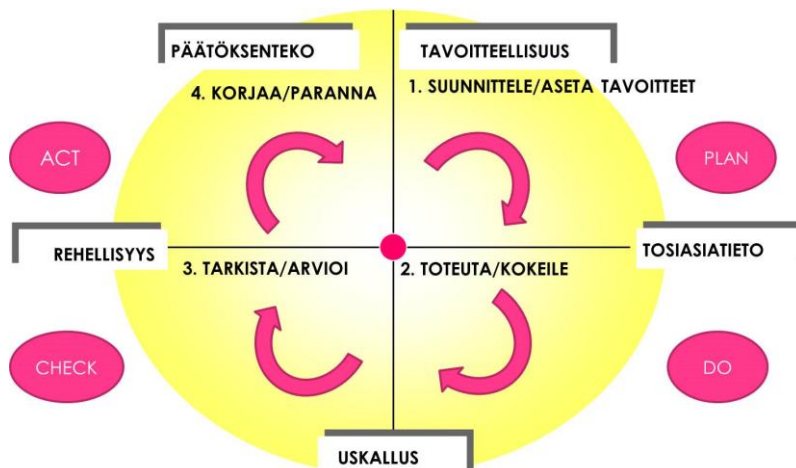
4.6.1 Prosessin kehittäminen ja jatkuva parantaminen

Prosessien kehittäminen liittyy aina organisaation muuhun kehittämiseen ja suunnitteluun ja siksi sen pohjana ovat organisaation toimintaa ohjaavat strategiat, visiot ja toimintaperiaatteet. Johto vastaa selkeistä toimeksiannoista ja prosessin kehittämisen tavoitteista sekä siihen käytettävistä resursseista. Prosessin kehittämisen tarkoituksena on pyrkiä jatkuvaan kehittämiseen ja vaikutusten mittaamiseen. (Juhta 2012, 3.)

Prosessin kehittämisellä tähdätään useimmiten toiminnan tehostamiseen, toiminnan laadun parantamiseen, ongelmatilanteiden hallintaan sekä kustannussäästöjen aikaansaamiseen (Juhta 2012, 3), joihin myös tässä tutkimuksessa prosessin optimoinnilla pyrittiin. Käytännössä tämä voi tarkoittaa päällekkäisten työvaiheiden poistamista läpimenoajan nopeuttamiseksi ja asioiden uudenlaista keskittämistä. Usein halutaan parantaa prosessin käytettävyyttä ja luotettavuutta.

Prosessin kehittämisen laajuus voi vaihdella tilanteen mukaan esimerkiksi jonkin prosessin osa-alueen parantamisesta uusien menetelmien käyttöönottoon ja koko organisaation kattaviin parannuksiin (SFS-EN ISO 9004:2009, 40; Juhta 2012, 3). Usein prosessin kehittämiselle tulee tarvetta, kun kohdataan ongelma, johon halutaan löytää ratkaisu (Laamanen 2012, 202). Prosessin kehittämisen seurauksena syntyy muutoksia, joilla tulee olla hyvät perusteet ja niiden läpiviemiseen on hyvä varata riittävästi resursseja ja aikaa (Juhta 2012, 3).

Prosessin kehittämisessä tavoitteena on jatkuva parantaminen, joka on suunnitelmallisen ja tietoisien kehitystyön tulosta. Prosessien parantamiseen on kehitetty erilaisia järjestelmälähtöisiä toimintamalleja, kuten PDCA-malli (Plan-Do-Check-Act), jota kutsutaan myös Demingin laatuympeyräksi (kuvio 3). (SFS-EN ISO 9004:2009, 40.) Ympyrän ensimmäisessä vaiheessa pohditaan mitä on tärkeintä saada aikaan ja mitä muutosta halutaan. Ympyrän toisessa vaiheessa toteutetaan haluttu muutos ja kolmannessa havainnoidaan muutoksen vaikutukset. Neljäs vaihe kuvaa parantamista, korjaamista, johtopäätösten tekemistä ja oppimista. (Laamanen 2012, 209-210.)



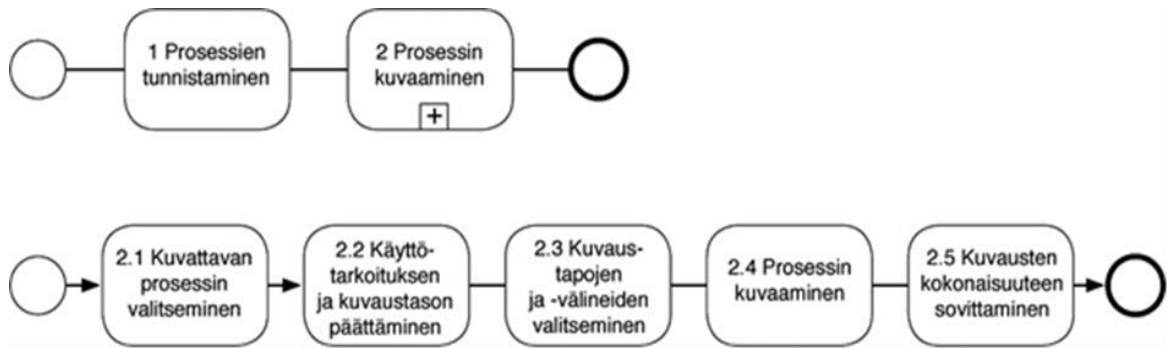
KUVIO 3. PDCA-malli eli Demingin ympyrä

4.6.2 Prosessin kuvaaminen

Prosessikuvaukset ovat prosessien hallinnan, johtamisen ja parantamisen välineitä. Ne auttavat hallitsemaan kokonaisuuksia, jäsentämään prosesseja ja toimijoiden vastuita sekä löytämään toiminnan tehostamistarpeita. Lisäksi prosessikuvauksia käytetään koulutukseen, perehdyttämiseen ja tietojärjestelmien kehittämiseen. (Juhta 2012, 3; Laamanen 2012, 79.)

Prosessikuvauksista on hyötyä tuloksia mitattaessa, palveluita kehitettäessä, laatua arvioitaessa, tietoturvariskejä kartoitettaessa sekä hiljaista tietoa kerätessä. Vaikka prosessikuvauksia laaditaan erilaisilla tarkkuustasoilla eri tarpeita varten, ovat prosessit tärkeä kuvata yhdenmukaisella tavalla. (Juhta 2012, 3.)

Prosesseja kuvattaessa lähtökohtana on tietää miksi prosessi kuvataan. Prosessikuvausten täytyy tuoda toimintaan hyötyä ja niiden tulee olla tarkoituksenmukaisia. (Juhta 2012, 4; Laamanen 2012, 79.) Alla olevassa esimerkissä (kuvio 4) kuvataan prosessien kuvaamisen eteneminen yksinkertaisesti prosessien tunnistamisesta prosessikuvauksen sovittamiseen organisaation kokonaisuuteen. Kuvion alemmassa prosessikuvauksessa avataan prosessin kuvaamiseen liittyvät vaiheet.

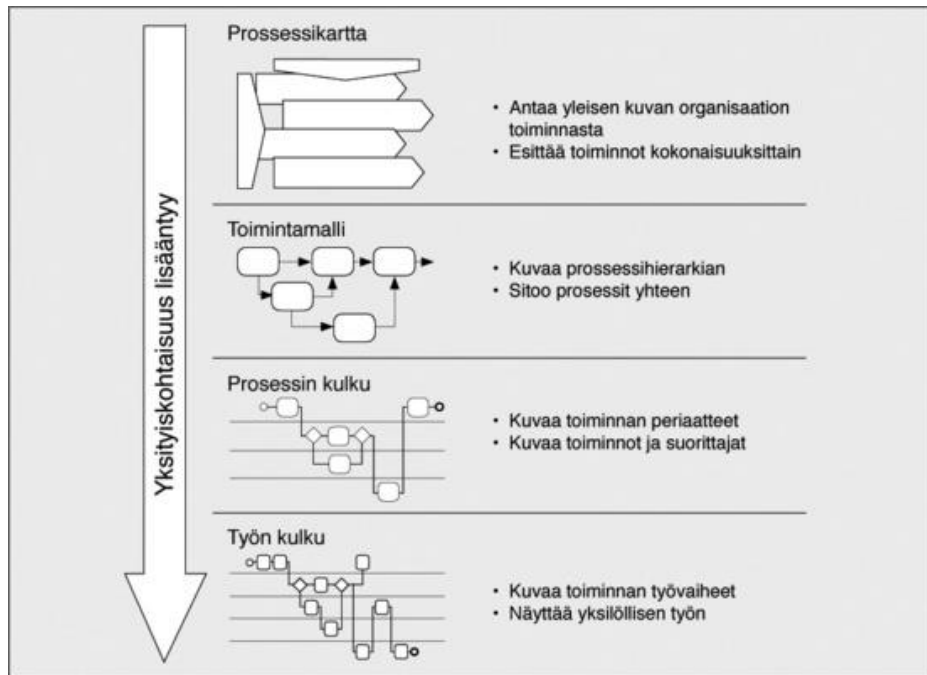


KUVIO 4. Prosessin kuvaamisen vaiheet (Juhta 2012, 4)

Prosessin kuvaaminen aloitetaan prosessin tunnistamisesta ja kuvattavan prosessin valitsemisesta ja rajaamisesta. Rajauksella varmistetaan, että prosessin alku ja loppu on määritelty. Seuraavaksi päätetään prosessin käyttötarkoitus ja sen perusteella kuvaustaso. Kuvaustasoa valittaessa on tärkeää, että kuvaus välittää olennaisen ja tärkeän tiedon. (Juhta 2012, 4-5.)











Prosessia kuvattaessa valitaan prosessia parhaiten kuvaava prosessikaavio, mietitään prosessin vaiheistusta ja niihin osallistuvia henkilöitä. Tässä vaiheessa olisi hyvä myös miettiä, millä välineillä prosessia kuvataan ja mihin prosessikuvaukset dokumentoidaan. Prosessin perustietojen kirjaamisen tarkoituksena on kirjata prosessiin liittyvät keskeiset tiedot. Prosessin kuvaamisen viimeisenä vaiheena on kuvausten kokonaisuuteen sovittaminen. Tässä vaiheessa tarkistetaan, että organisaation eri tasoilla tehdyt prosessikuvaukset eivät ole ristiriidassa keskenään. (Juhta 2012, 4-6.)

Prosessikuvauksia voidaan tehdä monella eri tasolla, joiden yksityiskohtaisuus vaihtelee. Alla olevassa kuviossa (kuvio 5) prosessit on jaettu neljään kuvaustasoon: prosessikarttaan, toimintamalliin (prosessitaso), prosessin kulkuun (toimintotaso) ja työn kulkuun. Prosessikuvaukset tarkentuvat ja yksityiskohtaisuus lisääntyy kuvaustasolla alaspäin siirryttäessä. (Juhta 2012, 6.)



KUVIO 5. Prosessien kuvaustasot (Juhta 2012, 6)

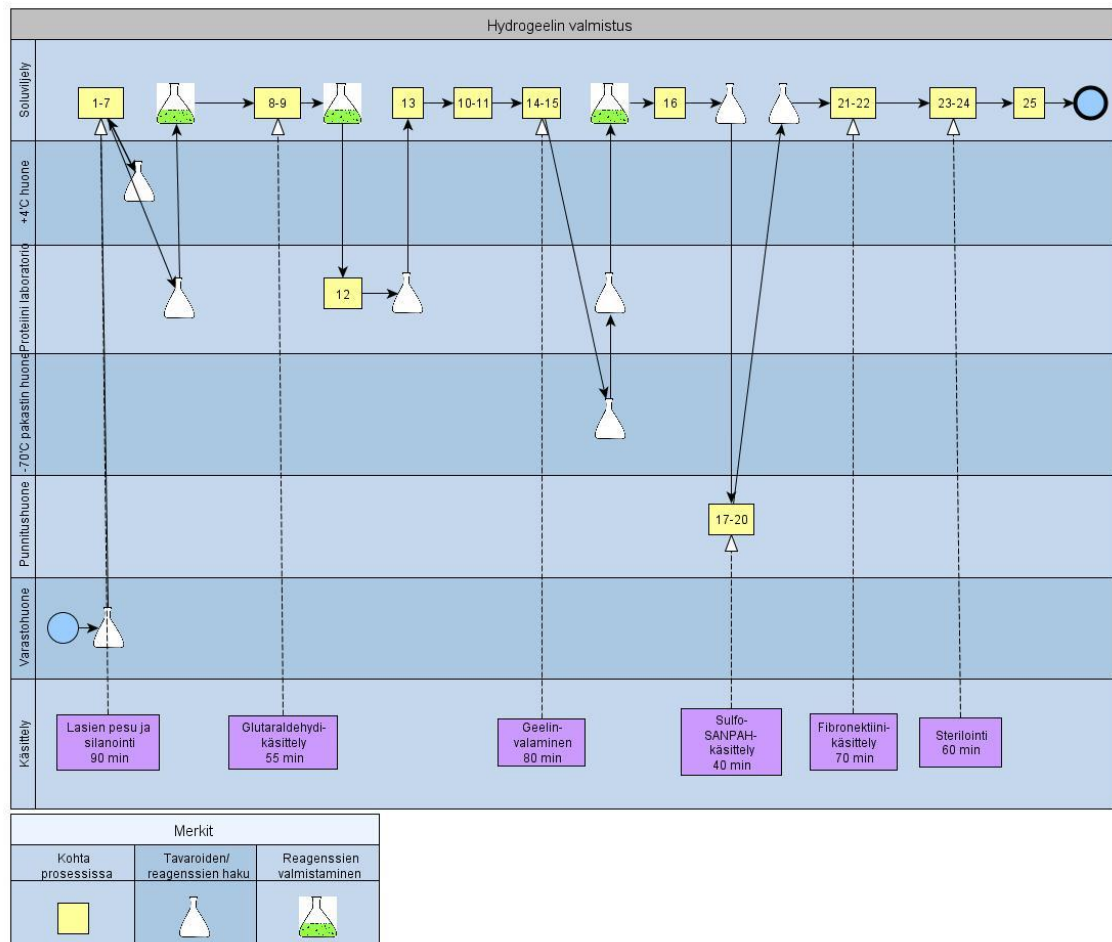
Prosesseja voidaan kuvata lukuisten eri tekniikoiden avulla. Yksityiskohtaiseen prosessikuvaukseen voidaan käyttää esimerkiksi vuokaaviota, uimaratekniikkaa, tehtävämatriisia tai tekstimuotoista ohjeistamista (Martinsuo & Blomqvist 2010, 11). Näissä tekniikoissa käytetään yleensä vakiintuneita merkintätapoja, joita esitellään kuviossa 6.

Merkintä	Merkitys
	Aloitus
	Tehtävä tai prosessi
	Uimarata
	Päätös
	Dokumentti
	Data
	Tiedon tai materiaalin kulku
	
	
	Lopetus

KUVIO 6. Yleisimmät prosessikuvauksen merkinnät (Martinsuo & Blomqvist 2010, 11, muokattu)

5 LÄHTÖTILANTEEN PROSESSIKUVAUS

Hydrogeelin valmistusprosessi kuvattiin uimaratatekniikalla prosessin kulku-tasolla (kaavio 1), jossa kuvattiin toiminnan työvaiheet ja toiminnot. Toimijoita ei kuvauksessa kuvattu, sillä kuvauksessa heitä oli vain yksi. Kaaviossa 1 kuvataan hydrogeelin valmistusprosessi kokonaisuudessaan. Kaavio pohjautuu tutkimusryhmän käyttämään hydrogeelin valmistusohjeeseen (liite 1).



KAAVIO 1. Hydrogeelin valmistusprosessi

Hydrogeelin valmistus aloitettiin prosessiin tarvittavien välineiden hakemisella varastohuoneesta. Hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdat 1-7 eli peitinlasien liekittäminen, pesu ja aminosilanointi suoritettiin soluviljelyhuoneessa. Aminosilanointi suoritettiin silanointiaineen (3-aminopropyyli)triethoxysilaanin (APTES, Sigma Aldrich Cat. No. 440140) avulla tutkimusryhmän käyttämän soluviljelyhuoneen eksikaattorissa. Silanointiaine haettiin +4°C huoneen eksikaattorista.

Laseja silanoitiin eksikaattorissa yksi tunti. Yhden inkubointitunnit aikana, eli hydrogeelin valmistusohjeen kohdan seitsemän aikana valmistettiin 0.5% glutaraldehydiliuos, jota varten haettiin reagensseja tutkimusryhmän proteiinilaboratoriosta. 0.5% glutaraldehydiliuos valmistettiin soluviljelyhuoneessa hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaan.

Glutaraldehydikäsittely eli hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdat 8-9 suoritettiin soluviljelyhuoneessa. Glutaraldehydikäsittelyn aikana valmistettiin jäykkyydeltä keskivahva akryyliamidi (8%) / bis-akryyliamidi (0.06%) / Hepes-liuos, josta poistettiin liuenneet kaasut proteiinilaboratorion USB ThermoVac (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA) -laitteella. Proteiinilaboratoriosta haettiin samalla APS- ja TEMED- (Sigma Aldrich Cat. No. T9281) reagenssit akryyliamidiseoksen polymerisoitumista varten eli hydrogeelin valmistusohjeen kohtaa 14 varten.

Geelin päällystämiseen käytettävät peitinlasit pestiin 70% EtOH:lla ja dH₂O:llä soluviljelyhuoneessa. Soluviljelyhuoneessa suoritettiin myös glutaraldehydiliuoksen kerääminen, peitinlasien peseminen dH₂O:llä ja geelin valaminen eli hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdat 10-11 ja 14-15. Polyakryyliamidiseoksen polymerisoitumisen aikana haettiin Sulfo-SANPAH -liuos (Thermo Scientific, Cat. No. 22589; 1 mg/ml in 50 mM Hepes) -70 °C pakkasesta ja samalla haettiin myös muita mahdollisesti tarvittavia tavaroita proteiinilaboratoriosta.

Sulfo-SANPAH -liuos valmistettiin soluviljelyhuoneessa hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaan. Hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohta 16 suoritettiin soluviljelyhuoneessa. Geelin Sulfo-SANPAH -käsittely eli hydrogeelin valmistusohjeen kohdat 17-20 suoritettiin punnitushuoneessa siellä sijaitsevan UV-lampun takia. Käsittelyä varten soluviljelyhuoneesta otettiin mukaan tarvittavia tavaroita ja reagensseja.

1 mg/ml fibronektiini (YoProteins, Cat. No. 663) sijaitsi soluviljelyhuoneen pakkasessa, josta se otettiin sulamaan Sulfo-SANPAH -käsittelyn jälkeen. Fibronektiinikäsittely eli hydrogeelin valmistusohjeen kohdat 21-22 suoritettiin soluviljelyhuoneessa. Fibronektiinikäsittelyn jälkeen valmis hydrogeeli steriloitiin soluviljelyhuoneen laminaarissa UV-käsittelyn avulla, hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdat 23-25. Valmiit hydrogeelit käytettiin heti valmistuksen jälkeen.

Hydrogeelin valmistusprosessiin kului kokonaisuudessaan noin seitsemän tuntia. Käytettyyn aikaan kuuluivat kahden hydrogeelin valmistaminen, toimintojen suorittaminen (taulukko 1) ja muu prosessiin käytetty aika. Muu prosessiin käytetty aika koostui välineiden ja reagenssien hakemisesta sekä prosessiin kuuluvien välivaiheiden tekemisestä. Muu prosessiin käytetty aika oli noin 25 minuuttia.

TAULUKKO 1. Hydrogeelin valmistusprosessin toimintojen tarkennettu kuvaus 5 minuutin tarkkuudella

TOIMINTO	TOIMINNON KUVAUS	AIKA/ MIN
Lasien pesu	Lasien liekitys, NaOH ja dH ₂ O pesut, kuivaus	15
Silanointi	APTES ja lasit eksikaattoriin, 1h inkubointi	75
Glutaraldehydi-käsittely	Glutaraldehydin lisäys lasille, 30 min inkubointi	55
Geelin valaminen	Polyakryyliamidiseoksen valmistaminen ja valaminen lasille, 30 min inkubointi	80
Sulfo-SANPAH -käsittely	Sulfo-SANPAH -liuoksen valmistus ja geeleille laitto, UV- käsittely	40
Fibronektiinikäsittely	Fibronektiinin lisäys geeleille, 1h inkubointi +37°C	70
Sterilointi	Hydrogeelien siirto steriileihin olosuhteisiin, PBS pesu, UV- käsittely 30 min, steriili PBS pesu, prosessin lopetus	60
Käytetty aika yhteensä		6h 35min

6 TUTKIMUKSEN AINEISTO JA MENETELMÄT

6.1. Kvalitatiivinen tutkimus

Tutkimusstrategian ja tutkimusmetodien valinta riippuvat valitusta tutkimustehtävästä tai tutkimuksen ongelmista (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2009, 132). Hirsjärvi ym. (2009, 114, 123) kuvailevat tutkimisen olevan valintojen ja päätösten tekoa aina siihen saakka, kun tutkielma on jätetty arvioitavaksi. Valinnasta on kyse, kun pohditaan tutkimuksen aihetta, aineiston valintaa ja lähestymistavan valitsemista. Valinnan tekeminen ei ole suinkaan helppoa, mutta valinnan ja päätöksen tekeminen on tärkeää ja ne luovat hyvät pohjat tutkimukselle.

Kvalitatiivisessa eli laadullisessa tutkimuksessa kohdetta pyritään tutkimaan mahdollisimman kokonaisvaltaisesti. Aineisto kootaan todellisissa, luonnollisissa tilanteissa ja kohdejoukko valitaan tarkoituksenmukaisesti. Kvalitatiiviselle tutkimukselle on ominaista, että tutkimussuunnitelma muotoutuu tutkimuksen edetessä. Tutkimus toteutetaan joustavasti ja suunnitelmia muutetaan olosuhteiden mukaan. (Hirsjärvi ym. 2009, 164.)

Tämä tutkimus oli kvalitatiivinen, tutkimusinstituution laboratorioon sijoittuva tutkimus, jossa tutkittiin yksittäistä rajattua kokonaisuutta eli hydrogeelin valmistusprosessia. Tutkimus oli soveltavaa tutkimusta, jossa pyrittiin ratkaisemaan hydrogeelin valmistusprosessiin liittyviä ongelmia ja kehittämään prosessia kokonaisuudessaan. Tutkimuksen suunnitelmia muutettiin ja tutkimuskysymyksiä tarkistettiin tutkimuksen edetessä. Tutkimuksen aineisto kerättiin laadullisesti osallistuvan ja systemaattisen havainnoinnin avulla sekä mikroskopoimalla. Laboratoriotyöskentelystä pidettiin myös tutkimuspäiväkirjaa, jota hyödynnettiin aineiston keruussa ja aineiston analysoinnissa.

6.1.1 Osallistuva ja systemaattinen havainnointi

Hirsjärven ym. (2009, 212-213) ja Vilkan (2006, 37) mukaan havainnointi on tieteellisen tutkimuksen perusmetodi, jonka avulla kerätään havaintoja. Havainnoinnin avulla saadaan välitöntä tietoa ihmisten todellisesta toiminnasta ja käyttäytymisestä luonnollisessa ympäristössä tai laboratorio-olosuhteissa. Havainnoinnin on katsottu sopivan tutkimuksiin, joissa tutkitaan yksittäisen ihmisen toimintaa (Vilka 2006, 37), kuten tässä tutkimuksessa, jossa osallistujajoukko oli yksi henkilö. Tässä tutkimuksessa tutkittava henkilö oli tutkijatohtori, joka työskenteli proteiinidynamiikan tutkimusryhmässä tutkijana. Hänen erikoisosaamistaan olivat nisäkässolujen viljelyt, solukokeet, mikroskooppiset tekniikat sekä perinteiset ja modernit molekyylibiologian tekniikat. Tutkittava sopi tähän tutkimukseen hyvin, sillä hän oli suorittanut hydrogeelin valmistusprosessin useita kertoja ja hän oli perehtynyt aiheeseen laajasti niin teorian kuin käytännönkin työn suhteen.

Havainnoinnin menetelmiä on useita ja menetelmän valinta riippuu siitä, miten tiukasti säädeltyä havainnointi on. Havainnointi voi olla hyvin tarkkaan määriteltyä ja systemaattista, tai se voi olla täysin vapaata. Havainnoija voi olla joko ulkopuolinen tai tarkkailtavan ryhmän jäsen. Näiden pohjalta voidaan erottaa havainnoinnin lajit eli systemaattinen ja osallistuva havainnointi. (Hirsjärvi ym. 2009, 214.) Tässä tutkimuksessa menetelmänä käytettiin molempia.

Osallistuva havainnointi on aineiston keruutapa, jossa tutkija osallistuu tutkimuskohteensa toimintaan tutkimuskohteen ehdoilla (Vilka 2006, 44). Osallistuvan havainnoinnin alalajit määräytyvät sen perusteella, miten kokonaisvaltaisesti tutkija osallistuu tutkittavien toimintaan (Hirsjärvi ym. 2009, 216). Tässä tutkimuksessa tutkijan osallistuminen tutkittavan toimintaan oli pääasiassa tarkkailevaa, eli kohteen ulkopuolista havainnointia. Havainnoinnin aikana tutkija pyrki olemaan osallistumatta tutkimuskohteen toimintaan. Havainnointi oli kuitenkin tilanteessa vapaasti muotoutuvaa ja havainnointitilanteessa keskusteltiin prosessin ongelmista ja kehittämisideoista. Vilkan (2006, 45) mukaan osallistuva havainnointi edellyttää sosiaalisia suhteita tutkimuskohteen jäsenten kanssa. Tutkimuksessa tämä toteutui hyvin, sillä tutkittava ja tutkija olivat aikaisemminkin tehneet yhteistyötä.

Systemaattisessa havainnoinnissa tutkija havainnoi rajatussa tilassa ja tallettaa keräämänsä tiedot tarkasti ja systemaattisesti. Tietojen tallettamista varten on kehitelty erilaisia apukeinoja. (Hirsjärvi ym. 2009, 215.) Systemaattisen havainnoinnin avulla selvitetään niitä asioita, joita on etukäteen paperille määritelty. Systemaattisen havainnoinnin taustalla on selkeä käsitys tutkittavasta toiminnasta. (Routio 2007.)

Tässä tutkimuksessa tutkija osallistui toimivana yksilönä aitoon kenttätilanteeseen ja havaintoja tehtiin ulkopuolisena henkilönä systemaattisesti ennalta laadituille havainnointilomakkeille (liite 2; liite 3). Havainnot prosessin kulusta, ongelmista, ongelmien luonteesta ja havainnoinnin aikana heränneistä prosessin kehittämisideoista kerättiin liitteeseen 2. Prosessin toimintojen suorittamiseen liittynyt ajanseuranta kirjattiin 5 minuutin tarkkuudella liitteeseen 3. Ajanseurannan avulla selvitettiin prosessiin kokonaisuudessaan käytettyä aikaa ja prosessin eri toimintoihin kulunutta aikaa. Liitteen 3 toimintojen kuvaukset tarkentuivat havainnoinnin ja aineiston analyysin aikana. Havainnot kirjattiin tiettyihin luokkiin ennen prosessin optimointia ja prosessin optimoinnin jälkeen prosessin kehittymisen selvittämiseksi. Havainnointikertoja oli yhteensä neljä ja ne suoritettiin touko- ja kesäkuun 2012 aikana.

6.1.2 Mikroskopointi

Tutkimuksen aineiston keruussa käytettiin myös fluoresenssimikroskopointia, jonka avulla saatiin tietoa hydrogeelien ja tutkimuksen prosessin kemiallisten reaktioiden toimivuudesta. Mikroskopoinnin ja mikroskopointia edeltävät työvaiheet, kuten soluviljelyn, solujen alustaan kiinnittämisen ja immunofluoresenssivärjäyksen (liite 8) suoritti tutkittava henkilö, sillä tutkija ei itse ollut perehtynyt fluoresenssimikroskopointiin, eikä edellä mainittuihin menetelmiin. Tutkimuksessa meneteltiin näin, sillä tutkimukseen suunnattu aika ei olisi riittänyt mikroskoopin käytön ja menetelmien oppimiseen.

Immunofluoresenssivärjäyksessä (liite 8) käytettiin primääri vasta-aineena Sigman Anti-Fibronectin -vasta-ainetta, joka oli tuotettu jäniksessä. Sekundääri vasta-aineena käytettiin fluoresoivaa Zymedin Anti-Rabbit -vasta-ainetta. Mikroskopointi suoritettiin Axio Apotomi-mikroskooppilla (Zeiss), joka oli varustettu AxioCam MRm kameralla. Objektiivina käytettiin 40x öljy-immersio -objektiivia (Zeiss Plan-NEOFLUAR, N.A. = 1.3).

Mikroskopoinnissa käytettiin teorialähtöistä visuaalista havainnointia. Näytteistä etsittiin teoriaan pohjautuvia ja kemiallisiin reaktioihin liittyviä asioita. Visuaalisessa havainnoinnissa kiinnitettiin huomiota hydrogeelien laatuun, solujen kasvuun geeleillä, solujen kasvualustaan kiinnittymiseen, fibronektiinin tarttumiseen ja fibronektiinin mahdolliseen irtoamiseen alustasta. Mikroskopoinnin tulokset kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan.

6.1.3 Tutkimuspäiväkirja

Aineiston keruussa hyödynnettiin tutkimuspäiväkirjan sisältöä. Tutkimuspäiväkirjaa pidettiin tutkimukseen kuuluneen laboratorio-osuuden aikana. Laboratorio-osuus suoritettiin touko- ja elokuun 2012 välisenä aikana. Päiväkirjaan kirjattiin laboratoriotyössä tehtyjä yleisiä havaintoja, suoritettuja laboratoriokokeita, tutkimuksen yleistä kulkua, tutkimukseen liittyviä muita tapahtumia ja mikroskopoinnin tulokset.

6.2. Aineiston analysointi

Hirsjärven ym. (2009, 221) mukaan tutkimusprosessin alkuvaiheessa tehdyt valinnat vaikuttavat siihen, miten aineistoa käsitellään ja tulkitaan. Asetetut tutkimusongelmat voivat ohjata menetelmien ja analyysien valintaa. Hirsjärvi ym. (2009, 221-222, 224) painottavat, että tutkimuksessa aineiston analyysi, tulkinta ja johtopäätösten teko ovat tärkeimmässä roolissa. Tärkeää on valita sellainen analyysitapa, joka tuo parhaiten vastauksen ongelmaan tai tutkimustehtävään.

Tässä tutkimuksessa havainnoinnin avulla kerätty aineisto analysoitiin aineistolähtöistä sisällönerittelymenetelmää käyttäen syys- ja lokakuun 2012 välisenä aikana. Ennen aineiston analysointia aineisto tarkastettiin, tietoja täydennettiin ja aineisto järjestettiin analyysiä varten. Mikroskopointiin pohjautuvaa aineistoa ei analysoitu erillisellä tavalla. Visuaalisen havainnoinnin aikana selvisivät suoraan hydrogeelien ja kemiallisten reaktioiden toimivuudet, jotka kirjattiin tutkimuspäiväkirjaan. Tutkimuspäiväkirja toimi pääosin aineistoa täydentävänä metodina ja sen antamaa aineistoa ei analysoitu erityisellä tavalla.

6.2.1 Sisällön erittely

Sisällön erittelyssä tutkimusaineisto jaetaan havaintoyksikköihin ja yksilöidään numerojärjestykseen (Vilkkä 2005, 139). Sisällön erittelyssä kuvataan kvantitatiivisesti esimerkiksi tekstin sisältöä. Aineistosta pyritään laskemaan kuinka monta kertaa jostakin asiasta on kirjoitettu ja jotain termiä käytetty. Tapahtumien lukumäärät pyritään selvittämään. Kvantitatiivisten mittaustulosten avulla vastataan asetettuihin tutkimusongelmiin. (Eskola & Suoranta 2001, 185-186.)

Sisällön erittelyssä on lukuisia eri tapoja luokitella ja järjestää laadullista aineistoa. Aineistolähtöisessä analyysissä aineisto voidaan ryhmitellä tarkkarajaisesti tiettyihin ennalta määrättyihin luokkiin. (Eskola & Suoranta 2001, 187.) Tässä tutkimuksessa havainnoinnin avulla saatu aineisto oli valmiiksi jaoteltu luokkiin (liite 2; liite 3).

Täytetyistä havainnointilomakkeista (liite 4; liite 6) laskettiin ongelmatyyppien lukumäärät, selvitettiin optimoinnin tarve, mahdollisuus ja prosessin kehittämiseksi. Vastaavasti täytetyistä toimintoihin liittyvistä ajanseurantalomakkeista (liite 5; liite 7) selvitettiin toimintoihin kulunut aika ja tarkasteltiin toimintojen kuvauksia. Aineistonanalyysissä tehtiin päätelmiä aineistosta nousevien seikkojen perusteella ja aineistoa tarkasteltiin yksityiskohtaisesti ja monitahoisesti.

7 TULOKSET

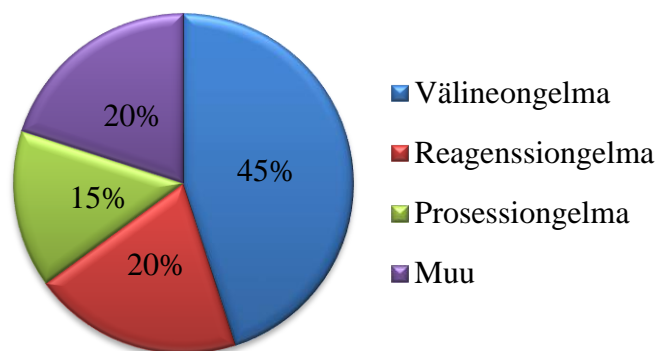
7.1. Hydrogeelin valmistusprosessiin liittyvät ongelmakohdat ennen prosessin optimointia

Havainnointilomakkeen (liite 2) avulla selvitettiin ongelman kohta prosessissa, optimoinnin tarve, ilmennyt ongelma ja optimoinnin mahdollisuus. Havainnointilomakkeeseen oli mahdollista myös kirjoittaa ”MUUTA” kohtaan havainnointitilanteessa heränneitä ajatuksia. Havainnointilomakkeen ongelmat jaettiin seuraavasti: 1 prosessiongelma, 2 tilaongelma, 3 reagenssiongelma, 4 välineongelma ja 5 muu. Prosessiongelmalla tarkoitettiin ongelmaa, joka vaikutti epäsuotuisasti prosessiin kulkuun. Tilaongelmaksi kirjattiin ongelmat, jotka liittyivät työskentelytilaan. Reagenssiongelmia olivat esimerkiksi reagenssinpuutteet ja välineongelmilla tarkoitettiin välineestä johtuvaa ongelmaa, kuten jonkin välineen puutetta. Muulla ongelmalla tarkoitettiin jotain muuta, edellä mainittuihin ongelmiin kuulumatonta ongelmaa. Havainnointilomakkeen ”ONGELMA”-kohtaan merkittiin ilmennyt ongelma edellä mainittujen perusteiden avulla.

Ensimmäisen havainnoinnin tuloksena huomattiin, että hydrogeelin valmistuksen ongelmakohdista olivat hydrogeelin valmistusohjeen kohdat 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 25 (liite 4). Ongelmakohdat eivät siis sijoittuneet tiettyyn kohtaan prosessia, vaan ongelmia esiintyi koko prosessin aikana. Täytetystä havainnointilomakkeesta (liite 4) huomattiin, että suurin osa ongelmista johtui välineongelmista. Ongelmia esiintyi myös reagenssipuolella, kolmessa kohtaa prosessia ja muissa ongelmissa. Tilaongelmia ei havaittu (taulukko 2). Kuviossa 7 esitetään hydrogeelin valmistusprosessissa ilmenneiden ongelmien prosentuaaliset osuudet.

TAULUKKO 2. Ongelmat hydrogeelin valmistusprosessissa

Ongelma	Lukumäärä
1 Prosessiongelma	3
2 Tilaongelma	-
3 Reagenssiongelma	4
4 Välineongelma	9
5 Muu	4
Yhteensä	20



KUVIO 7. Prosessin ongelmat prosentuaalisesti esitettynä

Yhdeksän ongelma-kohtaa 20:stä osoittautui välineongelmaksi. Hydrogeelin valmistusprosessin alussa, eli hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdissa 1, 2 ja 3, työskentelytilassa ilmeni useita puutteita välineisiin liittyen. Apupöytää ei ollut tavaroiden laskemista varten, eikä hydrogeelin valmistamiseen tarvittaville lasille tarkoitettua telineitä. Kohdassa 1 mietittiin lasien liekityksen tarpeellisuutta. Tutkimuksessa päädyttiin kuitenkin siihen, että lasia liekitetään jatkossakin ohjeen mukaan.

Kohtaan 6 (liite 4) kirjattiin välineongelma. Vakuumpumppu ei toiminut kunnolla. Kohdat 18 ja 19 sisälsivät myös välineongelman. Ongelma johtui UV-lampun sijainnista ja tämän takia soluviljelyhuoneesta jouduttiin poistumaan. Systemaattisen havainnoinnin aikana huomattiin, että välineongelmia esiintyi myös hydrogeelin valmistusohjeen kohdissa 5, 12 ja 24.

Kohdassa 5 ongelma johtui siitä, että APTES-reagenssi sijaitti +4°C huoneen eksikaattorissa ja siksi soluviljelyhuoneesta jouduttiin poistumaan. ThermoVac-laitetta ei ollut mahdollista käyttää soluviljelyhuoneessa ja siksi soluviljelyhuoneesta jouduttiin poistumaan proteiinilaboratorioon hydrogeelin valmistusohjeen kohtaa 12 suoritettaessa. Sterilointia suoritettaessa eli kohtaa 24, tarvittavia pipetinkärkiä ei ollut laminaari-ilmavirtauskaapissa, josta seurasi välineongelman kirjaaminen havainnointilomakkeelle.

Havainnoinnin tuloksena muita ongelmia havaittiin 4/20. Muilla ongelmilla tarkoitettiin näissä tapauksissa sitä, ettei lasien ja geelien säilyvyyttä oltu tutkimusryhmässä aikaisemmin tutkittu. Käsiteltyjen lasien ja geelien säilyvyystietojen tunteminen on tärkeää laadukkaan tuotteen aikaansaamiseksi.

Havainnoinnin tuloksena reagenssiongelma-kohtia ilmeni 4/20. Nämä ongelmat ilmaantuivat kohdissa 8, 14, 17 ja 24. Kohdan 8 ongelma johtui siitä, että 0.5% glutaraldehydiliuos jouduttiin valmistamaan aina uudestaan geelin valmistamisen yhteydessä. Kohdan 14 ongelma johtui APS:n ja TEMED:n puutteesta soluviljelyhuoneessa. Reagenssit jouduttiin hakemaan aina erikseen proteiinilaboratoriosta.

Kohdan 17 ongelmana oli se, että Sulfo-SANPAH -liuos jouduttiin valmistamaan aina jokaisen hydrogeelin valmistamisen yhteydessä, jotta reagenssi oli tuoretta sitä käytettäessä. Havainnointilomakkeelle kirjattiin kohtaan 24 reagenssiongelma, sillä hydrogeelien sterilointia suoritettaessa ei steriiliä PBS:ää ollut saatavilla.

Varsinaisiksi prosessiongelmiksi havaittiin kohdat 13, 17 ja 21. Hydrogeelin valmistusohjeen kohta 13 suoritettiin kohdan 12 jälkeen, jolloin peitinlasit eivät kerinneet kuivua täysin ennen niiden käyttöä. Hydrogeelien laatu heikkeni selvästi märkien peitinlasien käytöstä. Kohdan 17 ongelmana oli Sulfo-SANPAH -liuoksen säilyttäminen -70°C pakastimessa. Liuos kuului säilyttää -70°C lämpötilassa, jonka seurauksena soluviljelyhuoneesta jouduttiin poistumaan liuosta haettaessa.

Prosessiongelmaksi kirjattiin myös kohta 21. Fibronektiinin lisääminen geeleille hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaisella tekniikalla hidasti prosessin kulkua. Fibronektiini on arvokas ja erityisen ympäristöherkkä reagenssi ja siksi reagenssia käytettiin kyseisellä tekniikalla sen käytön minimoimiseksi. Kohdan 21 ongelma liittyi fibronektiinin käsittelytekniikkaan, johon ei pystytty vaikuttamaan. Kuvasta 3 nähdään työskentelytila sivusta ja edestä.



KUVA 3. Työskentelytila sivusta (vasemmalla) ja työskentelytila edestä (oikealla)

7.2. Prosessin suorittamiseen käytetty aika ennen prosessin optimointia

Toisena havainnointina suoritettiin prosessin toimintojen ajanseuranta (liite 3). Ajanseurannan avulla selvitettiin toimintoihin sisältyvien tarkempien toimintojen suorittamiseen käytettyä aikaa 5 minuutin tarkkuudella. Toimintojen kuvauksia tarkennettiin ensimmäisen havainnoinnin ja aineiston analyysin aikana (liite 5). Ajanseurannassa tarkasteltiin lasien pesuun, silanointiin, glutaraldehydikäsittelyyn, geelin valamiseen, Sulfo-SANPAH -käsittelyyn, fibronektiinikäsittelyyn ja sterilointiin käytettyä aikaa. Toimintoihin käytetyt ajat laskettiin yhteen, jolloin saatiin prosessin toimintoihin käytetty aika yhteensä. Laskettuun aikaan lisättiin muu prosessiin käytetty aika hydrogeelin valmistusprosessiin käytetyn kokonaisajan selvittämiseksi. Muun prosessiin käytetyn ajan sisältöä on selvitetty jo etukäteen tutkimuksen kappaleessa 5 (sivu 33).

Kuten tutkimuksen kappaleen 5 (sivu 33) taulukossa 1 on esitetty, hydrogeelin valmistusprosessin lähtötilanteessa lasien pesemiseen sisältyvien toimintojen suorittamiseen kului 15 minuuttia. Aikaa kului suhteellisen paljon, koska lasit jouduttiin pesemään yksitellen. Silanoinnin suorittamiseen kului 75 minuuttia ja glutaraldehydikäsittelyyn 55 minuuttia. Silanoinnin kohdalla prosessia hidasti soluviljelyhuoneesta poistuminen. Glutaraldehydikäsittelyyn käytettyä aikaa lisäsi huomattavasti glutaraldehydiliuoksen valmistaminen ja sen lisääminen lasille yksitellen.

Geelin valamiseen käytettiin aikaa 80 minuuttia. Prosessia hidasti polyakryyliamidiseoksen valmistamiseen tarvittavien välineiden hakeminen toisesta laboratoriosta ja seoksesta liuenneiden kaasujen poistaminen proteiinilaboratoriossa. Sulfo-SANPAH -käsittelyyn kului 40 minuuttia. Toimintoon kului paljon ylimääräistä aikaa, sillä toiminto jouduttiin suorittamaan soluviljelyhuoneen ulkopuolella ja tätä varten soluviljelyhuoneesta jouduttiin ottamaan mukaan tarvittavat välineet. Lisäksi Sulfo-SANPAH -liuos pitää olla aina tuoretta sitä käytettäessä ja siksi liuos jouduttiin valmistamaan aina jokaisen käytön yhteydessä uudestaan. Tämä hidasti prosessin kulkua.

Fibronektiinikäsittelyyn kului 70 minuuttia ja sterilointiin 60 minuuttia. Prosessia hidasti tarvittavien välineiden ja reagenssien sijainti laminaari-ilmavirtauskaapin ulottumattomissa. Tarpeen mukaan välineitä ja reagensseja haettiin varastohuoneesta ja proteiinilaboratoriosta. Edellä mainittuihin toimintoihin kului kokonaisuudessaan 6h 35 minuuttia. Muu prosessiin käytetty aika oli noin 25 minuuttia. Kahden hydrogeelin valmistusprosessiin kului aikaa kokonaisuudessaan siis noin 7 tuntia.

7.3. Prosessin teknisen toimivuuden lisääminen

Ennen prosessin optimointia työtilassa ei ollut tarvittavia välineitä, eikä reagensseja sujuvan työskentelyn mahdollistamiseksi. Työskentelytila oli myös ahdas ja sekava. Prosessin optimoinnin seurauksena työskentelytila muutettiin selkeäksi ja toimivaksi (kuva 4).

Työskentelytila siivottiin ja tilaan jäi ainoastaan hydrogeelin valmistamiseen tarvittavat välttämättömät välineet ja reagenssit. Jätteille järjestettiin oma paikka ja apupöytä saatiin varsinaisen työskentelyvetokaapin oikean puoleisen vetokaapin alle. Soluviljelyhuoneessa oli kaksi vetokaappia, joista vasemman puoleinen nimettiin varsinaiseksi työskentelyvetokaapiksi. Välineille ja reagensseille järjestettiin oma hylly vetokaapin vasemmalle puolelle.

Työskentelytilaan hankittiin prosessia varten erilaisia välineitä, kuten pipettisarja, pipetinkärkiä, 6-kuoppalevyjä ja tarvittavia liuoksia. Näin välineet olivat heti saatavilla niitä tarvittaessa. Toimenpiteillä lisättiin prosessin sujuvuutta, vähennettiin varastohuoneessa käyntejä ja välttyttiin kontaminoimasta muihin tehtäviin tarkoitettuja pipettejä ja liuoksia. Laminaarityöskentelyyn hankittiin myös omat liuokset ja pipetinkärjet steriiliä työskentelyä varten.

Prosessin sujuvuuteen vaikutti huomattavasti UV-lampun järjestäminen soluviljelyhuoneeseen Sulfo-SANPAH- käsittelyä varten. UV-lamppu sijoitettiin varsinaisen työskentelyvetokaapin viereiseen vetokaappiin. Ennen prosessin optimointia Sulfo-SANPAH -käsittely jouduttiin suorittamaan punnitushuoneessa. UV-lampun uudelleen sijoittamisen myötä käsittely voitiin suorittaa kokonaisuudessaan soluviljelyhuoneessa.

Prosessin teknistä toimivuutta lisättiin myös valmistamalla käytettäviä reagensseja suurempaan tilavuuteen yhdellä kertaa. Toimenpiteen avulla pipetointivirhettä vähennettiin, liuosten tasalaatuisuus lisääntyi ja reagenssien riittävyys varmistettiin koko prosessin ajan. Toimenpide vaikutti prosessinkulkuun myönteisesti, sillä reagensseja ei tarvinnut valmistaa hydrogeelin valmistuksen aikana.

APTES-reagenssia säilytettiin +4°C kylmähuoneen eksikaattorissa. APTES-reagenssia ei ollut mahdollista saada soluviljelyhuoneeseen ja siksi prosessia ei saatu optimoitua tältä osin. Prosessi saatiin kuitenkin optimoitua niin, että reagenssi haettiin +4°C-huoneesta heti hydrogeelin valmistusprosessin alussa. Näin välttyttiin soluviljelyhuoneesta poistumiselta.

Prosessia ei saatu optimoitua Sulfo-SANPAH -liuoksen hakemisen kohdalta, sillä reagenssi sijaitti -70°C pakastimessa, eikä soluviljelyhuoneeseen ollut mahdollista saada -70°C pakastinta. Sulfo-SANPAH -liuos täytyi olla tuore sitä käytettäessä ja siksi liuosta ei myöskään voitu valmistaa suurempaa määrää valmiiksi 0.5% glutaraldehydin tapaan.

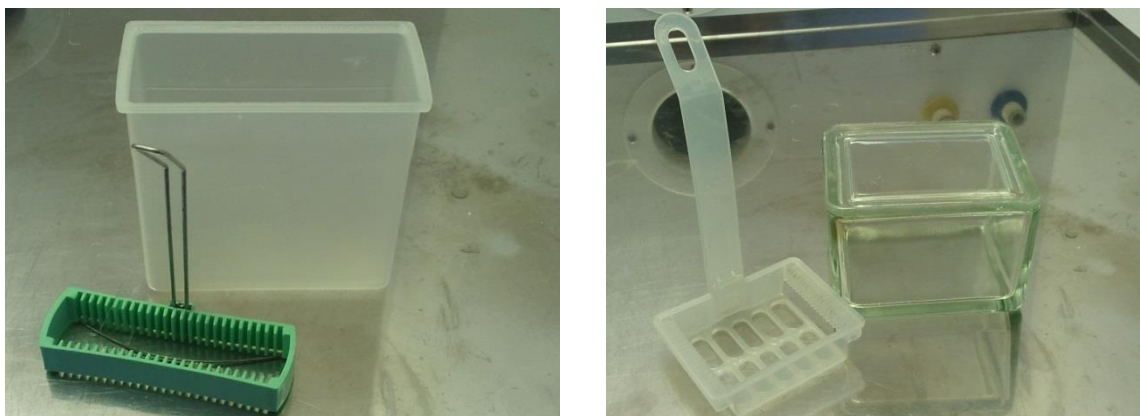


KUVA 4. Työskentelytila sivusta (vasemmalla) ja työskentelytila edestä (oikealla)

Ensimmäisen havainnoinnin pohjalta huomattiin, että pienten peitinlasien käsittely oli toisinaan haastavaa. Peitinlaseja käsiteltiin yksitellen pinsettien avulla, jolloin erityistä tarkkaavaisuutta jouduttiin kiinnittämään pinsettien otteen pitämiseen. Pinsettien ote saattoi kuitenkin pettää ja lasit tippua työvaiheiden aikana. Pinsettien liian kova puristusvoima aiheutti myös joidenkin lasien lohkeilemisen. Koska peitinlaseja ei voitu tukea hyvin työvaiheiden aikana, ne kaatuilivat ja aiheuttivat lisää haasteita niiden käsittelyyn.

Hydrogeelin valmistusprosessin glutaraldehydikäsittelyssä vain toinen puoli peitinlaseista voitiin käsitellä, jolloin peitinlasiin vain toista puolta voitiin käyttää prosessin edetessä. Käsiteltyä peitinlasiin puolta ei voitu erityisesti merkitä millään tavalla, jolloin vain prosessia suorittava henkilö tiesi käsitellyn lasin puolen. Tämä lisäsi virheiden syntymisen mahdollisuutta ja nosti prosessin epäonnistumisen riskiä.

Edellä mainittuihin ongelmiin keksittiin ratkaisu hankkimalla peitinlaseille teline ja telineeseen kuuluva astia (kuva 5). Teline piti lasit pystyssä ja näin laseja ei tarvinnut enää käsitellä yksitellen hydrogeelin valmistusprosessin aikana. Telineen ja astian avulla lasien käsitteleminen liuoksessa helpottui, sillä teline voitiin upottaa astiassa olevaan nesteeseen. Näin kaikki lasit kastautuivat nesteessä yhtä aikaa ja lasin molemmat puolet tulivat käsiteltyä, jolloin lasien jatkokäsittely ei ollut riippuvaista lasin käsittelypuolesta. Teline mahdollisti useamman lasin yhtäaikaisen prosessoinnin ja kehitys nopeutti prosessin kulkua huomattavasti.



KUVA 5. Teline pienille peitinlaseille (vasemmalla) ja isoille peitinlaseille (oikealla)

7.4. Hydrogeelin valmistaminen isommassa tilavuudessa

Tutkimus toteutettiin valmistamalla kaksi hydrogeeliä hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaan käyttämällä tutkimusryhmän suurempia peitinlaseja (54 x 70 mm). Hydrogeelin valmistuksessa käytettiin 6.56 x suurempi tilavuus polyakryyliamidiseosta, 0.5% glutaraldehydiä, Sulfo-SANPAH -liuosta ja fibronktiiniä pienempään peitinlasiin (24 x 24 mm) verrattuna. Polyakryyliamidiseosta valmistettiin yhdelle isommalle peitinlasille 132 μ l, kun pienelle peitinlasille seosta valmistettiin 20 μ l. Geelin akryyliamidi / bis-akryyliamidi -suhde oli isoissa ja pienissä sama, eli 8% / 0.06%.

Geelin valmistamisen jälkeen solut viljeltiin geeleille, kiinnitettiin ja värjättiin tutkimusryhmän käyttämän immunovärjäysohjeen (liite 8) mukaan sekä mikroskopoititiin fluoresenssimikroskoopilla. Tutkimuksen tuloksena hydrogeelit onnistuttiin valmistamaan isommille peitinlaseille ja valmiit hydrogeelit toimivat halutulla tavalla. Isompien geelien valmistaminen sujui ongelmitta ja geelejä oli helpompi käsitellä niiden suuremman koon takia. Mikroskopoinnin tuloksena hydrogeeleille viljeltyt solut kiinnittyivät ja kasvoivat normaalisti.

7.5. Lasien ja geelien säilyvyystutkimus

Lasien ja geelien säilyvyystutkimuksessa selvitettiin APTES-käsiteltyjen lasien, APTES- / glutaraldehydikäsiteltyjen lasien, APTES- / glutaraldehydi- / polyakryyliamidigeelien ja valmiiden hydrogeelin säilyvyyttä. Silanoitujen lasien säilyvyydestä ei ollut tietoa hydrogeelin valmistusohjeessa (liite 1) ja siksi niiden säilyvyyttä haluttiin tutkia myös. Tutkimuksessa valmistettiin kaksi lasia tai geeliä yhtä säilyvyystutkimusta kohden. Käsiteltyjä laseja säilytettiin niiden vaatimalla tavalla (liite 1) kaksi viikkoa, jonka jälkeen hydrogeelin valmistusprosessia jatkettiin fluoresenssimikroskopointiin asti.

Kaikki tutkimusten tulokset osoittivat, että lasit ja geelit voidaan säilyttää turvallisesti hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaisella tavalla. Käsiteltyjä laseja ja geelejä voidaan säilyttää ainakin kaksi viikkoa heikentämättä niiden toimintaa. Silanoituneet lasit säilyivät eksikaattorissa kaksi viikkoa +22°C hyvin, eikä niiden säilyttäminen vaikuttanut valmiin hydrogeelin laatuun. Silanoitujen lasien säilyttäminen eksikaattorissa jopa paransi valmiiden hydrogeelien laatua.

7.6. Prosessin kemiallisten reaktioiden toimivuus

Hydrogeelin valmistusprosessissa oli neljä eri kohtaa, joiden kemiallisten reaktioiden toimivuutta haluttiin tarkastella. Nämä kohdat olivat silanointi APTES-reagenssin avulla, 0.5% glutaraldehydikäsittely, Sulfo-SANPAH -käsittely ja fibronektiinikäsittely.

Kemiallisten reaktioiden toimivuutta tutkittiin valmistamalla hydrogeelit hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaan ja päällystämällä ne halutuilla proteiineilla. Valmiiden hydrogeelien pintaan viljeltiin soluja ja niitä kasvatettiin geeleillä 24h, jonka jälkeen solut kiinnitettiin ja värjättiin tutkimusryhmän käyttämän ohjeen (liite 8) mukaan. Kemiallisten reaktioiden toimivuutta tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla.

7.6.1 Silanoinnin ja glutaraldehydin toimivuustutkimus

APTES-reagenssin eli silanoinnin ja glutaraldehydin toimivuutta tutkittiin ensin. Tutkimus toteutettiin valmistamalla kaksi APTES- ja glutaraldehydikäsiteltyä peitinlasia ja kaksi vain glutaraldehydikäsiteltyä peitinlasia. Käsitellyille peitinlaseille valettiin polyakryyliamidiseosta (8% / 0.06%).

Tutkimuksen tuloksena saatiin, että peitinlasien silanointi APTES-reagenssin avulla ja lasien glutaraldehydikäsittely toimi, sillä glutaraldehydi sitoutui kovalenttisesti APTES:n aminoryhmään ja näin polyakryyliamidigeeli jäi kiinni halutulla tavalla silanoituun ja glutaraldehydikäsiteltyyn lasiin. Polyakryyliamidigeeli ei jäänyt kiinni vain glutaraldehydillä käsiteltyyn lasiin. Tutkimuksessa käytettiin visuaalista havainnointia. Tutkimuksen tulos selvisi kokeellisesti irrotettaessa geeliä peitinlasista.

7.6.2 Sulfo-SANPAH:n ja fibronektiinin toimivuustutkimus

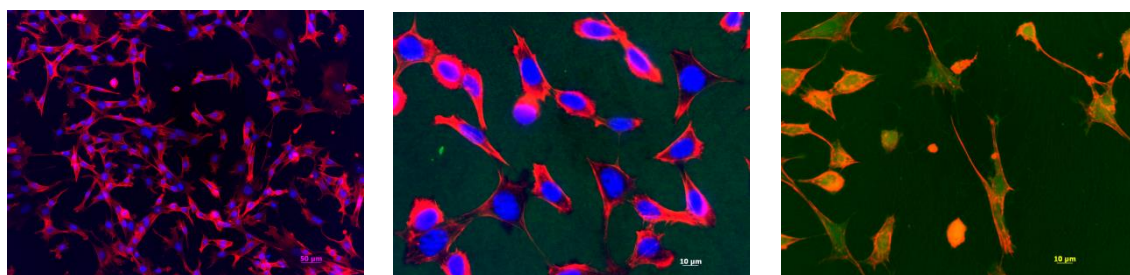
Sulfo-SANPAH:n ja fibronektiinin toimivuutta tutkittiin valmistamalla kaksi hydrogeeliä hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaan, kaksi hydrogeeliä ilman Sulfo-SANPAH -käsittelyä, kaksi APTES- / Sulfo-SANPAH- / fibronektiinikäsiteltyä lasia ja kaksi APTES- / fibronektiinikäsiteltyä lasia (taulukko 3).

TAULUKKO 3. Kemiallisten reaktioiden toimivuustutkimus

Sulfo-SANPAH:n ja fibronektiinin toimivuustutkimus		
Geeli/lasi	Kpl	Suoritettavat kohdat hydrogeelin valmistusohjeessa (liite 1)
Geeli	2	1-25
Geeli	2	1-16, 21-25
Lasi	2	1-7, 17-25
Lasi	2	1-7, 21-25

Solujen liikkumista geelillä ja fibronektiinin irtoamista geeliltä tutkittiin fluoresenssimikroskoopilla (kuva 6). Sulfo-SANPAH:n ja fibronektiinin toimivuustutkimuksen tuloksena fibronektiini ei irronnut kasvualustalta ja solut kasvoivat sekä liikkuivat kasvualustallaan normaalisti. Mikroskopointitulosten perusteella voitiin päätellä, että Sulfo-SANPAH ja fibronektiini toimivat halutulla tavalla.

Kuvan 6 kuvasarjassa havainnoidaan kemiallisten reaktioiden toimivuutta ja niiden vaikutusta solujen toimintaan. Kuvasarjan vasen kuva esittää MEF-solujen normaalia kasvua hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) mukaan tehdyllä PAA-geelillä. Kuvassa on käytetty 10x objektia. Kuvasarjan keskellä kuvataan MEF-solujen kasvua fibronektiini- ja Sulfo-SANPAH -käsitellyllä PAA-geelillä. Fibronektiini näkyy solujen taustalla vihertävänä mattona. Kuten kuvasta voidaan huomata, fibronektiini ei irtoa kasvualustasta solujen siinä liikkeessä. Viimeinen kuva oikealla kuvastaa kemiallisten reaktioiden toimimattomuutta ja fibronektiinin irtoamista kasvualustasta. Viimeisessä kuvassa PAA-geeli on käsitelty vain Sulfo-SANPAH:lla.



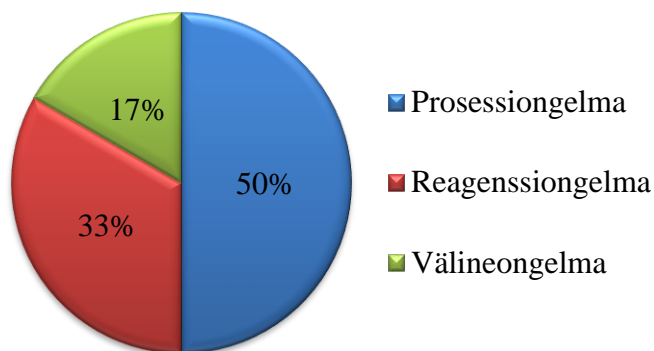
KUVA 6. Kuvasarja solukokeista. Vasemmalla MEF-solut PAA-geelillä. Keskellä MEF-solut fibronektiini- ja Sulfo-SANPAH -käsitellyllä geelillä. Oikealla MEF-solut vain Sulfo-SANPAH -käsitellyllä geelillä.

7.7. Prosessiin liittyvät ongelmakohdat prosessin optimoinnin jälkeen

Kolmannen havainnoinnin tuloksena (liite 6) hydrogeelin valmistusprosessin (liite 1) neljässä kohdassa havaittiin ongelmia. Ongelmat esiintyivät prosessin kohdissa 5, 10, 17 ja 21. Kolme ongelmaa luokiteltiin prosessiongelmaksiksi, kaksi reagenssiongelmaksiksi ja yksi välineongelmaksi. Tilaongelmia ja muita ongelmia ei havainnoitu (taulukko 4). Kuvioista 8 nähdään hydrogeelin valmistusprosessissa ilmenneiden ongelmien prosentuaaliset osuudet.

TAULUKKO 4. Ongelmat hydrogeelin valmistusprosessissa optimoinnin jälkeen

Ongelma	Lukumäärä
1 Prosessionongelma	3
2 Tilaongelma	-
3 Reagenssiongelma	2
4 Välineongelma	1
5 Muu	-
Yhteensä	6



KUVIO 8. Prosessin ongelmat prosentuaalisesti esitettynä

Hydrogeelin valmistusprosessin (liite 1) kohtaan 5 kirjattiin välineongelma (liite 6). Ongelma ilmeni jo ensimmäisen havainnoinnin tuloksena (liite 4). Ongelma kirjattiin kohtaan, koska APTES-reagenssia säilytettiin +4°C-huoneen eksikaattorissa. Tutkimusryhmällä ei ollut ylimääräisiä eksikaattoreita soluviljelyhuoneeseen reagenssin säilytykseen, joten APTES säilytetään jatkossakin +4°C-huoneessa. Tämä ei kuitenkaan hidasta hydrogeelin valmistusprosessin kulkua, sillä APTES haetaan 4°C-huoneesta heti prosessin alussa.

Optimoidun prosessin seurauksena glutaaraldehydijätteen ajateltiin lisääntyvän prosessin aikana. Tästä johtuen havainnointilomakkeelle (liite 6) kirjattiin uusi prosessi- ja reagenssiongelma kohtaan 10. Glutaaraldehydi on lajiteltava ympäristömyrkky (Sigma-Aldrich 2013) ja siksi kemikaali tulee hävittää oikeanmukaisella tavalla.

Ennen prosessin optimointia 0.5% glutaraldehydiä lisättiin yhdelle lasille 2ml, eli jätettä kertyi 2ml/lasi. Prosessin optimoinnin seurauksena pienten peitinlasien käsittelyn helpottamiseksi hankitun telineen astia täytettiin 100 ml:llä 0.5% glutaraldehydiä. Astiassa pystyttiin kuitenkin käsittelemään 20 lasia yhdellä kerralla ja astiassa olevaa glutaraldehydiä voitiin käyttää ainakin neljä kertaa ennen aineen reaktiivisuuden vähenemistä. Glutaraldehydijäte ei siis varsinaisesti lisääny prosessia toistettaessa.

Kohtaan 17 kirjattiin prosessi- ja reagenssiongelma (liite 6). Ongelma ilmeni jo ensimmäisen havainnoinnin tuloksena (liite 4). Sulfo-SANPAH täytyi säilyttää -70°C lämpötilassa ja Sulfo-SANPAH -liuos täytyy aina olla tuoretta sitä käytettäessä, joten kohtaa ei voitu optimoida edellistä optimointia paremmin. Kohta 21 sisälsi prosessiongelman. Kuten jo ensimmäisen havainnoinnin tuloksena ilmeni (liite 4), fibronektiinikäsittelyn todettiin olevan hidasta (liite 6). Fibronektiinin käsittelyongelmaan ei voitu kuitenkaan puuttua. Fibronektiini on kallis reagenssi ja sen laimentamista pienempään pitoisuuteen harkittiin. Tutkimuksen tuloksena fibronektiinin pitoisuutta päätettiin pienentää 1 mg/ml:stä 50 µg/ml:iin.

Havainnoinnin tuloksena huomattiin, että prosessista saatiin korjattua kaikki ensimmäisessä havainnoinnissa esille tulleet, optimoinnin mahdollistavat ongelmat. Kolme vanhaa ongelmakohtaa eli hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohtia 5, 17 ja 21 ei saatu poistettua prosessin optimoinnin avulla. Havainnoinnissa (liite 6) tuli esille yksi uusi ongelmakohta, hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohta 10. Ongelmakohtaan liittyen kirjattiin kaksi uutta optimoinnin mahdollistavaa ongelmaa, prosessi- ja reagenssiongelma. Ongelmia ei kuitenkaan varsinaisesti ollut glutaraldehydikäsittelyä tarkemmin tarkasteltaessa.

7.8. Prosessin suorittamiseen käytetty aika prosessin optimoinnin jälkeen

Kuten tutkimuksen kappaleen 8 (sivu 55) taulukossa 5 on esitetty, lasien pesemiseen sisältyvien toimintojen suorittamiseen kului 10 minuuttia. Aikaa säästettiin edelliseen tulokseen (taulukko 1) verrattuna laseille varatun telineen ja astian avulla. Silanoinnin suorittamiseen kului 70 minuuttia ja glutaraldehydikäsittelyyn 35 minuuttia.

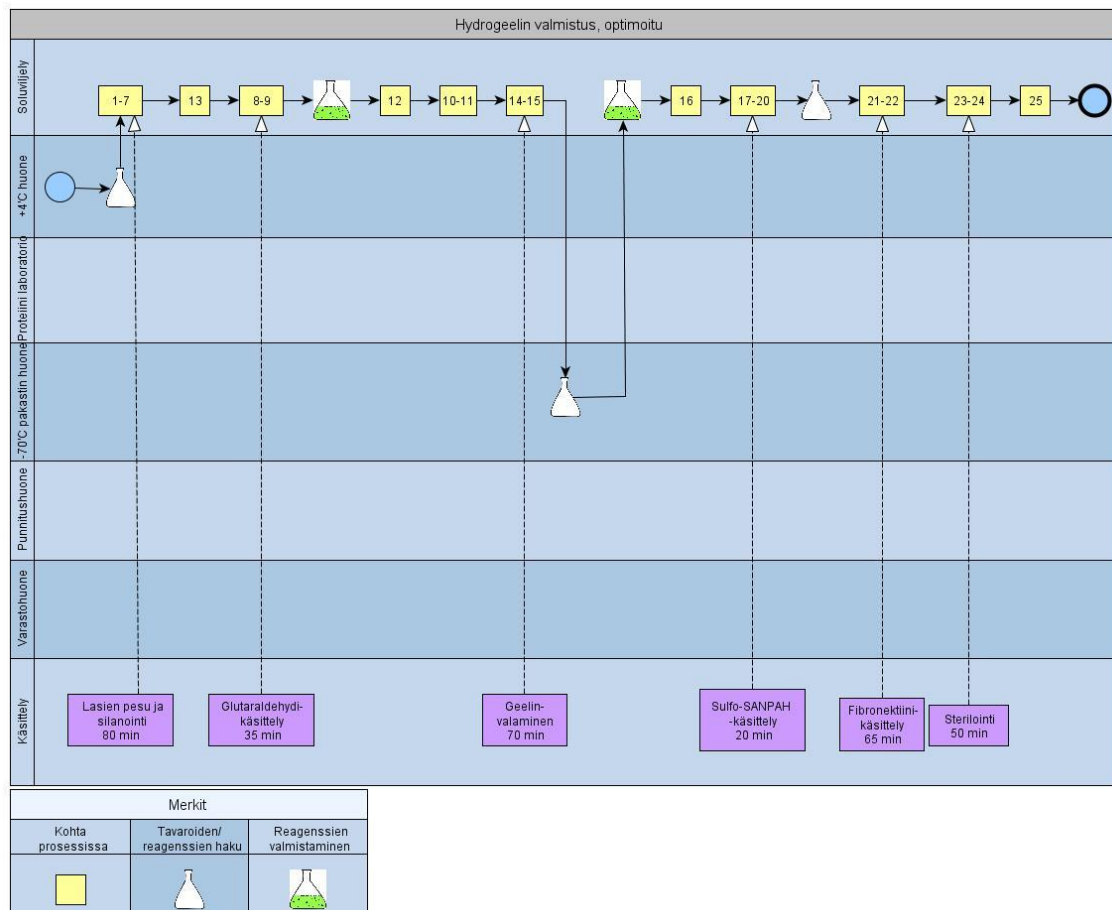
Silanoinnin kohdalla prosessia saatiin nopeutettua käyttämällä telineitä eksikaattorin sisällä. Näin lasit pysyivät pystyssä eksikaattoriin laitettaessa, eikä niitä siten tarvinnut nostella eksikaattorin pohjalta. Glutaraldehydikäsittelyyn käytetty aika väheni 20 minuuttia edelliseen ajanseurantaan (taulukko 1) verrattuna. Aikaa säästettiin valmistamalla glutaraldehydiliuos etukäteen ja suorittamalla käsittely telineen astiassa.

Geelin valamiseen käytettiin aikaa 70 minuuttia. Prosessia nopeutti polyakryyliamidiseoksen valmistamiseen tarvittavien reagenssien säilyttäminen soluviljelyhuoneessa. Toiminnot voitiin suorittaa kokonaisuudessaan soluviljelyhuoneessa ja näin saatiin aikaa säästettyä. Sulfo-SANPAH -käsittelyyn kului 20 minuuttia, eli puolet vähemmän kuin ennen prosessin optimointia. Tässä toiminnossa tehtiin suurin ajansäästö hydrogeelin valmistusprosessin optimoinnin avulla. Toiminto suoritettiin optimoinnin jälkeen kokonaisuudessaan soluviljelyhuoneessa, jonka avulla prosessia saatiin nopeutettua huomattavasti.

Fibronektiinikäsittelyyn kului 65 minuuttia ja sterilointiin 50 minuuttia. Toimintojen suorittamista saatiin nopeutettua välineiden ja reagenssien järjestämisellä työskentelytilan ja laminaari-ilmavirtauskaapin läheisyyteen. Edellä mainittuihin toimintoihin kului kokonaisuudessaan 5h 20 minuuttia. Hydrogeelin valmistusprosessin optimoinnin avulla saatiin säästettyä toimintoihin käytettyä aikaa yhteensä 1h 15 minuuttia. Muu prosessiin käytetty aika oli noin 15 minuuttia. Aika oli lähtötilanteeseen verrattuna pienempi, sillä optimoinnin tuloksena prosessi saatiin kulkemaan suoraviivaisesti soluviljelyhuoneessa ja näin ylimääräiset poistumiset soluviljelyhuoneesta saatiin poistettua. Prosessiin kuuluvia välivaiheita saatiin myös nopeutettua lasien käsittelyyn tarkoitetun telineen ja astian avulla. Kahden hydrogeelin valmistusprosessiin kului aikaa kokonaisuudessaan noin 5h 35 minuuttia. Hydrogeelin valmistusprosessin optimoinnin tuloksena hydrogeelin valmistaminen nopeutui noin 1h 25 minuuttia.

8 OPTIMOIDUN PROSESSIN KUVAAMINEN

Optimoidun hydrogeelin valmistusprosessi kuvattiin uimaratatekniikalla prosessin kulku-tasolla (kaavio 2) edellisen (kaavio 1) tapaan. Kaaviossa 2 kuvataan optimoidun hydrogeelin valmistusprosessi kokonaisuudessaan.



KAAVIO 2. Optimoitu prosessikuvaus

Hydrogeelin valmistus alkoi +4°C-huoneesta APTES-reagenssin hakemisella. Silanointi suoritettiin soluviljelyhuoneessa. Silanoinnin aikana pestiin geelin päälle tarkoitetut peitinlasit 70% EtOH:lla ja dH₂O:llä soluviljelyhuoneessa, jotta lasit ehtivät kuivua täysin ennen niiden käyttöä. Soluviljelyhuoneessa suoritettiin myös glutaraldehdykäsittely.

Glutaraldehydikäsittelyn aikana valmistettiin akryyliamidi / bis-akryyliamidi / Hepes-liuos, josta poistettiin liuenneet kaasut soluviljelyhuoneen eksikaattorissa vakuumpumpun avulla. Soluviljelyhuoneen vakuumpumppua ja eksikaattoria käyttämällä saatiin prosessi sujumaan luontevasti soluviljelyhuoneessa. Vaihtoehtoisesti liuenneiden kaasujen poistaminen voitiin suorittaa proteiinilaboratorion ThermoVac-laitteella.

Soluviljelyhuoneessa suoritettiin hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdat 10-11 ja geelin valaminen eli kohdat 14-15. Geelin polymerisoitumisen aikana haettiin Sulfo-SANPAH -liuos -70°C pakkasesta. Sulfo-SANPAH -liuos valmistettiin soluviljelyhuoneessa, jossa suoritettiin myös hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohta 16. Hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdat 17-20 suoritettiin kokonaisuudessaan soluviljelyhuoneessa.

Fibronktiini otettiin sulamaan soluviljelyhuoneen pakkasesta Sulfo-SANPAH -käsittelyn jälkeen. Soluviljelyhuoneessa suoritettua fibronktiinikäsittelyn jälkeen steriloitiin valmis hydrogeeli UV-käsittelyn avulla soluviljelyhuoneen laminaari-ilmavirtauskaapissa.

Hydrogeelin valmistusprosessiin kului kokonaisuudessaan noin 5h 35 minuuttia. Käytettyyn aikaan kuuluivat kahden hydrogeelin valmistaminen, toimintojen suorittaminen (taulukko 5) ja muu prosessiin käytetty aika. Muu prosessiin käytetty aika koostui välineiden ja reagenssien hakemisesta sekä prosessiin kuuluvien välivaiheiden tekemisestä. Muu prosessiin käytetty aika oli noin 15 minuuttia.

TAULUKKO 5. Optimoidun hydrogeelin valmistusprosessin toimintojen tarkennettu kuvaus 5 minuutin tarkkuudella

TOIMINTO	TOIMINNON KUVAUS	AIKA/ MIN
Lasi pesu	Lasin liekitys, NaOH ja dH ₂ O pesut, kuivaus	10
Silanointi	APTES ja lasi eksikaattoriin, 1h inkubointi	70
Glutaraldehydikäsittely	Glutaraldehydin lisäys lasille, 30 min inkubointi	35
Geelin valaminen	Polyakryyliamidiseoksen valmistaminen ja valaminen lasille, 30 min inkubointi	70
Sulfo-SANPAH -käsittely	Sulfo-SANPAH -liuoksen valmistus ja valaminen geelille, UV- käsittely	20
Fibronectiinkäsittely	Fibronectiinin lisäys geelille, 1h inkubointi +37°C	65
Sterilointi	Hydrogeelin siirto steriileihin olosuhteisiin, PBS pesu, UV-käsittely 30 min, steriili PBS pesu, prosessin lopetus	50
Käytetty aika yhteensä		5h 20min

9 POHDINTA

9.1. Tutkimuksen luotettavuuden tarkastelu

Tutkimuksen tarkoituksena on tuottaa luotettavaa tietoa tutkittavasta ilmiöstä (Kylmä & Juvakka 2007, 127). Kylmän ja Juvakan (2007, 127) mukaan laadullisen tutkimuksen luotettavuutta voidaan arvioida erilaisten kriteereiden avulla, kuten reflektiivisyyden, uskottavuuden, vahvistettavuuden ja siirrettävyyden mukaan. Näiden kriteereiden valossa arvioidaan myös tämän tutkimuksen luotettavuutta.

Tässä tutkimuksessa tutkimuksen lähtökohdat olivat selkeät ja ne kuvattiin tutkimuksessa. Tutkijan omat lähtökohdat tutkimukseen olivat teoria- ja käytännön tasolla hieman heikot, sillä aihe ja tutkittava prosessi oli tutkijalle vieras. Tutkimuksen aikana jouduttiin paneutumaan paljon teorian ja käytännön työn ymmärtämiseen. Tämä kuitenkin palveli yksilöllistä reflektioprosessia, jonka myötä kokonaisvaltainen oppiminen tutkimuksen aikana oli vahvaa. Suhteellisen laajan kirjallisuuskatsauksen ja käytännön työn avulla saatiin riittävä tarttumapinta tutkittavaan aiheeseen ja siten myös tarkasteltavaan aineistoon ja tutkimusta koskevia valideja tulkintoja pystyttiin tekemään. Tutkimuksen aihe oli kokonaisuudessaan selkeä ja toteutettava ja siten sen hallinta ja aiheen käsittely pysyivät hyvin kasassa. Tutkimuksen siirrettävyyttä lisäsi tutkimusprosessin tarkka ja yksityiskohtainen kuvaaminen sekä tutkimuksen selkeä aihekokonaisuus.

Tutkimuksen tarve esitettiin selkeästi ja tutkimustehtävät pyrittiin asettamaan riittävän väljästi mahdollisten tarkennusten ja muutosten varalta. Tutkimustehtävät tarkentuivatkin tutkimuksen edetessä ja niiden täsmentyminen kuvattiin tutkimuksessa. Kylmän ja Juvakan (2007, 128-129) mukaan vahvistettavuudessa on kyse tutkimuksen prosessin kulun seuraamisesta. Tämä ajatus pyrittiin pitämään koko tutkimuksen ajan mielessä ja tutkimus pyrittiin kuvaamaan kokonaisuudessaan realistisesti.

Tutkimuksen vahvistettavuutta lisäsi aineiston keruuprosessin kuvaaminen ymmärrettävästi. Tutkimuksessa käytettiin useampia aineistonkeruumenetelmiä, jotka myös kuvattiin. Aineistonkeruu suoritettiin pääasiallisesti havainnoinnin avulla, jossa tutkijan rooli oli pääasiallisesti tarkkaileva. Tarkkailevan roolin avulla aineisto kerättiin objektiivisesti ja sen sisältöön vaikuttamatta. Tämä lisäsi aineiston luotettavuutta kokonaisuudessaan.

Hirsjärven ym. (2009, 213) mukaan havainnoinnin varjopuolena voi olla tutkittavan toiminnan muuttaminen ja siten havainnointitilanteen häiritseminen. Tässä tutkimuksessa havainnoinnin negatiivisten piirteiden vaikutuksia pyrittiin vähentämään keskustelemalla tutkittavan kanssa ennen havainnoinnin aloittamista havainnointimenetelmästä, havainnoinnin ajankohdasta, sen toteutuksesta ja tutkijan roolista havainnoinnin aikana. Havainnointitilanteesta keskusteleminen lisäsi tutkijan ja tutkittavan välistä luottamusta ja siten myös aineiston uskottavuutta. Tutkimuksen luotettavuutta pyrittiin lisäämään myös erillisten havainnointikertojen järjestämisellä ja havainnoinnissa keskityttiin vain tutkimuskysymysten kannalta olennaisiin asioihin.

Mikroskopoinnin avulla saatuun aineistoon tutkija ei itse voinut vaikuttaa, sillä tutkittava henkilö suoritti visuaalisen havainnoinnin. Mikroskopoinnin avulla saatujen tulosten uskottavuutta ja vahvistettavuutta olisi lisännyt useamman visuaalisen havainnoijan käyttäminen mikroskointiin liittyvässä aineiston keruussa ja sen analysoinnissa. Tutkimukseen osallistuva tutkija oli kuitenkin erittäin pätevä ja tietoinen tutkittavasta aiheesta ja prosessista, joten hänen avulla saatua aineistoa voitiin pitää riittävänä ja luotettavana. Yleisesti ottaen tutkimuksen aineiston luotettavuutta olisi lisännyt suurempi osallistujajoukko, jolloin aineistoon olisi vaikuttanut useamman henkilön toiminta. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista, sillä useampia tutkittavia ei tutkimukseen ollut mahdollista saada.

Tutkimuksen uskottavuutta ja vahvistettavuutta lisäsi tutkimuspäiväkirjan pitäminen laboratoriotyöskentelystä. Tutkimuspäiväkirja toimi tärkeänä muistiona tehdyistä laboratoriokokeista ja havainnoista. Muistiinpanojen avulla aineistoa täydennettiin, tutkimuksen kulkua seurattiin ja se auttoi tiedostamaan tutkijan omaa toimintaa.

Aineiston analyysimenetelmä valittiin tutkimuksen luonteeseen sopien ja aineiston analyysi toteutettiin asianmukaisesti. Aineiston tarkastelua ohjasi tutkijan perehtyneisyys tutkimusaiheeseen liittyvään kirjallisuuteen ja havainnot laboratoriotyöskentelystä tutkimuksen aikana. Kokonaisuudessaan aineiston analyysi oli onnistunutta ja se kuvaa sitä, mitä tutkimuksessa on tarkoituskin kuvata. Aineiston analyysin onnistuneisuutta ja tulosten luotettavuutta pyrittiin lisäämään täytetyn havainnointilomakkeen näyttämällä tutkittavalle ja siitä keskustelemalla tutkittavan kanssa. Tutkimuksen uskottavuutta ja vahvistettavuutta lisäsi tutkimustuloksista keskusteleminen tutkittavan kanssa. Tutkimustulokset vastasivat myös tutkittavan omia näkemyksiä tutkimuskohteesta ja siten tuloksia voidaan pitää uskottavina. Vahvistettavuutta lisäsi tulosten ja johtopäätösten tekeminen monitahoisesti ja mahdollisimman objektiivisesti.

Kylmän ja Juvakan (2007, 128-129) mukaan siirrettävyyttä arvioitaessa kiinnitetään huomiota tutkimuksen tulosten siirrettävyyteen muihin vastaavanlaisiin tilanteisiin. Tutkimuksen tulokset hydrogeelin valmistusprosessiin liittyvien ongelmien kohdalta eivät ole täysin siirrettävissä toiseen tutkimustilanteeseen, sillä laboratorio-olot ja työskentelytilat vaihtelevat yritysten ja erilaisten yksiköiden välillä. Jokainen laboratorio asettaa erilaiset tarpeet, haasteet ja ongelmakohdat prosessille. Kirjallisuuden perusteella hydrogeelien valmistusohjeita on satavilla useita ja siksi tuloksetkin voivat vaihdella eri valmistusohjeita käytettäessä.

Biolääketieteellisen teknologian yksikössä vain proteiinidynamiikan tutkimusryhmä on perehtynyt hydrogeelien valmistamiseen ja yksikössä on vain yksi työpiste prosessin läpiviemiseen. Yksikössä melkein kaikki laboratoriotilat ovat yhteisessä käytössä ja siksi yksikön muut tutkimusryhmät voivat vapaasti hyödyntää hydrogeelin valmistukseen käytettävää työpistettä, hydrogeelin valmistusohjetta ja tutkimuksen tuloksia. Hydrogeelin valmistusohjeen kemiallisiin reaktioihin liittyvät tulokset ovat siirrettävissä muihin tutkimustilanteisiin, sillä aikaisemmat teoriat aiheesta tukevat niitä.

Tutkimuksen kirjallisuuskatsauksessa käytetty lähdemateriaali hydrogeeleihin liittyen oli erittäin haastavaa. Tämän tutkimuksen yleistä luotettavuutta lisäsi useamman aiheeseen perehtyneen ammattihenkilön käyttäminen tutkimuksen sisällön ohjauksessa ja sen tarkistamisessa. Tutkimuksessa käytettävien lähteiden luotettavuutta pyrittiin tarkastelemaan kriittisesti ja alkuperäisiä artikkeleita käytettiin mahdollisimman paljon.

9.2. Tutkimuksen eettiset kysymykset

Tutkimus oli eettisesti hyväksyttävä ja tutkimuksessa noudatettiin hyvän tieteellisen käytännön tapoja. Tutkimukseen anottiin lupa huhtikuussa 2012 ja osallistujalta pyydettiin myös vapaaehtoinen suostumus tutkimuksen suorittamiseen. Tutkimuksessa noudatettiin yleisesti rehellisyyttä ja yleistä tarkkuutta sen jokaisessa vaiheessa. Avoimuutta toteutettiin tulosten tallentamisessa ja niiden arvioimisessa. Tutkimus suunniteltiin, toteutettiin ja raportoitiin asianmukaisella tavalla. Muiden tutkijoiden tekemää työtä kunnioitettiin viittaamalla aikaisempiin julkaisuihin yleisten käytäntöjen mukaan.

Tutkimus oli kaikin puolin oikeutettu, eikä siitä ei aiheutunut kenellekään kärsimystä. Tutkimuksella pyrittiin hyvään eli kehittämään proteiinidynamiikan ja muiden tutkimusryhmien toimintaa. Kohteena ollut tutkimusryhmä ei säilynyt tuntemattomana, joka ei täysin vastannut hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimusryhmän arvoa kuitenkin kunnioitettiin ja epäkunnioittavaa kirjoittamistapaa vältettiin koko tutkimusprosessin ajan.

Kylmän ja Juvakan (2007, 152) mukaan pienyhteisöjä tutkittaessa, tutkimuksen tekijältä vaaditaan erityistä hienotunteisuutta ja tarkkuutta. Toimijalle on turvattava nimettömyys ja tutkimuksen myötä esille tulevissa asioissa on noudatettava luottamuksellisuuden ja kunnioituksen periaatteita. Proteiinidynamiikan tutkimusryhmä oli tietoinen tutkittavan osallistumisesta tutkimukseen. Tutkittava toimi kuitenkin anonyyminä, jonka avulla hänen koskemattomuutta ja yksityisyyttä pyrittiin turvaamaan. Tutkittava oli tietoinen mahdollisuudestaan vetäytyä tutkimuksesta ja hänen kanssa keskusteltiin jatkuvasti tutkimuksen kulusta sekä seuraavien vaiheiden suorittamisesta. Raportoinnissa pyrittiin huomioimaan vain raportoinnin kannalta olennainen asia.

Tutkimus tapahtui tutkimuseettisesti ja laillisesti asianmukaisesti. Tutkimuksen luonteesta johtuen siinä ei tunkeuduttu tutkittavan henkilön yksityisyysalueelle, eikä arkaluontoisia asioita käsitelty. Tutkittavan ammatilliseen osaamiseen liittyviä asioita tuotiin kuitenkin ilmi. Tutkimuspäiväkirjaan ei kirjattu tutkittavan henkilön tunnistamiseen liittyviä tietoja. Tutkija säilytti tutkimuspäiväkirjaa itsellään ja siten se ei missään vaiheessa päässyt muiden ihmisten nähtäväksi, vaikka se ei sisältänytarkään arkaluontoisia ja salassa pidettäviä tietoja.

9.3. Tulosten tarkastelu suhteessa teoreettisiin lähtökohtiin

Usein prosessien kehittämiseksi nähdään tarvetta ongelmien ilmentyessä. Prosesseja pyritään kehittämään esimerkiksi toiminnan tehostamiseksi, laadun parantamiseksi ja kustannussäästöjen aikaansaamiseksi (Juhta 2012, 3), kuten tässäkin tutkimuksessa prosessin optimoinnilla pyrittiin. Hydrogeelin valmistusprosessi oli tutkimusryhmän käytössä, mutta prosessia toistettaessa prosessin ongelmakohdat alkoivat ilmetä ja prosessin kehittämiseksi nähtiin suurta tarvetta.

Tutkimuksen tulosten perusteella ennen hydrogeelin valmistusprosessin optimointia prosessin aikana tehtiin ylimääräistä työtä, joka vaikutti prosessin kulkuun epäedullisesti. Kappaleen 5 kaaviosta 1 (sivu 31) voidaan huomata, että soluviljelyhuoneesta poistuttiin useita kertoja hakemaan erilaisia tarvikkeita ja liuoksia jouduttiin valmistamaan työvaiheiden aikana. Suurin osa prosessin ongelmista johtui juuri välineongelmista (9/20) ja reagenssiongelmissa (4/20). Tulosten perusteella ongelmia ilmeni myös työskentelytilaan liittyen. Työskentelytila ei ollut täysin toimiva ja mahdollistanut järjestelmällistä työskentelyä. Prosessi piti sisällään myös erilaisia teknisen työn haasteita, kuten peitinlasien käsittelyn pinsettien avulla ja vain toisen peitinlasin puolen käsittelyongelman. Prosessiin liittyvät ongelmat havaittiin ensimmäisen havainnoinnin (liite 4) aikana ja niihin pyrittiin tutkimuksessa vaikuttamaan.

Prosessin optimoinnin jälkeen tehtyjen havainnointitulosten perusteella työtilan järjestelyllä toiminnalliseksi ja työtä palvelevaksi on merkittävä rooli työn suorittamisen kannalta. Työtilan siisteys ja välineiden välitön saatavuus tekevät rutiinityöstä miellyttävämpää, sujuvampaa ja työn laatu paranee. Tutkimuksen tulokset antavat tietoa siitä, miten työmenetelmiä voidaan kehittää ja tehostaa yksinkertaisillakin asioilla. Hydrogeelin valmistusprosessin teknistä toimivuutta lisättiin esimerkiksi vetokaapin siivoamisella, hyllyjen asentamisella, reagenssien ja välineiden järjestämisellä työskentelytilaan sekä peitinlasien astioiden ja telineiden hankkimisella. Käytettäviä liuoksia valmistettiin myös isompiin tilavuuksiin, joka vähensi pipetointivirhettä ja näin paransi hydrogeelien laatua. Toimenpiteet olivat sinänsä pieniä, mutta niillä oli merkittävä rooli prosessin kehittämisessä.

Hydrogeelin valmistusprosessin kehittäminen sujui tavoitteiden mukaisesti, sillä vertaamalla kaaviota 1 (sivu 31) ja kaaviota 2 (sivu 53) keskenään voidaan huomata, että optimoinnin seurauksena prosessista tuli huomattavasti virtaviivaisempi, sujuvampi ja siten kokonaisuudessaan tehokkaampi. Vertaamalla myös toimintojen tarkennettuja kuvauksia (taulukko 1; taulukko 5), prosessin läpimenoaika lyheni 1h 25 minuuttia ja siten prosessi muuttui kustannuksia säästävämmäksi. Prosessi saatiin optimoitua käytännössä toimivammaksi ja inhimillisiä voimavaroja säästävämmäksi, sillä ylimääräiset ja energiaa vievät poistumiset soluviljelyhuoneesta saatiin poistettua. Hydrogeelin valmistusprosessin teknistä toimivuutta myös lisättiin, joka vaikutti laadukkaamman ja tasaisemman työn suorittamiseen ja prosessin käytettävyyden parantamiseen.

Tutkimuksessa selvitettiin myös tilavuudeltaan isompien hydrogeelien mahdollista valmistamista. Tutkimuskysymys asetettiin, jotta tutkimusryhmä voisi mahdollisesti käyttää myös isompia hydrogeelejä haluamiinsa käyttötarkoituksiin. Hydrogeeleistä voidaan rakentaa erikokoisia ja erimuotoisia kasvualustoja, mutta niiden valmistuksessa tulee kiinnittää huomiota geelin haluttuun paksuuteen ja jäykkyyteen. Geelin paksuutta ja jäykkyyttä voidaan säädellä muuttamalla peitinlasille valettavaa polyakryyliamidiseoksen tilavuutta ja seoksen akryyliamidin ja bisakryyliamidin välistä suhdetta (Pelham & Wang 1997, 13662). Polyakryyliamidin koostumus ja sen lopputilavuus vaikuttavat siten hydrogeelin ominaisuuksiin ja lopputuotteen syntyyn.

Isompien hydrogeelien valmistuksessa geelin jäykkyys ja paksuus pidettiin pienempiin hydrogeeleihin verrattuna samana ja näin kasvualustat olivat toisiinsa verrattavissa. Tutkimuksen tulokset osoittivat isojen hydrogeelien tarjoavan solujen kasvua ja haluttua toimintaa tukevan mikroympäristön pienempien hydrogeelien tapaan. Tulokset vahvistivat aikaisemmassa kappaleessa 4.3 (sivu 16) esitettyä teoriaa hydrogeelien monipuolisuudesta ja käytöstä soluviljelyalustana. Esitetyn teorian mukaisesti tutkimuksessa valmistetut hydrogeelit pitivät yllä solujen tarttumista, jakaantumista ja biologisia toimintoja ja näin niiden käyttöön soluviljelyalustoina voidaan luottaa.

Tutkimuksessa tutkittiin myös lasien ja geelien säilyvyyttä. Lasien ja geelien säilyvyyden selvittäminen oli tärkeä tehtävä tutkimuksessa. Säilyvyyden selvittämisen avulla hydrogeelin valmistusprosessi voitiin keskeyttää tiettyihin kohtiin prosessissa (liite 1) ja siten se antoi prosessiin joustavuutta.

Hydrogeelin valmistusohje (liite 1) sisälsi nämä kohdat, joihin geelin valmistaminen voitiin keskeyttää turvallisesti heikentämättä hydrogeelin laatua. Tieto oli kuitenkin teoriapohjaista, eikä tutkimusryhmän itse tutkimaan ja siksi lasien ja geelien säilyvyyden tutkimisella haluttiin varmistaa teorian tieto luotettavaksi. Tutkimuksen tulokset osoittivat hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) olevan luotettava näiden tietojen kohdalta.

Merkittävänä tuloksena huomattiin, että silanoitujen lasien säilyttäminen eksikaattorissa paransi valmiiden hydrogeelien laatua. Tähän vaikutti todennäköisesti eksikaattorissa säilytettyjen lasien täydellinen kuivuminen ennen niiden glutaraldehydikäsittelyä. Tulos tehosti prosessia, sillä nyt silanoituja peitinlaseja voidaan valmistaa etukäteen eksikaattoriin ja prosessi voidaan aloittaa suoraan peitinlasien glutaraldehydikäsittelyllä. Lasien silanoiminen etukäteen lyhentää prosessin yhtäjaksoista läpimenoaikaa ja siten vähentää ajallisesti työntekijän kiinnittymistä prosessiin.

Tutkimuksessa perehdyttiin myös prosessin kemiallisiin reaktioihin. Kemiallisten reaktioiden toimivuustutkimuksen avulla pyrittiin vastaamaan siihen, toimivatko geelin valmistusprosessin kemialliset reaktiot halutulla tavalla. Hydrogeelin valmistukseen liittyvät kemialliset reaktiot on jo esitetty aikaisemmin kappaleessa 4.4.1 kuvassa 2 (sivu 21). Aikaisempaan esittämäni teorian tietoon pohjautuen (kappale 4.4, sivut 20-24), prosessin kemiallisten reaktioiden on toimittava niitä edellyttävällä tavalla, jotta lopputuloksena syntyy soluviljelyn tarpeita vastaavia hydrogeelejä.

Silanoinnin ja glutaraldehydin toimivuustutkimuksessa selvitettiin edellä mainittujen yhdisteiden kemiallisten reaktioiden toimivuutta. Buxboim ym. (2010, 194117-194118) mukaan glutaraldehydin tarkoituksena on edesauttaa polyakryyliamidin kovalenttista sitoutumista aminosilanoitulle ja glutaraldehydikäsittelylle lasille. Teoriaan perustuen polyakryyliamidiseoksen primääristen amidiryhmien tuli sitoutua kovalenttisesti glutaraldehydin aldehydiryhmään (kuva 2) ja polymeroituneen polyakryyliamidiseoksen tuli jäädä APTES- ja glutaraldehydikäsiteltyyn lasiin hydrogeelin valmistusohjeen (liite 1) kohdassa 16. Tutkimuksessa polymeroitunut polyakryyliamidiseos ei saanut jäädä kiinni vain glutaraldehydikäsiteltyihin lasihin. Tutkimuksen tulokset vahvistivat teoriassa esitettyjen kemiallisten reaktioiden toimivan ja tutkimusryhmän käyttämien reagenssien olevan laadukkaita ja luotettavia.

Solun kasvualustoja voidaan muokata biofunktionaaliseksi esimerkiksi fibronektiinillä päällystämällä (Ibidi 2012), kuten tässä tutkimuksessa. Sulfo-SANPAH:n ja fibronektiinin toimivuustutkimuksessa selvitettiin, reagoiko Sulfo-SANPAH:n amiinireaktiivinen ryhmä polyakryyliamidigeelin primääristen amidiryhmien kanssa ja reagoiko Sulfo-SANPAH:n valoaktivoitava nitrofenyyliatsidiryhmä fibronektiinin aminoryhmien kanssa (kuva 2). Solujen liike irrottaa fibronektiiniä kasvualustasta, jos kemialliset reaktiot eivät toimi halutulla tavalla, eikä kovalenttista sitoutumista tapahdu. Reaktioiden toimiessa fibronektiini pysyy kiinni kasvualustassa solujen siinä liikkuesssa. Tutkimuksen tulokset vahvistivat näiden kemiallisten reaktioiden merkitystä sekä solujen integriinien ja kasvualustan fibronektiinimolekyylien yhteistyötä solujen alustaan kiinnittymisessä. Tulokset osoittivat kemiallisten reaktioiden toimivan esitetyn teorian mukaisesti.

9.4. Johtopäätökset ja jatkotutkimusaiheet

Tutkimuksessa perehdyttiin hydrogeelin valmistusprosessin tapahtumakulkuun yksityiskohtaisesti ja perusteellisesti. Tutkimuksen avulla saatiin lisätietoa tutkittavasta prosessista ja sen kehittämistarpeista. Tutkimus sisälsi paljon käytännön työtä, jonka avulla näihin kehittämistarpeisiin pyrittiin vastaamaan. Tutkimuksessa prosessin teknistä puolta kehitettiin, isompia hydrogeelejä onnitettiin valmistamaan, lasien ja geelien säilyvyysohjeet osoittautuivat luotettaviksi ja prosessin kemialliset reaktiot toimivat halutulla tavalla. Yhteenvetona voidaan sanoa, että asetettuihin tutkimuskysymyksiin vastattiin ja tutkimuksen tavoitteet saavutettiin hyvin.

Prosessien ja osaamisen kehittäminen on laadun kehittämistä. Tutkimuksen tulosten perusteella tutkimusryhmä sai arvokasta tietoa prosessista ja prosessin kehittämisen myötä myös laatua kehitettiin. Tutkimusryhmä sai käyttöönsä nopeamman ja laadukkaamman prosessin sekä asiantuntevan työntekijän tutkijasta, joka työllistyi tutkimusryhmään tutkimuksen aiheeseen liittyen.

Tutkimuksen tulokset monipuolistivat prosessin käyttötarkoituksia ja antoivat tutkimusryhmälle lisää intoa erilaisten kasvualustojen kehittämiseksi. Prosessin optimoinnin myötä prosessi saatiin tutkimusryhmän rutiinikäyttöön erilaisiin tutkimuksiin, kuten erilaisten hiiren fibroblastisolujen käyttäytymisen tutkimiseen erijäykkyyksillä PAA-kasvualustoilla, erilaisten integriinimutanttien toiminnan tutkimiseen ja hydrogeelien valmistukseen liittyvien kovalenttisten ristisilloitusten kehittämiseen. Tutkimusryhmä voi käyttää menetelmää laaja-alaisesti myös muidenkin solunsisäisten mekanotransduktiotapahtumien tutkimisessa. Prosessin optimoinnin myötä nyt myös muiden tutkimusryhmien on mahdollista valmistaa PAA-hydrogeelejä, sillä Biolääketieteellisen teknologian yksiköllä on yksi selkeä työpiste ja ohjeet niiden valmistamiseen.

Tutkimuksen antamaa tietoa voidaan hyödyntää kehitettäessä hydrogeelien valmistusta ja hydrogeelien sovelluksiin liittyviä menetelmiä. Tutkimuksen tulosten avulla tutkimusryhmä pääsee tutkimaan solujen toimintaa ja siten tutkimus voi antaa suurtakin ymmärrystä solujen toiminnasta ja niihin vaikuttavista tekijöistä. Tutkimuksen tuloksilla voidaan katsoa olevan merkitystä tulevaisuudessa terveydenhuollossa terveyden edistämiseksi, esimerkiksi kudosteknologiassa ja kantasolututkimuksessa.

Hydrogeelit ovat tärkeitä biomateriaaleja ja niiden kehittäminen erilaisiin sovelluksiin on tärkeää. Hydrogeelin valmistusprosessiin liittyen kehittämisen kohteeksi nähtiin Sulfo-SANPAH:n korvaaminen N-Hydroksisukkinimidi (NHS)-esterillä Sulfo-SANPAH:n huonon toistettavuuden ja prosessin suoraviivaistamisen takia. Kehittämisen kohteeksi nähtiin myös polymetyylisiloksaani (PDMS)- ja erimuotoisten geelien valmistaminen. Silikonipohjaisten PDMS-geelien hyvien ominaisuuksien takia PDMS-geelit voisivat olla potentiaalisia materiaaleja myös soluviljelyyn ja erimuotoisten geelien valmistaminen toisi lisää mahdollisuuksia solujen käyttäytymisen tutkimiseen. Fibronektiinin korvaamista esimerkiksi integriinitutkimuksen kannalta olennaisella vitronektiinillä tai kollageenillä voisi myös pitää mielenkiintoisena jatkotutkimusaiheena. Solujen biologisten toimintojen tutkiminen erijäykkyyksillä geeleillä edellyttää geelien jäykkyyksien tarkkaa tuntemista ja siksi myös atomivoimamikroskopian käyttämistä geelien jäykkyyksien selvittämiseen olisi syytä harkita.

9.5. Lopuksi

Tutkimuksesta oli minulle paljon tieteellistä ja käytännön työn hyötyä. Tutkimus auttoi ymmärtämään hydrogeelien käytön mahdollisuuksia ja sen valmistamiseen liittyviä haasteita ja ongelmakohtia. Tutkimukseen liittyvän kemiallisen tarkastelun ansiosta tutkimus lisäsi omaa ymmärrystäni kemiasta ja muistutti fysiikan lakien olemassaolosta. Tutkimus opetti minulle kokonaisuudessaan ajanhallintaa, tutkimustehtävien priorisointia, opinnäytetyöprosessin läpivientä ja pitkäjänteisyyttä raportin kirjoittamisessa. Tutkimus kehitti omaa ammattitaitoani varsinkin prosessien kehittämiseen liittyvässä työskentelyssä.

Tutkimus toteutettiin Biolääketieteellisen teknologian yksikössä proteiinidynamiikan tutkimusryhmässä, jonka myötä haluan osoittaa suuren kiitoksen tutkimusryhmän johtajalle Vesa Hytöselle. Tutkimusryhmässä työskentely palautti mieleeni tutkimusryhmän loistavan ryhmähengen ja auttavan ilmapiirin, jonka avulla sain puristettua tutkimuksen loppuun asti.

Tutkimuksen ohjaajan, Jenita Pärssisen avulla pääsin tutustumaan hydrogeelien ja MEF-solujen hurjaan ja hulvattomaan maailmaan ja siitä hänelle kuuluu kaunis ja lämmin kiitos. Hän kantoi suurta vastuuta tutkimuksen suunnittelusta ja toteutuksesta sekä panosti kaikin puolin kiitettävästi ohjaukseen. Rempseällä asenteellaan hän kantoi myös minua eteenpäin ja antoi voimia tutkimuksen loppumetreille asti. Haluaisin kiittää myös Henrik Hammarénia ja Rolle Rahikaista tärkeistä kommentteista ja heidän omasta panostuksestaan tutkimukseen. Kiitos kuuluu myös Tampereen ammattikorkeakoulun ohjaajalleni ja opponentilleni, jotka tekivät paljon korvaamatonta ohjaustyötä raporttini eteen.

Tutkimuksen toteutus vaati oman veronsa perheeltäni, Rakkaalta aviomieheltäni Mikolta ja Huippuihanalta esikoiseltamme Iitulta. Äiti saattoi olla aika ajoin aika väsynyt ja hieman kireä, mutta jokainen Iitun hymy ja Mikon uskomaton tuen osoitus auttoi hankalimpinakin aikoina jaksamaan. Ilman rakkaan mieheni hurjaa panostusta perheeseemme, ei tutkintoni suorittaminen olisi ollut mahdollista. Hänelle siitä ikuinen kiitos.

LÄHTEET

Bacakova, L., Filova, E., Parizek., Ruml, T. & Svorcik, V. 2011. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* 29 (6), 739-767.

BioMediTech. 2011. About us. Luettu 12.3.2012.
http://www.biomeditech.fi/about_us/

BioMediTech. 2011. Careers. Luettu 12.3.2012.
<http://www.biomeditech.fi/career/>

Buxboim, A., Rajagopal, K., Brown, A.E.X. & Discher, D.E. 2010. How deeply cells feel: methods for thin gels. *Journal of Physics: Condensed Matter* 22, 194116-194126. Luettu 21.2.2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864502/?tool=pubmed>

Discher, D-E., Janmey, P., Wang, Y-L. 2005. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science Magazine* 310, 1139-1143.

Engler, A., Bacakova, L., Newman, C., Hategan, A., Griffin, M. & Discher, D. 2004. Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses. *Biophysical Journal* 86(1), 617-628.

Engler, A., Griffin, M-A., Sen, S., Bönnemann, C-G., Sweeney, H-L. & Discher, D- E. 2004. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue- like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *The journal of cell biology* 166 (6), 877-887.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. & Discher, D.E. 2006. Matrix elasticity directsstemcell lineagespecification. *The Journal of cell biology* 126 (6), 677-689.

Eskola, J. & Suoranta, J. 2008. Johdatus laadulliseen tutkimukseen. 8. painos. Jyväskylä: Gummerrus Kirjapaino Oy.

Fournier, M-F., Sauser, R., Ambrosi, D., Meister, J-J. Verkhovsky, A-B. 2010. Force transmission in migrating cells. *The journal of cell biology* 188 (2), 287-297.

Freshney, R.I. 2005. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 5. painos. New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc.

Fu, R-H., Wang, Y-C., Liu, S-P., Huang, S-M., Kang, Y-H., Tsai, C-H., Shyu, W-C., Lin, S-Z. 2011. Differentiation of Stem Cells: Strategies for Modifying Surface Biomaterials. *Cell Transplantation* 20, 37-47.

Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S-J & Demirci, U. 2010. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine* 5(3), 469-484. Luettu 21.2.2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892416/?tool=pubmed>

- Hammarén, H. 2012. Setting up methods for the study of intracellular mechanotransduction. Tampereen yliopisto. Biolääketieteellisen teknologian yksikkö. Pro gradu -tutkielma.
- Hiltunen, A. & Rekunen, M. 1998. Laatu laboriorioalalle. Jyväskylän ammattikorkeakoulu. Laatu koulutuskokeilu. Luettu 3.5. 2012.
<http://www.sci.fi/~vrekunen/Marja/LaatuLaboriorioalalle.htm>
- Hirsjärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15 uudistettu painos. Hämeenlinna: Kariston Kirjapaino Oy.
- Ibidi. 2012. Cell Culture Surfaces. Luettu 16.12.2012.
<http://ibidi.com/applications/technical-aspects-of-microscopy/cell-culture-surfaces/>
- Juhta- Julkisen hallinnon tietohallinnon neuvottelukunta. 2012. JHS 152 Prosessien kuvaaminen. Luettu 31.1. 2013.
<http://docs.jhs-suositukset.fi/jhs-suositukset/JHS152/JHS152.pdf>
- Kojair. 2009. Ylivertaista puhdasilmateknologiaa. Luettu 05.02.2013.
http://www.kojair.com/fi/kojair_tech_oy
- Kylmä, J. & Juvakka, T. 2007. Laadullinen terveystutkimus. 1. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Laamanen, K. 2012. Johda liiketoimintaa prosessien verkkona. Ideasta käytäntöön. 9. painos. Espoo: Laatu keskus Excellence Finland.
- Lo, C-M., Wang, H-P., Dembo, M. & Wang, Y-L. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophysical journal 79,144-152.
- Marg, S., Winkler, U., Seustu, M., Himmel, M., Schönherr, M., Bär, J., Mann, A., Moser, M., Mierke, C.T. & Rottner, K. 2010. The Vinculin-ΔIn20/21 Mouse. Characteristics of a constitute, actin-binding Deficient splice variant of vinculin. PloS one 5 (7), e11530.
- Martinsuo, M. & Blomqvist, M. 2010. Prosessien mallintaminen osana toiminnan kehittämistä. Tampereen teknillinen yliopisto. Teknis- taloudellinen tiedekunta. Opetusmoniste 2. Luettu 13.1.2013.
http://dspace.cc.tut.fi/dpub/bitstream/handle/123456789/6825/prosessien_mallintaminen.pdf?sequence=1
- Miettinen, M. 2011. Influence of pluripotent stem cell culture conditions on cardiac differentiation. Tampereen yliopisto. Biolääketieteellisen teknologian yksikkö. Pro gradu -tutkielma.
- Pelham, R.J. & Wang, Y. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 (25), 13661-13665. Luettu 21.2.2012.
<http://www.pnas.org/content/94/25/13661.full.pdf>

Philippeos, C., Hughes, R-D., Dhawan, A. & Mitry, R-R. 2012. Introduction to cell culture. Teoksessa Mitry, R-R., Hughes, R-D. (toim.) Human cell culture protocols. Methods in molecular biology. 3. painos. Springer New York Dordrecht Heidelberg London 806, 1-13.

Protocol online. 2012. Mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder cell preparation. Luettu 7.5. 2012.

http://www.protocol-online.org/prot/Cell_Biology/Stem_Cells/Embryonic_Stem_ES_Cell_Culture/Mouse_Embryonic_Fibroblast_MEF_Feeder_Cell_Preparation/index.html

Qiagen. 2012. Animal cell culture. Luettu 05.02.2013.

<http://www.qiagen.com/Knowledge-and-Support/Spotlight/Protocols-and-Applications-Guide/Animal-cell-culture/>

Routio, P. 2007. Tuote ja tieto. Toteava tutkimus: Havainnointi. Luettu 2.12.2012.

<http://www2.uiah.fi/projects/metodi/062.htm>

SFS-EN ISO 9004:2009. Organisaation johtaminen jatkuvaan menestykseen. Laadunhallintaan perustuva toimintamalli. 2009. 3.painos. Suomen standardisoimisliitto SFS. Helsinki: SFS. Luettu 1.6.2012.

<http://www.sfs.fi>

Sigma-Aldrich. 2013. Glutaraldehyde solution. Luettu 1.3.2013.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/g5882?lang=fi®ion=FI>

Slaughter, B., Khurshid, S., Fisher, O., Khadmhosseini, A. & Peppas, N. 2009. Hydrogels in regenerative medicine. Wiley interscience discover something great. Advanced materials 21, 3307-3329.

Society for biomaterials. 2007. Biomaterial of the month. Luettu 23.2.2012.

<http://www.biomaterials.org/week/bio17.cfm>

Tabata, Y. 2009. Biomaterial technology for tissue engineering applications. Journal of the royal society interface 6, 311-324.

Tampereen yliopisto. 2011. Luettu 20.2.2012.

<http://www.uta.fi/ibt/esittely.html>.

<http://www.uta.fi/ibt/>.

Tampereen yliopisto. 2011. About research group. Luettu 12.3.2012.

<http://www.uta.fi/ibt/institute/research/hytonen/index.html>

Tampereen yliopisto. 2011. Introduction. Luettu 12.3.2012.

<http://www.uta.fi/ibt/introduction.html>

Thermo Scientific. 2011. Product instructions. NHS/Nitrophenyl Azide Crosslinkers. Luettu 1.9.2012. <http://www.piercenet.com/instructions/2160635.pdf>

The Wang research group. 2011. Wang group protocol: Preparation of polyacrylamide substrates. Luettu 12.3.2012.
<http://www.ece.cmu.edu/~yuliwang/Methods/Materials/Artificial%20Materials/PAASubstrates.pdf>

Tibbit, M. & Anseth, K. 2009. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and engineering* 103, 655-663. Luettu 21.02.2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2997742/?tool=pubmed>

Todaro, G-J. & Green, H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The journal of cell biology* 17, 299-313.

Vilkka, H. 2006. Tutki ja havainnoi. Vaajakoski: Gummerrus Kirjapaino Oy.

Vilkka, H. 2005. Tutki ja kehitä. Keuruu: Otavan Kirjapaino Oy.

Xu, W., Baribault, H. & Adamson, E-D. 1998. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development* 125, 327-337.

Yan,C., Pochan, D.J. 2010. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chemical Society Reviews* 39(9), 3528-3540. Luettu 21.02.2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104857/?tool=pubmed>

Yeung T., Georges, P-C., Flanagan, L-A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. & Janmey P-A. 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton* 60 (1), 24-34. Luettu 21.02.2012.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.20041/pdf>

LIITTEET

Liite 1. Making polyacrylamide gel substrates for cell culture: solutions 1 (2)

Buffers and solutions needed (volumes given are enough for coating 6 coverslips)

0.5 % Glutaraldehyde in PBS

- 315 μ l 8 % glutaraldehyde
- 500 μ l 10x PBS
- 4.185 ml dH₂O
- $\rightarrow V_{\text{total}} = 5 \text{ ml}$

2 % Bis-Acrylamide

10 % Acrylamide

50 mM Hepes (pH 8.5)

1 M Hepes

PBS

Solutions that have to be done on the same day:

Sulfo-SANPAH solution (1 mg/ml in Hepes)

- 10 μ l Sulfo-SANPAH in DMSO (1mg/20 μ l DMSO)
- 25 μ l 1 M Hepes
- 465 μ l dH₂O
- $\rightarrow V_{\text{total}} = 0.5 \text{ ml}$

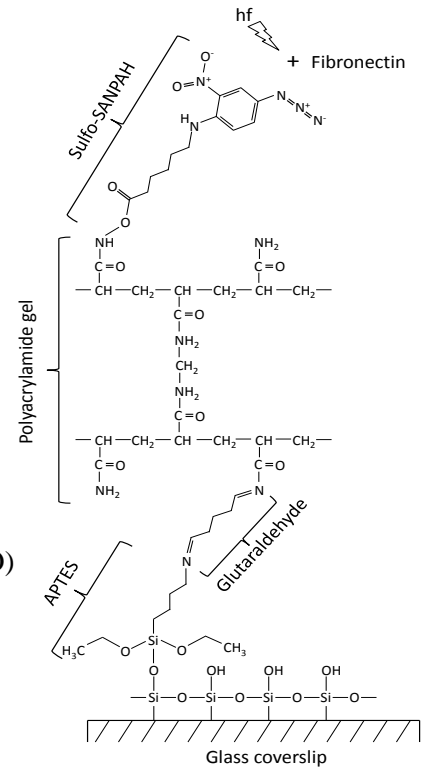
Polyacrylamide mix (total volume 250 μ l)

Acrylamide / Bis- acrylamide ratio (% / %)	Young's Modulus (kN/m ²) ^[1]	10 % Acry- lamide	2 % Bis- acrylamide	1 M He- pes	dH ₂ O	APS (10 %)	TEMED
5 / 0.025	7.0 ^[2]	125.0	3.1	2.5	116.9	1.5	1.0
8 / 0.03	14.0 ^[2]	200.0	3.8	2.5	41.3	1.5	1.0
8 / 0.06	30.0 ^[2]	200.0	7.5	2.5	37.5	1.5	1.0
8 / 0.08	75.0 ^[2]	200.0	10.0	2.5	35.0	1.5	1.0
3 / 0.03	0.3 ^[3]	75.0	3.8	2.5	166.3	1.5	1.0
6 / 0.06	9.9 ^[3]	150.0	7.5	2.5	87.5	1.5	1.0
8 / 0.08	34.0 ^[3]	200.0	10.0	2.5	35.0	1.5	1.0
8 / 0.1	?	200.0	12.5	2.5	32.5	1.5	1.0

^[1] Measurements Young's modulus are prone to error and highly dependent on the measuring method used

^[2] Wang group protocol: Preparation of polyacrylamide substrates <http://www.ece.cmu.edu/~yuliwang/Methods/Materials/Artificial%20Materials/PAASubstrates.pdf>

^[3] Buxboim et al., *How deeply cells feel: methods for thin gels.* J Phys Condens Matter 2010;22:194116.



Making polyacrylamide gel substrates for cell culture:

2 (2)

1. Take the desired amounts of coverglasses and **flame** them with a bunsen burner.
2. **Soak** glasses in 0.1 M NaOH, and **briefly rinse** glasses with dH₂O to avoid excess salt formation.
3. **Air dry** e.g. with pressured air, and put glasses on a dish or into wells of a 6-well plate.
4. **Prepare exicator** with fresh silica and fresh sealing vaseline if needed, and put cleaned coverslips into the exicator.
5. Take an aliquot (~1–3 ml) of **APTES solution** using a syringe into a plastic bottle.
6. Transfer the small APTES bottle into exicator (in vented hood), open the bottle and close the exicator. Use a vacuum pump to create a **vacuum into the exicator**. This takes ~5 min.
7. **Incubate** for 1 h. After incubation open exicator, immediately close APTES bottle. (If no gel substrate is desired, wash the silane-treated coverslip with 50 mM Hepes and proceed directly to step 17.)
8. **Add 0.5 % glutaraldehyde solution** until the coverslips are covered (~0.8 ml / slip).
9. **Incubate** for 30 min at RT in hood.
10. **Collect** the glutaraldehyde solution in liquid waste.
11. **Wash** coverslips extensively with dH₂O. (Activated coverslips may at this point be stored in an exicator for up to two weeks^[4].)
12. **Prepare acrylamide / bis-acrylamide / Hepes mixture**; degas the solution for 20 min in exicator with vacuum pump attached or using the ThermoVac degassing device. This is to remove oxygen, which could inhibit the polymerization.
13. **Wash** an extra coverslip with 70 % EtOH and dH₂O for each coated coverslip.
14. **Add** APS and TEMED and immediately add 20 µl of the acrylamide / bis-acrylamide mixture onto each of the silanized and glutaraldehyde-treated coverslips.
15. **Cover** the drops with the second, cleaned coverslips. Wait for the gel to polymerize (~30 min, or until the gel has set).
16. After polymerization **rinse** gel with 50 mM Hepes buffer (pH 8.5), carefully **remove** the upper coverslip using tweezers and a scalpel, and **wash** gel again with 50 mM Hepes. (The substrate may at this point be stored at 4 °C for up to two weeks.)
17. **Remove** excess liquid from substrates (don't dry!) and **add** 80 µl of freshly made Sulfo-SANPAH solution onto each gel.
18. **Expose** the coverslips (on the 6-well plate) to UV-light on a UV-table for 1.5 min.
19. **Remove** the Sulfo-SANPAH solution and **repeat** the photoactivation procedure.
20. **Quickly wash** with 50 mM Hepes (pH 8.5) (NOTE: the reactivity of Sulfo-SANPAH decreases quickly in solution).
21. **Add** fibronectin onto the coverslips e.g. by laying the coverslips *gel side down* onto a drop (~50 µl) of fibronectin solution (1 mg/ml).
22. **Incubate** either 1h at 37 °C, 4 h at RT, or O/N at +4 °C.
23. **Transfer** the coverslips into a sterile cell culture laminar hood.
24. **Rinse** the coverslips with sterile PBS, and **sterilize** the coverslips by exposing them to the UV-light of the laminar hood for 30 min.
25. **Rinse** w\ sterile PBS. Ready-made substrates can be stored at +4 °C for up to a week.

^[4] Wang groups protocol “Preparation of polyacrylamide substrates”

Liite 3. HAVAINNOINTILOMAKE

HYDROGEEELIN VALMISTUSPROSESSIN TOIMINTOJEN AJANSEURANTA

TOIMINTO	TOIMINNON KUVAUS	AIKA/ MIN
Lasien pesu	Lasien liekitys, pesut, kuivaus	
Silanointi	APTES käsittely, 1h inkubointi	
Glutaraldehydikäsittely	Lasien glutaraldehydikäsittely, 30 min inkubointi	
Geelin valaminen	Polyakryyliamidiseoksen valmistaminen ja valaminen, 30 min inkubointi	
Sulfo-SANPAH - käsittely	Sulfo-SANPAH -liuoksen valmistus ja geeleille laitto, UV- käsittely	
Fibronectiinkäsittely	Fibronectiinin lisäys geeleille, 1h inkubointi	
Sterilointi	Hydrogeelien siirto steriileihin olosuhteisiin, pesu, UV- käsittely 30 min, pesu, prosessin lopetus	
Käytetty aika yhteensä		

Liite 4. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE

HYDROGEELIN VALMISTUSPROSESSI, NYKYTILANTEEN KUVAUS

KOHTA	OPTIMOINNIN TARVE		ONGELMA	OPTIMOINTI MAHDOLLISTA		MUUTA
	KYLLÄ	EI		KYLLÄ	EI	
1	X		4	X		Apupöydän hankkiminen. Onko liekitys tarpeellinen?
2	X		4	X		Teline lasien käsittelyyn.
3	X		4	X		Laboratoriotarpeiden tarkastaminen (pipetit, 6-kuoppalevyt, peitinlasit, roskakori, pipetinkärjet, folio, liuokset jne.)
5	X		4		X	Laboratoriosta poistuminen.
6	X		4	X		Vakuumpumppu ei toimi kunnolla. Silanoinnin toimivuuden testaaminen.
7	X		5	X		Lasin säilyvyystutkimus.
8	X		3	X		Glutaraldehydin isomman määrän valmistaminen.
11	X		5	X		Lasin säilyvyystutkimus.
12	X		4	X		Laboratoriosta poistuminen. Voiko tämän kohdan suorittaa soluviljelyhuoneessa?
13	X		1	X		Peitinlasien valmistaminen etukäteen.
14	X		3	X		Laboratoriosta poistuminen. APS ja TEMED soluviljelyhuoneeseen.
16	X		5	X		Geelin säilyvyystutkimus.
17	X		1, 3		X	Laboratoriosta poistuminen.
18	X		4	X		UV-valon hankkiminen soluviljelyhuoneeseen. Valoitusajan optimointi. Laboratoriosta poistuminen. Silanoinnin, Sulfo-SANPAH:n ja fibronektiinin toimivuuden testaaminen.
19	X		4	X		UV-valon hankkiminen soluviljelyhuoneeseen.
21	X		1	X	X	Voiko fibronektiiniä lisätä lasille nopeammalla tekniikalla?
24	X		3, 4	X		Steriili PBS ja pipetinkärjet laminaarin läheisyyteen.
25	X		5	X		Hydrogeelin säilyvyystutkimus.

ONGELMA: 1 PROSESSIONGELMA, 2 TILAONGELMA, 3 REAGENSсионGELMA, 4 VÄLINEONGELMA, 5 MUU

Liite 5. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE

HYDROGEEELIN VALMISTUSPROSESSIN TOIMINTOJEN AJANSEURANTA,
NYKYTILANTEEN KUVAUS

TOIMINTO	TOIMINNON KUVAUS	AIKA/ MIN
Lasien pesu	Lasien liekitys, NaOH ja dH ₂ O pesut, kuivaus	15
Silanointi	APTES ja lasit eksikaattoriin, 1h inkubointi	75
Glutaraldehydikäsittely	Glutaraldehydin lisäys lasille, 30 min inkubointi	55
Geelin valaminen	Polyakryyliamidiseoksen valmistaminen ja valaminen lasille, 30 min inkubointi	80
Sulfo-SANPAH - käsittely	Sulfo-SANPAH -liuoksen valmistus ja geeleille laitto, UV- käsittely	40
Fibronectiinkäsittely	Fibronectiinin lisäys geeleille, 1h inkubointi +37°C	70
Sterilointi	Hydrogeelien siirto steriileihin olosuhteisiin, PBS pesu, UV- käsittely 30 min, steriili PBS pesu, prosessin lopetus	60
Käytetty aika yhteensä		6h 35min

Liite 6. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE

HYDROGEEELIN VALMISTUSPROSESSI, NYKYTILANTEEN KUVAUS OPTIMOINNIN JÄLKEEN

KOHTA	OPTIMOINNIN TARVE		ONGELMA	OPTIMOINTI MAHDOLLISTA		MUUTA
	KYLLÄ	EI		KYLLÄ	EI	
5	X		4		X	Voiko APTES:n siirtää soluviljelyhuoneeseen?
10	X		1, 3	X	X	Glutaraldehydijätteen lisääntyminen?
17	X		1, 3		X	Sulfo-SANPAH -70°C pakastin huoneessa.
21	X		1	X	X	Fibronktiinikäsittely hidasta. Fibronktiinin käyttö kallista, reagenssin laimentaminen?

ONGELMA: 1 PROSESSIONGELMA, 2 TILAONGELMA, 3 REAGENSсионGELMA,

4 VÄLINEONGELMA, 5 MUU

Liite 7. TÄYTETTY HAVAINNOINTILOMAKE

HYDROGEELIN VALMISTUSPROSESSIN TOIMINTOJEN AJANSEURANTA,
NYKYTILANTEEN KUVAUS OPTIMOINNIN JÄLKEEN

TOIMINTO	TOIMINNON KUVAUS	AIKA/ MIN
Lasien pesu	Lasien liekitys, NaOH ja dH ₂ O pesut, kuivaus	10
Silanointi	APTES ja lasit eksikaattoriin, 1h inkubointi	70
Glutaraldehydikäsittely	Glutaraldehydin lisäys lasille, 30 min inkubointi	35
Geelin valaminen	Polyakryyliamidiseoksen valmistaminen ja valaminen lasille, 30 min inkubointi	70
Sulfo-SANPAH - käsittely	Sulfo-SANPAH- liuoksen valmistus ja geeleille laitto, UV- käsittely	20
Fibronectiinikäsittely	Fibronectiinin lisäys geeleille, 1h inkubointi +37°C	65
Sterilointi	Hydrogeelien siirto steriileihin olosuhteisiin, PBS pesu, UV- käsittely 30 min, steriili PBS pesu, prosessin lopetus	50
Käytetty aika yhteensä		5h 20min

Liite 8. Immunostaining cells (e.g. MEFs), according to Marg, Winkler et al. 2010.

Version 1.2

1. (Plate ~20 000 cells per 6 well plate well to achieve individual, separated cells. Treat/Transfect cells as usual. Let cells grow for ~24 h.)
2. **Aspirate** medium and **rinse** with PBS.
3. **Fix** cells by adding 1,25 ml of phosphate-buffered 4 % paraformaldehyde to each well. Incubate 10 min at 37 °C.
4. **Wash** coverslips with PBS + 20 mM Glycine.
5. **Permeabilize** in PBS + 0,01 % Tween 20, for 5 min.
6. **Block** for 15 min with blocking solution (1 % BSA, 5 % FCS, 0,05 % Triton-X 100) at RT.
7. **Primary antibody:** Place a drop of ~25 µl of primary antibody solution (α Vinculin, 1/1000 in blocking solution) onto a level surface (e.g. inside of the cover of a 6 well plate) and place the coverslip *cell side down* onto the drop. Alternatively, add ~500 µl of antibody solution to each well.
8. **Incubate** 1 h at RT on platform shaker.
9. **Aspirate** primary antibody solution and store at +4 °C for possible future use.
10. **Wash** 3 x with PBS for 5–10 min.
11. **Secondary antibody:** Place a drop of ~25 µl of secondary antibody solution (goat anti-mouse FITC conjugate 1/200 and alexa-conjugated phalloidin 1/40 in blocking solution) onto a level surface and place the coverslip *cell side down* onto the drop. Alternatively, add ~500 µl of antibody solution to each well.
12. **Incubate** 1 h at RT on platform shaker.
13. **Discard** secondary antibody solution.
14. **Wash** 3 x with PBS for 5–10 min.
15. **Wash** briefly 1 x with dH₂O. Carefully remove excess water.
16. **Mount** coverslips onto microscope slides by adding 10–15 µl of DAPI-containing mounting reagent onto microscope slides and carefully aligning the coverslips onto the drop of mounting reagent *cell side down*.
17. If needed, **seal** the slides along the edges with rubber cement.

Needed buffers / solutions

4% paraformaldehyde fix (in 0.1 M phosphate buffer):

- Heat 500 ml MilliQ water in 1 liter beaker to 60°C. Do not exceed 65°C.
- Add 40 g paraformaldehyde, stir for several minutes
- Add a small squirt of 0.1 M NaOH (about 1 ml), keep stirring until solution is clear
- Filter
- Filter 500 ml 0.2 M phosphate buffer into same container as fix
- Final solution is 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer

Source: Sally Schroeter, Vanderbilt, Nashville, TN

PBS / 20 mM Glycine

PBS / 0,01 % Tween 20

1 % BSA, 5 % FCS, 0,05 % Triton-X 100