

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2014

Laura Kähäri

# KAPILLAARIVIRTAUS- MENETELMÄN OPTIMOINTI HIIREN ENDOTEELISOLUILLA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2014 | 54 sivua

Ohjaajat: Kaisa Auvinen, FT; Kai Rosenberg, FK

Laura Kähäri

# KAPILLAARIVIRTAUSMENETELMÄN OPTIMOINTI HIIREN ENDOTEELISOLUILLA

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia leukosyyttien tarttumista hiiren endoteelisoluihin. Tarkoituksena oli löytää olosuhteet, joissa leukosyyttejä tarttuisi, pyörisi ja transmigroituisi endoteeliin *in vitro* -olosuhteissa. Opinnäytetyön toimeksiantajana oli leukosyyttien liikennettä tutkiva tutkimusryhmä Turun Yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa. Menetelmää tullaan hyödyntämään myöhemmin käyttämällä poistogeenisiä hiirikantoja ja tutkimalla niistä eristettyjen endoteelisolujen kykyä sitoa valkosoluja. Työssä hyödynnettiin tutkimuslaboratorion henkilökunnan asiantuntemusta.

Puolet opinnäytetyöstä koostui verisuonten endoteelisolujen eristyskeinon löytämisestä ja optimoinnista. Hiiren kudoksista eristettäviin soluihin käytettiin kahta magnetismia hyödyntävää eristysmenetelmää. Toinen puoli työstä oli löytää olosuhteet leukosyyttien tarttumiselle kapillaarivirtausmenetelmällä. Kapillaarivirtausmenetelmässä virtauskammioon istutettiin endoteelisoluja, jolle aiheutettiin tulehdusreaktio stimuloimalla soluja kasvainkuoliotekijä- $\alpha$ :lla. Kammion läpi laitettiin virtaamaan leukosyyttejä, joiden tarttumista endoteelinpintaan virtausolosuhteissa tutkittiin mikroskoopin avulla. Kokeissa käytettiin kahta kaupallista solulinjaa ja eristettyjä primaarisoluja.

Opinnäytetyössä saatiin optimoituja olosuhteet, joilla endoteelisoluja onnistuttiin eristämään kapillaarivirtausmenetelmän tarkoituksiin. Solumäärät olivat kohtuullisen vähäiset, joten menetelmä ei ole vielä riittävän tehokas. Kapillaarivirtausmenetelmä saatiin kuitenkin toimimaan hiiren endoteelisoluilla ja leukosyyttejä saatiin tarttumaan endoteeliin. Tarttuneiden solujen määrä kasvoi kokeen alussa lisäämällä leukosyyttien määrää. Kasvainkuoliotekijä- $\alpha$ :n stimulaatioajan kasvattaminen vaikutti tarttuneiden solujen määrään lisääntymiseen. Kapillaarivirtausmenetelmä saatiin pystytettyä hiiren endoteelisoluille käytettäväksi ja primaarisia endoteelisoluja saatiin eristettyä kapillaarivirtausmenetelmän kokeisiin.

## ASIASANAT:

kapillaarivirtausmenetelmä, hiiren endoteelisolut, eristys, primaarisolut, leukosyytit, soluadheesio, hiiren kasvainkuoliotekijä- $\alpha$

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food technology | Biotechnology

2014 | 54 pages

Instructors: Kaisa Auvinen, Ph.D; Kai Rosenberg, M.Sc

Laura Kähäri

## OPTIMIZATION OF FLOW ASSAY METHOD WITH MOUSE ENDOTHELIAL CELLS

The objective of this Bachelor's Thesis was to investigate leukocyte adhesion to mouse endothelial cells. The aim was to find conditions where leukocytes would adhere, roll and transmigrate onto, along and through the endothelium in *in vitro* conditions. The study was commissioned by a research group studying leukocyte trafficking at Turku University Faculty of Medicine. This protocol will later be utilized on specific knockout mice population endothelial cells to investigate their ability to adhere leukocytes. The expertise of the laboratory personnel was utilized during this Bachelor's Thesis project.

The first half of this project consisted of finding and optimizing an isolation method for vascular endothelial cells. Two magnetic isolation methods were used to isolate the cells from mouse tissue. The second half of this thesis was to find conditions where leukocytes would adhere using a flow assay research method. Endothelial cells were seeded into a flow chamber and induced with an inflammation-causing stimulant in the flow assay method. A cytokine, mouse tumor necrosis factor- $\alpha$  was used as a stimulant. Leukocytes were subjected to flow through the chamber and their adhesion to the endothelium was observed with a microscope. Two commercial cell lines and isolated primary cells were used in these experiments.

The conditions where endothelial cells were successfully isolated for the flow assay purpose were optimized in this project. However, the number of cells was relatively low, and thus, the protocol is not as efficient as it could be. A flow assay was successfully established for mouse endothelial cells and leukocyte adhesion to the endothelium was achieved. The number of adhered cells increased as the amount of leukocytes was increased in the flow chamber experiments. Also the stimulation time applied to the endothelium had a positive impact on the number of adhering cells.

### KEYWORDS:

flow assay, mouse endothelial cells, primary cells, leukocytes, cell adhesion, mouse tumor necrosis factor- $\alpha$

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORIA</b>	<b>9</b>
2.1 Endoteelisolut	9
2.2 Leukosyyttien adheesiokaskadi	9
2.2.1 Pyöriminen	10
2.2.2 Adheesio	10
2.2.3 Ryömiminen	11
2.2.4 Transmigraatio	11
2.2.5 Tyvikalvon ohitus ja liike kudokseen	12
2.3 Leukosyyttiliikenteen tutkimusmenetelmät	12
2.3.1 <i>In vitro</i>	12
2.3.2 <i>In vivo</i>	13
<b>3 MATERIAALIT, MENETELMÄT JA LAITTEET</b>	<b>15</b>
3.1 Solut	15
3.1.1 Solulinjat	15
3.1.2 Primaarisolut	15
3.1.3 Soluhoito	16
3.2 Dynabeads ja MACS-kitti	17
3.3 Kapillaarivirtausmenetelmä	19
3.4 Virtaussytometri	20
<b>4 TYÖSKENTELEY</b>	<b>22</b>
4.1 Endoteelisolujen eristys	22
4.1.1 Käytetyt kudokset	22
4.1.2 Kudosten hajotus solususpensioksi	22
4.1.3 Dynabeads ja MACS-eristyskitti	23
4.2 Hiiren TNF $\alpha$ -stimulaatio	24
4.3 Leukosyyttieristys	25
4.4 Kapillaarivirtausmenetelmän kokeet	25
4.4.1 Solujen istutus virtauskammioon	25

4.4.2 Kapillaarivirtausmenetelmän kokeet	26
4.5 Virtauskanavien fluoresenssivärjykset	27
4.6 Immunofluoresenssivärjykset	28
<b>5 TULOKSET</b>	<b>29</b>
5.1 Endoteelisolujen eristys	29
5.2 Virtauskapillaarimenetelmän kokeet	29
5.2.1 Solulinjat	30
5.2.2 Primaarisolut	32
5.3 Värjykset	33
<b>6 PÄÄTELMÄT</b>	<b>36</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>40</b>

## LIITTEET

Liite 1. Solujen mediumit	
Liite 2. Puskuriliuokset ja kollagenaasiliuos	
Liite 3. EPICS-puskurit	
Liite 4. Vasta-aineet	
Liite 5. 3B11 FACS-analyysi: värjäämättömät solut	
Liite 6. 3B11 FACS-analyysi: CD31	
Liite 7. 3B11 FACS-analyysi: CD102	
Liite 8. EOMA FACS-analyysi: värjäämättömät solut	
Liite 9. EOMA FACS-analyysi: CD31	
Liite 10. EOMA FACS-analyysi: CD102	
Liite 11. Esimerkki tulosten laskemisesta	

## KUVAT

Kuva 1. Leukosyytin adheesio vaiheittain <sup>9</sup>	12
Kuva 2. Ibidi, johon on istutettu soluja	17
Kuva 3. Dynabeadsit magneettisessa telineessä eppendorf-putkissa	18
Kuva 4. MACS -pylväs magneettisessa telineessä	19
Kuva 5. Kapillaarivirtausmenetelmän kaaviokuva	20
Kuva 6. Kapillaarivirtausmenetelmän kuva, jossa nuolet osoittavat vaaleaa tarttunutta leukosyyttiä ja tummempaa transmigroitunutta leukosyyttiä.	30
Kuva 7. Fluoresenssivärjäys primaarisesta endoteelisolusta: vasemmalla CD31 värjäys ja oikealla LYVE-1	33
Kuva 8. Värjäysten histogrammit	35

## KUVIOT

Kuvio 1. 3B11-solujen kokeet	31
Kuvio 2. EOMA -solujen kokeet: 4 tunnin stimulaatio	31
Kuvio 3. Primaarisolujen kokeet osa 1: yön yli stimulaatio	32
Kuvio 4. Primaarisolujen kokeet osa 2: vuorokauden ja kahden vuorokauden stimulaatiot	32

## TAULUKOT

Taulukko 1. Käytetyt vasta-aineet ibidien värjäyksissä	27
Taulukko 2. EOMA –solujen värjäysten ja erotukset	34

## KÄYTETYT LYHENTEET

Lyhenne	Lyhenteen selitys
FACS	Fluoresenssiin perustuva soluerottelu (Fluorescence-activated cell sorting)
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HUVEC	Ihmisen napanuoran laskimon endoteelisolu (Human umbilical vein endothelial cell)
Ibidi	Virtauskammio
mTNF $\alpha$	Hiiren kasvainkuoliotekijä- $\alpha$ (Mouse tumor necrose factor $\alpha$ )
NMS	Hiiren normaali seerumi (Normal mouse serum)
PBS	Fosfaattipuskuri
P/S	Penisilliini streptomysiini

# 1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Turun Yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan tutkimuslaboratoriossa MediCityssä professori Sirpa Jalkasen tutkimusryhmässä syksyn 2013 ja kevään 2014 välisenä aikana. Tutkimusryhmässä tutkitaan verija imusuoniston pinnalla sijaitsevia tarttumismolekyylejä, jotka ohjaavat tulehdusliikehdintää. Kyseisillä molekyyleillä on merkitystä muun muassa tulehdus- tautien ja syövän synnyssä sekä leviämässä. Leukosyyttien normaali kulkeutuminen kehossa on tärkeä osa immuunipuolustusta, joka suojelee kehoa ulkopuolisilta taudinaiheuttajilta. Leukosyyttien vioittunut liikkuminen kehossa on syynä moniin sairauksiin ja edistää esimerkiksi syövän leviämistä. Näitä voitaisiin ehkäistä vaikuttamalla leukosyyttiliikenteeseen kehossa ja samalla keinolla vaikuttaa esimerkiksi syöpätutkimukseen.<sup>1</sup>

Opinnäytetyö toimeksi annettiin, jotta tutkimusryhmässä voitaisiin tutkia sekä leukosyyttien adheesiota että transmigroitumista hiirestä eristetyillä primaarisoluilla. Jatkossa voitaisiin hyödyntää tätä jo valmiiksi optimoitua ja testattua menetelmää sekä solulinjoilla että primaarisoluilla. Endoteelisolujen eristyksen onnistuminen on ollut erityisenä toiveena leukosyyttiliikennettä tutkivalle ryhmälle, jotta kapillaarivirtausmenetelmää voitaisiin käyttää esimerkiksi tietyillä poistogeenisillä hiirilinjoilla ja tutkia, kuinka niistä eristetyt endoteelisolut sitovat valkosoluja *in vitro*.



## 2 TEORIA

### 2.1 Endoteelisolut

Verenkiertosysteemi on vastuussa veren, ravintoaineiden, solujen ja kaasujen kuljetuksesta ympäri kehoa ja sen sisäpinta koostuu endoteelisoluista, jotka muodostavat endoteelin. Endoteeli peittää verisuoniston ja imusuoniston sisäpuolta solukerroksena, joka ulottuu sydämestä hiussuoniin asti. Verisuonista suurimmalla osalla on itse asiassa kaikilla samanlainen perusrakenne, joka koostuu endoteelisoluista ja niiden alapuolella sijaitsevasta membraanista. Endoteelisolut ovat muodoltaan hieman pitkänomaisia ja ovat asettautuneet vieri viereen toistensa kanssa verenkierron suuntaisesti muodostaen tasaisen pinnan.<sup>2</sup>

Verisuoniston ja imusuoniston yhteinen tehtävä on muun muassa leukosyyttien kuljettaminen kehossa. Leukosyytit matkaavat verisuonistoissa, kunnes siirtyvät ympäröivään kudokseen suonien seinämän ja endoteelisolujen läpi. Useimmat leukosyyttityypit liikkuvat kudoksesta imusuoniston kautta imusolmukkeisiin, josta ne ohjautuvat rintatiehyen kautta takaisin verenkiertoon. Leukosyyttien siirtymisestä verisuonista kudokseen kuvataan adheesiokaskadina.<sup>2</sup>

### 2.2 Leukosyyttien adheesiokaskadi

Leukosyytit eli valkosolut ovat kehon puolustusjärjestelmän soluja ja suojaavat sekä infektioitaudeilta että tuntemattomilta materiaaleilta. Leukosyytit jaetaan viiteen alatyyppiin: neutrofiilit, eosinofiilit, basofiilit, monosyytit ja lymfosyytit.<sup>3</sup>

Leukosyyttien liikehdintä tulehtuneelle alueelle kehossa on immuunijärjestelmän peruspilari, jota ilman puolustautuminen ulkoisia tunkeutujia kohtaan olisi mahdotonta. Tämä tapahtuu osana immuunivastetta, jota säätelevät soluadheesiomolekyylit endoteelin pinnalla.<sup>4</sup> Leukosyyttien interaktiot verisuonen seinämän kanssa koostuvat useista vaiheista, ja tätä kutsutaan leukosyyttien ad-

heesiokaskadiksi. Adheesiokaskadi käsittää leukosyyttien tarttumisen, pyörimisen, aktivaation, sivuttaisen ryömimisen ja viimeiseksi transmigroitumisen verisuonesta kudokseen.<sup>2</sup> Adheesiokaskadin vaiheet nähdään kuvasta 1 sivulla 12.

### 2.2.1 Pyöriminen

Leukosyyttien adheesiokaskadi alkaa vapaasti verisuonistossa kulkevasta leukosyytistä, joka kulkee virtauksen mukana.<sup>2, 4</sup> Leukosyyttiin tarttuvat ensimmäisenä selektiinit, jotka ovat membraanin glykoproteiineja ja säätelevät sidoksillaan leukosyytin pyörimistä endoteelia pitkin. Nämä proteiinit käynnistävät leukosyyttien ja endoteelin adheesiokaskadin.<sup>4, 5</sup> L-, P-, ja E-selektiinit kiinnittyvät vastaaviin ligandehinsa pyörimisprosessissa ja mahdollistavat leukosyytin tarttumisen tulehtuneeseen endoteeliin. P- ja E-selektiinit sijaitsevat endoteelisolujen pinnalla ja L-selektiinit leukosyytin pinnalla. Leukosyytti on näin alustavasti ja löyhästi otettu kiinni endoteeliin. Leukosyyttiin kohdistuu veren virtauksessa suuria leikkausjännitysvoimia, kun leukosyytti alkaa tarttua endoteelin seinämään ja hidastaa vauhtiaan. Muodostuneet sidokset vastustavat näitä voimia ja L- ja P-selektiinit tarvitsevat leikkausjännitystä tukemaan tarttumista. Tarttuneet leukosyytit irtoavat, jos virtaus keskeytetään. Myös integriinit vaikuttavat leukosyytin pyörimiseen, vaikka niiden merkitys on suurempi tiukan adheesion vaiheessa.<sup>5</sup>

### 2.2.2 Adheesio

Seuraava vaihe sitoo leukosyytin vahvemmin kiinni endoteeliin ja pysäyttää sen liikkeen virtauksesta. *In vitro* – ja *in vivo* –tutkimukset ovat osoittaneet, että leukosyytin pyörimisestä pysähtymiseen vaikuttavat kemokiinit ja sytokiinit.<sup>5</sup> Kiinnittymistä säätelevät endoteelisolujen pinnalla sijaitsevat immunoglobuliinien superperheen jäseniin lukeutuvat ICAM - ja VCAM –molekyylit, jotka muodostavat liitoksia leukosyytin pinnan integriinien kanssa.<sup>4, 5</sup> Tulehdustilanteessa sytokiinit aktivoivat endoteelisoluja ilmentämään adheesiomolekyylejä ja valmistamaan

itse muun muassa kemokiinejä, jotka ilmentyvät solun pinnalla. Kemokiinit säätelevät integriinien aktiivisuutta huomattavan nopeasti. Aktivoituessaan integriinit muuttavat asemoitumistaan merkittävästi. Ensin integriini on taipuneena alhaisen affiniteetin muodossa, jonka jälkeen se aktivoituessaan ojentuu korkean affiniteetin muotoon ja on valmis liitoksiin.<sup>5</sup>

### 2.2.3 Ryömiminen

Vaikka leukosyytti on tiukasti kiinnittyneenä endoteeliin, se jatkaa silti liikehdintää endoteelin pinnalla ennen transmigroitumisen vaihetta. Leukosyyteistä neutrofiilit ja monosyytit ryömivät endoteelisolujen pinnalla etsien sopivaa paikkaa aloittaakseen siirtymisen endoteelin läpi. Liikehdintä voi olla sivuttaista tai vastoin odotuksia myös virtauksen vastaista.<sup>5, 6, 7</sup> Jos ryömiminen on vioittunut, transmigraatio viivästyy, jolloin se tapahtuu yleensä transsellulaarisen reitin kautta eikä parasellulaarisesti.<sup>5</sup>

### 2.2.4 Transmigraatio

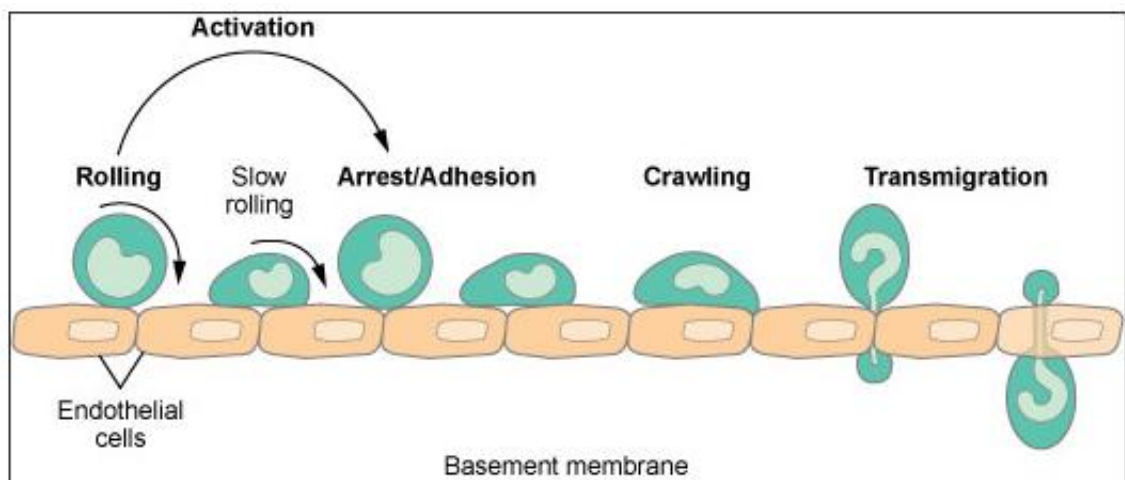
Leukosyytti kohtaa kolme selvää estettä siirtyessään verenkierrosta kudokseen: endoteelisolut, endoteelisolujen tyvikalvon ja perisyttikerroksen. Transmigroituminen kaikkien esteiden läpi on aikaa vievää. Leukosyyttisolukäyttää ensimmäisen viisi minuuttia endoteelikerroksen läpäisemiseen, kun taas tyvikalvon ohittamiseen keskimäärin 10 minuuttia. Näiden kolmen esteen läpi päästyään leukosyytti kulkee kudoksessa kohti tulehtunutta kohdetta. Löydettyään ryömimällä sopivan kohdan leukosyytti aloittaa migroitumisen endoteelikerroksen läpi. Transmigroitumisen laukaisee kemokiinien stimulointi, joka mahdollisesti toimii yhteistyössä leikkausjännitysvoimien kanssa.<sup>5</sup>

Transmigroituminen voi tapahtua parasellulaarisen tai transsellulaarisen reitin kautta. Parasellulaarinen migroituminen tarkoittaa työntymistä endoteelisolujen välisten liitoskohtien kautta. Tähän prosessiin vaikuttavat useat endoteelisolujen ja leukosyyttien väliset molekyyllisidokset. Vasta lähiaikoina on todettu transmig-

raation tapahtuvan myös transsellulaarisesti. Transsellulaarinen transmigroituminen tarkoittaa leukosyytin työntymistä suoraan endoteelisolun läpi. Tämän reitin valitsee kuitenkin vain vähemmistö leukosyyttejä, ja määrän arvioidaan olevan vain 5-20 % leukosyyteistä. Transsellulaarinen reitti voi olla nopeampi tapa leukosyytille transmigroitua ja solun kulkeminen endoteelin läpi voi kestää vain jopa alle minuutin.<sup>5</sup>

### 2.2.5 Tyvikalvon ohitus ja liike kudokseen

Transmigroiduttuaan endoteelin alle leukosyytit liikkuvat endoteelisolujen alla ja etsivät läpäisyyn sopivia kohtia ulospäin suuntautuvilla pullistumilla tunnustellen sekä tyvikalvoa että useimmissa tapauksissa myös perisyöttien kerrosta.<sup>5, 8</sup> Tuulehtuneelle alueelle leukosyytit suunnistavat kudoksessa kemokiinigradientin mukaan kemotaktisesti.<sup>6, 7</sup>



Kuva 1. Leukosyytin adheesio vaiheittain<sup>9</sup>

## 2.3 Leukosyyttiliikenteen tutkimusmenetelmät

### 2.3.1 *In vitro*

*In vitro* –tutkimusmenetelmä tarkoittaa elävän organismin ulkopuolella suoritettua koetta, esimerkiksi koeputkessa suoritettua tutkimusta.<sup>10</sup> Käytetyissä tutki-

musmenetelmissä endoteelisoluja istutetaan usein jonkinlaiselle pinnalle tai päällystetään muovipinta adheesiomolekyyleillä. Eristetyt leukosyytit reagoivat endoteelisolujen tai käsitellyn pinnan kanssa, ja mikroskoopilla tutkitaan mitä pinnalla tapahtuu. Kokeita voidaan suorittaa virtauksen alaisena tai ilman. Leukosyyttien kemotaksiaa eli kulkua kemokiinigradienttia kohti voidaan tutkia huokaisen membraanin avulla. Siinä tutkitaan, kuinka leukosyytit suunnistavat kudoksessa kemokiinireseptorien avulla oikealle tulehduspaikalle keinotekoisen membraanin läpi, jossa on niin pieniä huokosia, että vain aktiivisesti liikkuva solu pääsee niistä lävitse. Transendoteelista liikkumista leukosyyteillä tutkitaan virtauksen alaisissa olosuhteissa luoden mahdollisimman samanlaiset olosuhteet kuin *in vivo* -lähestymistavassa. Tällaisella metodilla voidaan seurata leukosyyttien liikkumista myös adheesio- ja endoteelin läpi migroitumisen jälkeenkin.<sup>11</sup>

Klassinen tapa tutkia leukosyyttien liikehdintää imukudokseen on HEV-menetelmä. Kyseisessä tutkimustavassa käytetään imusolmukkeesta tehtyä leikettä materiaalina, johon eristettyjen leukosyyttien tulisi tarttua kokeen aikana. Leike altistetaan eristetyille leukosyyttisuspensiolle halutuksi ajanjaksoksi liikkuvalla rotaatiopöydällä, jonka jälkeen käsitellään lasi ja leike halutulla tavalla. Mikroskopoiden lasketaan leikkeeseen tarttuneet leukosyytit.<sup>11</sup>

### 2.3.2 *In vivo*

*In vivo* -tutkimusmenetelmä tarkoittaa tutkimusta, joka tapahtuu elävässä organismissa, kuten koe-eläimessä.<sup>12</sup> Leukosyytiliikennettä voidaan tutkia esimerkiksi hiireissä leimaamalla lymfosyyttejä ja injektoimalla leimatut solut koe-eläimeen. Solujen annetaan kulkeutua isäntäeläimen kehossa tietyn ajanjakson ajan, jonka jälkeen voidaan tutkia, kuinka leimatut solut ovat levittäytyneet ympäri eläimen kehoa. Fluoresoivasti leimatut solut löydetään, kun kudokset eristetään, hajotetaan ja eristetyt solut värjätään virtaussytometrasta tutkimusta varten. Talteen otettuja kudoksia voidaan myös säilöä leikkeiksi, jotka voidaan värjätä immunohistologisesti.<sup>13</sup>

Uudempina menetelminä intravitaalimikroskopia ja kaksifotonimikroskopia ovat tulleet yleisimmiksi viimeaikaisissa tutkimuksissa. Intravitaalimikroskopiassa nukutettua koe-eläintä tarkastellaan mikroskoopin alla jolloin nähdään suoraan, mitä tapahtuu *in vivo*. Kaksifotonimikroskopian tekniikalla voidaan kuvantaa eläviä soluja melko syvälle kudokseen, esimerkiksi fluoresoivasti leimattuja soluja kudospäristössä. Tekniikassa käytetään kirkasta, lähes infrapuna-aallonpituuden laservalopulssia, joka fokusoidaan objektilinssillä hyvin lyhyeksi ajaksi. Havaituista fotoneista muodostetaan kuvien sarja, josta muodostetaan video.<sup>14</sup>

## 3 MATERIAALIT, MENETELMÄT JA LAITTEET

### 3.1 Solut

Käytetyt solulinjat tilattiin American Type Culture Collection -organisaatiolta (ATCC) ja ne saapuivat pakastettuina. Soluista varastoitui pienet erät tutkimusryhmän omaan solupankkiin. Tästä varastosta otettiin soluja käyttöön työskentelyyn. Primaarisolut eristettiin hiiren sydän- ja keuhkokudoksesta.

#### 3.1.1 Solulinjat

3B11-solulinja viittaa ATCC:n solulinjaan CRL-2160. Solut ovat adherentteja hiiren endoteelisoluja, jotka ovat SV40-transformoituja. Solut ovat aikuisen koirashiiren kasvaimesta eristettyjä.<sup>15</sup> Solut ilmentävät H-2K-proteiinia, joka on solun pintamolekyyli, ja VCAM-proteiinia, joka on verisuonen adheesioproteiini.<sup>16</sup> EOMA -solulinja on ATCC:n solulinja CRL-2586. Solut ovat peräisin aikuisen hiiren kasvaimesta ja ovat adherentteja endoteelisoluja.<sup>17</sup> Kasvain on hemoendooteliooma eli verisuonista koostuva kasvain, jossa endoteelisolut lisääntyvät hallitsemattomasti.<sup>17, 18</sup> EOMA -solut ilmentävät CD31-antigeeniä, verisuonen adressiini -nimistä proteiinia ja CD45-antigeeniä.<sup>19</sup>

#### 3.1.2 Primaarisolut

Primaarisoluviljelmät on eristetty suoraan isäntäeläimestä, minkä jälkeen soluja ryhdytty kasvattamaan keinoeläimissä elinolosuhteissa. Primaarisolujen viljely aloitetaan ottamalla talteen haluttu kudos, jossa tavoitellut solut ovat. Kudos hajotetaan mekaanisesti tai entsyymaattisesti, mutta tässä työssä käytettiin molempia hajotuskeinoja yhdessä. Mekaaninen hajotus rikkoo yhtenäisen kudoksen pienemmiksi paloiksi, kun taas entsyymaattinen käsittely hajottaa solujen välisiä liitoksia toisistaan luoden paremman yksisoluisen suspension. Entsyymaattisena käsittelynä käytettiin kahta kollageenaasia, jotka eivät vahingoita so-

luja, mutta purkavat kudosta epätäydellisesti. DNAasi-käsittely pilkkoo hajoneiden solujen DNA:ta, joka heikentää proteolyysiä ja siten aggregoisi soluja eristyksen aikana. Eristetyt solut istutettiin fibronektiinillä käsitellylle muovipinnalle. Fibronektiini edistää solujen kiinnittymistä.<sup>20</sup>

### 3.1.3 Soluhoito

3B11- ja EOMA -soluja hoidettiin kahdesta kolmeen kertaan viikossa huuhtomalla kasvatuspullo PBS:llä, lisäämällä 2 ml trypsiini-EDTA:ta ja inkuboimalla 37 °C:ssa kymmenen minuuttia, kunnes solut olivat näkyvästi irronneet kasvatuspullon pohjasta. Trypsiini-EDTA neutraloitiin HEC -mediumilla ja sentrifugoitiin solut pohjaan 300 x g 10 minuutin ajan, jonka jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja solut resuspensoitiin 1 ml tilavuuteen mediumiinsa. Solut jaettiin sopivaan suhteeseen jatkoviljelypulloihin 1:2-1:10 riippuen solujen tarvittavuudesta. Kasvatus tapahtui 75 cm<sup>2</sup> kasvatuspulloissa, joihin mediumia käytettiin 10 ml kerrallaan.<sup>21, 22</sup>

Primaarisoluja kasvatettiin useilla erikokoisilla kasvatuspinnoilla, kuten 24- ja 6-kuoppalevyillä sekä kasvatuspulloissa, joiden pinta-ala oli 25 ja 75 cm<sup>2</sup>. Kasvatuspullot todettiin ensimmäisten kokeilujen jälkeen aivan liian suuriksi pinnoiksi ja parhaimmaksi pinta-alaksi todettiin 24-kuoppalevy. Solumedium vaihdettiin joka toinen päivä. Viimeisenä kokeena primaarisolut istutettiin suoraan ibidiin, jolloin niitä ei irroteta ennen kapillaarivirtausmenetelmän koetta ja ibidi-istutusta, jolloin soluja ei menetetä irrotusprosessissa. Tämän istutustavan todettiin olevan tehokkain ja nopein tapa kasvattaa primaarisoluja kapillaarivirtausmenetelmän kokeisiin. Medium vaihdettiin ibidissä kasvaville soluille joka päivä.<sup>23</sup>



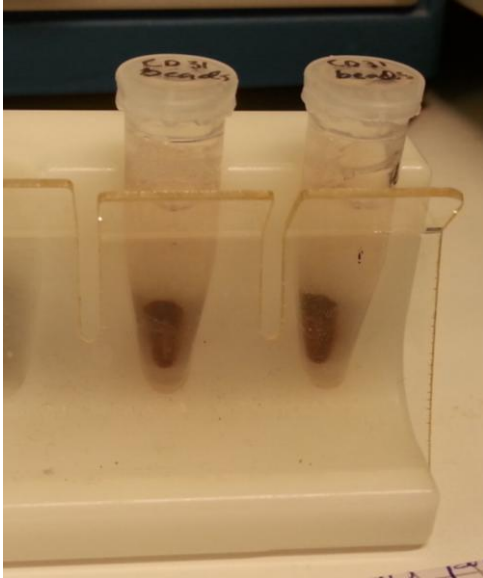


Kuva 2. Ibidi, johon on istutettu soluja

### 3.2 Dynabeads ja MACS-kitti

Sekä dynabeadsita että MACS -eristyskitissä käytetyt helmet ovat superparamagneettisesti toimivia nanopartikkelihelmiä.<sup>24, 25</sup>

Dynabeadseissa käytettiin lampaan anti-rotta polyklonaalisella vasta-aineella leimattuja helmiä. Vasta-aine IgG on kovalenttisesti sitoutunut helmen pintaan. Helmet leimattiin CD31 rotan anti-hiiren vasta-aineella, jolloin pystyttiin positiivisella eristyksellä erottamaan CD31 positiiviset hiiren solut CD31 negatiivisista soluista. CD31 on endoteelisolujen tunnistukseen käytetty vasta-aine. Samanlaista positiivista erottelutapaa käytettiin MACS -kitissä, mutta kyseisessä kitissä CD31-vasta-aineella käsiteltiin kudoksen solut, jonka jälkeen vasta-aineella käsitellyt solut yhdistettiin vuohen anti-rotta IgG vasta-aineella päällystettyjen helmien kanssa.<sup>24, 25</sup> Laitteistot nähdään kuvista 3 ja 4.



Kuva 3. Dynabeadsit magneettisessa telineessä eppendorf-putkissa

Molemmat erottelukeinot vaativat magneettisen ympäristön, jonka avulla superparamagneettisesti toimivat helmet erottuvat samalla erotellen CD31-positiiviset solut, jotka ovat endoteelisoluja.<sup>24, 25</sup> Dynabeadseissa käytetyt eppendorf-putket asetettiin magneettiseen telineeseen ja annettiin helmien tarttua seinustalle, johon magneettisuus vaikutti kahden minuutin ajan, ja tänä aikana pesuvaiheiden supernatantti voitiin kaataa pois.<sup>25</sup> MACS -kitissä käytettiin MACS:n LS-erottelupylvästä ja keräysputkia. Erottelupylväs koostuu ferromagneettisesta pallonmuotoisista hartsipartikkeleista, jonka ulkoisin kerros on soluja vahingoittamaton. Kun pylväs asetetaan magneettiseen MACS:n erottelutelineeseen, magneettikenttä pylväässä kasvaa 10 000 -kertaiseksi ja mahdollistaa vain hiemankin magneettisesti leimattujen solujen jäämisen pylvääseen. Solut, jotka eivät ole magneettisia, poistuvat siitä, joten eluointivaiheessa saannoksi saadaan vain endoteelisoluja.<sup>26</sup> Kuvassa 4 nähdään magneetissa oleva pylväs.

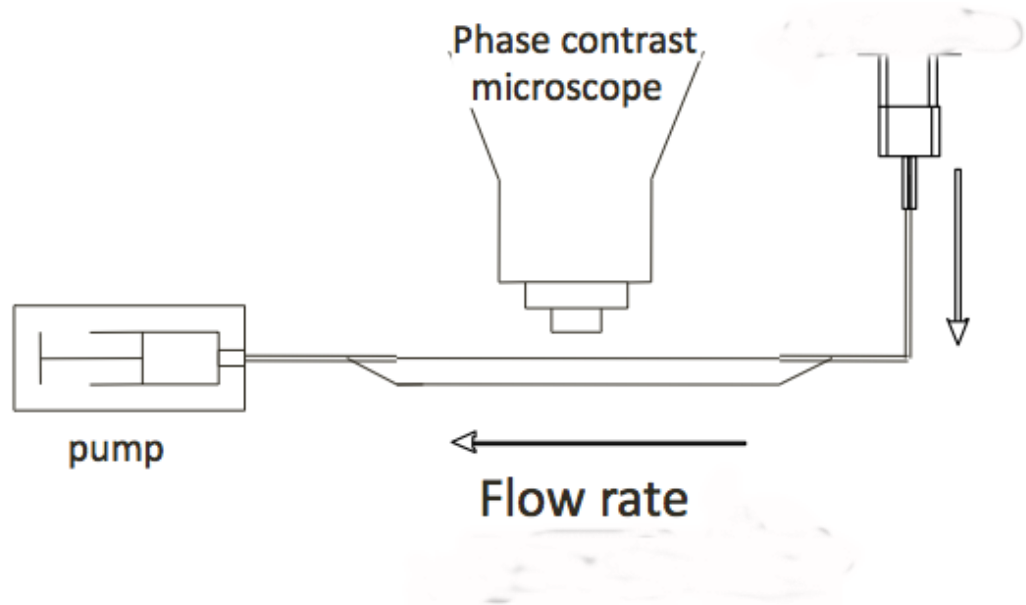


Kuva 4. MACS -pylväs magneettisessa telineessä

### 3.3 Kapillaarivirtausmenetelmä

Kapillaarivirtausmenetelmä on *in vitro* -tutkimuskeino, jolla seurataan reaalitajassa tapahtuvia vuorovaikutuksia leukosyyttien ja endoteelisolujen välillä.<sup>8</sup> Nämä vuorovaikutukset tapahtuvat virtauskanavassa eli ibidissä, johon endoteelisolut on istutettu. Ibidi on liitetty pumppuun (Harvard Apparatus PHD 2000) toisesta päästä putkella ja toisesta päästä venttiiliin, jossa on kaksi kanavaa soluille ja puskuriliuokselle.<sup>8</sup> Tapahtumia virtauskanavassa tarkasteltiin faasi-contrastimikroskoopilla (Olympus IX70) 100-kertaisella suurennoksella ja taltioitiin videokameralla (Hamamatsu Camera Controller ja Digital Camera ORCA-R<sup>2</sup> C10600) tiedostoiksi, joita voitiin tarkastella kokeen jälkeen.<sup>8</sup> Rakennekuva laitteesta nähdään kuvassa 5. Ibidistä kuvattiin kymmentä kenttää, jotka edustavat otoksia, ja näistä lasketaan tarttuneet leukosyytit tuloksiin. Yhden kentän pinta-ala on 0,5676 mm<sup>2</sup>. Kentät valikoituivat laitteiston ohjelmilla (HC Image ja

Olympus Cell D). Ibidistä valittiin ensin nollakohta pumppuliitoskohdan ja mikroskoopin avulla, jonka jälkeen ohjelmista valittiin kuusikanavainen ibidi, jolloin ohjelma määrittää automaattisesti kentät.



Kuva 5. Kapillaarivirtausmenetelmän kaaviokuva

### 3.4 Virtaussytometri

Molekyylien ilmentämistasot soluissa tutkittiin ja ajettiin BD FACSCalibur-virtaussytometrillä Biotekniikan keskuksessa. Näytteet ajoi tämän opinnäyte-työntekijä. Virtaussytometriä eli FACS tarkoittaa fluoresenssiin perustuvaa soluerottelua. Virtaussytometrisesti analysoidtavat solut ohjataan koeputkessa yksittäisten solujen suspensiona sopivassa puskurissa annostelijaan. Solut annostellaan virtauskammioon, johon solut virtaavat edelleen kapeana solujonona noin 500 solua sekunnissa. Pienellä laserilla kohdistetaan virtauskammiossa virtaaviin soluihin yksi kerrallaan valoa, joka heijastuu solusta pois solun ominaisuuksien mukaan pienessä kulmassa. Riippuen kulmasta, johon valo heijastuu, voidaan niitä kutsua suorasionnaksi ja sivusionnaksi. Suorasionta kertoo solun koon ja sivusionta kertoo solun granulaarisuuden.<sup>27</sup>

Detektori havaitsee valosignaalit ja sen tiedot voidaan nähdä tietokoneelta, johon laitteisto on liitetty. Suodattimilla voidaan kohdistaa fluoresoiva valo väridetektoriin, jolloin laserilla viritetty fluorokromilla leimattu solu emittoi tietyllä aallonpituudella tietyn väristä valoa, ja näin voidaan erotella värjätyt solut toisistaan.<sup>27</sup> Laitteiston data analysoidaan BD:n FACS -ohjelmistolla.

## 4 TYÖSKENTELY

### 4.1 Endoteelisolujen eristys

Endoteelisolujen eristyksessä käytettiin osittain tutkimusryhmässä aikaisemmin kokeiltua eristysmenetelmää, jossa yhdisteltiin useiden tieteellisten artikkeleiden endoteelisolujen eristysmenetelmiä.

#### 4.1.1 Käytetyt kudokset

Endoteelisolut eristettiin hiiren (C57BL/6) sydäimestä ja keuhkoista. Käytetyt hiiret olivat noin kymmenen vuorokauden ikäisiä villityypin hiiriä. Hiiret lopetettiin dekapitaatiolla, jonka jälkeen leikattiin sydän ja keuhkot steriilejä instrumentteja käyttäen. Kudokset siirrettiin PBS:ää sisältäviin eppendorffputkiin. Talteenotto tehtiin erityisesti kontaminaatioita varoen ja käyttämällä eri instrumentteja hiiren ihon käsittelyyn ja sydämen ja keuhkojen käsittelyyn. Elimet siirrettiin huoneenlämmössä eläinosastolta laboratorioon.

#### 4.1.2 Kudosten hajotus solususpensioksi

Sydän halkaistiin steriileillä saksilla puoliksi ja keuhkot leikattiin lohkoiksi, jonka jälkeen molemmat huuhdeltiin kolmesti HBSS:llä petrimaljan päällä. Näin päästiin suurimmista osasta punasoluista eroon. Sydän sekä keuhkot siirrettiin steriileihin C-MACS -putkiin, joihin lisättiin 37 °C:sta kollagenaasiliuosta 5 ml putkea kohden. Putki liitettiin gentleMACS Dissociator -laitteeseen ja käynnistettiin sydämelle ohjelma m\_heart\_01 ja keuhkoille m\_lung\_01. Ohjelmat ovat kullekin kudokselle optimoituja hajotusohjelmia, jotka pyörittävät putken korkissa olevia teriä tietyn ajan. Ohjelman ensimmäisen osan jälkeen kudoksia inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa jatkuvassa liikkeessä 20 minuutin ajan. Hajotusohjelmien toisilla osilla m\_heart\_02 ja m\_lung\_02 käsiteltiin kudokset inkuboinnin jälkeen. Hajotetut kudokset suodatettiin 70 µm suodattimen läpi ja sentrifugoitiin pohjaan

300 x g 10 minuutin ajan. Kollagenaasiliuos kaadettiin pois ja solupelletti resuspensoitiin eristyspuskuriin. Soluja yritettiin laskea, mutta tarkkaa solumäärää ei saatu laskettua. Päädyttiin arvioimaan solumäärä noin 10 miljoonaan käytettyä kudosta kohden.

#### 4.1.3 Dynabeads ja MACS-eristyskitti

Endoteelisolujen eristysvaiheeseen käytettiin kahta eristystapaa, dynabeadseja ja MACS -eristyskittiä. Molemmat menetelmät ovat magnetismia hyödyntäviä eristyskeinoja.

Lampaan anti-rotta dynabeadsit valmisteltiin käyttöä varten tuotteen valmistajan ohjeiden mukaisesti. Resuspensoituja helmiä otettiin 25  $\mu$ l, joka on 10 miljoonaa solua kohden suositeltu määrä. Helmet pestiin 1 ml eristyspuskurilla ja resuspensoitiin, jonka jälkeen helmet siirrettiin eppendorffputkessa magneettiseen telineeseen ja kaadettiin puskuriliuos pois. Helmet resuspensoitiin 25  $\mu$ l puskuria, joiden mukaan lisättiin 2  $\mu$ g CD31-vasta-ainetta. Helmiä käsiteltiin vastaaineella 30 minuutin ajan 4 °C:n lämpötilassa tasoravistelijalla. Vastaainekäsittelyn jälkeen helmet pestiin eristyspuskurilla viisi kertaa lisäämällä eppendorffputki täyteen puskuria ja asettamalla magneettiin minuutiksi, jonka jälkeen kaadettiin puskurin pois. Lopuksi helmet resuspensoitiin 1 ml tilavuuteen puskuria. Vastaaineella käsitellyt helmet säilyvät 4 °C:n lämpötilassa viikon ajan käytettävänä, joten vastaainekäsittely voitiin tehdä eristystä edeltävänä päivänä. Solususpensio lisättiin käsiteltyjen helmien joukkoon 10 minuutin ajaksi ja niitä pidettiin liikkeessä tasoravistelijassa huoneenlämmössä. Käsitelyn jälkeen solu-helmi -kompleksi siirrettiin magneettiin, jossa sen annettiin olla kahden minuutin ajan ja sen jälkeen supernatantti kaadettiin pois. Solut pestiin kaksi kertaa puskurilla magneettia käyttäen. Eristyksen jälkeen solupelletti resuspensoitiin mediumiin ja siirrettiin fibronektiinillä käsitellylle kasvatusalustalle kasvamaan inkubaattoriin.

MACS -eristyskittiin kuului vuohen anti-rotta mikrohelmet, eristyspylväs ja magneetti, johon pylväs asetettiin. Eristetty solususpensio käsiteltiin vasta-

ainelaimennoksella, jossa vasta-ainetta oli 0,5-2  $\mu\text{g}$  100  $\mu\text{l}$ :aan puskuria laimennettuna. Solut resuspensoitiin vasta-aineseokseen ja inkuboitiin jäällä 5 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 2 ml puskuria solususpensioon, jotta ylimääräiset vasta-aineet pestiin pois. Solut sentrifugoitiin pohjaan 300 x g 10 minuutin ajan 4 °C:ssa. Supernatantti pipetoitiin tarkasti pois ja solupelletti resuspensoitiin 80  $\mu\text{l}$  tilavuuteen. Solususpensioon lisättiin 20  $\mu\text{l}$  mikrohelmiä. Solut ja mikrohelmet vorteksoitiin ja inkuboitiin jäällä 15 minuutin ajan, jonka jälkeen pestiin 2 ml:lla puskuria ja sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 300 x g 4 °C:ssa. Supernatantti pipetoitiin tarkasti pois ja sekä solut että mikrohelmet resuspensoitiin 500  $\mu\text{l}$  tilavuuteen. Käytettävä LS -pylväs oli valmisteltu pesemällä se 3 ml:lla puskuria magneettiin asetettuna, jonka jälkeen sinne lisättiin solumikrohelmi-seos suodattamalla steriiliin 77  $\mu\text{m}$  silkin läpi. Pylväs pestiin kolmesti 3 ml:lla puskuria, jonka jälkeen eluoiitiin tarttuneet endoteelisolut irrottamalla pylväs magneetista, lisäämällä 5 ml puskuria pylväaseen ja painamalla puskuri pylvään mukana tulleella männällä läpi ja lopuksi keräämällä eluantti falconputkeen. Kerätyt solut sentrifugoitiin pohjaan 300 x g 10 minuutin ajan ja solupelletti resuspensoitiin solujen mediumiin ja istutettiin fibronektiinillä käsitellylle kasvatusalustalle.

#### 4.2 Hiiren $\text{TNF}\alpha$ -stimulaatio

Ibideille istutettuja endoteelisoluja stimuloitiin hiiren kasvainkuoliotekijä- $\alpha$ :lla ( $\text{mTNF}\alpha$ ) neljästä tunnista kahteen vuorokauteen ennen kapillaarivirtausmenetelmän koetta. Yön yli stimulointi viittaa noin 20 tunnin pituiseen ajanjaksoon.  $\text{TNF}\alpha$ -tekijä on sytokiini, joka aktivoi vaskulaarista endoteelia ja edistää verisuonten läpäisevyyttä leukosyyteille.<sup>4</sup> Hiiren  $\text{TNF}\alpha$  laimennettiin solujen mediumiin 1:100 ja pipetoitiin ibideille, jotka siirrettiin inkubaattoriin stimulaation ajaksi. Hiiren  $\text{TNF}\alpha$ :n loppupitoisuus oli 50 ng/ml.

Kaupallisilla solulinjoilla tehtiin neljän tunnin ja yön yli  $\text{mTNF}\alpha$ -stimulaatiot. EO-MA -soluilla huomattiin yön yli kestävässä stimulaatiossa solujen kuolemaa sekä kykenemättömyyttä tarttua ibidin pintaan tasaiseksi solukerrokseksi. Tästä



syystä EOMA -soluilla pystyttiin tekemään vain neljä tuntia kestävä stimulaatio kapillaarivirtausmenetelmän kokeissa. Primaarisoluille tehtiin vain yön yli kestäviä stimulaatioita ja kerran kahden vuorokauden mittainen stimulaatio.

### 4.3 Leukosyyttieristys

Leukosyytit eristettiin aikuisista villityypin hiiristä, jotka lopetettiin hiilidioksidilla ja sydänpunktiolla. Eristykseen käytettiin perifeerisiä imusolmukkeita nivusista ja kainaloista ja mesenteerisiä imusolmukkeita, jotka sijaitsevat suoliliepeessä vatsakalvokerroksessa. Imusolmukkeet harvestoitiin steriileillä instrumenteilla ja säilöttiin PBS:ssä jäihin. Leukosyyttieristys tehtiin kuitenkin mahdollisimman pian harvestoinnista.

Imusolmukkeet paineltiin petrimaljan päällä homogenisointiverkon läpi 1 ml:n ruiskun männällä, jolla rikottiin imusolmukkeen rakenne. Verkko huuhdottiin kolmesti HEC -mediumilla, jonka jälkeen kerätyt solut sentrifugoitiin pohjaan 300 x g 2 minuutin ajan ja resuspensoitiin solupelletti 1 ml tilavuuteen HEC -mediumia. Solulaskun näyte laimennettiin alkueräisestä solususpensiosta 1:10 trypanblue-liuokseen ja laskettiin Nexelom Cellometer Auto 2000 -laitteella, joka on elektroninen solulaskuri. Tyypilliset tulokset solulaskusta olivat periferisistä imusolmukkeista 8-15 miljoonaa solua/ml ja mesenteerisistä imusolmukkeista 3-10 miljoonaa solua/ml.

### 4.4 Kapillaarivirtausmenetelmän kokeet

#### 4.4.1 Solujen istutus virtauskammioon

Sopiva solutiheys ibideille testattiin istuttamalla erilaisilla tiheyksillä soluja ja kasvatettiin niitä yön yli kanavassa. Arvioitiin, että solutiheys olisi seuraavana päivänä konfluentti. Konfluenssilla tarkoitetaan tasaista ja aukotonta solukerrostta, jolloin solut ovat täysin peittäneet kasvatusalustansa. 3B11- ja EOMA -soluilla testattiin 1,5-3,5 miljoonaa solua/ml. Parhaimmaksi tiheydeksi todettiin

molemmilla soluilla 1,5 miljoonaa solua/ml. Solut irrotettiin kasvatuspulloista trypsiini-EDTA:lla, sentrifugoitiin pohjaan ja resuspendoitiin 1 ml tilavuuteen mediumia, jonka jälkeen solutiheys laskettiin. Tarvittavien solujen määrä laskettiin ja otettiin soluja niin, että lopputilavuudeksi tuli 100  $\mu$ l, josta otettiin 50  $\mu$ l laimennettua solususpensiota ja pipetoitiin ibidiin. Solujen annettiin tarttua kanavaan tunnin ajan inkubaattorissa, jonka jälkeen kanava täytettiin mediumilla.

#### 4.4.2 Kapillaarivirtausmenetelmän kokeet

Kapillaarivirtausmenetelmän kokeissa stimuloitujen solujen liitettiin kapillaarivirtausmenetelmän laitteistoon ja koe aloitettiin ajamalla ajopuskuriliuosta ibidin läpi kolmen minuutin ajan. Leukosyytit syötettiin ibidiin kahden ml tilavuudessa ruiskun kautta ja solujen annettiin virrata 10 minuutin ajan, kunnes ruisku oli tyhjentynyt. Ajopuskurin annettiin virrata solukäsittelyn jälkeen ibidin kuvaamisen ajan.

3B11-soluille tehtiin yhteensä kuusi koetta, joista kolme oli neljän tunnin stimulaatioita ja kolme yön yli kestäviä stimulaatioita. Molemmille kolmen kokeen sarjalle tehtiin samanlaiset ajot: ensimmäiseen kammioon laitettiin virtaamaan 1,5 miljoonaa leukosyyttisolua, toiseen 4 miljoonaa solua ja kolmantena tehtiin stationäärin koe, jossa solumedium pipetoitiin kammion pois ja pipetoitiin 0,5 miljoonaa solua 100  $\mu$ l tilavuudessa kammioon ja seisotettiin ibidiä viiden minuutin ajan huoneenlämmössä tasaisella alustalla. Kahden ensimmäisen kokeen aikana virtausnopeus oli 8,6 ml/h, mutta stationäärin kokeeseen virtauksiksi valittiin 17,2 ml/h.

EOMA-soluille tehtiin neljän tunnin stimulaation jälkeen kolme kapillaarivirtausmenetelmän koetta vastaavasti kuin 3B11-soluillekin: 1,5 miljoonaa solua, 4 miljoonaa solua ja 0,5 miljoonalla solulla stationäärinen koe. Virtausnopeudet olivat samat kuin 3B11-solulinjalla.

Primaarisoluille tehtiin ensimmäinen koe yön yli stimuloituille sydämestä eristetyille endoteelisoluille, joihin ajettiin ensin 4 miljoonaa solua 15 minuutin ajan.

Kaksi vuorokautta stimuloituille sydämen endoteelisoluille tehtiin koe, jossa 4 miljoonaa solua laitettiin virtaamaan kammion läpi 7 minuutin ajan. Keuhkoista ja sydäimestä eristetyille endoteelisoluille tehtiin kolmen kokeen sarja, kuten käytetyille solulinjoillekin. Ensimmäisenä ajettiin 1,5 miljoonaa solua, toisena neljä miljoonaa solua ja kolmantena 0,5 miljoonan solun stationäärikoe. Kaikissa kokeissa virtauksena käytettiin 17,6 ml/h, koska endoteelisolujen oletettiin tarttuneen tarpeeksi hyvin alustaansa pitkän kasvatusajan seurauksena.

#### 4.5 Virtauskanavien fluoresenssivärjäykset

Ibideissä olevat primaarisolut säilöttiin kapillaarivirtausmenetelmän kokeen jälkeen 4 % paraformaldehydillä 15 minuutin ajan jäällä, jonka jälkeen kanava huuhdeltiin kahdesti PBS:llä. Kanavat värjättiin vasta-ainelaimennoksilla, jotka tehtiin EPICS I -puskuriin. Kanavat täytettiin PBS:llä, suojattiin valolta foliolla ja varastoitettiin 4 °C:n lämpötilaan jääkaappiin. Värjäykset tehtiin viidelle ibidille seuraavan taulukon mukaisesti ja värjäyksien onnistuminen tutkittiin fluoresenssimikroskoopilla (Olympus IX70).

Taulukko 1. Käytetyt vasta-aineet ibidien värjäyksissä

Ibidit	Primaarinen vasta-aine	Sekundaarinen vasta-aine	Suorakonjugoitu vasta-aine
1.	CD31 10 µg/ml	Anti-rat Alexa 546 1:200 + 5% NMS	-
2.	LYVE-1 10 µg/ml	Anti-rabbit A546 1:200 + 5% NMS	-
3.	LYVE-1 10 µg/ml	Anti-rabbit A546 1:200 + 5% NMS	CD31-488 10 µg/ml

#### 4.6 Immunofluoresenssivärjäykset

Kapillaarivirtausmenetelmän kokeissa käytetyt solulinjat värjättiin ja analysoitiin virtausytometriaa varten. 3B11- ja EOMA -solut värjättiin CD31- ja CD102-vasta-aineilla ja negatiivisina kontroleina käytettiin värjäämättömiä soluja. CD31 ja CD102 valittiin tunnistusmolekyyleiksi, koska ne ovat endoteelisolujen anti-geenejä. Soluja otettiin värjykseen 500 000 solua värjättävää vasta-ainetta kohden kummastakin solulinjasta. Käytetyt vasta-aineet olivat primaarisia, joten nämä värjäykset vaativat sekundaarisen vasta-aineen, jossa on fluoresoiva leima.

Konsentraationa primaarivasta-ainevärjäyksissä käytettiin 10 µg/ml. Sekundääriä käytettiin vuohen anti-rotta IgG Alexa Fluor 488 laimentamalla 1:100 ja lisäämällä 5 % NMS. Solut värjättiin primaarivasta-aineessa 20 minuutin ajan jäällä, pestiin EPICS I:llä kahdesti, inkuboitii sekundaarilla 30 minuutin ajan jäällä, pestiin EPICS I:llä ja EPICS II:lla, jonka jälkeen säilöttiin näytteet EPICS Fix:n valolta suojattuna folioon. Värjätyt solut ajettiin BD FACSCalibur -laitteella ja käsiteltiin analysointiohjelmalla. Liitteissä 5-12 nähdään 3B11- ja EOMA -solujen histogrammikuvaajat.

## 5 TULOKSET

### 5.1 Endoteelisolujen eristys

Paremmaksi todettiin MACS -kitti suuremman solusaannon ja onnistuneemman viljelyn perusteella. Primaaristen endoteelisolujen eristys saatiin kohtuullisen hyvin toimivaksi systeemiksi. Solujen saantimäärä ei kuitenkaan ollut suuri ja ne eivät jakaantuneet tarpeeksi nopeasti. Solujen saannin huomattiin kasvavan käyttämällä enemmän kudosta lähtömateriaalina. Pidemmät inkubointiajat MACS -eristyskitillä huomattiin suurentavan solusaantoa. Solujen vasta-ainekäsittelyssä vasta-ainekonsentraatiota suurentamalla hieman suositusten yli saatiin paras solusaanti. Parhaimmat tulokset lyhyimmässä ajassa saatiin, kun istutettiin eristetyt primaarisolut suoraan ibidiin, jolloin solut kasvoivat nopeimmin konfluenteiksi ja ne pystyttiin käyttämään virtauskokeessa.

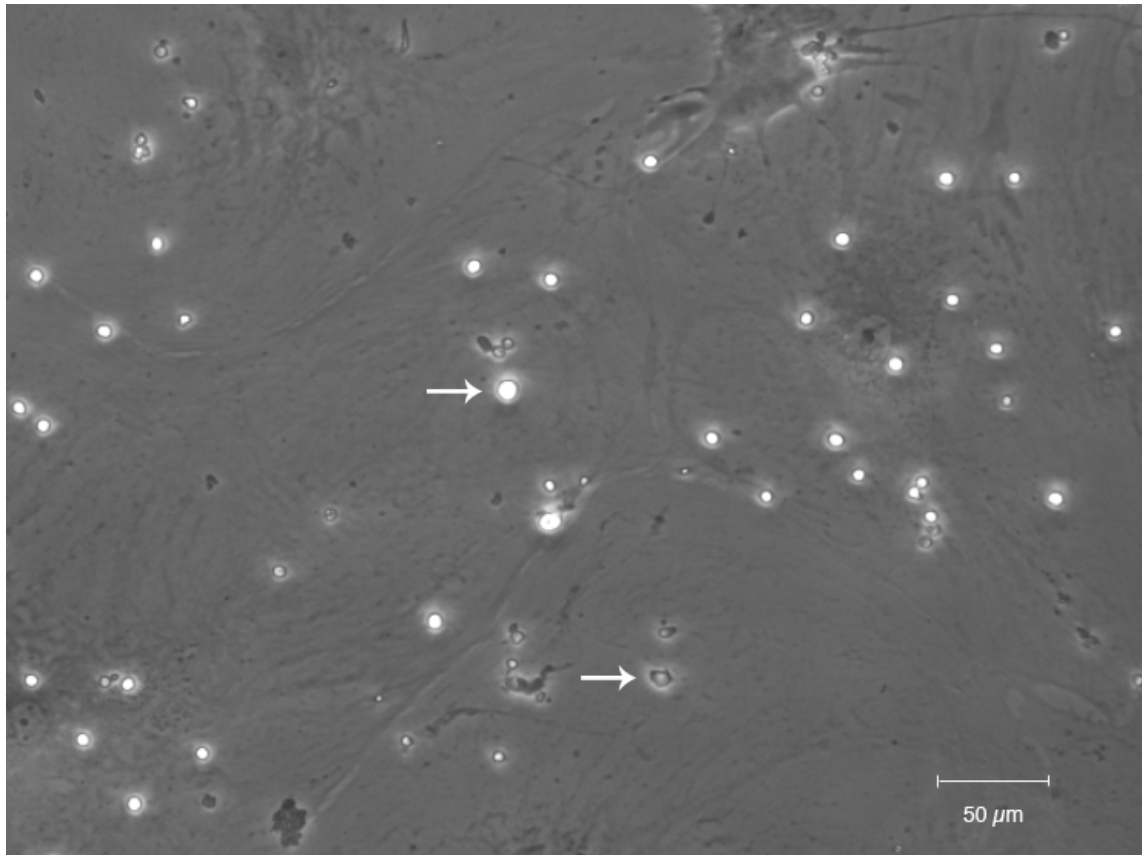
### 5.2 Virtauskapillaarimenetelmän kokeet

Virtauskapillaarimenetelmän kokeiden tulokset laskettiin laitteistolla kuvatuista kymmenestä kentästä, jotka edustivat kymmentä eri kohtaa virtauskammiossa. Näistä kymmenestä kohdasta laskettiin tarttuneiden leukosyyttien lukumäärät. Kentistä pystyttiin laskemaan keskiarvo yhtä kenttää kohden. Jos solukerros ei ollut täysin konfluentti, arvioitiin konfluenssi silmämääräisesti ja määritettiin prosenttiosuus, jonka endoteelisolut peittivät kentästä. Tämän prosenttiosuuden mukaan laskettiin tarttuneet leukosyytit ja arvioitiin leukosyyttien lukumäärä, jos endoteelisolut olisivat olleet konfluentit. Näin saatiin korjauskaava, mitä käyttämällä voitiin arvioida teoreettisesti oikea tarttuneiden leukosyyttien lukumäärä.

Korjauskaava on  $\frac{\text{leukosyytit}}{\text{konfluenssi}} \cdot 100\%$

Kuvasta 6 nähdään valkoisina leukosyytit, jotka ovat tarttuneet endoteeliin. Nuolet osoittavat vaaleaa tarttunutta leukosyyttiä ja tummaa transmigroitunutta leu-

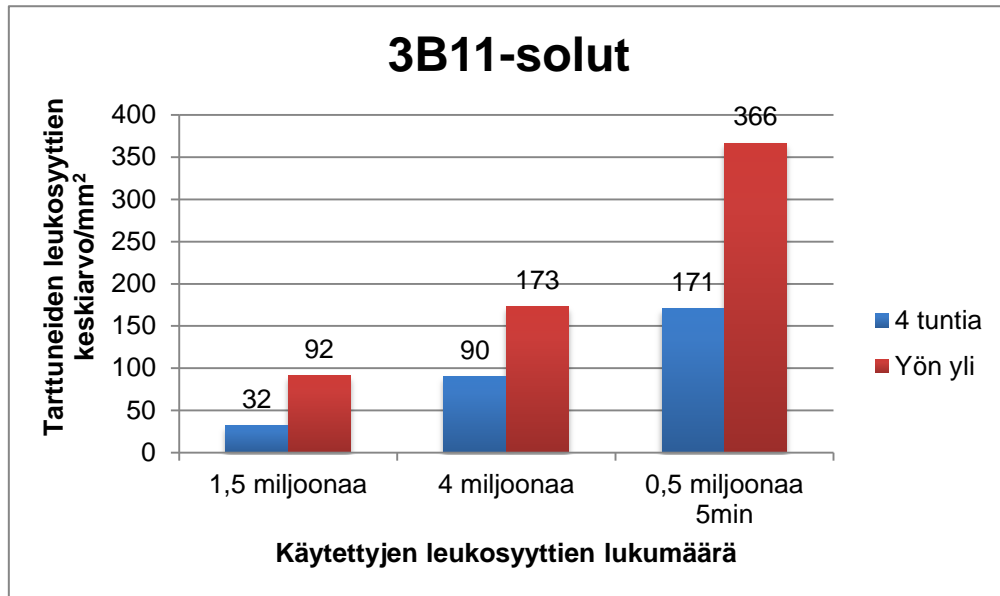
kosyyttiä. Hieman tummempina alueina nähdään transmigroituneet leukosyytit. Kyseisestä kentästä voidaan laskea tarttuneet solut.



Kuva 6. Kapillaarivirtausmenetelmän kuva, jossa nuolet osoittavat vaaleaa tarttunutta leukosyyttiä ja tummempaa transmigroitunutta leukosyyttiä.

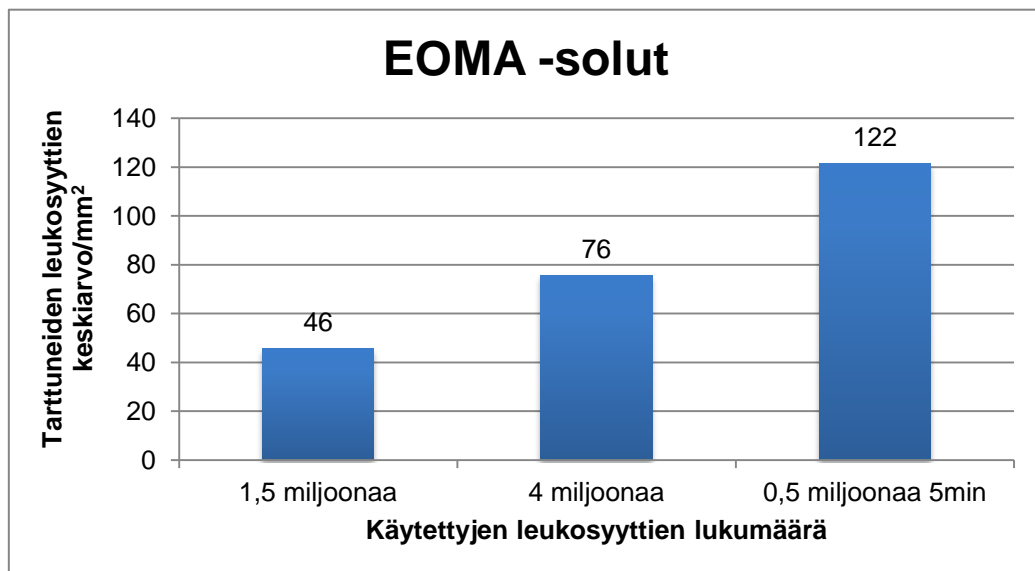
### 5.2.1 Solulinjat

3B11-solujen kapillaarivirtausmenetelmän kokeiden kuviosta 1 nähdään, että tarttuneiden solujen lukumäärä kenttää kohden kasvoi, mitä enemmän virtaavia soluja kammiossa käytettiin ja mitä kauemmin endoteelia stimuloitiin sytokiinilla. Liitteen 11 esimerkin mukaisesti laskettiin tarttuneiden leukosyyttien lukumäärä pinta-alayksikköä kohden kentän koon avulla.



Kuvio 1. 3B11-solujen kokeet

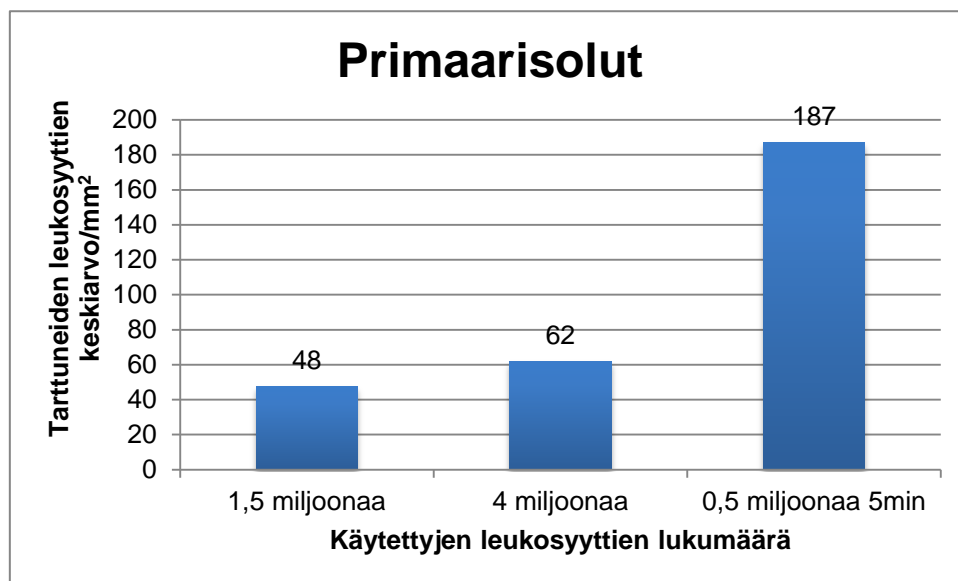
EOMA -solujen kokeiden tuloksista nähdään kuviosta 2, että tarttuneiden solujen lukumäärä nousi virtauksessa käytettyjen solujen lukumäärän mukaan. Tarttuneiden leukosyyttien lukumäärä laskettiin pinta-alayksikköä kohden.



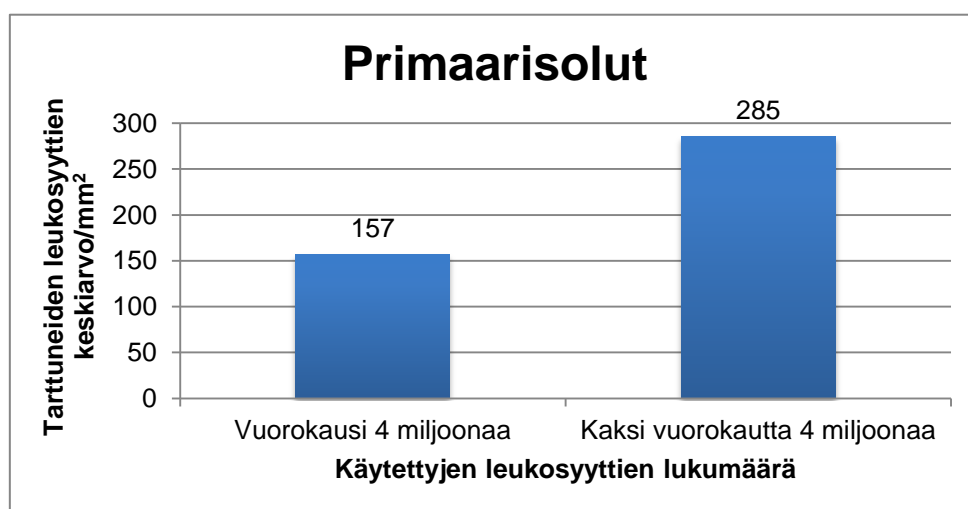
Kuvio 2. EOMA -solujen kokeet: 4 tunnin stimulaatio

### 5.2.2 Primaarisolut

Kuviosta 3 nähdään, että käytettyjen solujen määrä virtauskammiossa on yhteydessä tarttuneiden solujen lukumäärään endoteelissa. Suuremmalla käytetyllä solumäärällä tarttuu enemmän soluja. Kahden vuorokauden stimuloitajalla saatiin virtaavia soluja tarttumaan aikaisempia kokeita enemmän, joka nähdään kuviosta 4.



Kuvio 3. Primaarisolujen kokeet osa 1: yön yli stimulaatio

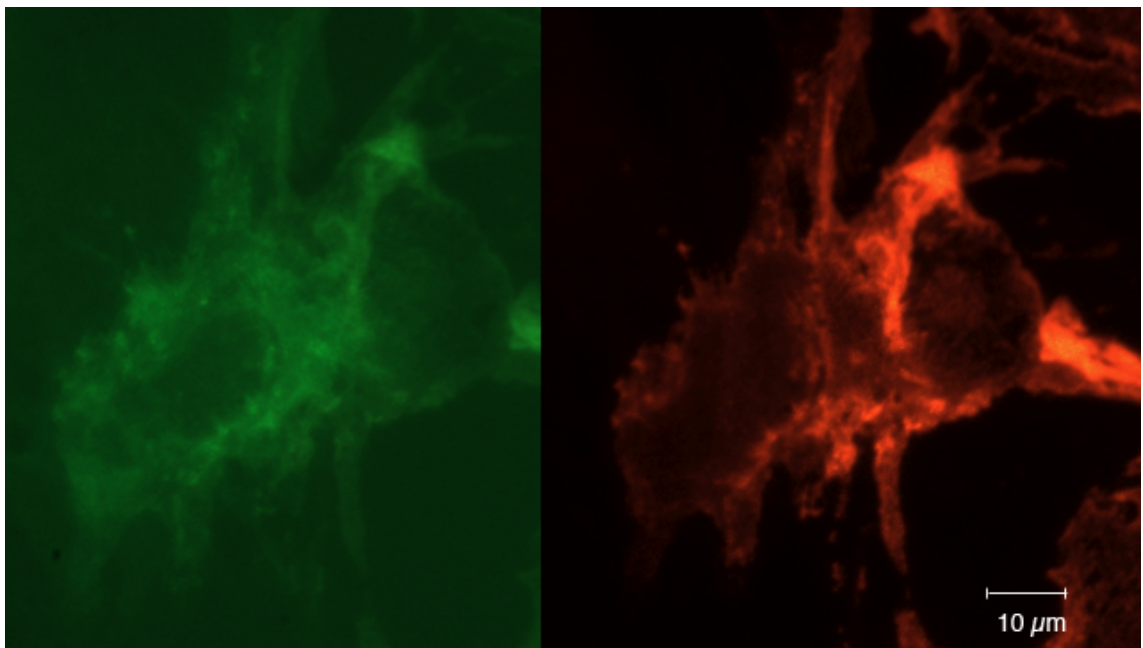


Kuvio 4. Primaarisolujen kokeet osa 2: vuorokauden ja kahden vuorokauden stimulaatiot



### 5.3 Värjäykset

Ibideissä kasvatetut primaariset endoteelisolut, jotka eivät kasvaneet tarpeeksi konfluenteiksi kapillaarivirtausmenetelmän kokeita varten, värjättiin fluoresoivilla vasta-aineilla ja tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla. Kuvasta 7 nähdään, että kuvassa oleva solu on värjäytynyt vihreällä CD31-488 suorakonjugoidulla verisuonen endoteelisolun tunnistavalla vasta-aineella, mutta ei imusuoniston markkerilla LYVE-1 punaisella fluoresenssivärillä.



Kuva 7. Fluoresenssivärjäys primaarisesta endoteelisolusta: vasemmalla CD31 värjäys ja oikealla LYVE-1

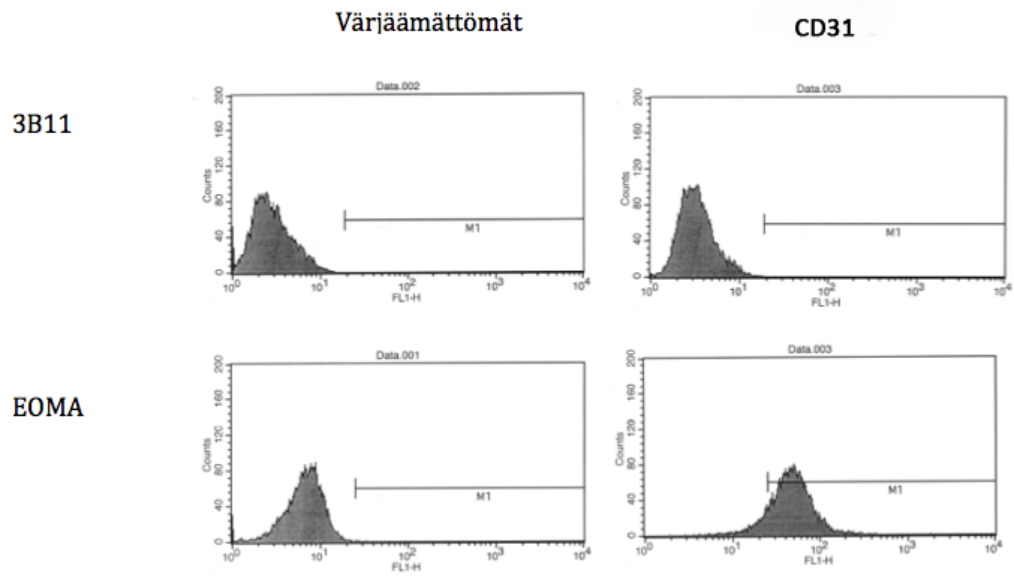
Liiteistä 5-10 nähdään 3B11- ja EOMA -solujen immunofluoresenssivärjäysten virtaussytometriset analyysit. Histogrammeista havaitaan, että 3B11-solujen kontrollina käytettyjen värjäämättömien solujen ja CD31 ja CD102 värjäysten välillä ei ole huomattavaa muutosta histogrammin asettumisessa. Analyyseistä voidaan laskea kontrollin ja värjäyksen rajattujen alueiden erotus, joka kertoo, kuinka paljon soluja on alueen rajojen sisällä koko solumäärästä. Rajattujen alueiden tulokset ovat kaikissa muissa värjäyksissä 0 paitsi CD102 värjäyksessä 0,06. Analyyseistä päätellen 3B11-solut eivät ilmennä CD31- eivätkä CD102-antigeeniä, ja siksi histogrammi ei ole muuttunut kontrolleihin verrattuna.

EOMA -solujen värjäämättömien kontrollien sekä CD31 että CD102 värjäysten välillä on selvä ero. CD31 histogrammi on selvästi siirtynyt ja CD102 on siirtynyt enemmän. Rajattujen otosten erotukset näkyvät taulukosta 2. Siirtynyt histogrammi ja otosten erotukset kertovat, että EOMA -solut ovat CD31- ja CD102-vasta-aineelle positiivisia, joka osoittaa niiden ilmentävän kyseisiä antigeenejä.

Virtaussytometrisistä tutkimuksista voidaan negatiivisten kontrollisolujen avulla määrittää alue, jolle värjättyjen solujen tulisi osua kuvaajassa. Tämän alueen arvoksi määritetään lähes 0 kontrollisoluilla. Negatiivisen kontrollin avulla voidaan kuvaajista nähdä ja tuloksista laskea kontrollin ja värjäyksen välinen erotus. Tämä arvo kertoo, kuinka paljon prosentuaalisesti soluista osuu määritetyn alueen sisälle. Taulukosta 2 nähdään EOMA-solujen erotusten arvot eri värjäyksillä. Kuvasta 8 nähdään 3B11- ja EOMA –solujen värjäämättömien solujen ja CD31 värjäysten histogrammit vertailtuna keskenään. Histogrammien siirtyminen näkyy selvästi EOMA -solujen CD31 värjäyksessä. 3B11-solujen histogrammi ei ole siirtynyt rajatun otoksen alueelle CD31 värjäyksessä ja alueiden arvojen väliset erotukset olivat 0.

Taulukko 2. EOMA –solujen värjäysten ja erotukset

EOMA	Rajattu alue	Värjäys – Kontrolli
Värjäämättömät kontrollisolut	0,04	0
CD31	88,76	88,72
CD102	99,91	99,87



Kuva 8. Värjäysten histogrammit

## 6 PÄÄTELMÄT

Primaaristen endoteelisolujen eristäminen ja kasvattaminen on haastavaa, ja siihen on yritetty löytää tehokas ja toimiva menetelmä. Menetelmän kehittäminen olisi erittäin tärkeää, sillä ryhmässä tehdään paljon tutkimusta poistogeenisillä hiirillä. Näiden hiirten endoteelisolujen ja leukosyyttien välisten interaktioiden seuraaminen *in vitro* –menetelmällä avaisi uusia näkymiä tutkimukseen.

Tutkimusprojektiin valittiin kaupallisista solulinjoista 3B11- ja EOMA –solut, jotka vaihtoehdoista parhaiten kasvoivat soluviljelyolosuhteissa. Kaupallisista solulinjoista saatiin hyvät vertailuun kelpaavat solut, koska kaikkia virtauskokeita ei pystytty tekemään primaarisoluilla alhaisen solusaannin takia. Solulinjoista EOMA –solut ulkonäöllisesti muistuttivat enemmän eristettyjä primaarisia soluja. Molemmat näistä olivat litteämpiä ja levittäytyivät isommalle alueelle. 3B11-solut olivat ulkonäöllisesti enemmän HUVEC –solujen kaltaisia. HUVEC –solut ovat napanuorista eristettyjä ihmisen endoteelisoluja.<sup>28</sup> 3B11- ja HUVEC –solut olivat molemmat pyöreämpiä muodoltaan ja veivät hieman vähemmän pinta-alaa kiinnittymisalustaltaan verrattuna primaarisiin soluihin ja EOMA –solulinjaan.

Solulinjoja tutkittiin immunofluoresenssivärjäyksillä ja analysoimalla värjäykset virtausytometrillä. 3B11- ja EOMA -solujen virtausytometriset analyysit osoittivat EOMA -solujen olevan CD31 ja CD102 positiivisia, mutta 3B11-solut eivät värjäysten mukaan olleet. Värjäyksistä voidaan päätellä, että EOMA -solut ovat endoteelisoluja, mutta 3B11-soluista värjäyksen mukaan varmistusta ei saatu. Kyseenalaiseksi jää, miksi 3B11-solut eivät ilmentäneet endoteelisoluille tyypillisiä antigeenejä. Mahdollinen syy 3B11-solujen antigeenien ilmentämättömyyteen voi olla, että soluja oli viljelty liian pitkään. Pitkään kasvatetut immortalisoidut solut muuttuvat helposti ja voivat menettää fenotyypinsä.

Virtauskanavien värjääminen oli sopivin tapa tutkia primaarisia soluja. Solut voitiin ensin käyttää kapillaarivirtausmenetelmän kokeissa, minkä jälkeen kanavat säilöttiin fiksatiiviin ja värjättiin. Fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltiin värjäysten tulokset ja pystyttiin erottamaan, ovatko eristetyt solut verisuonen vai mah-

dollisesti imusuoniston endoteelisoluja. Mikroskopoimalla löydettiin virtauskanavista verisuonen endoteelisoluja, joten eristyksessä oli suurimmaksi osaksi saatu eroteltua oikeita endoteelisoluja. Molemmat värjäysmenetelmät ovat teknisesti samanlaisia, koska niissä molemmissa käytettiin fluoresoivia vasta-aineita joko suorakonjugaattina tai primaarisina ja sekundaarisina. Primaarisille soluille FACS -värjäys ei soveltunut, koska solumäärä eristyksen jälkeen oli liian alhainen ja solut olisi menetetty analysoitaessa. Virtauskanavan värjäyksellä solut hyödynnettiin kokonaisvaltaisesti.

Eristysmenetelmän kanssa tehdyillä kokeilla saatiin eristettyä endoteelisoluja hiiren sydäimestä ja keuhkoista. Paremmaksi menetelmäksi todettiin MACS –eritysmenetelmä. Soluja saatiin huomattavasti enemmän ja syynä on mahdollisesti MACS –menetelmän uudempi teknologia verrattuna dynabeadseihin. MACS –menetelmän helmet olivat pienemmän kokoisia, hellävaraisempia ja myrkyttömiä soluille.<sup>24</sup> Sydän- ja keuhkokudosten solusaantoverailussa ei huomattu merkittäviä eroja, mutta eristysvaiheen vasta-aine- ja helmikäsittelyai-koja pidentämällä huomattiin hieman korkeammat solusaannot. Jatkossa solusaannon nousua voitaisiin testata pidemmällä inkubaatioajoilla. Solusaanto eristyksessä ei kuitenkaan ole vielä tarvittavan tehokas, joten menetelmää tulisi testata jatkossa tarkemmin. Endoteelisoluja kuitenkin saatiin eristettyä ja viljel-tyä, jolloin niille pystyttiin tekemään adheesiokokeita kapillaarivirtausmenetel-mällä.

Eristysmenetelmään otettiin vaikutteita Lim Y. *et al.*<sup>23</sup> tieteellisestä artikkelista, jossa menetelmä oli toiminut tulosten mukaan hyvin. Eroavaisuuksia artikkelin ja käytetyn menetelmän välillä oli käytettyjen hiirten ikä, kudosten hajotusmenetelmä sekä erottelumenetelmä. Artikkelissa käytetyt hiiret olivat 8-10 viikon ikäisiä, kun tämän työn menetelmässä alle 10 vuorokauden ikäisiä. Vanhempien hiirten kudokset ovat kooltaan ja solumäärältään suuremmat, mutta jakautuvat hitaammin ja vähemmän kuin nuorempien hiirten. Vanhempien hiirten kudosten käyttö olisi mahdollisesti parempi vaihtoehto, jos soluja ei tulla viljelemään pit-kää ajanjaksoa, vaan tullaan käyttämään hyödyksi pian eristyksen jälkeen. Tällä perusteella vanhempien hiirten käyttö voisi parantaa solusaantia eristysmene-

telmässä. Hajotusmenetelmän mallina käytetty menetelmä erosi testatusta menetelmästä saksien käytöllä sekä pidemmällä kollagenaasiliuoksen inkubaatioajalla. Kollagenaasikäsitteilyä olisi siis mahdollista pidentää ja mekaanista hajotusmenetelmää varioimalla. MACS –eristysmenetelmän käyttö valittiin, koska se on menetelmänä uudempi verrattuna dynabeadseihin.

Endoteelia stimuloitiin kapillaarivirtauksen kokeisiin neljän tunnin ajan, yön yli ja kahden vuorokauden ajan. Nämä stimulaatiot oli käytännöllisimmät työskentelyn toteuttamisen kannalta. Valitut stimuloitajat ovat hyvät vertailuun toistensa kanssa, koska neljän tunnin stimulaatio on selvästi lyhyempi ajanjakso kuin melkein vuorokauden pituinen yön yli stimulaatio. Endoteelia olisi jatkossa mahdollista stimuloida jollakin toisella tulehdusta aiheuttavalla tekijällä, jolloin saataisiin vertailukohde hiiren kasvainkuoliotekijä- $\alpha$ :n stimulaatiolle. Stimulantin konsentraatiota korkeammaksi muuttamalla olisi mahdollista saada lisää leukosyyttejä tarttumaan ja saada leukosyyttejä transmigroitumaan enemmän, jolloin kokeen pääpaino olisi transmigraatiolla.

Leukosyyttien adheesiokokeiden tulosten perusteella voidaan sanoa menetelmän pystytyksen onnistuneen, koska hiiren kasvainkuoliotekijä- $\alpha$ -stimulaatiolla saatiin leukosyyttejä tarttumaan endoteeliin. Tarttuneiden leukosyyttien määrä kasvoi sekä virtaavan leukosyyttimäärän että hiiren kasvainkuolio- $\alpha$ -stimulaation mukaan. Leukosyyttipitoisuuksien perusteella eniten leukosyyttejä tarttui stationäärisissä kokeissa. Viiden minuutin seisotuksissa leukosyyteillä on helpompi tarttua endoteeliin ilman virtausta. Toisaalta virtauskokeissa olosuhteet muistuttavat enemmän todenmukaista tilannetta verisuonissa ja mahdollistaa pyörimisen havainnoinnin. Leukosyyteille ei kokeissa tehty erottelua, jolla olisi saatu jokin tietty leukosyyttityyppi kapillaarivirtausmenetelmän kokeeseen. Jatkossa olisi mahdollista tehdä esimerkiksi neutrofiilien erottelu, jolloin nähtäisiin vain neutrofiilien tai vastaavasti muiden leukosyyttien käyttäytyminen kokeissa.

Tämän työn tuloksia tullaan hyödyntämään endoteelisolujen tutkimuksessa. Kohteena tälle olisivat poistogeeniset hiirikannat, joilla esiintyy endoteelisolujen adheesiomolekyylien puutostiloja. Mahdollisesti muuttunutta adheesiota pystyt-

täisiin tarkkailemaan kapillaarivirtausmenetelmän kokeilla. Uusien adheesiomolekyylien tutkimus edistää tietämystä valkosolujen kulkeutumismekanismeista ja mahdollistaa uudenlaisten adheesion vastaisten terapiamuotojen hyödyntämisen tulevaisuudessa hoitomuotona erilaisissa tulehduksellisissa taudeissa.

## LÄHTEET

- <sup>1</sup> Turku Science Park Oy. 2013. Akatemiaprofessori Sirpa Jalkanen seuraa solujen liikkeitä. Viitattu 16.5.2014. <http://www.turkusciencepark.com/fi/spark-utiset/1073/akatemiaprofessori-sirpa-jalkanen-seuraa-solujen-liikkeita/>.
- <sup>2</sup> Butcher E. C. 1991. Leukocyte-Endothelial Cell Recognition: Three (or More) Steps to Specify and Diversity. *Cell*. Vol. 67 1033-1036. Cell Press.
- <sup>3</sup> WISC-online. 2012. White Blood Cells. Viitattu 17.5.2014. <http://www.wisc-online.com/objects/ViewObject.aspx?ID=AP14704>.
- <sup>4</sup> Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. & Shlomchik, M. J. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing 2001. s. 72-75.
- <sup>5</sup> Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. Vol. 7 678-689. 2007. Nature Publishing Group.
- <sup>6</sup> Auvinen, K. 2009. VAP-1 in Leukocyte Trafficking. *Painosalama Oy*. s.11-12.
- <sup>7</sup> Keuschnigg, J. 2013. PV-1: Leukocyte Trafficking Molecule and Vascular Marker. s. 20-33.
- <sup>8</sup> Nourshargh, S.; Hordijk, P. L. & Sixt, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 11 366-372. 2010. Macmillan Publishers Limited.
- <sup>9</sup> Center for Cancer Research. Vol. 3 No. 2. 2009. viitattu 17.5.2014. [http://home.ccr.cancer.gov/connections/2009/vol3\\_no2/docs/feature3.pdf](http://home.ccr.cancer.gov/connections/2009/vol3_no2/docs/feature3.pdf).
- <sup>10</sup> Merriam Webster Incorporated. 2014. In vitro. Viitattu 3.6.2014. <http://www.merriam-webster.com/dictionary/in%20vitro>.
- <sup>11</sup> Hamann, A. & Engelhardt, B. *Leukocyte Trafficking*. 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. s. 403-411.
- <sup>12</sup> Merriam Webster Incorporated. 2014. In vivo. Viitattu 3.6.2014. <http://www.merriam-webster.com/dictionary/in%20vivo>.
- <sup>13</sup> Hamann, A. & Engelhardt, B. *Leukocyte Trafficking*. 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. s. 497-507.
- <sup>14</sup> Germain, R. N.; Robey, E. A. & Cahalan, M. D. A Decade of Imaging Cellular Motility and Interaction Dynamics in the Immune System. *Science* 2012.
- <sup>15</sup> ATCC. 2014. CRL 2160. Viitattu 11.3.2014. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2160.aspx#generalinformation>.
- <sup>16</sup> ATCC. 2014. Characteristics. Viitattu 11.3.2014. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2160.aspx#characteristics>.
- <sup>17</sup> ATCC. 2014. CRL 2586. Viitattu 3.4.2014. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2586.aspx>.
- <sup>18</sup> Terve Media Oy. 2014. Hemangioendotelioma. Viitattu 3.4.2014. <http://www.tohtori.fi/?page=4069997&search=hemangioendotelioma>.



- <sup>19</sup> ATCC. 2014. Characteristics. Viitattu 3.4.2014. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2586.aspx#characteristics>.
- <sup>20</sup> Freshney, R. I. 2000. Culture of Animal Cells. Wiley-Liss Inc. s. 149-151.
- <sup>21</sup> ATCC. 2014. Culture method. Viitattu 3.4.2014. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2586.aspx#culturemethod>.
- <sup>22</sup> ATCC. 2014. Culture method. Viitattu 11.3.2014. <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2160.aspx#culturemethod>.
- <sup>23</sup> Lim, Y.; Garcia-Cardena, G.; Allporti, J. R.; Zervoglos, M.; Connolly, A. J.; Gimbrone, M. A & Luscinskas, F. W. Heterogeneity of Endothelial Cells from Different Organ Sites in T-Cell Subset Recruitment. 2003. American Journal of Pathology. Vol. 162 no 5.
- <sup>24</sup> Miltenyi Biotec. 2014. MACS cell separation. Viitattu 12.3.2014. [https://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/macs-technology/microbeads\\_dp.aspx](https://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/macs-technology/microbeads_dp.aspx).
- <sup>25</sup> Life Technologies. 2014. Dynabeads. Viitattu 12.3.2014. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11035?ICID=search-11035>.
- <sup>26</sup> Miltenyi Biotec. 2014. Columns. Viitattu 31.3.2014. <https://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/manual-cell-separation/columns/lc-columns-1.aspx>.
- <sup>27</sup> Oregon State University. 2013. Flow cytometry. Viitattu 31.3.2014. [http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/flow\\_06](http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/flow_06).
- <sup>28</sup> ATCC. 2014. CRL-1730. Viitattu 3.6.2014. [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1730.aspx?geo\\_country=fi](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1730.aspx?geo_country=fi).

## Solujen mediumit

HEC

RPMI-1640 Sigma R0883 500 ml

+ 5 ml 100 x l-glutamiini

+ 10 % FCS

+ 640 µl P/S

3B11

Sigma D6429 Dulbecco's Modified Eagle Medium 500 ml

+ 10% FCS

+ 4,64 ml 7 % NaHCO<sub>3</sub>

+ 640 µl P/S

EOMA

Sigma D6429 Dulbecco's Modified Eagle Medium 500 ml

+ 10% FCS, ei inaktivoitu

+ 4,64 ml 7 % NaHCO<sub>3</sub>

+ 640 µl P/S

PromoCell Endothelial Cell Growth Medium (Ready-to-use) C-22010 500 ml

+ 640 µl P/S

+ 18 % FCS

## **Puskuriliuokset ja kollagenaasiliuos**

### PBS

Sigma D8537 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Modified without calcium chloride and magnesium chloride

### Dynabeads

Sigma D8537 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Modified without calcium chloride and magnesium chloride

+ 0,1% BSA

+ 2mM EDTA

### MACS -kitti

Sigma D8537 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Modified without calcium chloride and magnesium chloride

+ 0,5% BSA/FCS

+ 2mM EDTA

### Kollagenaasi

5ml PBS with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  THL Tuote 906

+ 5mg Kollagenaasi II

+ 5mg kollagenaasi IV

+ 1 mg DNase I

Ajopuskuriliuos

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with  $MgCl_2$  and  $CaCl_2$

+ 0,1% Human Serum Albumin

## **EPICS-puskurit**

### EPICS I

400 ml EPICS-PBS

1 ml 4% NaN<sub>3</sub>

8 ml FCS

### EPICS II

400 ml EPICS-PBS

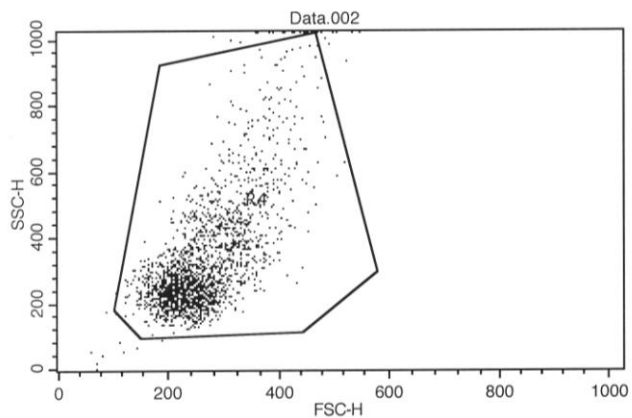
1 ml 4% NaN<sub>3</sub>

### EPICS fix

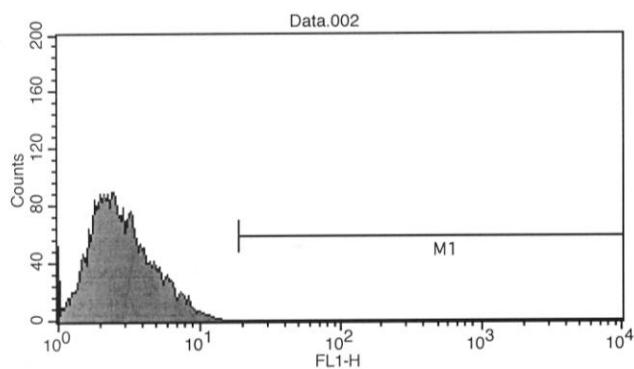
400 ml EPICS-PBS

10,8 ml 37% formaldehydi

Vasta-aineet					
Vasta-aine	Valmistaja	Valmistuseläin ja kohde-eläin	Konsentraatio	Klooni	Tuotenumero
CD31	BD Pharmingen	Rat anti-mouse	0,5 mg/ml	MEC 13.3	553370
CD31 NA/LE	BD Pharmingen	Rat anti-mouse	1,0 mg/ml	MEC13.3	553369
CD102	BD Pharmingen	Rat anti-mouse	1,0 mg/ml	3C4 (mLC2/4)	553325
CD31-488	BD Pharmingen	Rat anti-mouse	0,5 mg/ml	MEC 13.3	102514
LYVE-1	Reliatech GmbH	Rabbit anti-mouse	2 mg/ml	-	103-PA50
Alexa Fluor 488	Sigma Aldrich	Goat anti-rat	2 mg/ml	IgG-FITC	F6258-2ml
Alexa Fluor 546	Life Technologies	Goat anti-rabbit	2 mg/ml	IgG	A11035



3B11-solut  
värjäämättömät



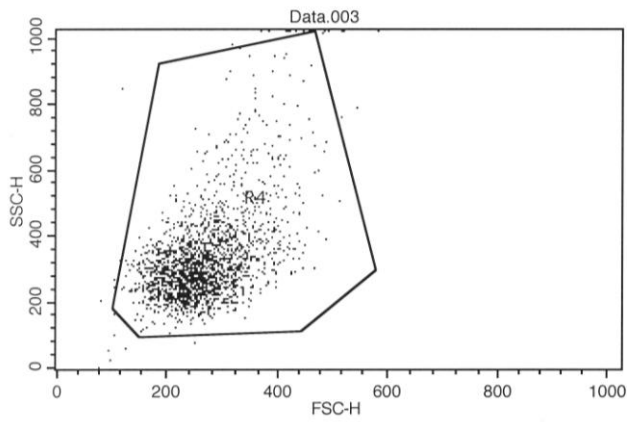
Histogram Statistics

File: Data.002  
Sample ID: ak-1  
Tube: Untitled  
Acquisition Date: 25-Oct-13  
Gated Events: 9787  
X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
Patient ID:  
Panel: Untitled Acquisition Tube List  
Gate: G4  
Total Events: 10000

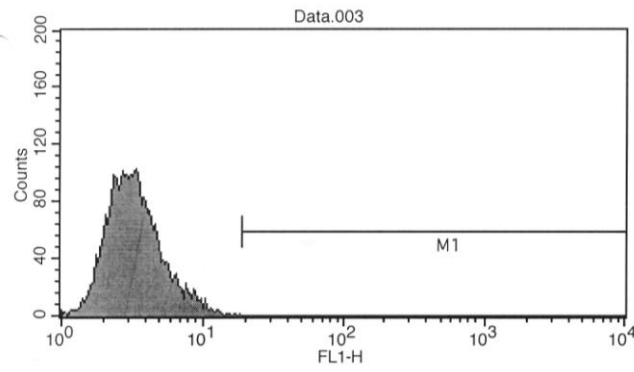
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	M
All	1, 9910	9787	100.00	97.87	3.18	2.82	55.17	
M1	19, 9910	0	0.00	0.00	***	***	***	





3B11-solut

CD31

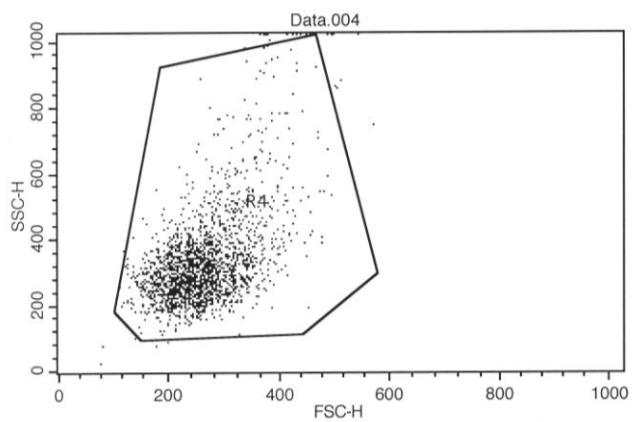


Histogram Statistics

File: Data.003  
 Sample ID: ak-1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 25-Oct-13  
 Gated Events: 9864  
 X Parameter: FL1-H (Log)

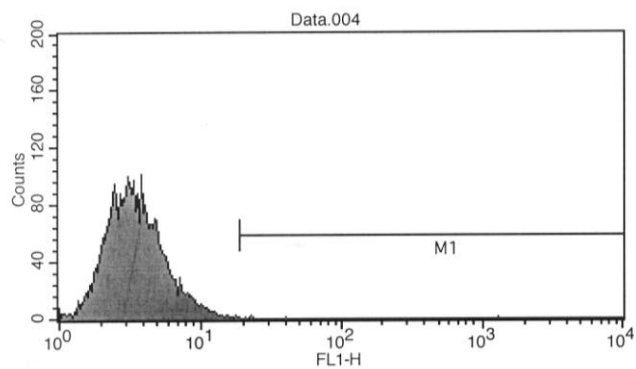
Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G4  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV
All	1, 9910	9864	100.00	98.64	3.60	3.28	48.31
M1	19, 9910	0	0.00	0.00	***	***	**



3B11-solut

CD102

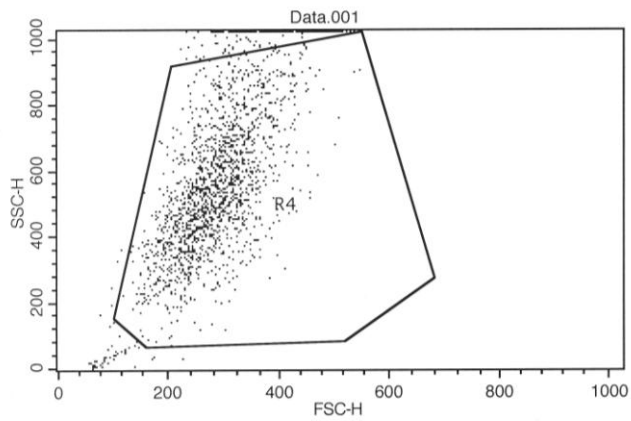


Histogram Statistics

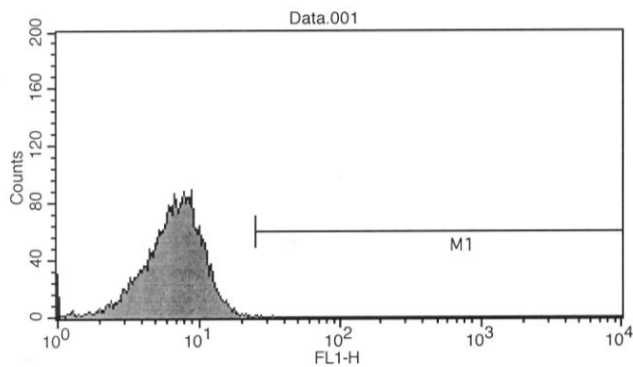
File: Data.004  
 Sample ID: ak-1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 25-Oct-13  
 Gated Events: 9871  
 X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G4  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV
All	1, 9910	9871	100.00	98.71	3.98	3.48	313
M1	19, 9910	6	0.06	0.06	225.54	45.93	218



EOMA -solut  
värjäämättömät

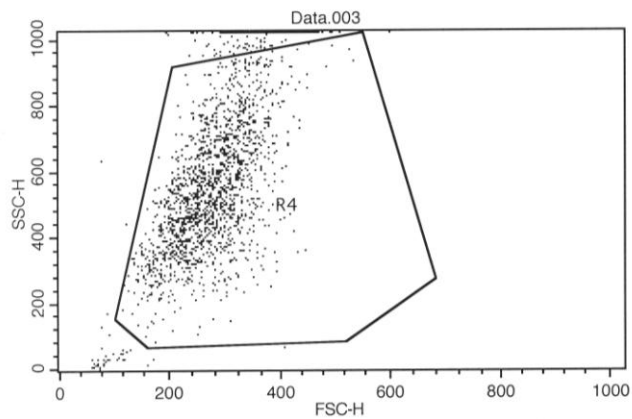


Histogram Statistics

File: Data.001  
 Sample ID: hiiri 1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 28-Nov-13  
 Gated Events: 8076  
 X Parameter: FL1-H (Log)

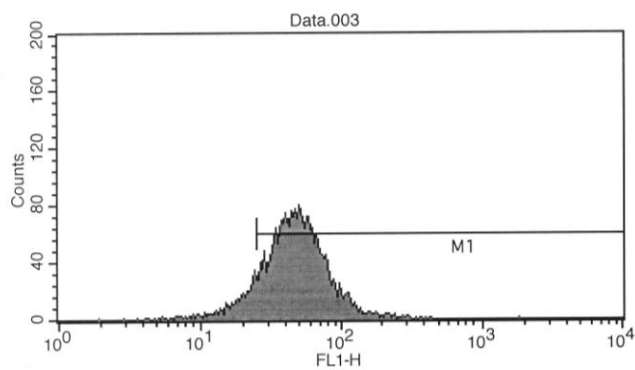
Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G4  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV
All	1, 9910	8076	100.00	80.76	7.20	6.58	41.23
M1	25, 9910	3	0.04	0.03	28.39	28.22	13.79



EOMA -solut

CD31

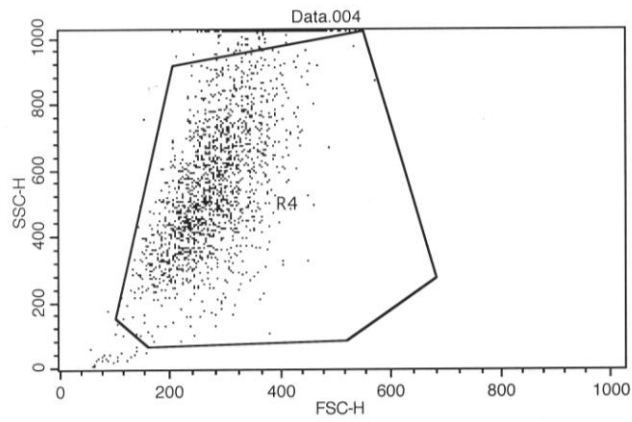


Histogram Statistics

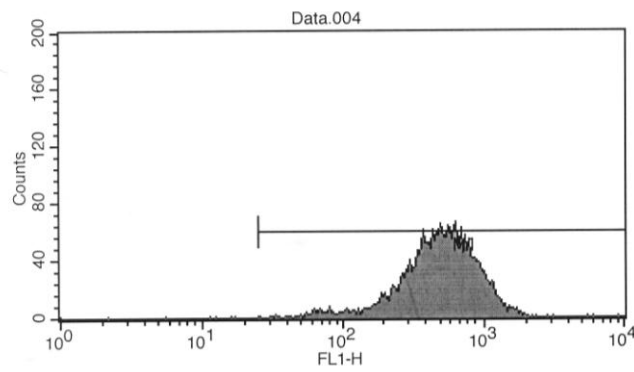
File: Data.003  
 Sample ID: hiiri 1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 28-Nov-13  
 Gated Events: 8284  
 X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G4  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV
All	1, 9910	8284	100.00	82.84	51.46	44.99	67.68
M1	25, 9910	7353	88.76	73.53	55.60	50.57	62.58



EOMA -solut  
CD102



Histogram Statistics

File: Data.004  
 Sample ID: hiiri 1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 28-Nov-13  
 Gated Events: 8047  
 X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: G4  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV
All	1, 9910	8047	100.00	80.47	545.02	465.40	57.47
M1	25, 9910	8040	99.91	80.40	545.48	467.13	57.37

## Esimerkki tulosten laskemisesta

Eräässä kokeessa endoteeliin kiinnittyneiden leukosyyttien lukumäärä oli alla olevan taulukon mukainen. Kokeessa mikroskojottiin kymmenen kenttää.

Kentät	Leukosyyttien lukumäärä
1	45
2	56
3	74
4	34
5	55
6	70
7	41
8	23
9	45
10	66
Keskiarvo	50,9

Keskiarvon avulla voidaan laskea tarttuneiden solujen lukumäärä pinta-alayksikköä kohden jakamalla solujen lukumäärän keskiarvo kentän pinta-alalla seuraavalla tavalla, kun kentän pinta-ala on 0,5676 mm<sup>2</sup>:

$$\frac{50,9 \text{ sol/ua}}{0,5676 \text{ mm}^2} = 89,7 \approx 90 \text{ sol/ua/mm}^2$$