

Eeva Kotti

Ihmisen rasvakudoksesta eristettyjen kantasolujen erilaistumiskyvyn vertailu luusolujen suuntaan

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalytiikka
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
17.11.2011

Alkulause

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Biolääketieteellisen teknologian yksikössä aikuisten kantasolut-ryhmässä. Haluan kiittää FT, dosentti Susanna Miettistä mahdollisuudesta suorittaa opinnäytetyöni hänen ryhmässään. Haluan myös kiittää FT, tutkijatohtori Bettina Mannerströmiä, joka opasti ja kannusti minua opinnäytetyön tekemisessä. Kiitos myös Mimmi Patrikaista, joka opasti minua alkuun opinnäytetyön tekemisessä, ja koko muuta tutkimusryhmää, kiitos neuvoistanne ja avustanne.

Halua kiittää myös kouluni puolesta opinnäytetyöni ohjaajana toiminutta lehtori Jarmo Palmia neuvoista ja kannustuksesta.

Kiitän myös perhettäni ja ystäviäni, joilta olen saanut tukea ja kannustusta.

Helsingissä 17.11.2011

Eeva Kotti

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Eeva Kotti Ihmissen rasvakudoksesta eristettyjen kantasolujen erilaistumiskyvyn vertailu luusolujen suuntaan 37 sivua + 5 liitettä 15.9.2010
Tutkinto	Laboratorioalan koulutusohjelma
Koulutusohjelma	laboratorioanalyytikko
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	FT, dosentti Susanna Miettinen Lehtori Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Biolääketieteellisen teknologian yksikössä Aikuisten kantasolut -ryhmässä, jonka tutkimus painottuu solujen karakterisointiin, kasvatusolosuhteiden optimointiin sekä solujen käyttöön luu-, rusto-, ja pehmytkudossovelluksissa. Aikuisten kantasolut -ryhmässä tehtävät kliiniset potilashoidot painottuvat rasvakudoksen kantasolujen käyttöön luupuutosten korjauksessa.</p> <p>Opinnäytetyössä tutkittiin ihmisen rasvakudoksesta eristettyjen kantasolujen erilaistumiskykyä luusolujen suuntaan vertailemalla vakiintunutta olosuhdetta uuteen olosuhteeseen, joissa eläinperäiset ainesosat on korvattu ihmisperäisillä tai rekombinanttitekniikalla tuotetuilla aineisilla. Vertailussa testattiin myös uusia luusolujen erilaistuksen analysoimiseen tarkoitettuja reagensseja virtauscytometrialla ja immunosytokemialla. Tavoitteena oli parantaa ja tarkentaa luuerilaistumiskyvyn määrittämistä soluviljelyolosuhteissa.</p> <p>Opinnäytetyössä eristettiin rasvakudoksesta kantasoluja rinnakkain vakiintuneissa ja uusissa olosuhteissa. Kantasoluja viljeltiin, jotta kantasoluja saatiin tarvittava määrä testejä varten. Kun tarvittava määrä kantasoluja oli saavutettu, kantasolujen erilaistumista luusolujen suuntaan stimuloitiin kaksi viikkoa, jonka jälkeen solut analysoitiin. Analyysimenetelmät olivat virtauscytometria, sytologiset värjäykset sekä immunosytologia.</p> <p>Opinnäytetyössä käytettyjen sytologisten väriaineiden avulla erilaistuneet solut ja kantasolut erottuivat selkeästi toisistaan. Immunosytologia testauksia tulisi jatkaa pienemmillä vasta-ainepitoisuuksilla. Virtauscytometriassa käytettyjä merkki-ainepitoisuuksia tulisi vielä optimoida, koska tuloksissa eri solulinjojen välillä oli suurta hajontaa. Eri kasvatusolosuhteiden välillä ei ollut eroavaisuutta.</p>	
Avainsanat	kantasolu, luuerilaistuminen, virtauscytometria, immunosytokemia, sytologinen värjäys, luusolu.

Author(s) Title Number of Pages Date	Eeva Kotti Comparison of the differentiation ability of stem cells isolated from human adipose tissue towards bone cells 37 pages + 5 appendices 5 May 2010
Degree	Laboratory Sciences
Degree Programme	Bachelor of Laboratory Services
Specialisation option	
Instructor(s)	Susanna Miettinen, PhD, Docent Jarmo Palm, Lecturer
<p>This work was carried out in the Institute of Biomedical Technology in the University of Tampere, in the Adult Stem Cell group, whose research emphasizes on the characterization of cells, optimizing the growing conditions, and using cells in bone-, cartilage- and soft tissue applications. Clinical patient treatments done in the Adult Stem Cell group are currently focusing on bone applications.</p> <p>For this thesis stem cells were studied isolated from human adipose tissue and their ability to differentiate towards bone cells by comparing established conditions to a new one, in which reagents of animal origin are replaced by those of human origin, or by reagents produced by recombinant technology. Also new reagents intended for analyzing bone cell differentiation were tested in this comparison by using flow cytometry and immunocytochemistry. Our aim was to improve and optimize the analysis of the bone differentiation ability in cell culture conditions.</p> <p>Research started by isolating stem cells from adipose tissue in parallel in established and new conditions. When the required amount of cells was reached, stem cell differentiation towards bone cells was stimulated for two weeks, and after that the cells were fixed and analyzed with molecular biology methods. Methods for analysis were flow cytometry, cytological staining and immunocytochemistry.</p> <p>Cytological stains used in for this thesis proved to give a clear result for distinguishing the stem cells from the differentiated bone cells. In immunological fluorescent staining the testing could be continued by using smaller antibody concentrations. The concentration of markers used in flow cytometry should be further optimized, because there were large discrepancies between cells lines. There was no major difference between cell culture conditions.</p>	
Keywords	Stem cells, bone differentiation, flow cytometry, immunocytochemistry, cytological staining, bone cells.

Sisällys

1 Johdanto	1
2 Teoria	3
2.1 Tutkimushistoria	3
2.2 Kantasolutyypit	4
2.2.1 Alkion kantasolut	4
2.2.2 Aikuisten kantasolut	6
2.2.3 Indusoidut pluripotentit kantasolut	8
2.3 Luusolut	8
2.4 Kantasolujen viljely	9
2.5 Virtaussytometria	10
2.6 Immunosytokemialliset värjäykset	13
2.7 Sytologiset värjäykset	14
3 Työn toteutus	14
3.1 Rasvakantasolujen eristys	16
3.2 Kantasolujen ylläpito	16
3.3 Kantasolujen luusoluerilaistus	17
3.4 Immunosytologinen värjäys	17
3.5 Sytologiset värjäykset	19
3.6 Virtaussytometrinäytteiden valmistus ja analyysi	19
4 Tulokset ja niiden tarkastelu	21
4.1 Soluviljely	21
4.2 Immunofluoresenssivärjäys	23
4.3 Sytologiset värjäykset	27
4.4 Virtausytometria	28
5 Johtopäätökset	31
Lähteet	35

Liite 1. Yksittäisten merkkiaineiden FACS-tulokset.

Liite 2. Värjäykseen käytettävien reagenssien valmistus

Lyhenteet ja määritelmät

BMP-proteiini	luun morfogeneettiset proteiini (engl.bone morphogenetic protein)
BMPR	luun morfogeneettisen proteiinin reseptorit (engl. Bone Morphogenetic Protein Receptor)
BSPII	luun sialoproteiini II(engl.bone sialoprotein II)
CFU	kolonnia muodostava yksikköä (<i>engl.</i> colony-forming unit)
EP-solut	endoteeliprogenitorisolut, jotka muodostavat uusia verisuonia ja kuuluvat PBMC-kantasolujen alaryhmään.
ES-kantasoluviljelmiä	sikiöaikaisten kantasolujen viljelmiä
FACS	solujen lajittelua fluoresenssi-aktiivisuuden mukaan ja lajittelu tapahtuu virtaussytometrialla (engl. Fluorescence-activated cell sorting).
FBS	vasikkasikiön seerumi (engl. fetal bovine serum)
Fenotyyppi	solun havaittu ominaisuus, johon vaikuttavat geenien ja ympäristön yhteisvaikutus
iPS-solut	Indusoidut pluripotentit kantasolut (engl. induced pluripotent stem cells)

PBMC-kantasolut	perifeerisen veren mononukleaariset kantasolut (engl. peripheral blood mononuclear cell)
PBS-liuos	fosfaatti puskuroitu suolaliuos (engl. phosphate buffered saline)
TNAP	kudokseen epäspesifinen alkaalinen fosfataasi (engl. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase)
TGF	transformoiva kasvutekijä (engl. Transforming Growth Factor)
VEGF-proteiini	verisuonten endoteelisolujen kasvutekijä (engl. Vascular Endothelial Growth Factor)

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Solu- ja kudosteknologiakeskus Regeassa, joka yhdistyi Lääketeollisen teknologian instituutin kanssa biolääketeollisen teknologian yksiköksi (IBT) vuoden 2011 alussa. Tutkimustyö yksikössä keskittyy kliinisiin sovelluksiin tähtäävään solu- ja kudosteknologiaan. Tutkimuksien pääkohteina ovat silmä-, hermosto-, sydän-, luu-, rusto- ja pehmytkudossovellukset. Suomen lainsäädännön ja EU-direktiivien vaatimukset täyttävä kansallinen kudospankki toimii Regeassa. [1.]

Regeassa on neljä eri kantasolujen tutkimusryhmää. Ryhmien laatujärjestelmät ja puhdistilat ovat GMP (Good Manufacturing Practice) – tasoisia. Tämä on mahdollistanut ensimmäisten joukossa maailmassa kantasolutuotannon ja kliinisten kantasolusiirteiden valmistamisen. Tutkimusryhmät ovat aikuisten kantasolujen tutkimusryhmä, neuroryhmä, silmäryhmä ja sydänryhmä. Opinnäytetyö tehtiin aikuisten kantasoluryhmässä, jonka vetäjänä toimii FT, dosentti Susanna Miettinen. Tutkimustyö painottuu ryhmässä aikuisten kantasolujen karakterisointiin, kasvatusolosuhteiden optimointiin ja solujen käyttöön eri sovelluksissa. Tutkimusryhmän kokeelliset kliiniset potilashoidot keskittyvät tällä hetkellä luusovelluksiin. [1; 2.]

Kaikki kehon solut muodostuvat erilaistuneista kantasoluista. Kantasolu on solu, jolla on kyky uusiutua kantasoluna ja erilaistua eri solutyypeiksi. Kantasolut ovat usein lepotilassa olevia soluja, jotka aktivoituvat erilaisten signaalien välityksellä. Kantasolut jakautuvat joko epäsymmetrisen tai symmetrisen mitoosin kautta. Epäsymmetrisessä mitoosissa muodostuu erilaistuva solu ja kantasolu. Symmetrisessä mitoosissa muodostuu kaksi identtistä kantasolua. Kantasoluja voidaan eristää alkioista, sikiöstä tai aikuisista yksilöistä. Kaikkein monikykyisin kantasolun lähde ovat alkion kantasolut. Ne voivat erilaistua lähes elimistön kaikiksi solutyypeiksi. Aikuisten yksilöiden kantasoluja voidaan eristää muun muassa luuytimeä, rasvakudoksesta ja aivokudoksesta ja kantasolut erilaistuvat useiksi solutyypeiksi mutta ovat erilaistuskyvyltään heikompia verrattuna alkion kantasoluihin. [3; 2] Tässä opinnäytetyössä eristettiin kantasoluja aikuisen yksilön rasvakudoksesta.

Rasvakudos on runsas kantasolujen lähde, jolla on terapeuttisia sovellusmahdollisuuksia lääketieteen eri osa-alueilla kudonsvaurioiden korjauksessa. Rasvakudoksen kantasoluilla on kyky uusiutua kantasoluina ja erilaistua useiksi eri solutyypeiksi kudoksen signaalien ohjaamina. [4.]

Erilaisia potilashoitoja ajatellen kantasoluja on saatava tietty määrä ja kantasoluja täytyy saada eristettyä vaivatta. Ihmisen rasvakudoksesta saadaan eristettyä kantasoluja ongelmitta paljon enemmän kuin luuytimeistä. Kantasoluja on siis helppo eristää suuria määriä ja niitä voidaan vaivattomasti lisätä laboratoriossa. Rasvan kantasolut on saatu erilaistumaan muun muassa rasva-, rusto-, lihas-, luu- ja jopa hermosolujen suuntaan soluviljelyolosuhteissa kasvatusliuokseen lisättävien ainesosien avulla. [4.]

Kliinisiä potilashoitoja ajatellen on löydettävä turvallisia korvaavia vaihtoehtoja yleisesti käytössä oleville soluviljelyreagensseille, jotka sisältävät eläinperäisiä ainesosia. Eläinperäiset ainesosat voivat aiheuttaa vakavan allergisen reaktion potilaalle. Lisäksi eläinperäisten ainesosien tuomiin riskeihin kuuluvat viruksien ja bakteerien aiheuttamat infektiot, prionit ja toistaiseksi tunnistamattomat eläintaudit. Kantasolujen turvallisuutta potilashoidoissa voitaisiin parantaa lisäämällä rasvakudoksen kantasoluja kasvatusolosuhteissa, joissa eläinperäiset ainesosat kuten esimerkiksi naudan seerumi on korvattu ihmisen seerumilla.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tutkia ihmisen rasvakudoksesta eristettyjen kantasolujen erilaistumiskykyä luusolujen suuntaan vertailemalla vakiintuneita ja uusia kasvatusolosuhteita. Tarkoituksena on kehittää uudet kasvatusolosuhteet, jossa eläinperäiset ainesosat on korvattu ihmisperäisillä tai rekombinanttitekniikalla tuotetuilla ainesosilla. Kaikki uusissa kasvatusolosuhteissa käytetyt reagenssit on hyväksytty potilashoitoihin. Vertailussa testattiin myös tutkimusryhmälle uusia luusolujen erilaistuksen analysoimiseen tarkoitettuja reagensseja virtausytometrialla ja immunosytokemialla. Tavoitteena oli myös parantaa ja tarkentaa luuerilaistuskyvyn määrittämistä soluviljelyolosuhteissa.

2 Teoria

2.1 Tutkimushistoria

Kantasolututkimusta on tehty hyvin varhaisessa vaiheessa, vaikka aluksi tutkijat eivät tienneet tutkivansa kantasoluja. Ensimmäisiksi kantasolututkijoiksi voidaan luokitella 1700-luvun luonnontieteilijät, jotka tutkivat salamanterin hännän uusiutumista. Varsinaisten kantasolujen löytäminen kesti kauan, koska kantasoluilla on taipumus piiloutua syvälle kudoksiin ja kantasoluja on hyvin pieniä määriä. Niiden tunnistaminen ja eristäminen oli hankalaa. [5.]

Tärkeämmät kantasoluhavainnot tehtiin vasta 1950-luvulla. Leroy Stevens löysi tuolloin Roscoe Jackson Memorial Laboratoryssa Mainen osavaltiossa Yhdysvalloissa hiiristä epätavallisen paljon teratoomakasvaimia. Teratooma eroaa tavallisista syöpäkasvaimista siten, että niiden sisälle kasvaa monenlaista solukkoa. Teratooman sisällä voi siis kasvaa esimerkiksi tukisoluja, sydänekudosta, luuta, karvoja ja hampaita, eli kaikkia kehon eri solutyyppejä. Eräessä tapauksessa hiiren teratoomasta löydettiin yli 300 hammasta. Kun tutkijat havaitsivat, että teratooman kaltaisia epätavallisia syöpäsoluja kasvoi yleensä munasarjoissa ja kiveksissä, he päättelivät kyseessä olevan kantasolun päässeen väärään paikkaan alkion kehityksen vaiheessa. [5.]

1990-luvulla kantasolututkimukset edistyivät huimaa vauhtia. Osa syynä oli IVF (engl. In vitro fertilisation) eli keinohedelmöitymishoidon edistysaskeleet. Tutkijat saivat enemmän tutkimusmateriaalia ja oppivat kasvattamaan ihmisen alkion kantasoluja. Ensimmäisen ihmisen alkion kantasolulinjan perustajana pidetään James Thomsonin työryhmää Wisconsinin yliopistossa Yhdysvalloissa. Thomsonin työryhmä eristi kantasoluja alkion sisäsolumassasta. Alkion kantasolututkimuksien kehitys nosti pintaan eettiset kysymykset varsinkin Yhdysvalloissa. Republikaanipresidentti Bushin hallinto kielsi valtion varojen käyttämisen kantasolututkimukseen. Nykyään se on kuitenkin sallittu Yhdysvalloissakin. Kantasoluja pystyttiin 2000 -luvulla eristämään ja kasvattamaan aikuisten kantasoluista. Vaihtoehtoisia kantasolulähteillä vältyttiin suuremmilta eettisiltä ongelmilta. Vuoden 2006 lopulla Tampereen solu- ja kudosteknologiakeskus Regea teki ensimmäisten joukossa maailmassa kliiniset kantasoluhoidot otsaontelontulehduksesta kärsiville potilaille. Potilailta otettiin heidän omaa rasvakudosta, josta eris-

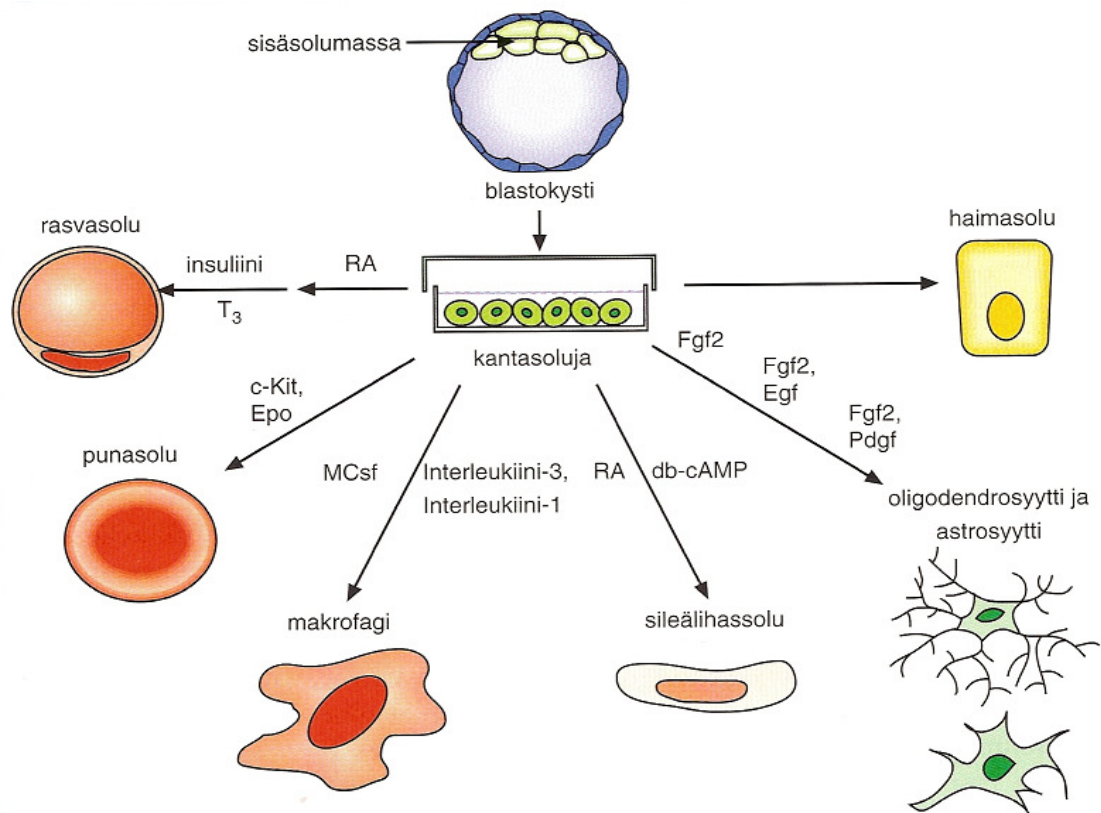
tettiin kantasoluja. Kantasolut laitettiin biomateriaaliin ja siirrettiin koko massa potilaan otsaonteloon, johon kasvoi umpiluuta. [6.]

2.2 Kantasolutyypit

2.2.1 Alkion kantasolut

Alkion kantasolut eroavat aikuisen yksilön kantasoluista siten, että alkion kantasoluilla on rajaton kyky jakaantua ja erilaistua miksi tahansa kehon solutyypiksi. Embryonaaliset eli alkion kantasolut voivat olla joko totipotentteja tai pluripotentteja kantasoluja. Näitä saadaan hedelmöitymishoidosta jääneistä alkioista. [5; 7.]

Hedelmöittyneet munasolut ja alkion solut ovat 2-3 vuorokauden ikäisiksi asti kaikkikykisiä kantasoluja, joita kutsutaan totipotentteiksi. Nämä kantasolut pystyvät tuottamaan kaikki elimistön solut ja niistä voi muodostua kokonainen yksilö. [5; 7.] Kuvassa 1 on kuvattu, kuinka alkion kantasolulinja erilaistuu erilaisiksi soluiksi.



Kuva 1. Alkion sisäsolumassasta eristetyt kantasolut voivat erilaistua monenlaisiksi erityyppisiksi soluiksi. [3.]

Blastokystivaiheessa olevat 4-7 vuorokauden ikäiset alkion kantasolut eli pluripotentit kantasolut eroavat totipotentista kantasoluista siten, että pluripotentista kantasolusta ei voi muodostua istukan ja sikiökalvon kudoksia. Kantasolut ovat tässä vaiheessa lähes kaikkikykäisiä soluja, mutta niistä ei voi kasvaa kohdussa alkioita. Pluripotentit kantasolut voivat käytännössä kasvaa soluviljelyssä rajatta, koska niillä on korkea telomeeriaktiivisuus antamassa kyvyn jatkuvaan jakautumisen. [5; 8; 9.]

Blastokystivaiheessa syntyy kolme solukerrosta, jotka ovat endodermi, eksodermi ja mesodermi. Pluripotentit voivat erilaistua kaikiksi kolmeksi solukerrokseksi. Kehittyessä alkionleudolle muodostuu solukerroksista erilaisia kudoksia ja epiteelisoluja. Endodermistä on havaittu muodostuvan ruuansulatuskanavan, hengitysteiden ja keuhkojen epiteelisoluja. Ihon epiteelisoluja ja hermosoluja on havaittu muodostuvan eksodermikerroksesta. Mesodermisolut ovat alkeissidekudoksesta peräisin olevia kantasoluja, jotka erilaistuvat helposti side- ja lihaskudokseksi. Sikiöaikaista kantasolua kutsutaan ES-kantasoluksi (engl embryonic stem cells). ES- eli sikiöaikaisten kantasolujen viljelmää tehdään blastokystin sisäsolumassasta. [8; 9; 10.]

Sikiön kudoksissa olevia kantasoluja kutsutaan multipotenteiksi. Multipotenttisoluja ilmenee myös aikuisen yksilön kudoksissa ja elimissä. Multipotenttien erilaistumismahdollisuudet ovat normaalissa ympäristössä rajalliset. [9.]

2.2.2 Aikuisten kantasolut

Aikuisen ihmisen kehossa on miljardeja soluja, jotka syntyvät, elävät oman aikansa ja kuolevat pois. Kehossa solujen määrä pysyy koko ajan vakiona, koska uusia soluja syntyy kuolleiden solujen tilalle. Aikuisen yksilön solut ovat lähtöisin kantasoluista. Kantasolut ovat kehossa lepovaiheessa ja odottavat aktivoitumista. Kantasolujen aktivoituminen tapahtuu ainoastaan silloin, kun uusia soluja tarvitaan. Nämä solut pystyvät korvaamaan vioittuneita osia kehossamme. Kantasoluja on alettu käyttää ominaisuuksiensa ansiota laajasti eri hoitosovelluksiin. Näitä soluja pystytään eristämään omasta kudoksesta, mikä vähentää kantasolusiirränäisen hylkimisreaktiota potilaan omaan kehoon laittaessa. Kantasoluja on löydetty muun muassa silmistä, aivoista, verestä, luuytimeä, rasvakudoksesta, sydäimestä, hampaista, rasvakudoksesta ja ihosta. Lääketieteessä panostetaan hoitoihin, joissa kantasolut korjaavat vioittuneet kudokset. Kantasolut saadaan erilaistumaan haluttuun suuntaan muuttamalla niiden kasvuympäristöä kemiallisesti tai fysikaalisesti. [6; 11; 12.]

Luuytimeä eristetyistä kantasoluista voidaan erottaa kahta eri kantasolupopulaatiota eli hematopoieettisia ja mesenkymaalisia. Hematopoieettiset kantasolut ovat kantasoluja, jotka voivat erilaistua ainoastaan veren eri soluiksi. Mesenkymaaliset solut ovat side- ja tukikudoksista peräisin olevia kantasoluja. Mesenkymaaliset kantasolut pystyvät erilaistumaan muun muassa rasva-, luu- ja rustosoluiksi. Mesenkymaalisten ja hematopoieettisten kantasolujen eron huomaa soluviljelyssä, kun mesenkymaaliset kantasolut kiinnittyvät pintaproteiineista soluviljelyalustan pinnalle toisin kuin hematopoieettiset kantasolut. [13; 14.]

Veressä kiertää hematopoieettiset solut, jotka ovat erilaistuneita tai erilaistumattomia kantasoluja. Luuytimessä syntyvät hematopoieettiset kantasolut pystyvät tuottamaan itsensä kaltaisia pitkäaikaisia ja lyhytaikaisia verisolujen muodostumista ylläpitäviä soluja. Lyhytaikaiset hematopoieettiset kantasolut jakautuvat lymfaattisiksi ja myeloidiksi

kantasoluiksi. Näistä kantasoluista erilaistuu verisolutuotannon linjat. Lymfaattiset kantasolut muodostavat T- tai B-soluja, jotka ovat vastuussa antigeenien tunnistamisesta elimistöstä. Myeloidinen kantasolulinja, joka erilaistuu elimistön puolustusjärjestelmän soluiksi esimerkiksi granulosityteiksi (jyvässolu), erytrosyyteiksi (punasolu), monosyyteiksi ja megakaryosyyteiksi (luuytimen jättisolu). Lymfaattisia monikykyisiä ja suuntautuneita kantasoluja ei pystytä morfologisesti tunnistamaan tosistaan. Lymfaattiset kantasolut nimetään kasvatettujen kantasolupesäkkeiden muodostavien yksiköiden CFU ja BFU mukaan. Verestä on pystytty eristämään lymfaattisoluista muun muassa PBMC-kantasolujen alaryhmään kuuluvia endoteeliesisoluja. Näiden solujen on havaittu muodostavan verisuonia. [15.]

Rasvan kantasolut eristetään yleensä yksilohkoisesta valkoisesta rasvakudoksesta. Ihmisen kehossa on kahdenlaista rasvakudosta, valkoista ja ruskeaa rasvakudosta. Aikuisen elimistöstä löytyy kuitenkin pääosin valkoista rasvakudosta. Valkoisella rasvakudoksella on kyky laajeta ja kutistua olosuhteiden säätelemänä, jonka mahdollistaa esisolut ja kantasolut. Rasvakudoksen kantasolut kuuluvat fenotyypiltään mesenkymaaliisiin kantasoluihin. Ne voivat erilaistua rasvasoluiksi, rustosoluiksi, lihassoluiksi, sydänsoluiksi ja hermosoluiksi. Rasvakudoksen kantasolut ovat nousseet mielenkiintoiseksi tutkimuskohteeksi, koska rasvakudoksesta on helpompi eristää kantasoluja kuin muista kudoksista. Tämä mahdollistaa sen, että kantasoluja voidaan kantasoluhoidoihin eristää potilaan omista kudoksista, jolloin ei tapahdu mahdollista immuunijärjestelmän aktivoitumista ja solujen tuhoutumista siirrettäessä kantasoluja potilaaseen. [5; 16; 17.]

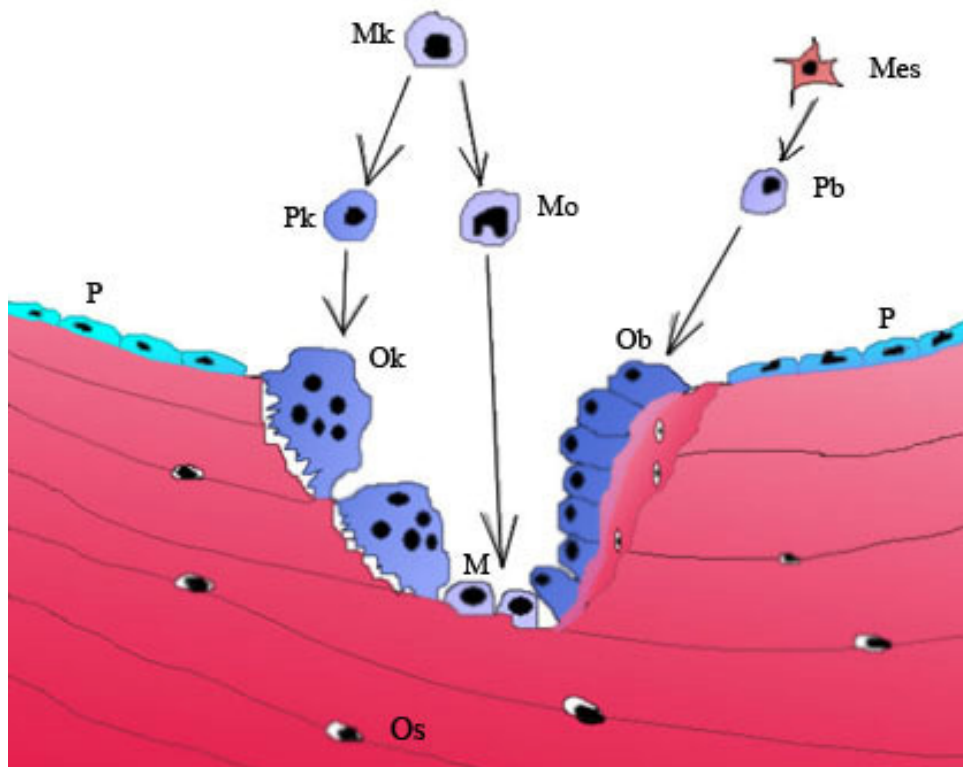
Luusovellukset ovat yksi rasvakudoksen kantasolujen sovelluksista. Rasvan kantasoluja voidaan saada rasvaimulla tai leikkauksista otetusta rasvakudoksesta, joista ei koidu juurikaan riskitekijöitä potilaalle verrattuna luuytimeistä otettuihin kantasoluihin. Luuytimeistä kantasolujen ottaminen saattaa aiheuttaa lihasjäykkyyttä, alaselän kipua, pahoinvointia, päänsärkyä ja veren hemoglobiinin alenemista. Rasvakudoksen kantasolujen ottaminen rasvaimulla voidaan tehdä paikallispuudutuksessa, joka aiheuttaa melko vähän kipua, kun luuytimen kudoksen eristämiseksi vaaditaan kivulias selkäydinpuudutus. Rasvakudoksen kantasolujen saanto on suuri, joiden määrä määrä saadaan nopeasti lisättyä soluviljelyssä. [16; 5.]

2.2.3 Indusoidut pluripotentit kantasolut

Indusoidut pluripotentit kantasolut (iPS) ovat aikuisen ihmisen erilaistuneista soluista uudelleen ohjelmoituja erilaistumattomia täysikykyisiä kantasoluja. Dolly-lampaan kloonauksen käynnisti tutkimukset tuman uudelleen ohjelmoinnista, jonka ei uskottu olevan aikaisemmin mahdollista. Indusoituja pluripotentteja kantasoluja voidaan tuottaa esimerkiksi aikuisen ihmisen erilaistuneista ihon soluista. Tämä mahdollistaa indusoitujen pluripotenttisolujen tuoton potilaan omista soluista. Se vähentää hyljintäreaktiota potilaalle tehtäessä solujen ja kudoksien korvaushoitoja. Indusoiduilla pluripotentteilla kantasoluilla on luultavasti tulevaisuudessa tärkeä rooli lääkekehityksessä, mutta toistaiseksi iPS-solu menetelmää ei ole vielä tarpeeksi tutkittu. Menetelmässä käytetyt retro- ja lentiviruksvektorit pitäisi vaihtaa kliinisiin kantasoluhoidoihin soveltuvampaan vaihtoehtoon. Syövän riski on myös teoriassa suuri, koska solujen toimintaa on muokattu perusteellisesti solujen kasvua edistävän onkogeenin (c-MYC) avulla. [18.]

2.3 Luusolut

Luussa on neljä solutyyppiä, jotka voidaan erottaa toisistaan morfologisesti ja toiminnallisesti. Luun neljä solutyyppiä ovat osteoblastit, osteosyytit, osteoklastit (luun-syöjäsolu) ja luun pintasolut. Luun väliaineen eli matriksin tuottaa osteoblastit, jotka muodostuvat mesenkymaalisten kantasolujen muuttuessa preosteoblastisolujen kautta osteoblasteiksi. Osteoblastien erilaistumisen käynnistävät kasvutekijä-TGF- β -perheen proteiinien jäsenet. Luun morfogeneettiset proteiinit ohjaavat erityisesti luun erilaistumista soluissa. Osteoblastien erilaistumista voi myös ohjata transkriptiotekijät kuten runx2 ja osterix. Transkriptiotekijät ovat proteiineja, jotka säätelevät lähetti-RNA-synteesiä ja kiinnittyvät DNA:han tiettyyn kohtaan emäsjärjestyksen mukaisesti. Muutuneet kantasolut alkavat ilmentää alkaalista fosfaattia, joka on osteoblastien tuottama entsyymiä. Alkaalisen fosfaatin pitoisuus nousee juuri ennen luun muodostumista ja alkaalista fosfataattia tarvitaan luun mineraatioissa. Osteoblastit huolehtivat luun väliaineen mineraalisaatiosta eli luun tiheyden kasvusta. [19; 20.] Kuvassa 2 on esitetty uuden luun muodostuminen.



Kuva 2. Kuvassa on neljä erilaista solutyyppiä, joita kutsutaan osteoblastiksi (Ob), osteosyytiksi (Os), osteoklastiksi (Ok) ja pintasoluksi (P). Mesenkymaalinen kantasolu (Mes) muodostaa osteoblastia preosteoblastien (Pb) kautta. Monosyyttilinjan kantasolusta (Mk) muodostuu osteoklasteja muodostaen ensin preosteoklasteja (Pk). Makrofagit (M) muodostuvat myös monosyyttilinjan kantasoluista. [20.]

Pintasolut ovat lepääviä soluja, jotka osallistuvat luun aineenvaihdunnan säätelyyn. Pintasolut voivat muodostua osteoblasteista. Valmistamansa matriksin sisään hautautuneita osteoblasteja kutsutaan osteosyyteiksi. Suuret monitumaiset solut eli osteoklasit huolehtivat luun hajotuksesta. Osteoklasit sekä makrofagit voivat muodostua samasta verenmuodostuksen kantasolukosta. Ensimmäiseksi kehitysketjussa monosyyttilinjan kantasolu muuttuu joko preosteoklastiksi tai makrofagiksi. Lopulta preosteoklastisolut muuttuvat osteoklastiksi. Makrofagit huolehtivat luupinnan valmistamisesta. Luun hajotus ja uuden luun muodostaminen pitäisi tapahtua tasapainossa, jotta kyseessä olisi terve luu. [20.]

2.4 Kantasolujen viljely

Soluviljelyssä on tarkoitus luoda mahdollisimman luonnolliset olosuhteet soluille. Soluviljelyolosuhteita kontrolloidaan tarkasti. Solut tarvitsevat tarkasti säädellyt olosuhteet

ravintoaineiden, lämpötilan, CO₂-pitoisuuden ja pH-arvon suhteen säilyäkseen hyväkuntoisina. [21.]

Soluviljelyä varten on hyvä miettiä sopivaa kasvualustaa solutyypin mukaan. Mesenky-maalaiset tarvitsevat pinnan, johon ne pystyvät kiinnittymään, joten niitä kasvatetaan kasvatusliuoksella peitettynä eri pinnoilla varustetuissa pulloissa, maljoilla tai kuoppalevyillä. Olosuhteiden ollessa sopivat solut voivat nopeasti täyttää koko käytettävissä olevan pinnan. Solujen tiheys- eli kosketusinhibitio pysäyttää yleensä kasvun, kun solut ovat käyttäneet koko kasvatusalustan pinnan. Kantasolut saattavat myös alkaa erilaistua spontaanisti kosketusinhibition takia. Siksi on tärkeää irrottaa ja siirtää solut uusiin kasvatuspulloihin tai maljoihin. [21; 22.]

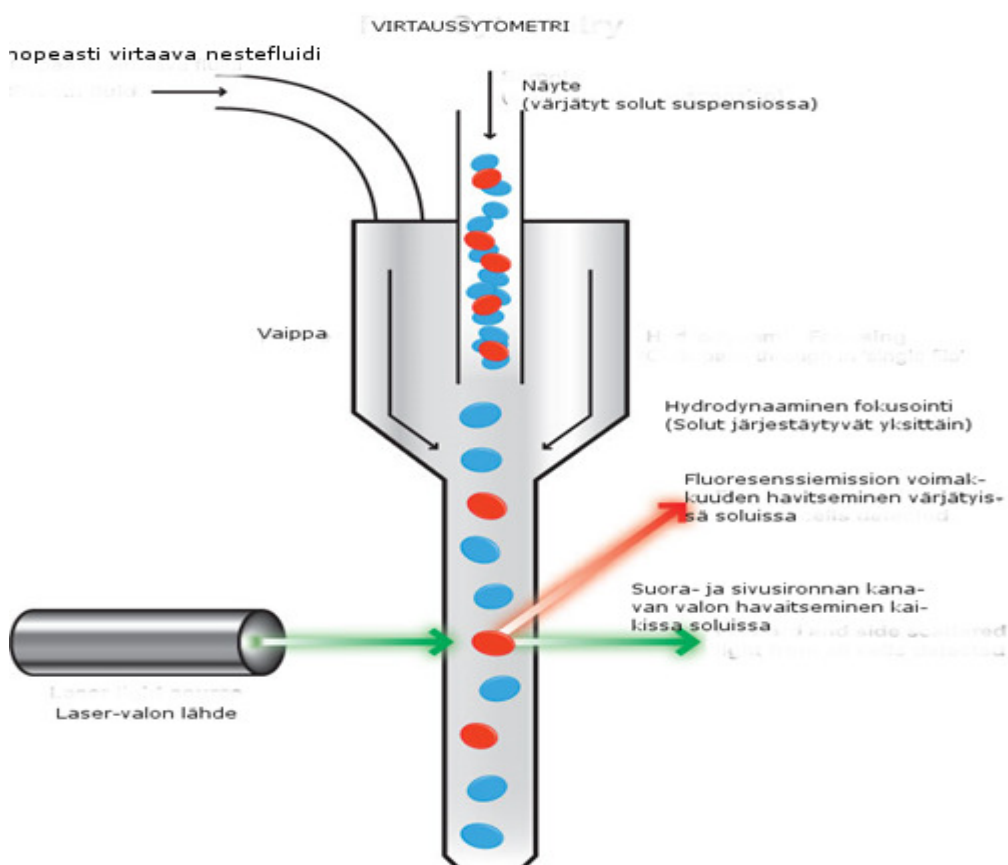
Kasvatusliuoksen ainesosina voi olla eläin- tai ihmisperäistä seerumia. Seerumi toimii kasvatusliuoksessa kasvutekijänä. FBS (engl. Fetal Bovine Serum) -seerumi on vasi-kanseerumia ja HS (engl. Human Serum) -seerumi on ihmisperäistä seerumia. Kasvatusliuoksessa solujen ravintoliuoksena toimii DMEM/F-12 (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium) -liuos, joka sisältää ravinteita ja hormoneja. DMEM/F-12-liuoksessa voi olla mukana fenolinpunaväri, joka toimii pH-indikaattorina. Solujen kasvatusliuoksen pH:n pitäisi olla mahdollisimman neutraali. Antibioottiliuos, joka sisältää penisilliiniä ja streptomysiiniä (PEN-STREP) lisätään kasvuliukseen. Se estää monenlaisten grampositiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien kasvun soluviljelyssä. GlutaMAX™-I on solujen kasvua edistävä aine kasvatusliuoksessa. [21; 22; 23.]

Peruskasvatusliuoksen ainesosien lisäksi rasvakudoksen kantasolut tarvitsevat askorbiinihappoa, natriumbetaglyserofosfaattia ja deksametasonia erilaistua luuta muodostaviksi soluiksi. Askorbiinihappo edistää solujen kasvun ja Deksametasoni erilaistaa kantasoluja luusoluiksi. [19.]

2.5 Virtausytometria

Virtausytometrillä voidaan lajitella erikokoiset ja erirakenteiset partikkelit toisistaan. Lajittelevasta virtausytometrialla tehtävästä analyysistä käytetään nimitystä FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter). Virtausytometrialla voidaan mitata yksittäisten fluoresenssilla leimattujen solujen ominaisuuksia valon sirronnan tai fluoresenssiemission avulla. Solut saadaan leimattua esimerkiksi fluorokromilla konjugoiduilla vasta-

aineilla, jotka kiinnittyvät spesifisesti solun kohdemolekyylisiin. Eksitoitaessa soluja lasersäteellä voidaan mitata solujen lähettämän emission voimakkuutta. Virtaussytometrissä näytteen partikkelit hajaantuvat nestevirrassa toisistaan ja järjestäytyvät yksittäisinä soluina jonoon virtauskanavassa, jotta detektori pystyy analysoimaan yksittäisen solun tai partikkelin lähettämän signaalin. Detektoreiden spesifisyyttä kontrolloivat optiset suodattimet ja peilit, jotka estävät ylimääräiset aallonpituudet. Näytteen solut fokusoidaan hydrodynaamisesti vaippanesteen avulla kulkemaan yksitellen valosädekimpun lävitse. Suorasironnalla mittaamalla voidaan erottaa eläviä ja kuolleita soluja toisistaan. Solujen suorasironnan intensiteetti vastaa karkeasti partikkelikokoa. Sivusironnan kanavasta lähtevällä valolla pystytään keräämään tietoa partikkeleiden granuloiden sisällöstä. Näiden kahden sironnan avulla voidaan erottaa solutyyppejä toisistaan, koska ne ovat yksilöllisiä jokaiselle partikkelille. Valomonistamisputkea käytetään sivusironnan ja fluoresenssin mittaamiseen. [24.] Kuvassa 3 on esitetty virtaussytometrian toimintaperiaate.



Kuva 3. Virtaussytometrian toimintaperiaatteesta kuva. [25.]

Solunsisäisten merkki-aineiden käyttö voi olla vaikeaa värjäyksessä, koska vasta-aineen pitäisi läpäistä solukalvo kiinnittyäkseen solun sisäisiin antigeeneihin. Käytännössä tämä toteutetaan käsittelemällä solukalvo vasta-aineita läpäiseväksi. [24.]

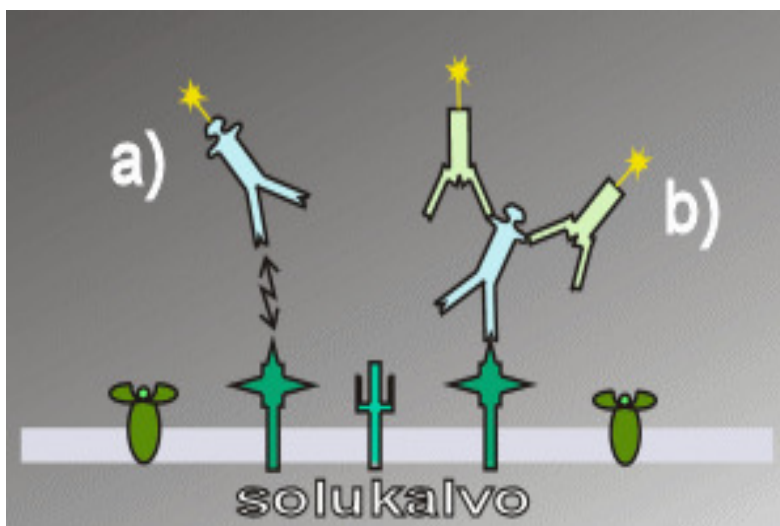
Immunofenotyyppitykseksi sanotaan solun spesifisen pinta-antigeenien määritystä fluoresenssin avulla. Kaikki solut ilmaisevat erilaisia pinta-antigeenejä, mutta epänormaali kasvu tai kasvuolosuhteiden muutos saattaa häiritä solun luonnollisen pinta-antigeenien ilmentymistä. Tämän takia immunofenotyyppitystä voidaankin käyttää esimerkiksi erottamaan terveet ja sairaat solut toisistaan. Immunofenotyyppitys on suurin kliinisen solubiologian sovelluksista virtausytometriassa. [24.]

Mesenkymaaliset kantasolut identifioidaan pintarakenteiden avulla. Mesenkymaalisten kantasolujen populaatiot yleensä ilmentävät lähes 95 -prosenttisesti CD105- , CD73- ja CD90 -pinta-antigeenejä virtausytometria-analyysissa, vaikka nämä pintamerkkiaineita eivät olekaan täysin spesifisiä rasvakudoksen kantasoluille. Vielä ei ole yhtä yksittäistä pinta-antigeeniä, jonka olisi osoitettu olevan spesifi vain mesenkymaaliselle kantasoluille. CD105 -pintamerkkiaine ilmenee myös verisuonen seinämiä ympäröivissä endoteelisoluissa. Mesenkymaaliset kantasolupopulaatiot eivät yleensä ilmennä CD45- , CD34- , CD14- ja CD19 -pinta-antigeenejä. Nämä pinta-antigeenit ovat hematopoieettisten solujen antigeenejä. [26.]

Alkaalista fosfaattista (ALP) -merkkiainetta on käytetty luun alkaalisen fosfataasi entsyymin tunnistamiseen. VEGF-proteiinit ovat verisuonten endoteelisolujen kasvutekijöitä (engl. Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF-R1, VEGF-R2 ja VEGF-R3 ilmaisevat ensisijaisesti endoteelisolujen populaatiota, mutta myös veren monosyyttejä. VEGF-proteiini tunnetaan verisuonien kasvutekijänä. TGF-proteiini on transformatiivinen kasvutekijä (engl. Transforming Growth Factor). TGF- β 1-merkkiaine tunnustetaan solun proteiini, joka kuuluu TGF-beta ryhmään. TGF-beta on monikäyttöinen proteiini, jolla on tärkeä rooli luun uudelleen muodostumisessa. BMPR-proteiinia on luun morfogeneettisen proteiinin reseptoreita (engl. Bone Morphogenetic Protein Receptor), mitkä ilmenee alkionkehityksen aikana ja uuden luun muodostumisessa. [19.]

2.6 Immunosytokemialliset värjäykset

Immunosytokemiallisia värjäysmenetelmiä ovat suora- ja epäsuoramenetelmä. Suoramenetelmä on yksinkertainen. Siinä tehdään ainoastaan yksi vasta-ainekäsittely kohdeantigeenille leimatulla vasta-aineella. Epäsuorassa menetelmässä hyödynnetään kahden vasta-ainetta eli primaarivasta-ainetta ja sekundaarivasta-ainetta, joiden avulla voidaan saada aikaiseksi parempi reaktioherkkyys ja intensiivisempi värjäystulos. Primaarivasta-aineeseen voidaan liittää useita merkkiaineen sisältäviä sekundaarivasta-aineita. Immunosytokemiallisessa värjäyksessä estetään epäspesifistä värjäytymistä ennen vasta-aineen lisäämistä blokkauksella eli salpaamisella. Epäspesifistä värjäytymistä aiheuttavat solun omat entsyymit ja epäspesifiset sitoutumista aiheuttavat yhdisteet. [27.] Kuviossa 4 on esitetty immunosytokemiallisen värjäyksen suora- ja epäsuoramenetelmä.



Kuva 4. Suoramenetelmässä (a) antigeeniin liittyy leimattu vasta-aine, kun taas epäsuoramenetelmässä (b) antigeeni-vasta-ainekompleksiin liitetään leimatut vasta-aineet [27].

Vasta-aineen ja antigeenin yhteissidokset ovat reversiibeileitä ja ei -kovalenttisiä sidoksia. Värjäyksessä vasta-aineen ja antigeenin välinen sidoksen täytyy olla voimakas, jotta vasta-aine ei irtoaisi antigeenistä huuhdellessa näytettä värjäysprosessin eri vaiheiden välillä. Vasta-aineen ja antigeenin välisen sidoksen havainnollistamiseksi on liitettävä vasta-aineisiin sopiva merkkiaine, joka on fluoresoiva leima. Tällöin vasta-aine-antigeeni-kompleksi näkyy fluoresenssimikroskoopin avulla. [27.]

2.7 Sytologiset värjäykset

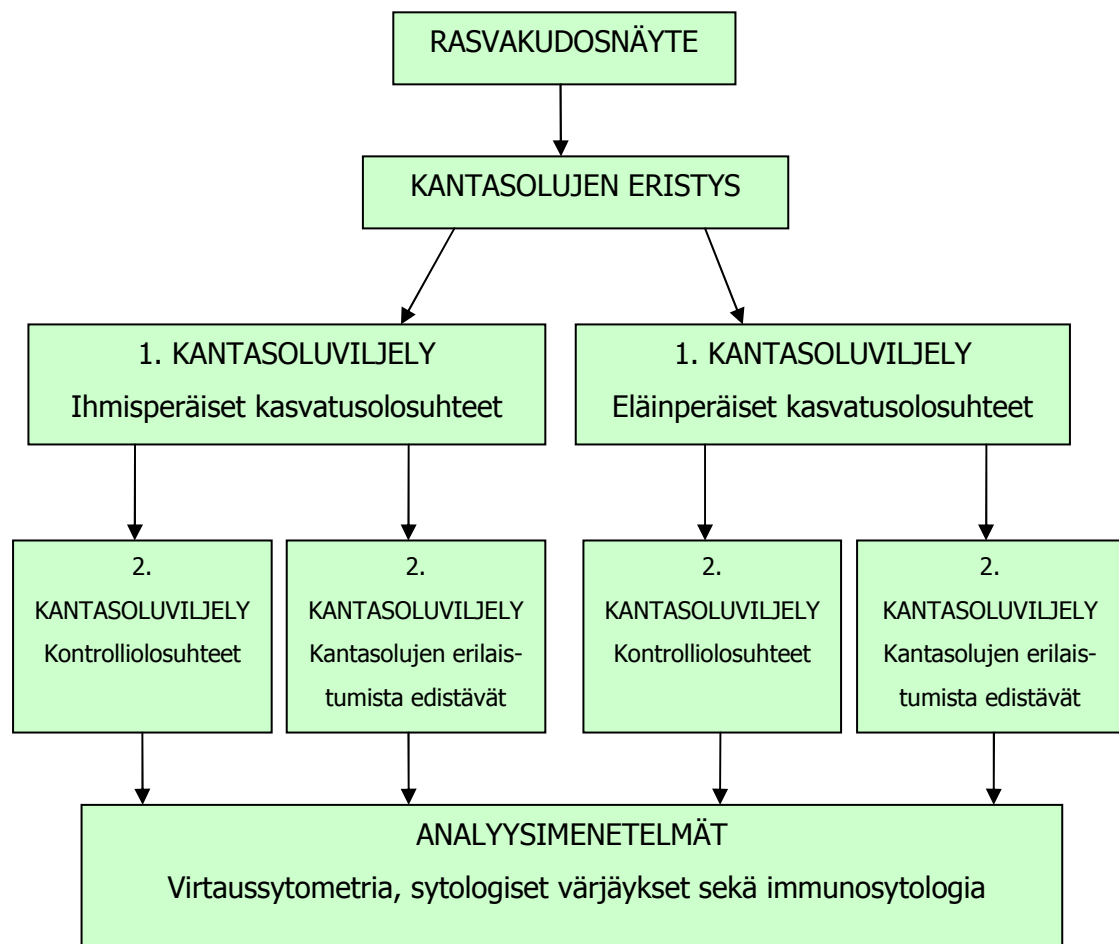
Sytologisella värjäysmenetelmällä voidaan saada tietoa solun rakenteesta, erilaisia molekyyleistä tai solun sisäisistä metabolisista aktiivisuuksista. Sytologisessa värjäyksessä voidaan käyttää vasta-aineita, entsyymiä tai radioaktiivisia yhdisteitä hyödyksi. [28.]

Alkaalinen fosfaattinen (ALP) -värjäys perustuu siihen, että väriaine sitoutuu alkaaliseen fosfataasi-entsyymiin. Alkaalisen fosfataasin pitoisuus nousee varhaisessa vaiheessa kantasolun erilaistuessa luusolun suuntaan. Natriumnitraatti ja FRV-alkaaliliuos reagoivat nopeasti keskenään muodostaen diatsoniumkloridia. Diatsoniumkloridi muodostaa Naftoli AS-BI-liuoksen kanssa violetteja suoloja. [29; 30; 19.]

Alitsaarin punainen -värjäyksellä pystytään tunnistamaan kalsiumi esimerkiksi kudosteikkaita. Väriliuos värjää valikoidusti kalsiumin tummanpunaiseksi ja kudoksen keltaiseksi. Värireaktio ei ole ainoastaan spesifinen kalsiumille. Magnesium, mangaani, bariumi ja rauta saattavat häiritä värjäystä. Kuitenkin näitä ainesosia esiintyy harvoin niin suurina pitoisuuksina, että se häiritsisi tulosten tulkintaa. Alitsaarin punainen -väri on antrakinonin johdannainen ja se muodostaa kalsiumin kanssa monimutkaisen kelaatin. [31.]

3 Työn toteutus

Työssä vertailtiin rasvakudoksen kantasolujen vakiintuneita ja uusia kasvatusolosuhteita. Vakiintuneet kasvatusolosuhteet sisälsivät eläinperäisiä ainesosia solujen kasvatusliuoksessa ja uudet kasvatusolosuhteet sisälsivät ihmisperäisiä ainesosia solujen kasvatusliuoksessa. Vertailussa testattiin uusia luusolujen erilaistuksen analysoimiseen tarkoitettuja reagensseja virtausytometrialla ja immunosytokemialla. Luusolujen erilaistuksen analysoimiseen tarkoitettujen reagenssien toiminta perustui vasta-aineiden käyttöön erilaisten solujen antigeenien paikantamiseen. Työn vaiheet koostuivat kantasolujen eristyksestä rasvakudosnäytteistä, kahdesta erilaisesta soluviljelystä sekä analyysimenetelmistä. Jokainen analyysimenetelmä tehtiin ryhmän työohjeiden mukaisesti. Vuokaaviossa (kuva 5) on esitetty työn vaiheet.



Kuva 5. Vuokaavio työn vaiheista

Tampereen yliopistollisen sairaalan plastiikkakirurgian osastolta saaduista rasvakudosnäytteistä oli kolme kantasolulinjaa (9/10, 7/11 ja 8/11). Jokaista kantasolulinjaa kasvatettiin rinnakkain eläinperäisessä ja ihmisperäisessä olosuhteessa. Kantasoluja viljeltiin, kunnes saavutettiin tarvittava määrä kantasoluja testeihin. Kantasoluja laitettiin 12-kuoppalevyille ja T75 -pulloihin noin 2500 solua/cm². Kantasolulinjat olivat testeissä siirrostusluvussa kolme. Luusolujen erilaistuksen analysoimiseen tarkoitettuja reagensseja testattiin, kun kantasoluja oli kasvatettu kaksi viikkoa rinnakkain luusoluiksi erilaistumista edistävässä kasvatusliuoksessa ja ryhmän yleisesti käytetyssä kasvatusliuoksessa. Kontrollina käytettiin solunäytteitä, joihin ei laitettu erilaistumista edistävää kasvatusliuosta.

3.1 Rasvakantasolujen eristys

Työ aloitettiin eristämällä rasvakudoksesta kantasoluja. Rasvakantasolujen eristys tapahtui steriilisti GLP-luokan (hyvän laboratoriokäytännön, Good Laboratory Practicen) perustutkimuslaboratoriossa. Rasvakudoksesta otetut näytteet pilkottiin pieniksi osiksi saksilla. Tyyppi 1 kollagenaasi -entsyymiä lisättiin pilkkomaan rasvaa pienemmiksi fragmenteiksi. Näytettä pidettiin tunti +37 °C vesihauteessa pilkkomisen nopeuttamiseksi. Kantasolut erotettiin putken pohjalle sentrifugoimalla (1000 rpm, 10 min, +4 °C) ja supernatantti poistettiin. Verisolut hajotettiin steriilillä vedellä. Solujen pesu tapahtui DPBS-liuoksella (Invitrogen, BE17-5128), jonka jälkeen näyte sentrifugoitiin (1000 rpm, 10 min, +4 °C), jotta saatiin erotettua solupelletti. Supernatantti poistettiin ja lisättiin kasvatusliuosta. Kasvatusliuos koostui DMEM/F-12-kasvatusliuoksesta (Invitrogen, 21331-020), johon lisättiin Glutamax 1X -liuosta (Gibco Invitrogen, 35050), penisilliini streptomysiini-antibioottiseosta (PEN-STREP, Invitrogen, 3810-74-0) ja haluttua seerumia. Seerumina käytettiin joko eläinperäistä vasikan seerumia (FBS, Gibco Invitrogen, 10500) tai ihmisperäistä tyyppi AB seerumia (HS, Lonza, 14-490E). Näyte suodatettiin rasvakudoksen jäämien varalta, jonka jälkeen laitettiin solususpensiota ja kasvatusliuosta steriileihin T75-pulloihin.

3.2 Kantasolujen ylläpito

Kantasolujen määriä lisättiin kasvattamalla soluja 37 °C CO₂-inkubaattorissa ja vaihtamalla solujen kasvatusliuokset säännöllisesti pari kertaa viikossa. Esilämmitettyä kasvatusliuosta lisättiin sama määrä, mitä poistettiin kasvatuspulloista. Kantasolut irrotettiin ja laitettiin uusiin kasvatuspulloihin solujen täyttäessä kasvatuspullon pohjan lähes konfluentisti eli solujen täyttäessä kasvatuspullon pohjan noin 70-80 %:sti. Kantasolujen irrottaminen tapahtui entsyymaattisesti käyttäen joko eläinperäistä Trypsin 1x -liuosta (Invitrogen, 15400-054) tai vaihtoehtoisesti rekombinanttitekniikalla bakteereista tuotettua Tryple™ select -liuosta (Invitrogen, 12563-011) kasvatusliuoksessa käytetystä seerumista riippuen. Osa soluista pakastettiin ylläpitovaiheessa, jotta ne voitiin ottaa tarvittaessa uudelleen käyttöön. Pakastamista varten soluilta otettiin vanha kasvatusliuos pois ja solut pestiin DPBS -liuoksella (5 ml). Solut irrotettiin pullon pohjalta entsyymaattisesti kuten solujen jaossa. Sentrifugoinnin jälkeen poistettiin supernatantti ja

sekoitettiin pelletti 1,5 millilitraan pakastusliuokseen (10 prosenttinen DMSO FBS- tai HS-seerumissa). Solut siirrettiin merkattuun kryoputkeen. Kryoputki siirrettiin kryojäähdyttimeen ja laitettiin -75 °C:een pakastimeen. Kryoputki siirrettiin seuraavana päivänä kryojäähdyttimestä nestetyypisäiliöön.

3.3 Kantasolujen luusoluerilaistus

Kantasoluja laitettiin 12-kuoppalevyille ja T75-pulloihin neljäksitoista päiväksi kasvaamaan n. 2500 solua/cm² testejä varten. Kantasolujen määrä laskettiin solujen irrotusvaiheessa Bürkerin-kammiossa. Kantasolut kasvoivat nopeammin ihmisperäisissä kasvatusolosuhteissa kuin eläinperäisissä kasvatusolosuhteissa, minkä takia kokeet aloitettiin eri päivinä. Soluja kasvatettiin rinnakkain kantasolujen luuerilaistumista edistävässä kasvatusliuoksessa ja tavallisessa kontrollikasvatusliuoksessa. Luuerilaistumiskasvatusliuos sisälsi DMEM/F-12, 1 prosenttia P/S-antibioottiliuosta, 10 -prosenttia seerumia ja 1 prosenttia glutamiiniliuosta ja kantasolujen luuerilaistumista edistäviä aineisosa. Nämä ainesosat olivat askorbiinihappoliuos, natriumglyserofosfaattiliuos ja deksametasoniliuos.

3.4 Immunosytologinen värjäys

Immunologista värjäystä varten kantasoluja kasvatettiin neljätolista päivää 12-kuoppalevyllä rinnakkain eläinperäisissä ja ihmisperäisissä ainesosia sisältävissä kasvatusliuoksissa, joista puolet oli kontrollikasvatusliuoksessa ja puolet erilaistuskasvatusliuoksessa. Immunologiseen värjäykseen käytettiin tutkimusaitoksen sisäistä fluoresenssivärjäysmenetelmää. Solut fiksoitiin neljä prosenttisella paraformaldehydiliuoksella. Solut pestiin fiksoinnin jälkeen kaksi kertaa yksi prosenttisella PBS -liuoksella. Solunäytteisiin lisättiin 45 minuutiksi blokkaus-liuos (10 % aasin seerumia, 0.1 % TritonX-100-liuosta ja 1 % naudan seerumialbumiinia). Solut pestiin PBS -liuoksella ja soluille lisättiin primaarivasta-aine, jotka olivat luun sialoproteiini II (BSPII; Santa cruz biotechnology) ja alkaalinen fosfataasi (TNAP; Santa cruz biotechnology). Testattavat vasta-ainelaimennokset olivat 1:100 ja 1:200. Kontrollisolujen kuoppiin ei laitettu primaarivasta-aineliuosta. Solunäytteet inkuboitiin alumiinifoliossa valolta suojattuna kylmiössä + 4 °C:ssa yön yli. Taulukossa 1 on esitetty värjäysmenetelmä yhtä solulinjaa kohti.

Taulukko 1. Rinnakkaisten näytteiden lukumäärä ja vasta-ainelaimennokset.

	Vasta- aine- tyyppi	alkuperä	HS- kuoppia	FBS- kuoppia	kuoppi- en mää- rä yh- teensä	primaariliu- osta (ul)	pipe- tointi- vara + 15%	vasta- ainetta (ul)
TNAP 1:100	IgG1 mouse	santa cruz sc-21708	2	2	4	2000	2300	23,0
TNAP 1:200	IgG1 mouse	santa cruz sc-21708	2	2	4	2000	2300	11,5
BSPII 1:100	IgG1 mouse	santa cruz sc-73630	2	2	4	2000	2300	23,0
BSPII 1:200	IgG1 mouse	santa cruz sc-73630	2	2	4	2000	2300	11,5

Inkuboinnin jälkeen solut pestiin kolme kertaa 1 -prosenttisella naudan seerumin albumiinilla ja lisättiin sekundaarivasta-aineliuos. Sekundaarivasta-aineena käytettiin Alexa488-vasta-ainetta (IgG aasi, anti-hiiri Molecular Probes, A21202), joka kiinnittyy primaari vasta-aineeseen fluoresoiden tietyllä aallonpituudella. Sekundaarivasta-ainelaimennos oli 1:400. Yhtä kuoppaa kohti lisättiin aina 500 µl valmista sekundaarivasta-aineliuosta. Taulukossa 2 esitetty värjäysasetelma yhtä solulinjaa (10 kuoppaa) kohti.

Taulukko 2. 10 kuoppaan lisättävien sekundaariliuoksien määrät.

	Vasta- aine- tyyppi	alkuperä	HS- kuo- pat	FBS- kuo- pat	yhteen- sä kuu- oppia	sekundaari- liuosta vol (ul)	pipetointivara + 15%	Vasta- ainetta (ul)
Alexa488 IgG 1:400	IgG don- key anti- mouse	Molecular Probes A-21202	10	10	20	10000	11500	28,8

Sekundaarivasta-aineen annettiin sitoutua tunnin ajan, jonka jälkeen suoritettiin kuoppien pesu kahdella eri liuoksella. Solunäytteiden pesuun käytettiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta ja PB -liuosta. PB -liuos sisälsi Na₂HPO₄ ja steriiliä vettä. Solujen tumat saatiin näkyviin fluorenssimikroskoopilla värjäämällä solut Mount Vectashield -liuoksella

(Vector laboratories, H-1200), koska liuos sisälsi tumaväriainetta. Kuoppien päälle asetettiin lasi. Värjäyksen tuloksia tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla.

3.5 Sytologiset värjäykset

Sytologisessa värjäyksessä tehtiin alkalinen fosfataasi (ALP) -värjäys sekä Alitsarin punainen-värjäys. Värjäykset suoritettiin eri näytekuopille. Solut fiksoitiin 4 -prosenttisella paraformaldehydiliuoksella. Tämän jälkeen soluille laitettiin väriliuokset. Värjäys aloitettiin Alitsarin punainen -värjäyksellä, koska väriliuoksen inkubaatioaika oli pitempi kuin ALP -väriaineen.

Alitsarin punainen -väriliuosta pipetoitiin 500 µl yhtä kuoppalevyn kuoppaa kohti. Väriliuoksen annettiin vaikuttaa huoneenlämmössä puoli tuntia, jonka jälkeen näytekuoppia pestiin neljä kertaa steriilillä vedellä. ALP-värjäykseen käytettiin fosfaattisen alkaani -kitin (Sigma-aldrich Lot.019K4345) reagensseja ja värjäysmenetelmää. ALP-värjäyksessä inkubaatio tapahtui pimeässä 15 minuutin ajan. Inkubaatioiden jälkeen suoritettiin pesu näytekuopille tislattulla vedellä. Solukuoppiin jätettiin vettä siten, että solukuopan pohja peittyi täysin. Tuloksia tarkasteltiin paljain silmin ja valomikroskoopilla.

3.6 Virtaussytometrinäytteiden valmistus ja analyysi

Kasvatuspulloissa kasvaneet solut pestiin DPBS-liuoksella ja irrotettiin pullojen pohjasta entsymaattisesti joko Trypsin 1x -liuoksella (Invitrogen, 15400-054) tai Tryple select-liuoksella (Invitrogen, 12563-011), kun solut olivat kasvaneet 80 -90 -prosenttisesti konfluenttiaseteeseen. Kasvatusliuosta lisättiin ja samassa olosuhteessa kasvaneet solut yhdistettiin yhteen putkeen. Solut sentrifugoitiin (1000 rpm, 5 min), jotta solupelletti muodostuisi. Putkesta poistettiin supernatantti. Solupelletti sekoitettiin kasvatusliuokseen, jotta syntyisi homogeeninen liuos. Solujen määrä laskettiin Bürker -laskukammiossa. FACS -näytteisiin laitettiin 100 000 solua yhteen näytteeseen, jotta mittaus tapahtuisi vaivatta ja saataisiin selkeämpiä mittaustuloksia. Näytteitä tarvittiin yhteensä 17 kappaletta yhdessä olosuhteessa. FACS -putkeen lisättiin 1 ml FACS -puskuria. FACS -puskuri sisälsi 5 % seerumia DPBS -liuoksessa. Näyte sentrifugoitiin (1500 rpm, 5 min, + 4 °C). Sentrifugoinin jälkeen näytteestä poistettiin supernatantti. Solut kiinnitettiin kylmällä (0,5 ml) 4 -prosenttisella paraformaldehydiliuoksella inku-

boimalla näytettä huonelämmössä 10 minuuttia. Solujen kiinnittämisen jälkeen solut pestiin lisäämällä 1 ml PBS-liuosta ja solunäytettä sentrifugoitiin (1500 rpm, 5 min). Putkista poistettiin supernatantti kaatamalla liuos jäteastiaan. Solupelletti sekoitettiin 0,5 millilitraan puskuriin ja säilytettiin jääkaapissa (+4 °C:ssa) seuraavaan päivään vasta-aine leimausta varten.

Pinta-antigeenivärjäyksessä käytetyt merkkiaineet olivat CD14, CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, ALP, BMPR-IA, TGF- β 1, VEGF R1, VEGF R2 ja VEGF R3. Värjäyksen aloittamiseksi poistettiin näytteistä sentrifugoimalla supernatantti ja lisättiin 80 μ l FACS-puskuria. Näytteisiin lisättiin tiettyä merkki-ainetta. Yhteen näytteeseen ei laitettu merkki-ainetta, koska sitä käytettiin taustanäytteenä. Taustanäytteillä pystyttiin tekemään tarvittavat asetukset FACS-laitteelle ja poistamaan taustahäiriötä mittaustuloksista. Taulukossa 3 on havainnollistettu suoritettuja FACS- vasta-ainevärjäyksiä.

Taulukko 3. FACS-menetelmässä käytetyt vasta-aineet.

Näytteet	Merkki-aine	Tuotenumero	Valmistaja	Merkkiainetta (μ l)
1.	Taustanäyte	-	-	-
2.	CD14-PE-Cy7	557742	BD pharmingen	2
3.	CD19-PE-Cy7	341113	BD pharmingen	4
4.	CD34-APC	21270346	Immunotools	10
5.	CD45R0-APC	340438	BD pharmingen	3
6.	CD73-PE	550257	BD pharmingen	10
7.	CD90-APC	559869	BD pharmingen	0.5
8.	CD105-PE	FAB10971P	R&D systems	10
9.	ALP-APC	FAB1448A	R&D systems	10
10.	BMPR-IA-FITC	FAB346F	R&D systems	10
11.	TGF- β 1 (LAP)-PE	FAB24631P	R&D systems	10
12.	VEGF R1-PE	FAB321P	R&D systems	10
13.	VEGF R2-PerCP	FAB357F	R&D systems	10
14.	VEGF R3-APC	FAB3492A	R&D systems	10
15.	Taustanäyte (solunsisäinen)	-	-	-
16.	VEGF-PE (solunsisäinen)	IC2931P	R&D systems	10
17.	Latent TGF- β -PE (solunsisäinen)	IC388P	R&D systems	10

Merkkiaineiden lisäyksen jälkeen näytteitä inkuboitiin 15 minuuttia kylmässä. Inkubaation jälkeen merkkiaineet olivat kiinnittyneet solujen pinta-antigeeneihin. Solunäytteisiin lisättiin 1 ml FACS -puskuria ja solunäytettä sentrifugoitiin (1500 rpm, 5 min, +4 °C) supernatantin poistamiseksi. Solut sekoitettiin 150 mikrolitraan puskuriin ja värjäystulokset mitattiin FACS- laitteella. Virtaussytometrian mittauksen suoritti FACS -laitteella ryhmän kaksi jäsentä, jotka olivat tutkija Mimmi Partikainen ja laboratoriohoitaja Miia Juntunen. Opinnäytetyössä tein kokonaisuudessaan FACS -merkkiaineilla soluvärjäykset. Olin myös mukana avustamassa virtaussytometriamittauksissa.

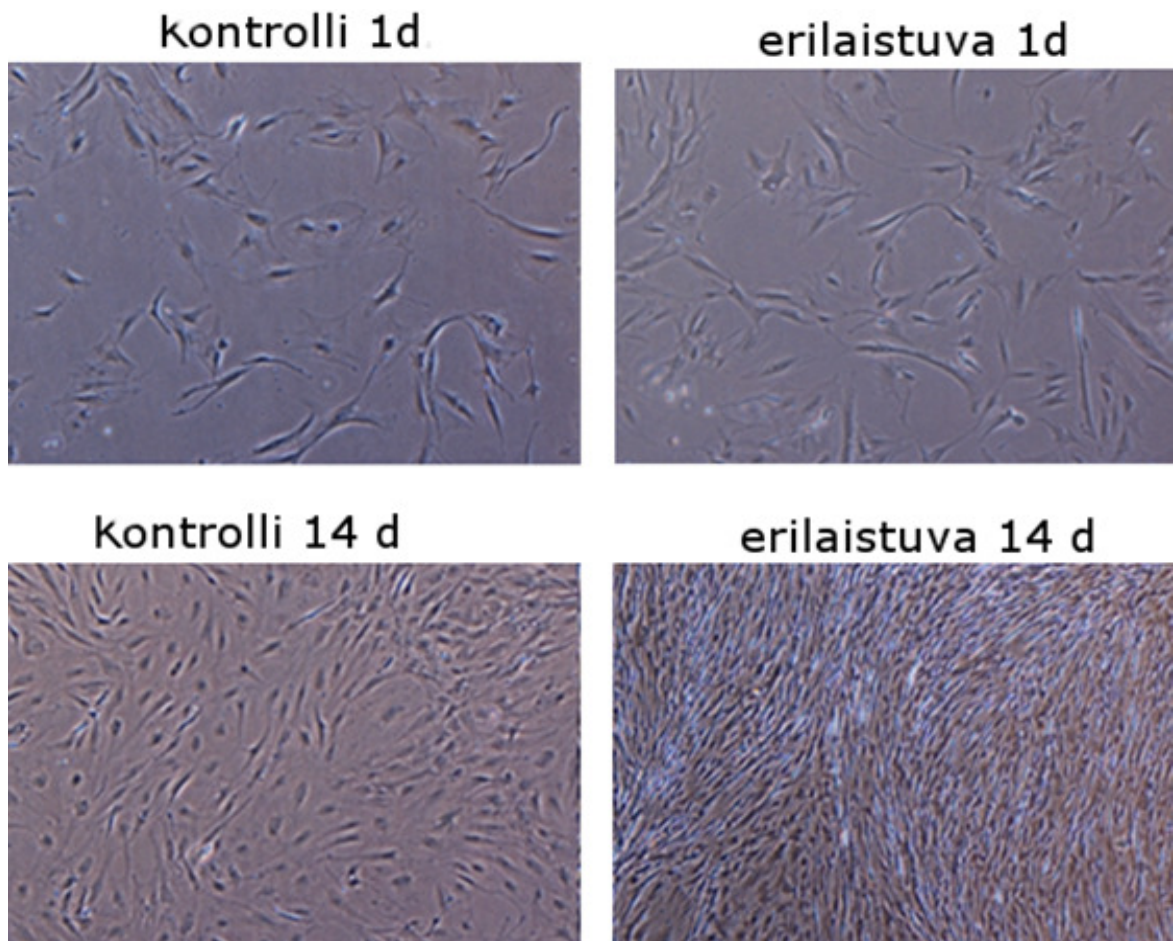
Solunsisäiset merkkiaineilla VEGF ja latentti TGF-B (ks. liite/taulukko) värjäykset tehtiin eri tavalla kuin muilla merkkiaineilla. Solujen kiinnittämisen jälkeen solut sentrifugoitiin pelletiksi supernatantin poistamiseksi ja soluille lisättiin 0,1 -prosentista saponiiniliuosta. Saponiiniliuoksesta solukalvot muuttuivat merkkiaineita läpäisiviksi. Saponiiniliuoksen lisäämisen jälkeen suoritettiin sentrifugointi (1500 rpm, 5 min, +4° C) ja näytteistä poistettiin supernatantti. Solunäytteisiin lisättiin 80 µl puskuria. Putkiin lisättiin haluttu merkkiaine, eli toiseen putkeen VEGF -merkkiainetta ja toiseen putkeen latentti TGF-B -merkkiainetta. Solunsisäisessä värjäyksessä käytettiin omaa taustanäytettä. Taustanäytteelle tehtiin samat käsittelyt kuin muille solunsisäisillä näytteillä, mutta taustanäytteeseen ei lisätty merkkiainetta. Näytteitä inkuboitiin pimeässä 15 minuuttia huoneen lämmössä. Näytteisiin lisättiin 1 ml saponiiniliuosta. Näytteet sentrifugoitiin ja poistettiin supernatantti, jonka jälkeen putkiin lisättiin 150 µl PBS -liuosta. Näytteet mitattiin samanaikaisesti pinta-antigeenivärjättyjen näytteiden kanssa FACS -laitteella.

4 Tulokset ja niiden tarkastelu

4.1 Soluviljely

Viljelyvaiheessa huomattiin, että ihmisperäisiä aineisosa sisältävässä kasvatusliuoksessa kasvatusolosuhteet edistivät solujen kasvua kuin eläinperäisessä kasvatusliuoksessa. Ihmisperäiset kasvatusliuokset ovat soluille luonnollisempi olosuhde kuin eläinperäisiä ainesosia sisältävät kasvatusliuokset, koska kantasolut eristettiin ihmisen rasvakudoksesta.

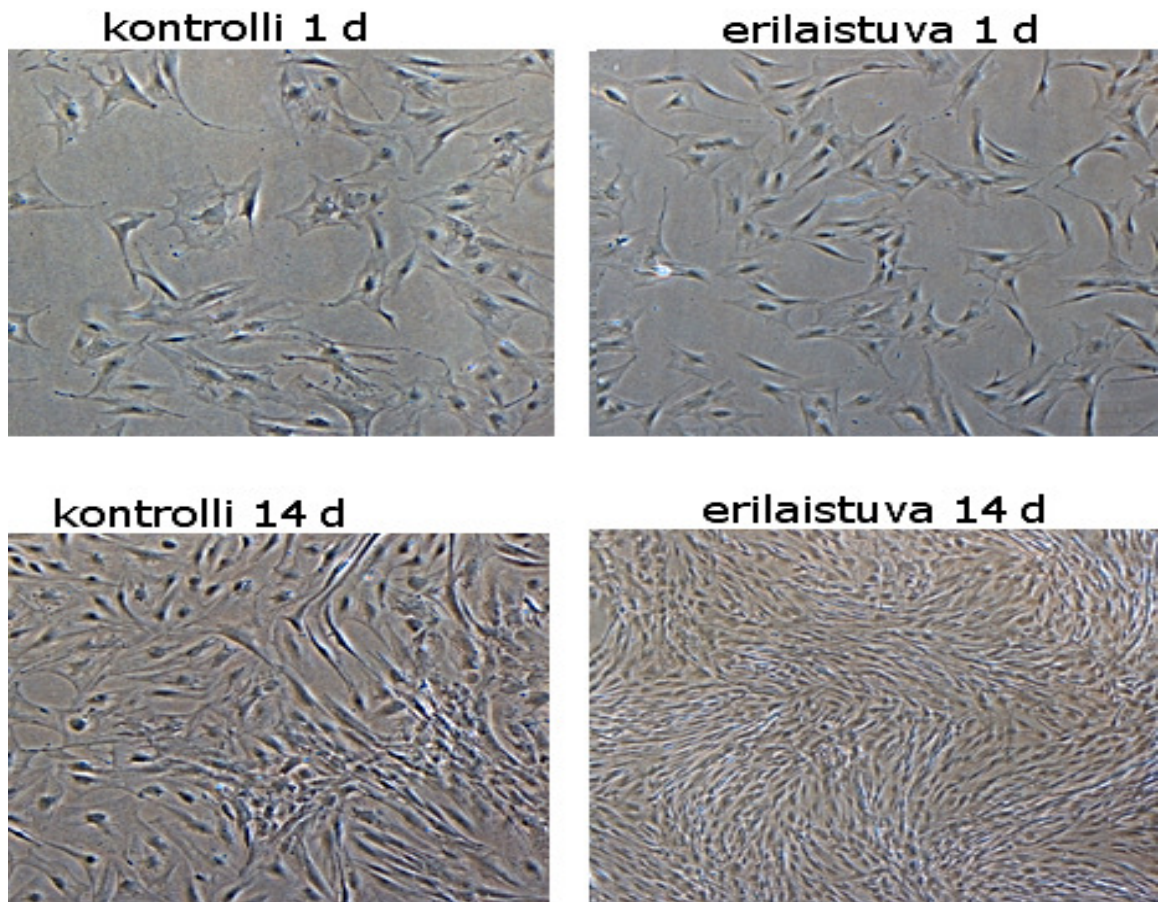
Luuerilaistusanalyysen varten kantasoluja kasvatettiin erilaistumisliuoksessa ja tavallisessa kasvatusliuoksessa 14 päivää, minä aikana solut kuvattiin. Viimeisen päivän valomikroskooppikuvissa näkyi, että kontrollisolut eivät olleet erilaistuneet juuri ollenkaan eläinperäisissä eikä ihmisperäisissä olosuhteissa. Kuvassa 6 on valomikroskoopilla otettut kuvat ihmisperäisissä olosuhteissa olevista kantasoluista (solulinja 7/11) ensimmäisenä ja viimeisenä soluviljelypäivänä.



Kuva 6. Solulinjan 7/11 kontrolli- ja erilaistusolosuhteissa kasvatetuista kantasoluista valomikroskooppikuvia kymmenenkertaisina suurennoksina. Kuvat on otettu ensimmäisenä päivänä ja kahden viikon kuluttua testien aloittamisesta ihmisperäisissä olosuhteissa kasvaneista soluista.

Erilaistumisolosuhteissa olevat solut olivat kasvaneet tiheään ja pitkittäisiksi kasvatusalustoilla, kun taas kontrolliolosuhteissa solujen morfologia säilyi muuttumattomina ihmisperäisissä olosuhteissa. Ihmisperäisissä olosuhteissa olevat solut kasvoivat nopeammin kiinni toisiinsa kuin eläinperäisissä olosuhteissa olevat solut. Kuvassa 7 on va-

lomikroskoopilla otetut kuvat eläinperäisissä olosuhteissa olevista kantasoluista (solulinja 7/11) ensimmäisenä ja viimeisenä soluviljelypäivänä.



Kuva 7. Solulinjan 7/11 kontrolli- ja erilaistusolosuhteissa kasvatetuista kantasoluista valomikroskooppikuvia kymmenenkertaisina suurennoksina suurennoksella. Kuvat on otettu ensimmäisenä päivänä ja kahden viikon kuluttua testien aloittamisesta eläinperäisissä olosuhteissa kasvaneista soluista.

Erilaistuneet solut olivat myös kasvaneet tiheään ja pitkittäisiksi kasvatusalustalla eläinperäisissä olosuhteissa. Solut eivät olleet kasvaneet eläinperäisissä olosuhteissa yhtä tiheään kuin ihmisperäisissä olosuhteissa olevat solut. Solujen morfologinen muutos oli myös havaittavissa erilaistuvissa soluissa eläinperäisissä olosuhteissa.

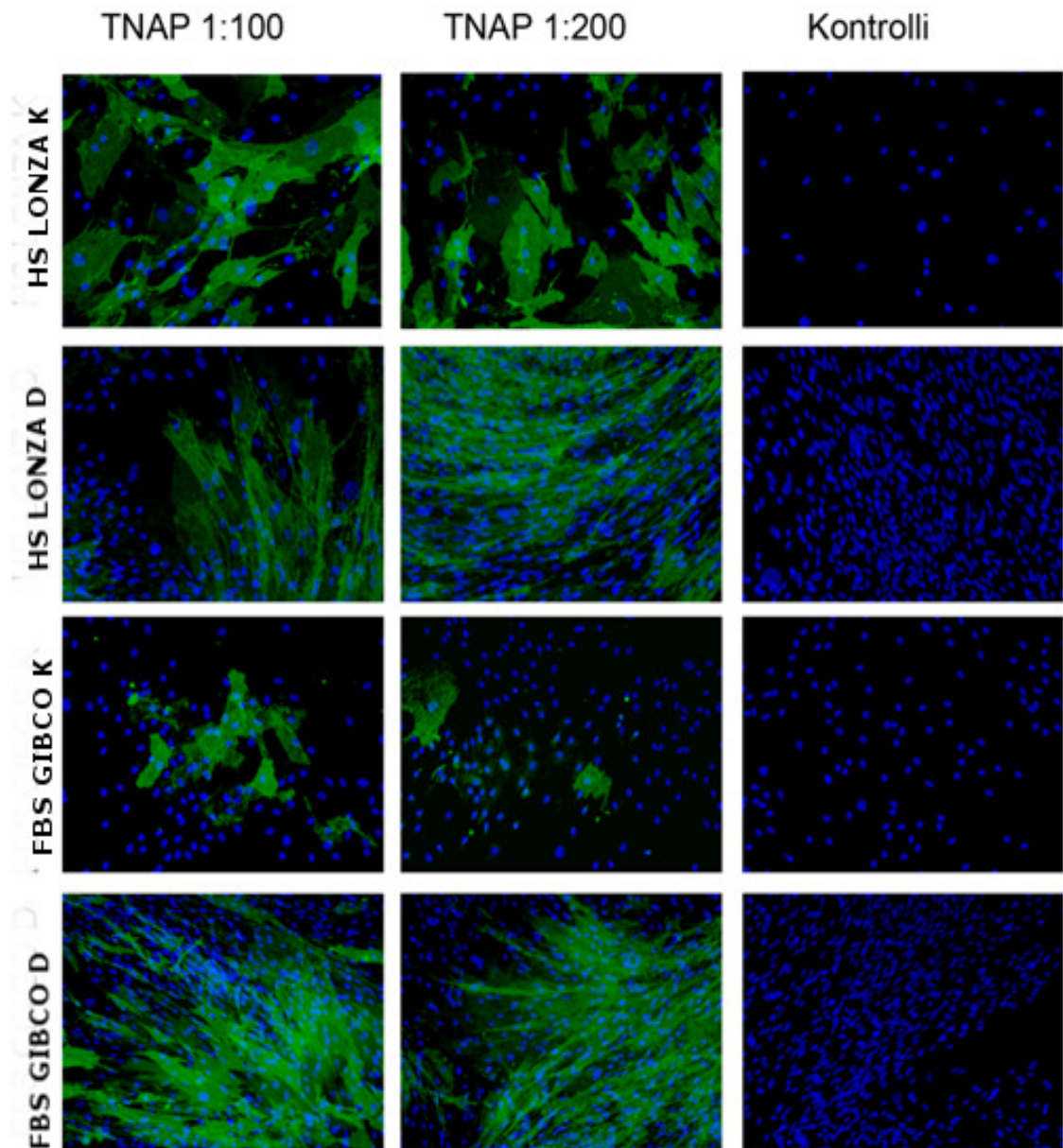
4.2 Immunofluoresenssivärjäys

Immunologisessa värjäyksessä testattiin kahden erilaisen primaarivasta-aineen (TNAP ja BSP II) sitoutumista eri kasvatusolosuhteissa viljeltyihin solunäytteisiin kahdella eri pitoisuudella. Vasta-aineiden pitoisuudet olivat 1:100 ja 1:200. Sekundaarivasta-aine

kiinnittyi primaarivasta-aineeseen (BSPII tai TNAP) tuoden näkyviin fluoresenssimikroskoopilla solun antigeenejä. TNAP on varhaisempi luueraistumisproteiini, kun taas BSPII-proteiinia muodostuu kypsissä luusoluissa mineralisaation aikana. Värjäyksen jälkeen fluoresenssimikroskoopilla otettiin kuvia näytekuoppien eri kohdista kahdella suurennoksella.

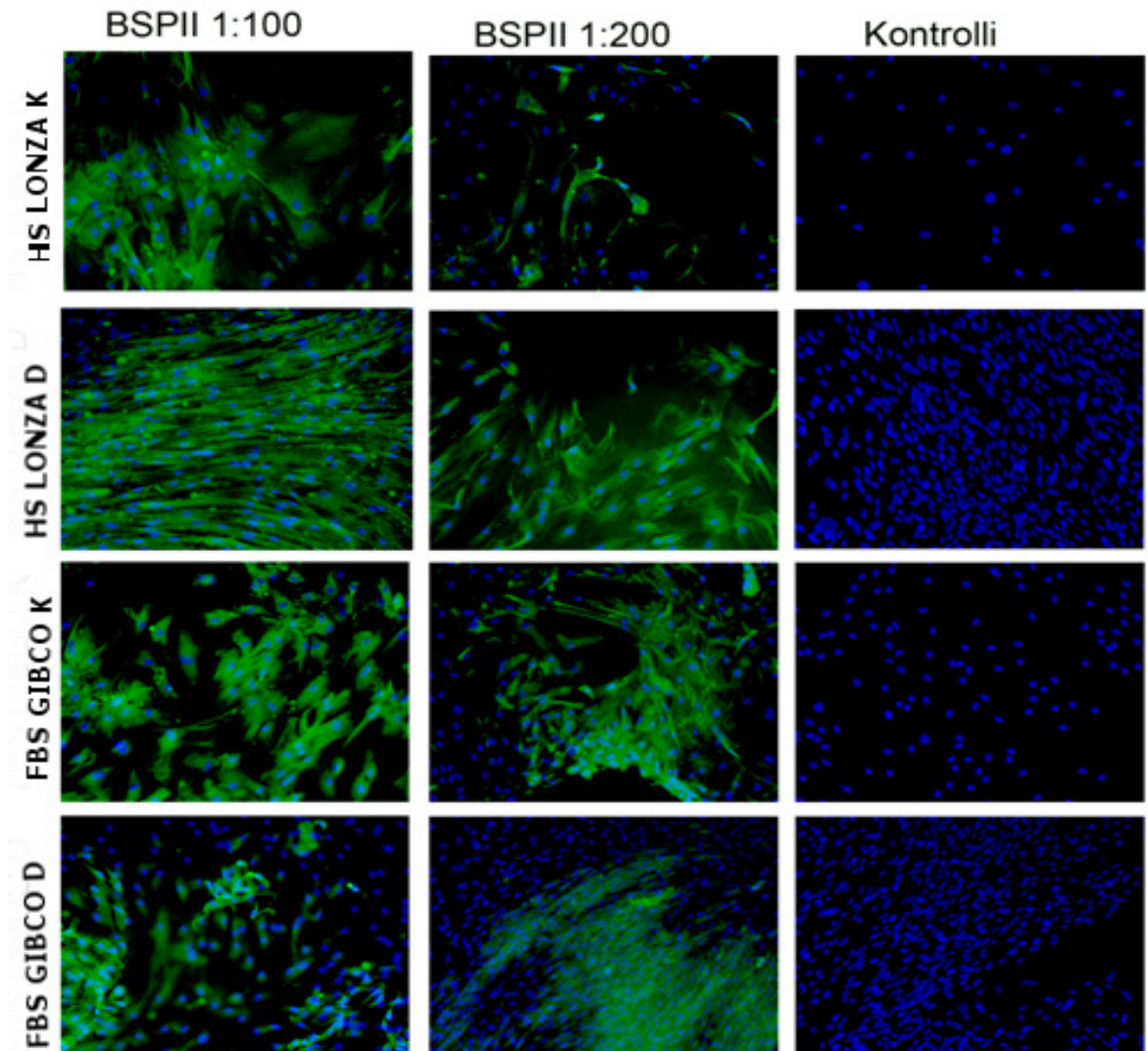
Solujen tumat värjättiin DAPIlla joka tuo näkyviin solujen tumat sinisenä fluoresenssimikroskoopilla. Sekundaarikontrollinäytteessä, jossa ei ollut primaarivasta-ainetta, näkyi ainoastaan DAPI -värjäys, mikä osoittaa värjäysmenetelmän toimivuuden. DAPI-värjäyksen perusteella erilaistumista edistävissä olosuhteissa kasvavien kantasolujen määrä oli suurempi kuin perusolosuhteissa olevien kantasolujen lukumäärä. Ihmisperäisissä viljelyolosuhteissa kantasolujen lukumäärä näytti olevan hieman korkeampi kuin eläinperäisissä viljelyolosuhteissa. Kaikki solut eivät ilmentäneet TNAP- tai BSPII-vasta-aineita, koska fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltaessa näkyi vähemmän vihreää solun rakennetta kuin sinistä solun tumaa kaikissa olosuhteissa.

TNAP -vasta-ainetta ilmeni solulinjoissa enemmän erilaistumisolosuhteessa kuin kontrolliolosuhteiden soluissa. Tämä oli havaittavissa varsinkin eläinperäisessä viljelyolosuhteessa. Ihmisperäisessä viljelyolosuhteissa olevissa soluissa TNAP -vasta-aineen ilmentymisen määrässä ei ollut yhtä selkeää eroa kontrolliolosuhteiden ja erilaistumisolosuhteiden välillä. Solujen muodossa oli myös tapahtunut havaittavaa muutosta tarkasteltaessa TNAP -vasta-ainevärjäyksen tuloksia kontrolli- ja erilaistumisolosuhteessa. Kontrolliolosuhteissa kasvaneet solut eivät kasvaneet yhtä tiheässä ja pitkittäisinä muodoltaan kuin erilaistumisolosuhteissa kasvaneet solut. Solujen morfologinen muutos oli havaittavissa sekä ihmisperäisissä viljelyolosuhteissa että eläinperäisissä viljelyolosuhteissa kaikissa kolmessa käytetyissä solulinjoissa. TNAP -vasta-aineella näkyi solujen värjäys hieman voimakkaammin kuin BSPII -vasta-aineella tehdyt värjäykset sekä eläinperäisissä että ihmisperäisissä olosuhteissa. Kuvassa 8 on esitettyä solulinjan 7/11 TNAP-vasta-ainevärjäyksen tulokset.



Kuva 8. TNAP -vasta-aineella värjätyt kantasolut ja DAPI-värjätyt kantasolujen tumat (solulinja 7/11) kymmenkertaisella suurennoksella. Fluoresenssimikroskoopilla otetuissa kuvis- sa kontrolliolosuhteiden (K) ja erilaistumisolosuhteiden (D) välillä on tapahtunut muutosta kantasolujen muodossa ja TNAP-proteiinin ilmentymisessä. Oikeanpuoleinen sarake on negatiivinen kontrolli, joka osoittaa vasta-aineen toimimisen.

BSPII -proteiinia ilmeni solujen pinnalla molemmissa pitoisuuksissa vahvasti riippumatta siitä, oliko kyseessä eläinperäiset vai ihmisperäiset viljelyolosuhteet. Erilaistumis- ja kontrolliolosuhteiden välillä ei ollut selkeää eroa BSPII -proteiinin ilmentymisessä. Kuva 9 osoittaa vasta-aineiden sitoutumisen yhdessä solulinjassa (7/11), jotka on kuvattu kymmenkertaisella suurennoksella fluoresenssimikroskoopilla.

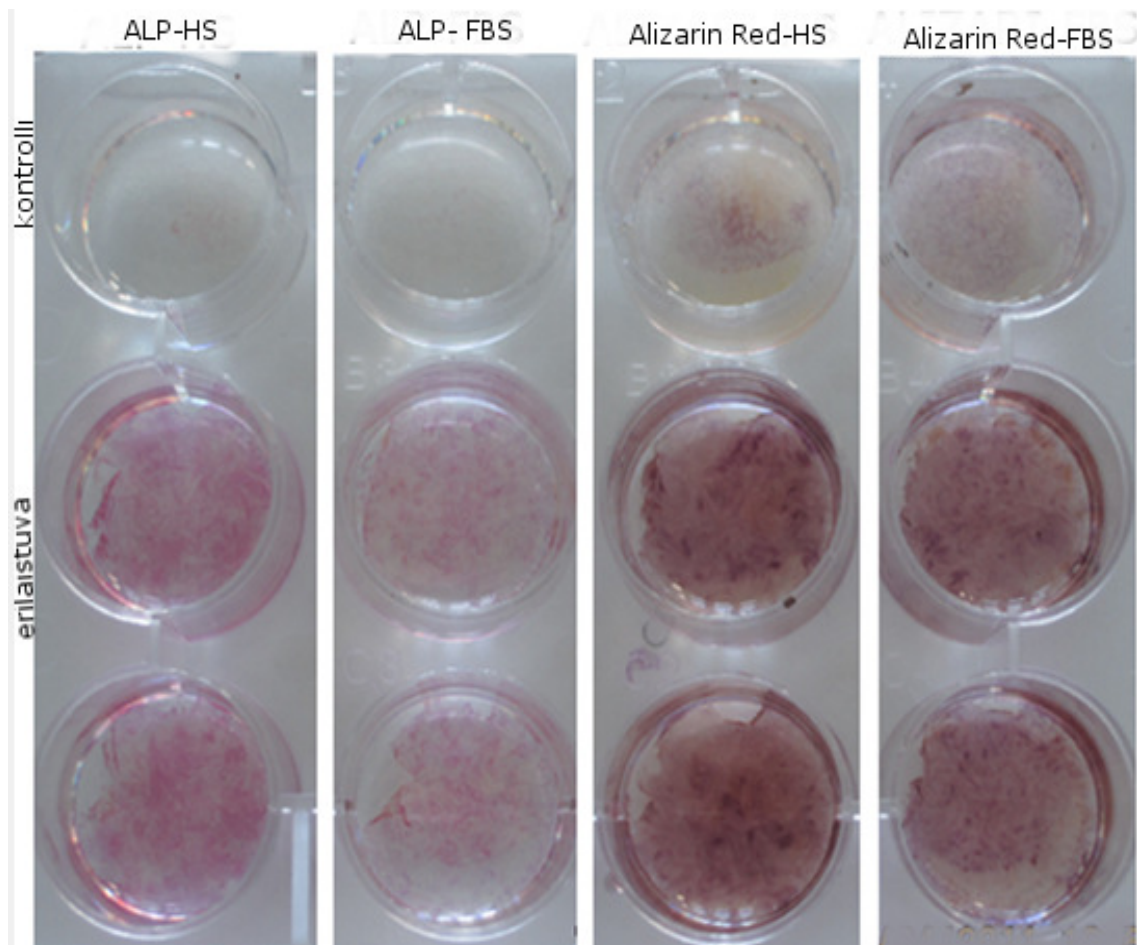


Kuva 9. Fluoresenssimikroskooppilla otettuja kuvia BSPII -vasta-aineella värjäydyistä kantasoluista ja DAPI -värjättyjen kantasolujen tumat (solulinja 7/11). Erilaistusolosuhteessa (D) solut ilmentävät hieman enemmän BSPII -vasta-ainetta kuin kontrolliolosuhteissa (K). Oikeanpuoleisessa olevassa sarakkeessa on negatiivinen kontrolli, joka osoittaa BSPII -vasta-aineen toimimisen.

Havaittavaa eroa oli vähän värjäytyneiden solujen muodossa erilaistumis- ja kontrolliolosuhteiden välillä. Solut olivat värjäytyneet vähän enemmän BSPII -vasta-aineella erilaistusolosuhteissa. Tämä oli parhaiten havaittavissa ihmisperäisissä olosuhteissa. Solut olivat myös hieman pitkittäisiä muodoltaan ja kasvoivat tiheimmässä erilaistusolosuhteissa kuin kontrolliolosuhteissa. Eroavaisuutta ei ollut havaittavissa juuri ollenkaan eri solulinjojen välillä.

4.3 Sytologiset värjäykset

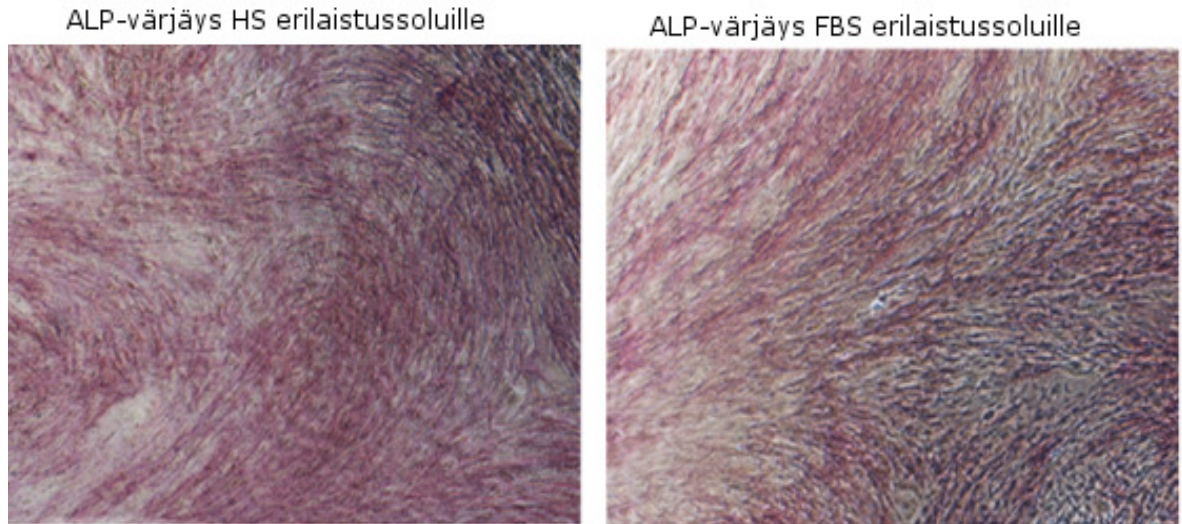
ALP -värjäyksessä kantasolujen luuerilaistumista edistävissä olosuhteissa olevat solut olivat värjäytyneet punertaviksi. Kontrollisolut eivät värjäytyneet olleenkaan. Alitsarin punainen -värjäyksessä erilaistumiskasvatusliuoksessa kasvaneet solut värjäytyivät selkeästi punertavan ruskeaksi, kun taas kontrollikasvatusliuoksessa kasvaneet solut värjäytyivät heikosti. Sytologisten värjäyksiä tuloksia voidaan tarkastella kuvasta 10.



Kuva 10. Kantasolulinjan 7/11 sytologisten värjäyksiä tulokset. Sytologisissa värjäyksissä ihmisperäisissä olosuhteissa olevat solut olivat värjäytyneet voimakkaammin.

Sytologisissa värjäyksissä oli eroa eläinperäisten ja ihmisperäisten olosuhteiden välillä.

ALP- ja Alitsarin punainen -värjäykset näkyivät voimakkaammin ihmisperäisessä viljelyolosuhteessa kuin eläinperäisissä viljelyolosuhteissa. Eläinperäisten ja ihmisperäisten olosuhteiden välistä eroa ALP -värjäyksessä voidaan tarkastella kuvasta 11.



Kuva 11. Kuvat on otettu valomikroskoopilla kymmenenkertaisella suurennoksella ALP -värjäyistä erilaistuneista soluista. Kuvassa ihmisperäisissä (HS) viljelyolosuhteissa ALP näkyy voimakkaammin ja määrältään enemmän kuin eläinperäisessä (FBS) viljelyolosuhteissa.

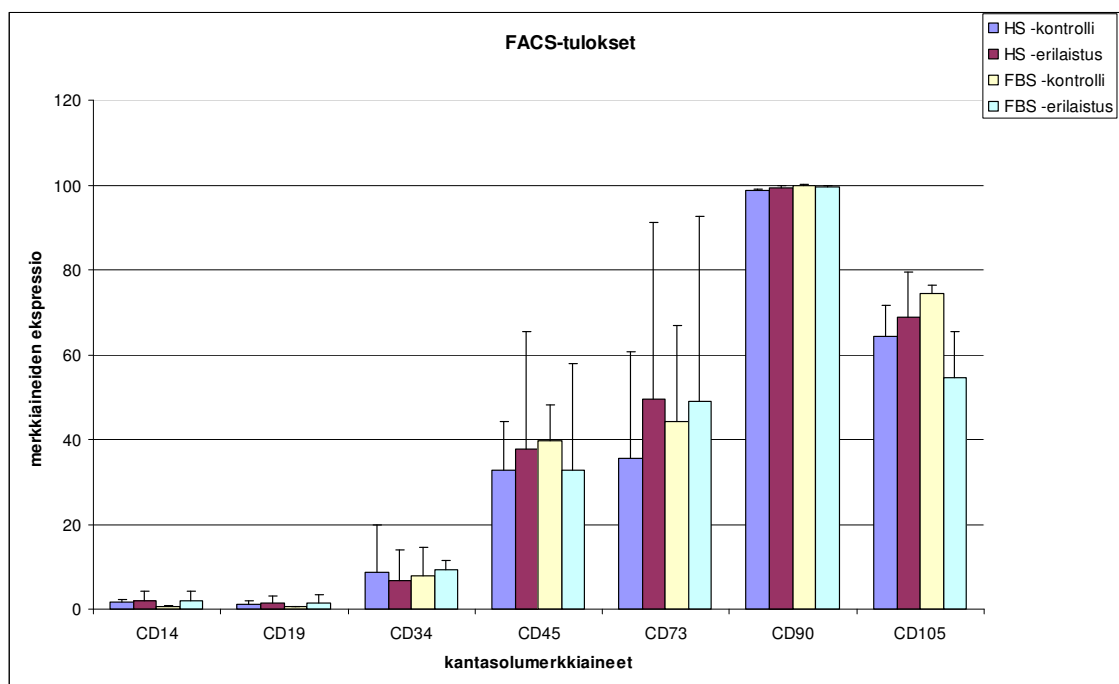
ALP- ja Alitsarin punainen -värjäyksien tulokset olivat selkeät, mutta eri solulinjojen välillä oli hieman eroa värjäyksissä. Linjoista solulinja 9/10 värjäytyi kaikista vähiten, kun taas solulinjan 8/11 solut värjäytyivät voimakkaimmin. ALP -värjäyksissä solulinjojen välinen ero oli suurempi kuin Alitsarin punainen -värjäyksillä.

4.4 Virtausytometria

Opinnäytetyössä tilastollista tulosten tarkastelua virtausytometrian osalta ei ole tehty, koska solulinjoja oli liian vähän (kolme solulinjaa) osoittamaan tilastollista merkittävyyttä. FACS -tuloksia tarkastellaan siksi tässä opinnäytetyössä merkkiaineiden suhteellisten ilmentämisprosenttiarvojen perusteella, vertailemalla merkkiaineiden keskiarvoa ja hajontaa.

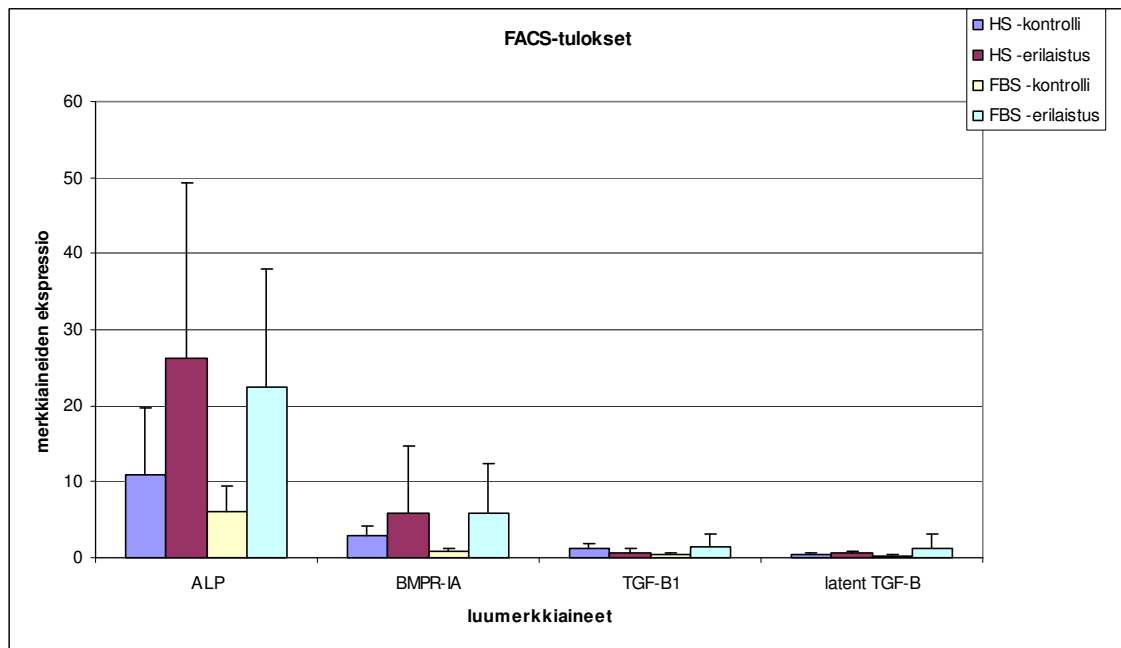
FACS -tuloksissa kantasoluille tarkoitetuista pinta-antigeeneistä osa liittyi verisoluihin (CD14, CD19 ja CD34), siksi nämä merkkiaineet eivät ilmentyneet voimakkaasti rasva-

kudoksen kantasoluissa. CD34 -merkkiaine oli ilmentynyt kaikissa viljelyolosuhteissa. CD34 -merkkiaine ilmentyy yleensä veren soluissa ja verisuonisoluissa. CD45 ilmentyi solulinjoissa kaikissa viljelyolosuhteissa. CD45 on myös verisolumerkkiaine, mutta merkkiaine kiinnittyy myös mesenkymaalisiin kantasoluihin. Pinta-antigeenit CD73, CD90 ja CD105 ilmentyivät kantasoluissa kaikissa viljelyolosuhteissa. Kaaviossa 1 on esitetty kantasolumerkkiaineiden ilmentymisen solulinjoissa.



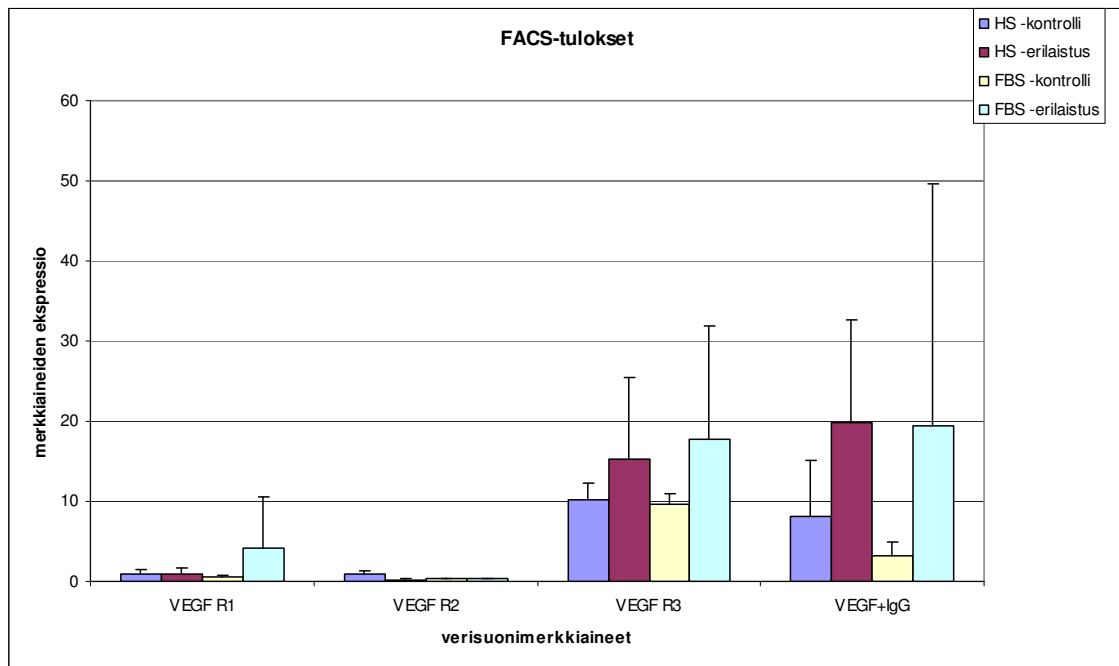
Kaavio 1. Eri kasvatusolosuhteissa olevien kolmen solulinjan kantasolujen FACS -ajon tuloksien keskiarvot ja hajonnat kantasolumerkkiaineilla.

Lumerkkiaineiden (ALP, BMPR, latent TGFB ja TGF) pitäisi ilmentyä soluissa, mikäli kantasolujen erilaistumista luusoluksi on tapahtunut. FACS -tuloksissa varhainen luuerilaistusmerkkiaine ALP ilmentyi eläinperäisissä hieman vähemmän kuin ihmisperäisissä olosuhteissa, sekä myös enemmän erilaistusolosuhteissa kuin kontrolliolosuhteissa. BMPR -merkkiaine ilmentyi hieman erilaistusolosuhteissa sekä eläinperäisissä että ihmisperäisissä olosuhteissa yhtä paljon. TGF- ja latent TGF -lumerkkiaineet eivät ilmenneet FACS -tuloksien perusteella missään olosuhteessa. Kaavioissa 2 on esitetty lumerkkiaineiden ilmentymistä kantasoluissa eri kasvatusolosuhteissa.



Kaavio 2. Eri kasvatolosuhteissa olevien kolmen solulinjan kantasolujen FACS -ajon tuloksien keskiarvot ja hajonnat luumerkkiaineilla. Luumerkkiaineista ALP ja BMPR ilmentyivät enemmän ihmisperäisissä olosuhteissa kuin eläinperäisissä olosuhteissa.

Verisuonimerkkiaineista VEGF-R3 on ilmentynyt vähän enemmän eläinperäisissä olosuhteissa kuin ihmisperäisissä olosuhteissa. VEGF -merkki-aine oli taas hieman enemmän ilmentynyt ihmisperäisissä olosuhteissa kuin eläinperäisissä olosuhteissa. VEGF- R3- ja VEGF -merkkiaineet ilmentyivät vähän enemmän erilaistumisosuhteissa kuin kontrolli-olosuhteissa. VEGF -merkkiaineella saaduissa FACS -tuloksissa oli kuitenkin erittäin paljon hajontaa. Hajonta oli suurempaa eläinperäisissä olosuhteissa kuin ihmisperäisissä olosuhteissa verisuonimerkkiaineiden VEGF -R3 ja VEGF tuloksissa. VEGF-R1 ja VEGF-R2 eivät ilmentyneet juuri ollenkaan eri olosuhteissa. Pientä havaittavaa ilmentymistä oli VEGF-R1 -merkkiaineella erilaistussoluissa eläinperäisissä olosuhteissa 9/10 -solulinjan kohdalla. Kaaviosta 3 voidaan tarkastella verisuonimerkkiaineiden antamat FACS -tulokset.



Kaavio 3. Eri kasvatusolosuhteissa olevien kolmen solulinjan kantasolujen FACS -ajon tuloksien keskiarvot ja hajonnat verisuonimerkkiaineilla.

Solulinjojen välillä oli FACS -tuloksissa suurta hajontaa. Solulinjan 9/10 eroavaisuus muihin solulinjoihin verrattuna oli suurta. Linjan 9/10 eroavaisuus saattoi johtua siitä, että solulinja oli otettu uudelleen kasvatukseen pakkasesta vuoden säilönnän jälkeen. Solulinja (9/10) ei siis ollut tuore solulinja kuten muut opinnäytetyössä käytetyt kaksi solulinjaa. Kaikki solulinjat eroavat toisistaan jonkin verran FACS -tuloksien perusteella. Solulinjojen tuloksien eroavaisuuksia voi tarkastella liitteessä (liite 1) olevista taulukoista.

5 Johtopäätökset

Solulinjat erosivat toisistaan kasvunopeuden ja erilaistumisen suhteen. Nämä solulinjojen väliset yksilölliset erot kertovat tilannetta normaalissa potilasjakaumassa. Hajontaan vaikutti solulinjojen yksilölliset erot, koska jokainen solulinja oli eristetty eri rasva-kudosnäytteistä. Kantasolujen eroihin saattoi lisäksi vaikuttaa näytteen lahjoittavan potilaan ikä, terveydentila ja muut yksilölliset eroavaisuudet. FACS -tuloksissa oli myös suurta hajontaa solulinjojen välillä, mikä vaikeutti tulosten tulkintaa. Solulinjojen välistä hajontaa saattoi aiheuttaa myös se, että FACS -analyysia suoritti kaksi eri henkilöä.

Kantasolujen erilaistumista luusolujen suuntaan pystyi havaitsemaan ALP -värjäyksellä sekä Alitsarin punainen -värjäyksellä. Nämä väriaineet ovat suhteellisen epäspesifisiä ja värjäystulokset kannattaa varmistaa muilla analyysimenetelmillä. Sytologisissa värjäyksissä kontrollisolut pysyivät lähes värittöminä, kun taas erilaistuneet solut muuttuivat värillisiksi. Eroavaisuuksia oli eläinperäisissä ja ihmisperäisissä olosuhteissa kasvaneiden kantasolujen välillä. Ihmisperäiset viljelyolosuhteet antoivat voimakkaamman värimuutoksen erilaistuneissa kantasoluissa kuin eläinperäisissä olosuhteissa. ALP -värjäytyneet solut erilaistumisolosuhteissa olivat alkaneet muuttua luusolujen suuntaan ja tuottaa alkaalista fosfataasientsyymiä, jonka pitoisuus nousee juuri ennen luun muodostumista. Alitsarin punainen -värjäyksessä erilaistumisolosuhteen solut värjäytyivät ruskean punaisiksi. Tästä voi päätellä, että luuerilaistumista on tapahtunut ja väriaine sitoutui luusolun sisältämään kalsiumiin. Luusolun suuntaan erilaistumista oli tapahtunut hieman enemmän ihmisperäisissä olosuhteissa.

Immunosytokemiallisessa värjäyksessä TNAP -proteiinia ilmentyi enemmän kantasoluissa kuin BSPII -proteiinia, koska kaikki kantasolut eivät olleet kypsyneet luusoluksi asti. Kantasolut olivat saattaneet alkaa muuttua preosteoblastisoluiksi, jotka muuttuvat osteoblasteiksi. Havaittava ero erilaistumisolosuhteiden ja kontrolliolosuhteiden välillä TNA P-värjäyksessä kertoi myös kantasolujen erilaistumisesta luusolun suuntaan. Varsinkin eläinperäisissä olosuhteissa kontrollikantasolut ilmensivät TNAP -proteiinia vähemmän kuin erilaistetut kantasolut. Kantasolujen muoto oli myös muuttunut erilaistetuissa kantasoluissa sekä eläinperäisissä että ihmisperäisissä olosuhteissa. Lisäksi kaikkia solulinjoja tarkasteltaessa eläinperäisessä olosuhteissa kantasolujen erilaistuminen oli paremmin havaittavissa kuin ihmisperäisissä olosuhteissa TNAP -proteiinin ilmentymisen perusteella. BSPII -proteiinin ilmentymisessä ei ollut yhtä selkeää havaittavaa muutosta kontrolliolosuhteen ja erilaistumisolosuhteen välillä kuin TNAP -proteiinin. Tämä vahvistaa sen, että kantasolujen erilaistuminen luuksi oli vasta alkuvaiheessa. BSPII-proteiini ilmentyi hieman enemmän kantasolujen erilaistumista ihmisperäisissä erilaistumisolosuhteissa kuin eläinperäisissä erilaistumisolosuhteissa. Huomattavaa eroa ei ollut primaarivasta-aineiden pitoisuuksien välillä. Opinnäytetyössä tehty immunosytokemiallinen värjäys antoi osviittaa primaarivasta-aineiden optimointien jatkamiselle. Primaarivasta-aineita voitaisiin vielä testata pienemmillä pitoisuuksilla.

Kantasolumerkkiaineet CD73, CD90 ja CD105 olivat ilmentyneet kaikissa olosuhteissa olevissa kantasoluissa. Tämä on tyypillistä rasvakudoksen kantasoluille. Eroavaisuutta ei ollut juurikaan kontrollisolujen ja erilaistussolujen välillä, koska kantasolujen erilaistuminen oli vielä vähäistä. Tuloksissa CD14, CD19 ja CD34 eivät ilmentyneet juuri ollenkaan eri olosuhteiden kantasoluissa, koska ne ovat verisolumerkkiaineita joita ei normaalisti esiinny rasvakudoksen kantasolujen solukalvolla. Samankaltaisia tuloksia ovat esittäneet myös Lindroos ym. artikkelissaan "The potential of adipose stem cells in regenerative medicine" [32]. Luumerkkiaine ALP ilmentyi kuten sytologisissa värjäyksissä vähän enemmän ihmisperäisissä olosuhteissa kuin eläinperäisissä olosuhteissa sekä oli enemmän koholla erilaistumisolosuhteissa. Tämä osoittaa että kantasolut olivat luusoluiksi erilaistumisen varhaisessa vaiheessa. TGF -merkkiaine olisi ilmentynyt erilaistuuolosuhteissa olevissa soluissa, jos kantasolujen erilaistuminen luusoluksi olisi osteoblastisolusta pidemmällä. Osteoblastisolujen erilaistumista käynnistävät TGF -kasvutekijä, johon myös latent TGF ja BMP kuuluvat. Verisuonimerkkiaine VEGF R3 ilmentyi vähän enemmän eläinperäisissä kuin ihmisperäisissä olosuhteissa, kun taas verisuonimerkkiaine VEGF ilmentyi vähän enemmän ihmisperäisissä olosuhteissa kuin eläinperäisissä olosuhteissa. Verisuonimerkkiaineet VEGF-R3 ja VEGF ilmentyivät voimakkaimmin erilaistetuissa kantasoluissa. Kantasolut olivat ehkä alkaneet muodostamaan verisuonisoluja, jotka ovat luun muodostuksessa myös tärkeitä. Solupopulaatiossa voi olla myös verisoluja, jotka kypsyvät erilaistuksen myötä. Verisuonien muodostuksessa aineenvaihdunta lisääntyy luusoluissa. Solulinjojen eroavaisuuksista johtuen merkkiaineita tulisi kokeilla vielä uusilla solulinjoilla.

Opinnäytetyön tulosten perusteella luuerilaistus oli voimakkaampaa ihmisperäisissä olosuhteissa kuin eläinperäisissä. Ihmisperäisissä viljelyolosuhteissa erilaistumisolosuhteissa kasvaneiden kantasolujen pieni ero kontrolliolosuhteissa kasvaneisiin kantasoluihin näkyi pääosin varhaisia luuerilaistumismerkkiaineita käytettäessä. Rasvakudoksen kantasoluilla on kyky erilaistua 14 päivässä, mutta ne eivät vielä kypsy tuottamaan mineralisoitunutta matriksia. Samankaltaisia tuloksia oli saanut Bettina Lindroos väitöskirjassaan "Characterization and optimization of in vitro culture conditions of adult stem cells for clinical cell therapy" [33] rasvakudoksen kantasolujen erilaistumisesta luusoluksi. Immunosytokemiallinen analyysimenetelmä antoi hieman erilaisen tuloksen muihin analyysimenetelmiin nähden. Varhaisen luusolun muodostukseen liittyvä TNAP -proteiini ilmeni erilaistuneissa soluissa enemmän eläinperäisissä olosuhteissa kuin ih-

misperäisissä olosuhteissa. Kantasolujen morfologinen muutos oli havaittavissa eläinperäisissä ja ihmisperäisissä olosuhteissa yhtä paljon TNAP -proteiinin ilmentymisessä.

Lähteet

- [1] Regea. Tutkimuksesta tulevaisuuden hoitoihin. Verkkodokumentti.
<http://www.regea.fi/>. Luettu 20.4.2011.
- [2] Regea. Aikuisten kantasolujen ryhmä. Verkkodokumentti.
<http://www.regea.fi/researchgroups.php?p=4&l=fi>. Luettu 20.4.2011
- [3] Sariola, Hannu. ym. 2003. Kehitys biologia: Solusta yksilöksi . Jyväskylä: Gummerrus.
- [4] Stern, Brian. ym. 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Verkkodokumentti.
<http://www.kjm.keio.ac.jp/past/54/3/132.pdf>. 05.09.2005. Luettu 19.6.2011.
- [5] Kaaro, Jani. 2005. Täällä kasvaa kantasoluja. Verkkodokumentti.
http://www.tiede.fi/artikkeli/497/taalla_kasvaa_kantasoluja. 3.10.2005. Luettu 12.5.2011.
- [6] Uusikylä, Marjo. 2009. Kantasolujen edeltäviä löytyy suomesta. Verkkodokumentti.
http://www.tekes.fi/fi/community/Asiakkaiden_tuloksia/403/Asiakkaiden_tuloksia/647?name=Kantasoluhoidojen+edellakavija+loytyy+Suomesta. 05.10.2009. Luettu 12.05.2011.
- [7] Skottman, Heli & Hovatta, Outi. 2006. Culture conditions for human embryonic stem cells. Verkkodokumentti. <http://www.reproduction-online.org/content/132/5/691.full>. 8.8.2006. Luettu 1.6.2011.
- [8] Polgren, Anna. 2001. Lupaava, pulmallinen kantasolu. Verkkodokumentti.
http://www.tiede.fi/artikkeli/252/lupaava_pulmallinen_kantasolu. Luettu 1.6.2011.

- [9] Heino, Jyrki & Vuento, Matti. 2007. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: Wsoy Oppimateriaalit Oy.
- [10] The National Institutes of Health. 2010. Stem cell basics. Verkkodokumentti. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3.asp>. Luettu 11.6.2011.
- [11] Liippo, Jussi & Lassila, Olli. 2003. Kantasolut-keisarin uudet vaatteen? Vekkkodokumentti. <http://www.terveyskirjasto.fi/xmedia/duo/duo93533.pdf>. Luettu 15.6.2011.
- [12] Bioteknologian info. Mitä kantasolut ovat? Verkkodokumentti. http://www.bioteknologia.info/etusivu/terveys/Kantasolut/fi_FI/mita_kantasolut_ovat/. Luettu 15.6.2011.
- [13] Riordan, Neil H.ym. 2007. Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression? Verkkodokumentti. <http://neilriordan.net/wordpress/wp-content/uploads/2011/03/1479-5876-5-8.pdf>. Luettu 15.6.2011
- [14] Paczkowska, E. ym. 2005. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. Verkkodokumentti. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0609.2005.00536.x/abstract>. Luettu 15.11.2011.
- [15] Ek, Annakaisa. 2009. Verisolujen tunnistusaapinen. Kankaanpää: Messon.
- [16] Zuk, Patricia A. ym. 2002. Human Adipose Tissue is a source of multipotent stem cells. Verkkodokumentti. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC138633/?tool=pubmed>. 23.8.2008. Luettu 19.6.2011.

- [17] Mattila, Minttu. 2010. Istukkaverestä peräisin olevien mesenkymaalisten kantasolujen komplementtiherkkyys. Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto. Verkkodokumentti.
<https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/23905/URN%3ANBN%3Afi%3Aju-201005311970.pdf?sequence=1>. Luettu 19.6.2011
- [18] Aalto-Setälä, Katriina, Silvennoinen, Olli & Otonkoski, Timo. 2008. Ihmisen erilaistuneiden solujen uudelleenohjelmointi kantasoluiksi. Artikkel. 3/2008. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim.
- [19] Barry, Frank P, Murphy, Mary. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol. Verkkodokumentti.
http://staging2.orthofix.com/ftp/assets/Product/Product_Files/Trinity_Evolution/Barry.pdf. Luettu 13.7.2011.
- [20] Solunetti. Luusolut. Verkkodokumentti.
http://www.solunetti.fi/fi/histologia/luusolut_1/. Luettu 1.7.2011.
- [21] Solunetti. Soluviljely. Verkkodokumentti.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/. Luettu 1.7.2011.
- [22] Lonza. Product informations. Verkkodokumentti.
https://shop.lonza.com/shop/b2c/start/%28xcm=lonza_b2b&care=DF369A2B4DC512F18852001A4B525E10%29/.do. Luettu 15.6.2011
- [23] Invitrogen. Media supplement. Verkkodokumentti.
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/media-supplements.html>. Luettu 15.6.2011.
- [24] Rahman, Misha. 2009. Introduction to flow cytometry. Oxford: MorphoSys UK Ltd.

- [25] Abcam. Flow cytometry guide. Verkkodokumentti.
http://docs.abcam.com/pdf/protocols/Introduction_to_flow_cytometry_May_10.pdf. Luettu 18.10.2011.

- [26] Dominici, M, ym. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for Cellular therapy position statement. Verkkodokumentti.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>. Luettu 18.10.2011

- [27] Solunetti. Immunosytokemia. Verkkodokumentti
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunosytokemia/2/>. Luettu 27.8.2011

- [28] Solunetti. Sytokemiallisia menetelmiä. Verkkodokumentti.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sytokemialliset_menetelma. Luettu 25.9.2011

- [29] Barger, Graca, Bailey, Messick, De Lorimier & Fan, Hoffmann. 2005. Use of Alkaline Phosphatase Staining to Differentiate Canine Osteosarcoma from Other Vimentin-positive Tumors. Verkkodokumentti.
<http://vet.sagepub.com/content/42/2/161.full.pdf+html>. Luettu 21.7.2011.

- [30] Sigma-Aldrich. Alkaline phosphatase(AP), Leukocyte (procedure No.86). Verkkodokumentti.
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/1/86.Par.0001.File.tmp/86.pdf. Luettu 21.7.2011.

- [31] Chaudhary, L.R, Hofmeisterb, A.M & Hruskaa, K.A. 2003. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. Verkkodokumentti.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328203004149#secx6>. 13.12.2003. Luettu 23.7.2011.

- [32] Lindroos, Bettina, Suuronen, Riitta & Miettinen, Susanna. 2010. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. Verkkodokumentti. <http://www.springerlink.com/content/805x7036241pv280/>. Luettu 28.10.2011.

- [33] Lindroos, Bettina. 2009. Characterization and optimization of in vitro culture conditions of adult stem cells for clinical cell therapy. Tampere: Tampereen yliopisto.

Yksittäisten merkkiaineiden FACS-tulokset

Ihmisperäistä seerumia sisältävässä kasvatusliuoksessa kasvaneiden kontrollisolujen tulokset:

Merkkiaineet	HFSC 7/11	HFSC 8/11	HFSC 9/10	Keskiarvo	Keskihajonta
CD14	2,2	1,6	1,2	1,7	0,5
CD19	1,9	1	0,6	1,2	0,7
CD34	21,5	4,2	0,2	8,6	11,3
CD45	31,3	44,9	21,8	32,7	11,6
CD73	8,1	40,6	57,6	35,4	25,2
CD90	98,7	98,4	98,9	98,7	0,3
CD105	68,6	68,6	55,7	64,3	7,4
ALP	21	4,8	6,8	10,9	8,8
BMPR-IA	1,8	2,2	4,5	2,8	1,5
TGF-B1	1,1	1,9	0,6	1,2	0,7
VEGF R1	0,9	1,6	0,5	1	0,6
VEGF R2	0,9	1,4	0,4	0,9	0,5
VEGF R3	12,6	9,4	8,7	10,2	2,1
VEGF+IgG	1,7	7,4	15,5	8,2	6,9
latent TGF-B	0,5	0,5	0,3	0,4	0,1

Ihmisperäistä seerumia sisältävässä kasvatusliuoksessa kasvaneiden erilaistuneiden solujen tulokset:

Merkkiaineet	HFSC 7/11	HFSC 8/11	HFSC 9/10	Keskiarvo	Keskihajonta
CD14	0,5	0,6	4,5	1,9	2,3
CD19	0,3	0,3	3,2	1,3	1,7
CD34	14,5	5,6	0,2	6,8	7,2
CD45	45,4	7,1	60,9	37,8	27,7
CD73	20,4	30,9	97,1	49,5	41,6
CD90	99		99,6	99,3	0,4
CD105	81,2	62,6	62,3	68,7	10,8
ALP	50,1	24,4	4,4	26,3	22,9
BMPR-IA	1,3	0,2	16,1	5,9	8,9
TGF-B1	0,4	0,4	1,3	0,7	0,5
VEGF R1	0,8	0,5	1,7	1	0,6
VEGF R2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1
VEGF R3	14,4	5,6	25,8	15,3	10,1
VEGF+IgG	7,8	18,6	33,2	19,9	12,7
latent TGF-B	0,5	0,8	0,5	0,6	0,2

Eläinperäistä seerumia sisältävässä kasvatusliuoksessa kasvaneiden kontrollisolujen tulokset:

Merkkiaineet	HFSC 7/11	HFSC 8/11	HFSC 9/10	Keskiarvo	Keskihajonta
CD14	0,4	0,8	0,5	0,6	0,2
CD19	0,4	0,4	0,5	0,4	0,1
CD34	2,2	15,5	5,4	7,7	6,9
CD45	48,4	39,2	31,3	39,6	8,6
CD73	19,8	48,1	64,8	44,2	22,7
CD90	99,8		100	99,9	0,1
CD105	76,6	74,1	72,9	74,5	1,9
ALP	8,8	2,5	7	6,1	3,2
BMPR-IA	0,6	1,1	1	0,9	0,3
TGF-B1	0,4	0,5	0,6	0,5	0,1
VEGF R1	0,5	0,6	0,7	0,6	0,1
VEGF R2	0,4	0,4	0,3	0,4	0,1
VEGF R3	9,8	10,9	8,2	9,6	1,4
VEGF+IgG	1,4	4,9	3,3	3,2	1,8
latent TGF-B	0,2	0,2	0,4	0,3	0,1

Eläinperäistä seerumia sisältävässä kasvatusliuoksessa kasvaneiden erilaistuneiden solujen tulokset:

Merkkiaineet	HFSC 7/11	HFSC 8/11	HFSC 9/10	Keskiarvo	Keskihajonta
CD14	0,3	0,9	4,5	1,9	2,3
CD19	0,4	0,5	3,5	1,5	1,8
CD34	11,1	6,5	9,7	9,1	2,4
CD45	59,9	10,4	27,8	32,7	25,1
CD73	35,4	13,8	97,9	49	43,7
CD90	99,9		99,5	99,7	0,3
CD105	56,1	43	64,5	54,5	10,8
ALP	38,7	20,6	7,8	22,4	15,5
BMPR-IA	3,8	0,6	13,2	5,9	6,5
TGF-B1	0,4	0,4	3,4	1,4	1,7
VEGF R1	0,5	0,3	11,5	4,1	6,4
VEGF R2	0,3	0,4	0,3	0,3	0,1
VEGF R3	30,6	2,5	19,9	17,7	14,2
VEGF+IgG	2,4	1,4	54,4	19,4	30,3
latent TGF-B	0,3	0,3	3,4	1,3	1,8

Värjäykseen käytettävien reagenssien valmistus**2 -prosenttinen Alitsarin punainen -liuos:**

2 g	Alizarin Red S -jauhetta
100 ml	tislattua vettä

Lisätään noin 70 ml tislattua vettä 100 ml:n mittapulloon. Siirretään 2 g Alitsarin punainen -jauhetta tislattun veden sekaan ja sekoitetaan hyvin. Lisätään loput 100 ml:n vedestä liuokseen. Säädetään pH 4.1-4.3 ammoniumhydroksidiliuoksella. pH:n säätäminen on tärkeää, ja väriliuoksen täytyy olla tuoretta. pH kannattaa myös tarkistaa väriliuoksesta, mikäli väriliuos on kuukautta vanhempaa.

10% BSA -liuos PBS:ssa, (20ml)

2 g	BSA
20 ml	PBS

BSA -jauhe ja PBS-liuos sekoitetaan keskenään putkessa. Seoksesta tulee homogeeninen, kun putken ulkopintaa pitää lämpimän juoksevan veden alla hetken. Liuos säilyy viikon ja on säilytettävä +4°C:ssa.

Blokkausliuos (10ml)

250 µl	4% TritonX-100
1 ml	10% BSA
1 ml	aasin seerumi (NDS) (suodattettava tarvittaessa)
7,75 ml	PBS

Reagenssit sekoitetaan keskenään. Valmisliuos säilyy viikon ja liuos on säilytettävä +4°C:ssa.

Primaariliuos+ pesuliuos (20ml)

0,5 ml	4% TritonX-100
--------	----------------

2 ml	10% BSA
200 µl	normaali aasin seerumi (NDS)
17,3 ml	PBS

Reagenssit sekoitetaan keskenään. Säilyy yhden viikon +4°C:ssa

Sekundaariliuos + pesuliuos (50ml)

5 ml	10% BSA
45 ml	PBS

Reagenssit sekoitetaan keskenään. Säilyy yhden viikon +4°C:ssa

Fosfaattipuskuri (PB)

A liuos	NaH ₂ PO ₄	27,6g
	dH ₂ O	1000 ml
B liuos	Na ₂ HPO ₄	28,6g
	dH ₂ O	1000 ml

Säilytetään huoneen lämmössä.

PB käyttöliuos, 0,01M, pH 7.4 (100 ml)

Laitetaan putkeen 1,15 ml A liuosta ja 3,85 ml B liuosta. Lopuksi lisätään 95 ml steriili-suodatettua vettä.

Liitteen 2 työohjeet ovat muokattu Tampereen yliopiston Biolääketieteellisen teknologian yksikön Aikuisten kantasolut -ryhmän työohjeista.

