



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

MATIAS JOKINEN
HYPOKSIKAMMIOT HIIREN ALKION FIBROBLASTIEN PROLI-
FERAATIO TUTKIMUKSESSA

Kandidaatintyö

Tarkastajat:
Tutkija Joose Kreutzer
Yliopistonlehtori Juha Nousiainen

TIIVISTELMÄ

JOKINEN, MATIAS: Hypoksiakammiot hiiren alkion fibroblastien proliferaatiotutkimuksessa

Tampereen teknillinen yliopisto

Kandidaatintyö, 38 sivua, 4 liitesivua

Heinäkuu 2018

Tekniikan ja luonnontieteiden kandidaatin tutkinto-ohjelma

Pääaine: Biolääketieteen tekniikka

Tarkastajat: Joose Kreutzer ja Juha Nousiainen

Avainsanat: hypoksia, hypoksiakammiot, proliferaatio, solulaskenta, hiiren alkion fibroblastit, happihomeostasia

Fysiologinen hypoksia on noussut kiinnostavaksi tutkimusaiheeksi solu- ja kudostutkimuksessa. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että solu- ja kudokasvatusten kasvatusatmosfäärillä on vaikutusta solujen käyttäytymiseen. Tässä tutkimuksessa käytettyjen hiiren alkion fibroblastien proliferaatio on aikaisempien tutkimuksien mukaan ollut voimakkaampaa vähähappisissa olosuhteissa kuin normaalissa huoneilmassa. Solujen ja kudosten tutkimisen tärkeys kontrolloidussa atmosfäärissä on tämän työn teemoja.

Tämän työn tarkoituksena oli osoittaa, että hiiren alkion fibroblastit proliferoituvat matallisissa happiolosuhteissa nopeammin kuin lähellä huoneilman happitasoa. Tutkimus tehtiin uudella menetelmällä, jonka toimivuus oli tarkoitus osoittaa tämän työn kokeellisessa osuudessa ja laitteen ominaisuuksia verrata jo markkinoilla oleviin hypoksialaitteistoihin.

Tutkimuksessa mitattiin kahdesta koesarjasta solujen proliferaatiota mittaamalla solujen peittämän kasvatuskaivon pinta-ala. Kokeista saatiin kahdenlaisia tuloksia. Ensimmäinen koesarja osoitti, että 5 % O₂ oli optimiolosuhte solujen jakautumiselle, kun taas toisessa koesarjassa 1 % O₂ olosuhte oli solunjakautumisen kannalta parempi olosuhte. Kokeet osoittavat, että solukasvatuksessa käytetty laitteisto toimii ja kykenee luomaan kontrolloidut olosuhteet soluviljelykaivoihin.

ALKUSANAT

Haluan kiittää työtäni ohjanneita Joose Kreutzeria ja Juha Nousiaista ohjauksesta ja kommenteista kirjoitusprosessin aikana. Haluan kiittää myös Katarina Liukkosta ja Ria Makkosta työni opponoinnista ja motivoinnista. Lopuksi haluan kiittää Aarni Joensuuta ”vilpittömästä kannustamisesta” koko kandidaatintyöprojektin aikana.

Tampereella, 5.9.2018

Matias Jokinen

SISÄLLYS

1.	JOHDANTO.....	1
2.	HYPOKSIATUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA JA MENETELMÄT	3
2.1	Hypoksian vaikutusmekanismi ja havaitseminen soluissa ja kudoksissa	3
2.2	Hapenkuljetus kehossa ja hypoksia kudoksissa	5
2.3	Hiiren alkion fibroblastit fysioksisessa ympäristössä ja käyttö tutkimuksessa	6
2.3.1	Hiiren alkion fibroblastien proliferaatio in vivo	7
2.3.2	Fibroblastien migraatio in vivo	8
2.4	Hypoksian luomiseen käytetyt menetelmät.....	11
2.4.1	Biokemiallisesti tuotettu hypoksia	11
2.4.2	Menetelmiä luoda hypoksiset olosuhteet käyttämällä kontrolloitua kaasua	12
3.	FIBROBLASTIEN PROLIFERAATIOKOKKEET JA KUVA-ANALYYSI.....	14
3.1	Tutkimuslaitteisto ja välineistö	14
3.2	Koejärjestelyt, esivalmistelut ja muutokset soluviljelylaitteistoon	16
3.3	Fibroblastien viljeleminen hypoksiakammioissa ja kuvaaminen mikroskoopilla	17
3.4	Kuva-analyysi.....	19
3.4.1	Kuvien esikäsittely proliferaatioanalyysia varten	19
3.4.2	Kuvien analysointi.....	20
3.4.3	Kuvan muuttaminen matriisiksi ja kuvan varianssisuodatus	20
3.4.4	Soluproliferaation määrittäminen varianssisuodatetusta kuvasta ..	21
4.	TULOKSET	23
4.1	Ensimmäinen hypoksiakoesarja	23
4.2	Toinen hypoksiakoesarja	25
4.3	Fibroblastien proliferaatiokäyrät	26
5.	TULOSTEN TARKASTELU	30
5.1	Koesarjojen tulosten arviointi	30
5.2	Virhelähteitä	31
6.	YHTEENVETO	33
	LÄHTEET	34
	LIITE A: KUVA-ANALYYSISSÄ KÄYTETTY MATLAB-KOODI.....	39

1. JOHDANTO

Kudosten ja solujen alentunut happipitoisuus eli hypoksia on yleinen ilmiö useissa sairauksissa. Kudosten akuuttiin hypoksia on usein seurausta hapen kuljetuksessa. Ympäristöstä aiheutuvia hetkellisiä hapenpuutetiljoja voivat aiheuttaa ohut ilma vuoristossa tai typpikuplien tukkimat verisuonet sukeltajantaudissa. Sairaudet, kuten keskushermostolliset vammat, tajuttomuus, ilmarinta, hengitystieinfektio tai sydänvamma, voivat aiheuttaa kehoon hengenvaarallisen hapenpuutetila. Kroonista hypoksiaa eli pitkäaikaista hapen puutostilaa esiintyy useimmiten kasvaimissa, joissa kudoksen liikakasvun seurauksena verisuonitus ei kykene kuljettamaan hapetta riittävän tehokkaasti kasvainten keskiöön, jolloin hapen osapaine kasvaimissa eroaa ympäröivästä terveestä kudoksesta. Vaikka hypoksia usein liittyy sairauksiin ja akuutteihin hapenkuljetusjärjestelmän ongelmiin, on se keholle tuttu ilmiö ja soluilla on mekanismit reagoida heikentyneeseen hapensaantiin toiminnallaan. Esimerkiksi pidempikestoisessa fyysisessä rasituksessa ihmisen lihassolut joutuvat riittämättömän hapensaannin takia reagoimaan energian tarpeeseen tuottamalla kehon käyttämää polttoainetta, ATP-molekyylejä, hapettomissa olosuhteissa. Hetkellinen hypoksia siis ei ole tavaton ilmiö terveissäkään kudoksissa, mutta silti kontrolloitua happiatmosfääriä ei käytetä standardina solukasvatustutkimuksissa [1]. Syynä tähän voi olla kontrolloidun happiatmosfäärin luomiseen tarvittavat kalliit ja hankalat tutkimusvälineet, kuten hanskakaapit. Kalliiden hypoksiamenetelmien takia solututkimuskentällä on tarve helpolle ja edulliselle tavalle luoda fysiologiset olosuhteet, jotta solujen ja kudoksia voidaan kasvattaa oikeanlaisessa ympäristössä.

Tässä työssä tutkitaan hiiren alkion fibroblastien proliferaationopeutta eri happiolosuhteissa. Työn kokeellisen osuuden on tarkoitus näyttää, että hypoksiakammioiden kaasuympäristöä voidaan hallita Tampereen teknillisen yliopiston Micro- and Nanosystems-laboratorion kehittämällä MiniHypoxy-laitteistolla, jolla voidaan luoda fysiologisia olosuhteita matkivat olosuhteet. Kokeellisen osuuden tuloksia verrataan hiiren alkion fibroblastien proliferaationopeuksiin kirjallisuudesta saatuihin tietoihin. Tässä työssä hapen osapaine hypoksiakammioissa valittiin tutkittavaksi parametriksi, sillä pelkästään hapen puutteen laukaisemat säätelytekijät vaikuttavat satoihin geeneihin ja siten muuttavat solun käyttäytymistä [1-3]. Tämän työn teoriaosuudessa käydään läpi hypoksian teoriaa ja sovelluksia, sekä hiiren alkion fibroblastien taustoja ja niiden käyttöä hypoksiatutkimuksessa.

Työssä tarvittava teoria on esitetty luvussa 2 Hypoksiatutkimuksen teoreettinen tausta ja menetelmät. Kokeellinen osuus esitellään luvussa 3 Fibroblastien proliferaatiokokeet ja

kuva-analyysi. Luvussa 4 Tulokset on esitetty kandidaatintyön kokeellisen osuuden tulokset. Luvussa 5 Tulosten tarkastelu on pohdittu tulosten merkityksellisyyttä ja luvussa 6 Yhteenveto on esitelty päätelmät työstä.

2. HYPOKSIATUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA JA MENETELMÄT

Hypoksia on tila, jossa kudokset tai yksittäiset solut saavat liian vähän happea. Hapen rajoittunut saanti muokkaa solujen ja kudosten käyttäytymistä. Hypoksialla voidaan kuvata myös koko eläimen tai ihmisen tilaa, jossa heikentynyt hapensaanti on syystä tai toisesta johtanut hypoksiaan. Normaalitilaa, jossa soluilla on käytössä optimaalinen määrä happea, kutsutaan normoksiaksi ja vastaavasti olosuhdetta, jossa soluilla on happea ylimäärin käytössä, kutsutaan hyperoksiaksi. Solu- ja kudostasolla hypoksia muuttaa solun normaalia metaboliaa, ja happihomeostasian järkkyyessä solut alkavat sopeutumaan muuttuneeseen tilanteeseen. Näiden termien lisäksi käytetään kudoksissa vallitsevasta happiympäristöstä nimeä fysioksia [4], joka tarkoittaa eri kudoksille ominaista hapen määrää. Fysioksia-termi on luotu erottamaan selkeästi se, että kudoksissa vallitseva 3 % - 5 % O₂-konsentraatio on kudokselle normaalitila, vaikka sen määrä olisikin liian vähäinen hengitettäväksi. Monet tutkimukset käyttävät ulkoilman normoksiaa eli 21 % O₂-konsentraatiota [5] tai inkubaattorissa normina vallitsevaa 19,9 % O₂-konsentraatiota [4] kudosten normoksian määreenä.

Tässä luvussa käsitellään hypoksiaan liittyvät vasteet ja reaktiot kudoksissa sekä kuinka hiiren alkion fibroblastit käyttäytyvät hypoksiassa. Kandidaatintyön kokeellisessa osuudessa tutkitaan fibroblastien käyttäytymistä ja tässä luvussa on kuvattu fibroblastien proliferaatiota ja migraatioon liittyvät käsitteet ja mekanismit. Hypoksian tuottamiseen käytettävät menetelmät käsitellään myös tästä luvusta, mikä toimii vertailukohtana kokeellisessa osuudessa käytettyyn menetelmään.

2.1 Hypoksian vaikutusmekanismi ja havaitseminen soluissa ja kudoksissa

Hypoksia ei ole ainoastaan poikkeuksellinen, sairauksien tai trauman aiheuttama tila kudoksessa, vaan se on normaalia esimerkiksi fyysisiä harjoitteita tehtäessä. Fyysisessä harjoittelussa hapentarve lisääntyy ja kehon on käynnistettävä hapen kuljettamista edistäviä mekanismeja pidempiaikaisia hypoksisia olosuhteita välttämällä. Esimerkiksi lihaskudoksessa mitokondrioissa tapahtuvassa glykolyysissa vapautetaan energiaa solun käyttöön, mutta mikäli happea ei ole riittävästi, siirtyy solu käyttämään maitohappofermentaatiota energiansaannin turvaamiseen. Hypoksisissa olosuhteissa NADH, eli nikotiiniamidiadeniininukleotidi ei voi pelkistyä NAD⁺:ksi, jota tarvittaisiin glykolyysin elektronisiirto-reaktioissa ATP:n tuottamiseksi. Hypoksiassa energia tuotetaan sen sijaan muutamalla pyruvaatti laktaatiksi, joka kykenee pelkistämään NADH:n ja saattamaan glykolyysin

loppuun. [6, 7] Aikuisen ihmisen kudoksissa vallitsee normaalisti 3 % - 5 % O₂-konsentraatiot ja pienetkin konsentraatioiden alenemiset aiheuttavat asteittaisen vasteen hypoksiaa vastaan, mikä tarkoittaa energia-aineenvaihdunnan muutoksia, tiettyjen säätelytekijöiden lisääntyntä määrää sekä muutoksia solusignaaloinnissa [8].

Hypoksia voidaan havaita soluista esimerkiksi punasolujen tuotantoa lisäävää hormonin EPO:n eli erythropoietiniin lisääntyneenä määränä [3]. EPO:n tuotantoa lisää säätelytekijä HIF (hypoxia induced factor). Zhu et al. [9] esittävät julkaisussaan, kuinka Northern-blottausta hyväksi käyttäen voidaan havaita lisääntynyt EPO:n määrä havaitsemalla EPO:a koodaava mRNA. Zhu et al. [9] tekemässä Northern-blottauksessa ihmisen Hep3B-solujen EPO:a tuottavien mRNA:jen määrää tutkittiin hypoksiassa ja sitä vertailtiin kobolttin indusoimaan EPO-mRNA:n tuotantoon. Kobolttia käytettiin vertailukokeessa, sillä koboltti lisää EPO-tuotantoa hypoksian tavoin vaikuttamalla suoraan solun hypoksiaan reagoiviin säätelytekijöihin.

Hypoksia voidaan havaita kudostasolla angiogeneesinä, joka tarkoittaa verisuonituksen lisääntymistä kudoksessa hapen kuljetuksen tehostamiseksi. Angiogeneesi on suora seuraus hypoksiasta, koska hapen puute aiheuttaa kudokseen stressin, joka pakottaa kudoksen lisäämään kykyänsä toimittaa happea hypoksiin soluihinsa. Michieli [10] esittää artikkelissaan, että syöpäsolut alkavat etsiä hypoksisissa olosuhteissa uusia keinoja saada happea. Kahden päivän seurannan aikana syöpäkasvain oli levinnyt ympäröivään soluväliaineeseen saadakseen happea. Kontrollina toiminut tuumori ei ollut ajautunut metastaasiaan eli ryhtynyt levittymään kudokseen [10] Toisena esimerkkinä on Facciabenen et al. [11] tekemä tutkimus, jossa 17:a munasarjasyöpäsolulinjaa tutkittiin hypoksisissa (1,5 % O₂) ja hyperoksisissa (21 % O₂) olosuhteissa. Tutkimalla syöpäsolujen solulinjojen kemokineesejä, jotka ovat signaaliproteiineja solujen välisessä viestinnässä, he osoittivat, että hypoksisissa olosuhteissa kasvaimen angiogeneesiä tukevan vaskulaarisen endoteelikasvutekijä A:n määrä kasvoi. Tutkimuksessa tutkittiin syöpäsolulinjojen geenien ilmentymistä. Solun selviytymistila aktivoituu, kun solu joutuu riittämättömään happiympäristöön [12]. Näkyvimmat erot solujen toiminnoista hypoksiassa, normoksiassa ja hyperoksiassa voidaan saada aikaan geenien ilmentymistutkimuksissa, joista saadaan selville solujen aktiiviset geenit ja niiden tuottamat proteiinit.

Hypoksia tarjoaa mielenkiintoisen näkökulman syöpäsairauksien hoitoon. Hypoksia voisi parhaimmillaan olla luonnollinen tapa tuhota syöpäkudosta, sillä hoitokeinona voisi käyttää vain hapen kuljetuksen estämistä kudokseen. Tutkimukset kuitenkin osoittavat, että hypoksia pakottaa syöpäsolut taisteluun hapestä lisäämällä sen toleranssia vastustaa kehon puolustusjärjestelmää [4, 5]. Lisäksi hypoksia vahvistaa kasvaimen verisuonitusta sekä lisää kasvaimen aktiivisuutta irrottaa itsestään etäpesäkkeitä verenkiertoon sekä soluväliaineeseen.

2.2 Hapenkuljetus kehossa ja hypoksia kudoksissa

Yleiskielessä kudosten hypoksialla tarkoitetaan hieman erilaista happikonsentraationtilaa kuin ihmisen fysiologiassa ymmärretään. Fysiologisella hypoksialla tarkoitetaan heikentyntä hapensaantia, mikä johtaa keskushermoston ja elinten vajaatoimintaan [6]. Hengitämme hengitysilman mukana 21 % happea, mikä ei kuitenkaan välity sellaisenaan kudoksille asti. Kudoksissa vallitsevat toisistaan poikkeavat happiolosuhteet riippuen kudoksen tyypistä ja sijainnista happea kuljettaviin valtimoihin nähden. Hengitysilman hapen osapaine muuttuu jo suuresti matkalla keuhkorakkulaan ja hapen määrään keuhkoissa ei näistä syistä ole sama kuin ulkoilman. Kudosten happikonsentraatioon vaikuttavat myös rasitus, hengitystiheys ja sydämen toiminta. Taulukossa 1 on esitetty hengityselimistön läpi kulkevan hapen osapaineen muutos elohopeamillimetreissä sekä prosentteina.

Taulukosta 1 nähdään, että happea on 160 mmHg sisäänhengitysilmassa, mikä vastaa 21,1 % ilman kaasuista. Hapen saapuessa keuhkoputkeen sisään hengitetyn ilman hapen osapaine laskee 150 mmHg (19,7 % O₂), kun sisäänhengitysilma sekoittuu keuhkoista uloshengityksen mukana keuhkoputkeen jääneen uloshengitysilman kanssa. Sama jatkuu hengitysilman siirtyessä keuhkorakkuloihin asti, jolloin hapen osuus keuhkorakkuloissa olevasta ilmasta on enää 110 mmHg (14,5% O₂) ja valtimoveressä 80 - 100 mmHg (10,6 % - 13,2 % O₂). Kuten aikaisemmin on todettu, kudoksen happikonsentraatio putoaa edelleen valtimoveren arvosta kudoksessa arvoon, joka on kolmesta kymmeneen prosenttiin. Taulukkoon 1 on kerätty eri kudosten tavalliset happikonsentraatiot. Taulukko pohjautuu Carreau et al. julkaisun taulukkoon [4].

Ihmisen keuhkojen keskimääräinen tilavuus on noin 2300 ml, mutta keuhkorakkuloihin siirtyy normaalissa ventilaatiossa vain 350 ml juuri hengitettyä uutta ilmaa [13]. Tämä tarkoittaa siis sitä, että keuhkoissa jatkuvasti sekoittuvat sisäänhengityksen ja uloshengityksen kaasut toisiinsa. Kaasujen sekoittuminen aiheuttaa sen, että keuhkorakkuloissa hapen osapaine laskee jo ihmistä ympäröivän ilman 21 prosentista 14,5 prosenttiin [4]. Näin ollen soluilla ei ole mahdollisuutta saavuttaa niin sanottua normoksiaa, jolla useissa tutkimuksissa [12] tarkoitetaan 21 % happikonsentraatiota. Tutkimuksissa käytetään usein 19,9 % happea, mikä on inkubaattorissa vallitseva happikonsentraatio, kun kaasuosuhteita kontrolloivaa kasvatuslaitteistoa ei ole saatavilla. Inkubaattorin huoneilmaa matalampi happikonsentraatio johtuu siitä, että inkubaattorin hiilidioksidikonsentraatiota on lisätty kudoksissa olevan hiilidioksidikonsentraation suuruiseksi [4].

Taulukko 1. *Hapen osapaineet ihmisen eri kudoksissa*

	<i>mmHg</i>	<i>pO₂ %</i>	<i>Lähde</i>
<i>Ulkoilma</i>	160	21.1	[4]
<i>Sisäänhengitysilma</i>	150	19.7	[4]
<i>Keuhkorakkula</i>	110	14.5	[4]
<i>Valtimoveri</i>	100	13.2	[4]
<i>Laskimoveri</i>	40	5.3	[4]
<i>Solu</i>	9.9-19	1.3-2.5	[6]
<i>Mitokondrio</i>	<9.9	<1.3	[6]
<i>Aivot</i>	33.8 ± 2.6	4.4 ± 0.3	[14-17]
<i>Keuhkot</i>	42.8	5.6	[18]
<i>Iho (sub-papillary plexus)</i>	35.2 ± 8	4.6 ± 1.1	[19]
<i>Iho (dermal papillae)</i>	24 ± 6.4	3.2 ± 0.8	[19]
<i>Iho (superficial region)</i>	8 ± 3.2	1.1 ± 0.4	[19]
<i>Epiteelikudokset</i>	57.6 ± 2.3	7.6 ± 0.3	[20-22]
<i>Maksa</i>	40.6 ± 5.4	5.4 ± 0.7	[23-25]
<i>Munuainen</i>	72 ± 20	9.5 ± 2.6	[26, 27]
<i>Lihäs</i>	29.2 ± 1.8	3.8 ± 0.2	[28-33]
<i>Luuydin</i>	48.9 ± 4.5	6.4 ± 0.6	[34, 35]

Taulukossa 1 ovat kudosten osapaineet ilmoitettu elohopeamillimetreissä ja prosenttiosuutena kaasusta. Eri kudosten välillä happikonsentraatiot vaihtelevat suuresti, mikä käy ilmi taulukon 1 listauksesta. Näin ollen ihmiskeholla ei voi määrittää tarkkaa raja-arvoa hypoksialle kudosten erilaisista hapenkonsentraation normaalitiloista eli normoksioista johtuen. Kudosten erilaiset vaatimukset ympäristötekijöille luovat tarpeen säädellä tutkittavien kudosten tai solujen kaasuympäristöä, sillä solujen käyttäytyminen on erilaista hypoksiassa, normoksiassa ja hyperoksiassa [12].

2.3 Hiiren alkion fibroblastit fysioksisessa ympäristössä ja käyttö tutkimuksessa

Hiiren alkion fibroblasteja käytetään yleisesti solututkimuksissa ja uusia menetelmiä tai ilmiöitä testaavissa tutkimuksissa [36, 37], sillä ne ovat yleisiä ja helposti kasvatettavissa olevia solulinjoja. Fibroblastien helpolla kasvatettavuudella tarkoitetaan, etteivät ne ole niin herkkiä kasvatusolosuhteistaan ja niitä on saatavilla. Solut reagoivat ympäristönsä muuttuviin tekijöihin, kuten lämpötilaan, yhdisteiden muuttuviin konsentraatioihin sekä kaasukonsentraatioihin. Tekemässäni tutkimuksessa tutkitaan fibroblastien käyttäytymistä soluviljelmässä erilaisissa kontrolloiduissa happikonsentraatioissa.

Tutkimuksessani käyttämäni solut ovat hiiren alkioista eristettyjä fibroblasteja, jotka kuuluvat sidekudoksen solujen ryhmään. Fibroblastit ovat jakaantuneena sidekudokseen ja ylläpitävät ja huoltavat soluväliainetta [38]. Fibroblastit kykenevät muuttamaan toimintaansa laajasti reagoimalla muiden solutyypin tuottamiin mediatoireihin. Signaalit voivat muuttaa fibroblastien proteiinisynteesiä, kollageenisynteesiä tai saada solu erilaistumaan toiseksi soluväliainesoluperheen soluksi, kuten osteosyytiksi tai kondrosyytiksi. Osteosyytit muodostavat uutta luukudosta ja kondrosyytit ovat rustosoluja. Fibroblastit ovat tällöin monipuolinen solutyyppi, joka kykenee mukautumaan erinomaisesti ympäröivän kudoksen tarpeisiin.

Fibroblasteilla on spesifi rooli kudoksen korjausprosessissa. Kudoksen vaurioitua läheiset fibroblastit alkavat jakaantua ja siirtyä vaurioituneille alueille normaalia tehokkaammin ja erittävät kollageenia ympäristöönsä. Kollageeni muodostaa ympäröivän soluväliainetta, joka edistää kudoksen parantumista sekä eristää vaurioituneen alueen [7]. Fibroblastit ovat ensimmäisten solujen joukossa siirtymässä vaurioituneille alueille. Yin et al. osoittivat tutkimuksessaan, että etenkin haava- ja arpialueiden fibroblastien migraatio ja proliferaatio kasvoi huomattavasti hypoksisisissa olosuhteissa normaksisiin olosuhteisiin verrattuna [38, 39]. Fibroblastien kyky mukautua muuttuviin olosuhteisiin ja niiden rooli kudosten parantumisessa selittää paljon niiden helppohoitoisuutta soluviljelmissä.

Kantasolujen kasvattamiseen käytetään usein syöttösoluina hiiren alkion fibroblasteja (mEF), joilla varmistetaan ravinteiden ja hapen siirtyminen kasvatettaville soluille. Hypoksiassa kasvatetut mEF:it lisääntyvät tehokkaasti ja täyttävät kasvatusalustan muuttamisen kantasolujen erilaistumiskykyä. Badger et al. osoittivat kokeissaan, että hypoksiassa toteutetussa solukasvatuskokeessa hiiren alkion fibroblastien kanssa kasvatetut pluripotentit kantasolut eivät näyttäneet kärsineen hypoksiasta kuuden kuukauden kokeessa. Tutkimuksessa verrattiin normoksiassa kasvatettuun kontrolliin hypoksiassa kasvaneita soluja, eikä suuria eroja eri happikonsentraatioissa kasvatettujen solujen proliferaatioissa osoitettu. [37] Näin ollen fibroblastit ovat osoittautuneet toimivan hyvin hypoksisisissa olosuhteissa ja ne käyttäytyvät feeder-soluina kantasolututkimuksessa samalla tavalla hypoksisisissa ja normaksisisissa olosuhteissa.

2.3.1 Hiiren alkion fibroblastien proliferaatio in vivo

Proliferaatiolla tarkoitetaan suvutonta solunjakautumista mitoosissa. Tarkastellessa laboratorioissa petrimaljalla kasvavaa solujoukkoa, proliferaatio kuvaa solujen lisääntymistä. Solut tarvitsivat ideaaliset olosuhteet jakautuakseen, sillä useat nisäkkäiden solut elävät vain rajatun ajan ja jakautuvat useaan kertaan elinikensä aikana [40]. Solukasvatuksessa kontrolloitavia ympäristötekijöitä ovat fysikaalis-kemialliset parametrit, kuten O_2 - ja

CO_2 -konsentraatiot, pH, lämpötila ja osmoottinen paine sekä fysiologiset ympäristötekijät, kuten hormoni- ja ravinnekonsentraatiot [41]. Fysiologinen ympäristö voidaan asettaa ideaaliseksi valitsemalla soluille sopiva kaupallinen medium. Fysikaalis-kemiallisia olosuhteita voidaan asettaa ideaalisiksi esimerkiksi inkubaattorilla, jolloin inkubaattori-kaappi huolehtii sopivasta lämpötilasta. Osmoottinen paine ja pH voidaan asettaa sopiviksi mediumin avulla.

Tavallisesti sopivat parametrit nisäkkäiden solulinjojen kasvatukselle ovat Sigma Aldrichin julkaiseman Handbook: *Cell culture basics* -solukasvatusohjekirjan mukaan: pH 7,4; 4-10 % CO_2 ja lämpötila 36 °C - 37 °C [41]. Ohjekirja ei ota kantaa minkälaisessa happikonsentraatioissa soluja tulisi kasvattaa. Kuten aiemmin todettua, happikonsentraatio vaihtelee hyvin paljon, jolloin happikonsentraatiot täytyy valita koekohtaisesti. Hiiren fibroblasteja on kuitenkin tutkittu useissa tutkimuksissa ja niiden proliferaationopeudesta on tietoa eri happikonsentraatioissa. Tutkimuksessa Yoshida et al. osoittivat, että hypoksia lisää fibroblastien autofagiaa eli kudosten sisäistä solusyöntiä. Hypoksia lisää solujen toksisuutta, mutta tutkimusryhmä huomasi, että hiiren alkion fibroblastit eivät olleet niin herkkiä hypoksialle kuin esimerkiksi ihmisen ihon fibroblastit. [37] Tutkimukset ovat osoittaneet, että hiiren alkion kantasolut kehittyvät tehokkaimmin hypoksisessa 5 % O_2 konsentraatioissa, kun taas 21 % O_2 kasvatettujen solumäärä oli alhaisempi kuin hypoksiassa 5 % O_2 olosuhteissa kasvatettujen solujen. [36, 37] Myös muut tutkimukset ovat osoittaneet, että hiiren alkion fibroblastien proliferaatio on alhaisemmissakin happikonsentraatioissa (3% O_2) tehokkaampaa kuin korkeammassa [12].

2.3.2 Fibroblastien migraatio in vivo

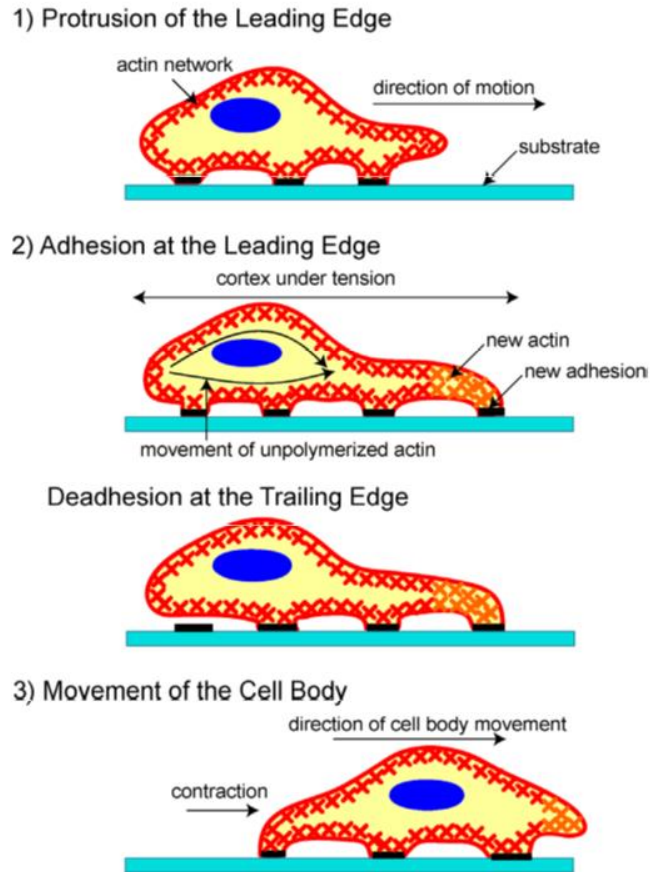
Fibroblastit reagoivat ympäristön muutoksiin monin eri tavoin. Kun soluja kasvatetaan lasipinnan päällä soluille suotuisissa olosuhteissa, solut pyrkivät täyttämään niille annettun tilan jakautumalla ja liikkumalla. Fibroblastien liikettä lokaatiosta toiseen kutsutaan migraatioksi. *In vivo* kasvatetut solut kiinnittyvät lasipintaan tai toisiinsa ei-spesifisten elektrostaattisten vuorovaikutusten avulla. Lisäksi solujen välillä vaikuttavat spesifiset sitoutumiset, joilla tarkoitetaan solujen adheesiomolekyylien, kuten selektiinien, integriinien ja cadheriinien sitoutumista toisiinsa solujen välillä. Yksittäisen solun adheesio voi purkautua solun reagoidessa saamiinsa signaaleihin ympäristöstä. Tällöin solu irrouttuu ja alkaa liikkumaan suotuisampaan paikkaan. [8]

Sytoskeletonilla on suuri rooli liikkeen tuottamisessa eläinsoluissa. Sytoskeleton on yhdistelmä kolmesta biopolymeeristä: aktiinista, mikroputkista ja filamenteista. Nämä kolme biopolymeeria yhdessä luovat solun liikkeen. Aktiini toimii sytoskeletonin moottorina, sillä se kykenee dynaamisesti mukautumaan uudeksi rakenteeksi. Aktiiniverkosto täyttää usein solun reunaosat ja tuottaa liikkeen solukalvon läheisyydessä. Mikroputket

taas suuntautuvat yleensä solun keskustasta solun reunoja kohti ja ne kykenevät ohjaamaan solun liikkeen suuntaa kyvyllä liikuttaa aktiiniverkoston liittynyttä mikroputken päätä. Filamentit sitovat sytoskeletonin muihin solun rakenteeseen ja tekee sytoskeletosta yhtenäisen rakenteen. Sytoskeletonin uloimpana oleva rakenne eli solukalvon läheisyydessä oleva aktiiniverkosto kykenee tuottamaan solun liikkeen.

Solun liikkumisessa on kolme vaihetta: kurottautuminen, kiinnittäytyminen ja irrottautuminen sekä liike. Kuvassa 1 on esitetty nämä vaiheet ja ensimmäisessä vaiheessa solu signaalin saadessaan alkaa kurottautua ohjattuun suuntaan polymerisoimalla aktiinisäikeitä kohti solukalvoa venyttäen sitä eteenpäin. Aktiinin polymerisaatio voi aktivoida ulkoisesta mekaanisesta stressistä, jolloin aktiiniverkoston rakenne solukalvon lähellä muuttuu ja solu depolymerisoi väärin asettuneen aktiiniverkoston sekä polymerisoi uuden aktiiniverkoston vastaamaan solun uutta muotoa. Aktiinisäikeet eivät ole jäykkiä, vaan ne kykenevät elastisuutensa ansiosta taipumaan kohdatessaan pieniä painolasteja tai voimia. Solu voi muiden solujen signaloimana lähteä kurottautumaan uuteen suuntaan polymerisoimalla uutta aktiiniverkostoa kuvan 1 kohdan 1 ja 2 mukaisesti. Solu lopettaa polymerisoinen, kun se törmää johonkin, jota se ei voi liikuttaa tai se kohtaa liian suuren voiman, jota vastaan se ei voi liikkua. [7] Aktiiniverkosto ei kuitenkaan ole täysin stabiili rakenne, joka pitäisi solun muodon kasassa. Aktiiniverkostossa vaikuttaa myös niin sanottu Brownin liike eli molekyylien lämpöliikkeestä johtuva siksak-liike.

Kun solu on muodostanut kurouman liikkeen suuntaan, tapahtuu kaksi asiaa saman aikaisesti: solu kiinnittyy kuroumallaan uuteen kohtaan alustasta ja irrottautuu päinvastaisesta suunnasta. Kiinnittymisessä solun integriinit eli solukalvon integraaliset soluväliainereseptorit kiinnittyvät soluväliaineessa oleviin molekyyliin, kuten kollageeneihin.



Kuva 1. *Fibroblastin soluliikkeen vaiheet 1) kurottautuminen liikesuuntaan 2) polymerisoidun solujalan kiinnittyminen uuteen kohtaan ja irtaavan solujalan depolymerisoituminen 3) solun siirtyminen liikesuuntaan uuden solujalan päälle.*
[42]

Nämä proteiinit koostuvat kahdesta erilaisesta glykoproteiinista, jotka muodostavat heterodimeeriparin, joka spesifisesti sitoutuu kohdemolekyyliinsä. Integriinien lisäksi myös syndekaattit ja selektiinit ovat mukana solun sitoutumisessa soluväliaineeseen. Näitä kiinnittymisreseptoreita on solukalvolla suuri määrä ja niiden sitoutumisaffiniteetti on heikko, mikä mahdollistaa useiden kiinnityskohtien pitämisen solun irtoamisen estämiseksi ja ympäristön tunnustelun heikolla sitoutumissidoksilla. Solun solukalvon reseptorit kiinnittyvät ligandehinsa soluväliaineeseen ja muihin soluihin.

Viimeisessä solun migraatiovaiheessa tapahtuu itse siirtyminen. Solu siirtyy kokonaisuudessaan uusien kiinnityspisteidensä päälle. Myosiinimoottorit liikuttavat aktiiniverkosta solun kehossa ja takaosassa siten, että solu saa kuroumaa kohti olevan liikkeen aikaiseksi. Myosiini on ATP:ta energianlähteenään käyttävä proteiini, joka liikuttaa aktiinisäikeitä joko liukumalla tai kävelemällä säiettä pitkin ja siten siirtäen säiettä eteenpäin.

2.4 Hypoksian luomiseen käytetyt menetelmät

Hypoksian luominen käyttämällä ainoastaan hypoksiakammioita sisältää muutamia huomioon otettavia kohtia. Normaalisti hypoksia luodaan asettamalla kammioon hypoksiset olosuhteet kaasun avulla. Kuitenkin mediumin ja ilman välinen happitasapainon tasapainottuminen ottaa aikaa useamman tunnin [10]. Toinen haaste on kasvatusastian hetkittäinen altistuminen normaali-ilmanalalle, kun kasvatusastiaan esimerkiksi vaihdetaan medium tai tehdään tutkimustoimenpiteitä, kuten värjäyksiä tai fiksaatioita. Tällöin hypoksia katoaa kasvatusastiasta ja on osoitettu, että nämä lyhytaikaisetkin hypoksian katoamiset vaikuttavat solujen geenien ilmentymiseen [10].

Seuraavassa osiossa on esitelty erilaisia keinoja luoda hypoksia kasvatusastiaan tai mikrosysteemiin. Kandidaatintyön kokeellisessa osuudessa on käytetty uudenlaista solukasvatusemikrosysteemiä. Tämän takia vertailukohdiksi on otettu vanhoja menetelmiä, kuten biokemiallisesti ja hypoksiakammioiden avulla tuotettua hypoksiaa.

2.4.1 Biokemiallisesti tuotettu hypoksia

Kemiallisesti tuotetussa hypoksiassa, hypoksian luomiseen voidaan käyttää kobolttikloridia (CoCl_2) tai desferrioxamine (DFX), jotka kykenevät luomaan simuloitun hypoksian solukasvatusemediumiin [43]. Etenkin CoCl_2 on laajasti käytetty kemikaali kudoksen hypoksian simuloimiseen. CoCl_2 ja DFX eivät kuitenkaan poista fyysistä happea mediumista vaan aiheuttavat hypoksisen vasteen aktivoimalla tai stabilisoidulla HIF-1 [44]. Solujen toimintaa vähähappisessa ympäristössä säätelee hypofia-inducible factors eli HIF transkriptiotekijä. HIF-1:llä on tärkeä rooli kehon happitasapainon säätelyssä, sillä se säätelee lähes sataa geeniä. [2, 3, 45] Nuo HIF:n säätelemät geenit parantavat hapen kuljetusta aktivoimalla angiogeneesiä sekä säätelemällä kehon hapetus-pelkistysreaktio tasapainoa ja energiatasapainoa. HIF-1 on osoitettu reguloivan myös solujen proliferaatiota, ja adheesiota, soluväliaineen metaboliaa ja glukoosin metaboliaa [46]. Näin saadaan pelkästään HIF-1 säätelytekijää säätelemällä luotua hypoksinen ympäristön vaste solukasvatukseen, mikä tosin vaikuttaa vain solun geenien ilmentymiseen. CoCl_2 ja DFX:llä tuotettua hypoksiaa voidaan kritisoida siitä, ettei se ota huomioon todellisen happivajauksen vaikutusta soluun, vaan solut reagoivat ainoastaan HIF-1 tekijän muuttuneeseen määrään. Lisäksi kyseisten kehoon kuulumattomien kemikaalien vaikutusta solun toimintaan on vaikea arvioida.

Toinen biokemiallinen tapa tuottaa hypoksia on käyttää erityisiä happea kuluttavia entsyymireaktioita. Entsyymaattisesti toteutetussa hypoksiassa yleensä käytetään entsyymiparia glukoosioksideaasi ja katalaasi [47]. Glukoosioksideaasi hapettaa beta-d-glukoosia tuottaakseen glukonihappoa ja vetyperoksidia kuluttaen samalla happea. Katalaasi taas pilkkoo vetyperoksidia vedeksi ja hapeksi, jolloin happea sitoutuu tuotteisiin jääneeseen vesimolekyyliin. Hypoksian luomiseen voidaan käyttää myös toisia happea kuluttavia

entsyymejä kuten lakkaasia. [47] Entsyymeillä toteutettu hypoksia voidaan ajatella kobolttikloridia ja DFX:ää luonnollisemmaksi tavaksi luoda happiympäristöä soluille, mutta toisaalta entsyymien biologista vaikutusta solun toimintaan muuten kuin lopputuotteiden osalta on vaikea sanoa. Tällöin täytyy ottaa huomioon solun kohonnut glukakonihiappotasoa ja kuinka solu muuttaa käyttäytymistään tämän ilmiön takia. Myös suuret määrät glukooxioksidaasia ja katalaasia soluja ympäröivässä mediumissa voi signaloita solut tekemään hypoksia käyttäytymisestä poikkeavaa.

2.4.2 Menetelmiä luoda hypoksiset olosuhteet käyttämällä kontrolloitua kaasua

Perinteisin tapa luoda hypoksiset olosuhteet soluviljelmään on sulkea soluviljelykasvatusastia huoneilmalta ja kytkeä se haluttuun atmosfääriin, esimerkiksi 5 % happea sisältävään ilmaan. Tällöin kammion ilmaa kontrolloidaan laitteiston avulla ja soluviljelämä saatetaan haluttuihin olosuhteisiin vain ympäröivää kaasua muuttaen. Käyttämällä kontrolloitua kaasua saadaan näkyviin solun todellinen vaste hypoksisiin olosuhteisiin, mikä aikaisemmin esitellyissä menetelmissä on keinotekoisesti tuotettu. Kaasun sijaan voidaan myös käyttää ennalta käsiteltyjä mediuumeja, joiden happiosapaine on laskettu soluissa ja kudoksissa vallitseviin olosuhteisiin. Fiksattua mediumia käytetään paljon erilaisien bioreaktoreiden ja mikrofluidististen laitteiden kanssa, joissa hypoksian luominen kaasuilla tai biokemiallisesti voi olla vaikeampaa [44]. Mediumin fiksaukseen perustuvia menetelmiä ovat kehittäneet yhdysvaltalainen yritys nimeltä Celertia. Celertian PetakaG3 -tuotteen tuote LOT (Low Oxygen Transfer) on bioreaktori, jonka avulla voidaan asettaa 1-21 % happikonsentraation bioreaktoriin. [48] PetakaG3-laitteen yhteyteen on mahdollista saada happianturi, joka monitoroi fluoresenssianturin avulla reaaliaikaisesti happikonsentraatiota. Kyseisessä laitteessa hypoksia toteutetaan hypoksisella mediumilla, jonka happi- ja hiilidioksiditasot ovat asetettavissa sopivaksi. Tällöin olosuhteita ylläpidetään tai halutessa muutetaan vaihtamalla solujen mediumia. Mediumiin asetettu hypoksia kuitenkin purkautuu varsin nopeasti, mikäli se on kosketuksissa huoneilman kanssa. Näin ollen ilman täydellisesti suljettua systeemiä olosuhteet ovat epästabiliitit ja toisaalta suljetun systeemin rakentaminen voi olla vaikeaa sovelluksesta riippuen.

Hypoksiakammiosovelluksia on solututkimuksen saralta useampia. Hypoksia voidaan toteuttaa solukasvatukseen tarkoitetussa inkubaattorissa, johon saa kytkettyä hiilidioksidin lisäksi myös hapen ja typen, jolloin kaikki ilman komponentit ovat säädettävissä. Tämänlaisia inkubaattoreita on ainakin kaupallisesti tarjolla ThermoFisherin tuotekatalogissa [49]. Näillä kolmikaasuinkubaattoreilla voi säätää kaikkien kolmen kaasun suhdetta, mutta asetettu olosuhde alkaa välittömästi katoamaan, kun solukasvatus otetaan huoneil-

maan tutkittavaksi. Inkubaattorien avulla toteutetun hypoksiatutkimuksen ongelmia vastaan on kehitetty erilaisia hypoksiakammioratkaisuja, joissa olosuhteet voidaan kyetä pitämään stabiileina soluviljelyn aloittamisesta loppuun asti.

Hypoksiakammiosovelluksia ovat muun muassa suljetut kontrolloidun ilman kaapit eli kansankielisesti hanskakaapit, jossa kokonaisen kaapin olosuhteet ovat hallittavissa. Hanskakaapeissa on nimensä mukaisesti kaapin seinämään kiinnitetyt paksut muovihanskat, joiden avulla pystytään käsittelemään kaapin sisältöä. Hanskakaappeja on tarjolla moniin eri käyttötarkoituksiin ja pienimmät, edullisimmat ja muovista valmistetut ovat pöydän päälle laitettavia liikuteltavia laatikoita, joissa voi tehdä suojattuna perustutkimusta. Hanskakaapit, joihin on mahdollista saada kontrolloitu atmosfääri vaativat jo hieman enemmän tilaa sekä isot kaasupullot kontrolloidun atmosfäärin saamiseksi. Kontrolloidun atmosfäärin hanskakaappien valmistaja Labconco lupaa kaappien kykenevän tuottamaan 0,0005 % O₂-konsentraation ja erinomaisen tiiveyden [50]. Hanskakaapit takaavat siis erinomaisen suorituskyvyn ja puhtauden sekä mahdollistaa tutkittavien näytteiden käsittelemisen esimerkiksi solukasvatuksen aikana. Lisäksi on hanskakaappeja pienempiäkin yksiköitä, joihin luoda kontrolloitu atmosfääri. Fisher Scientific myy myös Bel-Art™ SP Scienceware™ Techni-Dome™ 360 Glove Chamber -nimistä laitetta, johon on mahdollista kytkeä haluttu atmosfääri ja ei kuitenkaan vie kokonaisen hanskakaapin verran tilaa. Kuitenkaan kyseiseen kenttäkäyttöönkin soveltuvaan kontrolloidun atmosfäärin hanskalaatikossa ei ole mahdollista säädellä lämpötilaa tai ilmankosteutta. [51]

Kyseisillä hypoksiakammiosovelluksilla voidaan erinomaisesti ylläpitää solukasvatusta halutussa kaasufaasissa, mutta kun soluja täytyy jakaa tai tutkia mikroskoopilla, solujen hypoksia katoaa vähitellen ja ”normalisoituu” huoneilman mukaiseksi. Broxmeyer et al. osoittivat tutkimuksissaan, kun hypoksisissa olosuhteissa kasvatettu soluviljelmä altistetaan hetkittäisesti huoneilmalle, solujen geenien ilmentyminen muuttuu merkittävästi [52]. On siis tutkimusnäyttöä siitä, että nopeat muutostilat soluja ympäröivässä kaasuo-losuhteissa muuttavat solujen käyttäytymistä. Tämän ilmiön takia on tarve tarkastella uusia menetelmiä tutkia solu- ja kudosisäisiä täydellisen stabiileissa olosuhteissa, jotta voidaan simuloida kehon sisäisiä olosuhteita ja olla antamatta tutkimusolosuhteiden muutosten vaikuttaa tutkimusdataan.

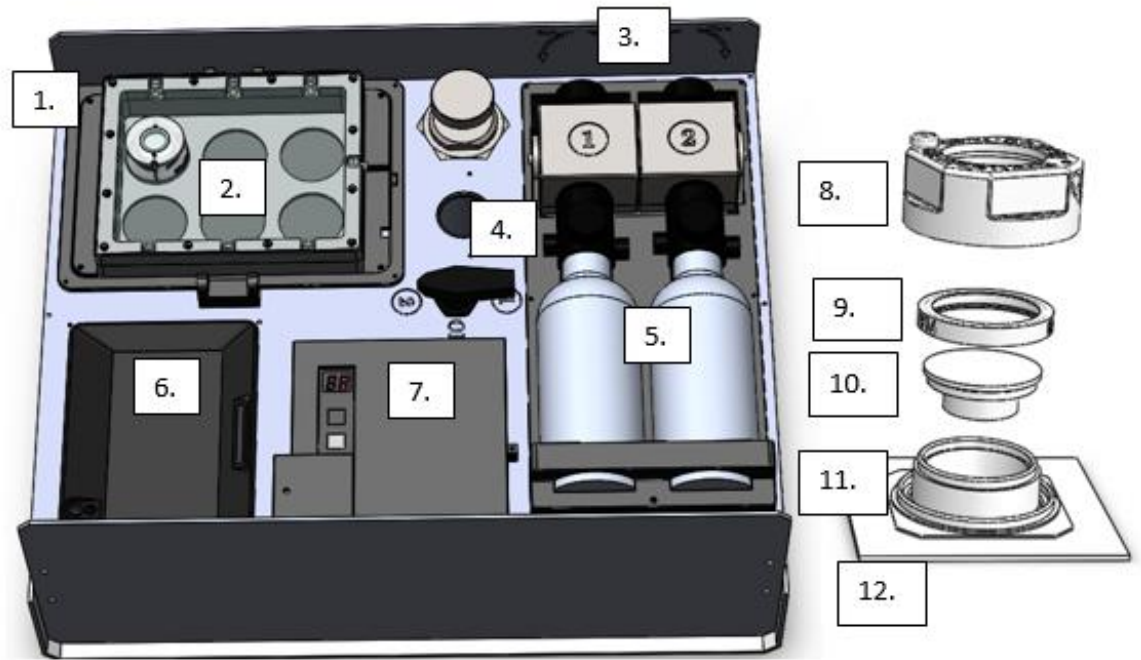
3. FIBROBLASTIEN PROLIFERAATIOKOKKEET JA KUVA-ANALYYSI

Tämän kandidaatintyön kokeellisessa osuudessa testattiin Tampereen teknillisen yliopiston Micro- and Nanosystems tutkimusryhmässä kehitetyn uuden hypoksiakammiosovel-
luksen, MiniHypoxy –soluviljelylaitteiston, toimivuus seuraamalla hiiren alkion fib-
roblastien proliferaatiota kammiossa. Käytännön kokeiden tarkoituksena oli osoittaa, että
hypoksia syntyy kammiossa olevaan solukaivoon. Hypoksia osoitettiin solujen prolife-
raatiomuutoksilla 1 % O₂, 5 % O₂ ja 19 % O₂ atmosfääreissä. Fiksattujen atmosfäärien
lisäksi pidettiin referenssikaivoja inkubaattorissa, joka happikonsentraatio on 19,9 % O₂.
Proliferaation muutokset määritettiin tutkittavien solujen proliferaatiokäyrästä, joka teh-
tiin mikroskooppikuvista kuva-analyysin keinoin. Koe koostui neljän päivän solukasva-
tusjaksosta, jossa seurattiin solujen kasvua mikroskopoimalla hypoksiakammioita 24 tun-
nin välein. Tulosten varmistamiseksi koe toistettiin uudemman kerran.

3.1 Tutkimuslaitteisto ja välineistö

Tässä osiossa on esitelty tutkimuslaitteisto ja välineet, joita on käytetty kokeiden suorit-
tamiseksi. Osioista on jätetty pois soluviljelyssä käytetyt materiaalit, jotka löytyy tarvitta-
essa ThermoFischerin soluviljelyoppaasta [41].

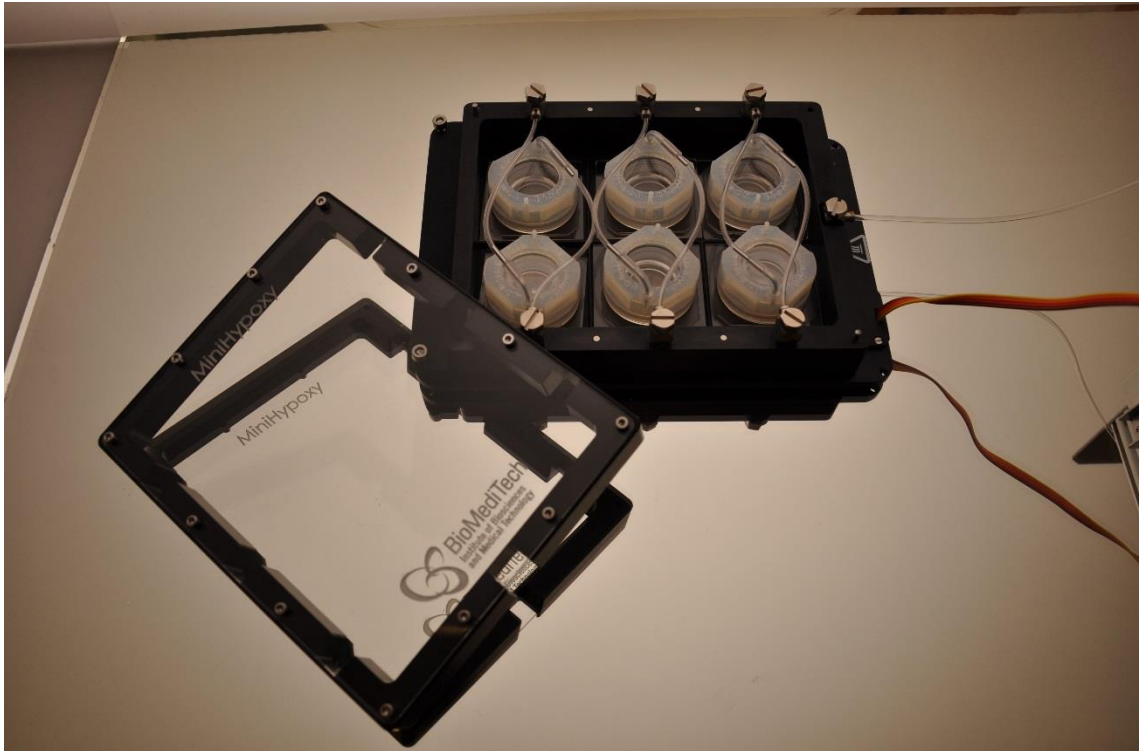
Kokeissa käytettiin MiniHypoxy-laitteistoa, jonka avulla soluja voi kasvattaa kontrol-
loiduissa olosuhteissa. MiniHypoxy on liikuteltava solukasvatusalusta, joka sisältää so-
luille tärkeät lämpötilan ja atmosfäärin kontrolloimismahdollisuudet. Kuvassa 2 on esi-
tetty laitteisto ja sen komponentit.



- | | | |
|----------------------------|---------------------------|------------------|
| 1. Lämpölevy | 5. Kaasupullot | 9. Kansirengas |
| 2. Kaasunjakolaatikko | 6. Lämpölevyn kontrolleri | 10. Kansi |
| 3. Auki/kiinni venttiilit | 7. Virtalähde/akku | 11. Kaivorakenne |
| 4. Kaasun valintaventtiili | 8. Kammion hattu | 12. Lasilevy |

Kuva 2. *MiniHypoxy-soluviljelylaitteisto*

Kuvassa 2 on solukasvatuslaitteisto, jota sovellettiin kokeissa. Kaasunjakolaatikko (2) rajoittaa kaasuvirtauksen 5 ml/min ja jakaa kaasun tasaisesti kuudelle kammionle. Kaasu ohjattiin kolmesta erillisestä kaasupullosta solukammioille. Kuvassa 2 näkyy osista 8-12 koostuva solukasvatuskammio, jossa kaivorakenteeseen laitetaan tutkittavat solut kasvatamaan ja ne suljetaan kannella (10), joka tiivistetään kansirengasalla (9). Tämän jälkeen kaivorakenteen ja kameran päälle asetetaan kammion hattu (8), joka sulkee kammion ilmatilan huoneilmasta. Kuvassa 3 nähdään, kuinka kaasut tuodaan kammioon kaasunjakolaatikon avulla.



Kuva 3. Hypoksiakammiot kaasunjakolaatikossa lämpölevyn päällä

Kaasunjakolaatikko eli hypoksialaatikko suljetaan kannella, jotta lämpölevyn tuottama lämpö pysyy tasaisena laatikon sisällä. Lisäksi läpinäkyvän laatikon ikkunan päälle asetettiin musta valonsäteet estävä kansilevy. Solukasvatuslaitteiston lisäksi tutkimuksessa solujen kuvaamiseen käytettiin Zeissin Observer Z1 -mikroskooppia.

3.2 Koejärjestelyt, esivalmistelut ja muutokset soluviljelylaitteistoon

Kokeita varten valmistettiin kaivorakenteita kahdeksan kappaletta. Samankaltaisia kaivorakenteita on käytetty aikaisemmassa tutkimuksessa [53]. Kaivorakenteita tehtiin valamalla valmistettua PDMS-liuosta muottiin, joka paistettiin 60 °C asteessa 10 tunnin ajan. Valmistetut PDMS-rakenteet liitettiin lasilevyjen päälle ja desinfioitiin 70 % etanolilla ja laitettiin 30 minuutiksi UV-lampun alle, jotta kaikki epäpuhtaudet ja elävät organismit saadaan poistettua kaivosta ennen solujen lisäämistä.

Solukokeissa kuvassa 2 esitettyä laitteistoa muokattiin siten, että kaasunjakolaatikkoon tuotiin yhden kaasun sijaan 3 eri kaasua. Yksi kaasuista kulki laatikon kautta kahdelle liittimelle ja kaksi muuta tuotiin hypoksialatikon kahdesta seinän läpiviennistä laatikon sisälle. Näin ollen hypoksialatikkoon saatiin kolmelle rinnakkaiselle hypoksiakaivolle happiatmosfäärit 1 % O₂, 5% O₂ ja 19% O₂. Muita muutoksia soluviljelylaitteistolle ei tehty.

3.3 Fibroblastien viljeleminen hypoksiakammioissa ja kuvaaminen mikroskoopilla

Kokeellinen osuus voidaan jakaa kahteen vaiheeseen. Soluviljelmän aloittaminen ja hypoksian asettaminen kasvatuskaivoihin ja soluproliferaation seuraaminen mikroskoopilla.

Kokeet aloitettiin siirrostamalla hiiren alkion fibroblasteja (mEF) kasvatusmaljasta 50 ml falcon-putkeen. Kyseiset hiiren alkion fibroblastit olivat olleet hetken aikaan käytössä muissa tutkimuksissa ja niiden jakaantumisluku oli noin 20 luokkaa. Solujen siirrostaminen aloitettiin valmistelemalla tarvittavat liuokset: PBS, trypsiini ja kasvatus medium lämmittämällä ne 37 °C lämpötilaan. Inkubaattorista otettu T25-kasvatusastiasta imettiin vanha medium pois ja solujen peittävä kasvatusastian pohja huuhdeltiin PBS-pesuliuoksella. PBS-liuos imettiin pois ja kasvatusastian lisättiin 0,4 ml trypsiiniä. Trypsinin tarkoitus on irrottaa kasvatusmaljassa tiukkaan istuvat solut irti astian seinämästä. Trypsiniläisyyden jälkeen kasvatusmaljaa inkuboitiin neljä minuuttia inkubaattorissa. Trypsinoinnin jälkeen varmistettiin mikroskopoimalla, että solut ovat pyörityneet ja irronneet kasvatusmaljan seinämästä. Seuraavaksi trypsiinin vaikutus pysäytettiin lisäämällä kasvatusmaljaan 4,6 ml tuoretta kasvatusmediumia ja näin saatu solususpensio siirrettiin 50 ml falcon-putkeen.

Solususpensiota sekoitettiin pipetoimalla sitä edestakaisin mittapipetillä, jotta suspensio olisi mahdollisimman tasalaatuinen solulaskentaa varten. Sekoitetusta suspensiosta otettiin 2 x 10 µl näyte Burker-solulaskentakammioihin. Solulaskennan perusteella mediumia lisättiin siten, että ensimmäisessä koesarjassa soluja oli 300 000 ja 150 000 solua millilitrassa mediumia rinnakkaisina kasvatuskaivoina. Toisessa mittaussarjassa tehtiin taas 200 000 solua millilitrassa sisältävä solususpensio. Tämän jälkeen solususpensiosta jaettiin 1 ml suspensiota solukasvatuskaivoa kohden. Kuvassa 4 on esitetty esimerkkikuva solususpensiota sisältävästä kaivorakenteesta.



Kuva 4. *Hypoksiakammio koostuu lasikannesta, solukaivosta ja kammion sulkevasta hatusta. Kuvan solukaivoon on lisätty 1 ml solususpensiota.*

Solususpensiolla täytetyt kaivot suljettiin lasikannella ja laitettiin inkubaattoriin kahdeksi tunniksi, jotta solut kiinnittyisivät solukaivon pohjan lasilevyille. Kun solut olivat kiinnittyneet lasilevyille, kaikki kaivot kuvattiin ja näin saatiin aloituspiste solujen proliferaatiokäyrälle. Mikroskooppikuvien ottamisen jälkeen solukasvatuskaivot suljettiin kammiohatuilla ja asetettiin omiin määriteltyihin olosuhteisiin. Hypoksiakammioita oli molemmissa kokeissa kahdeksan kappaletta. Rinnakkaisia kammioita kasvatettiin 1 % O₂, 5 % O₂, 19 % O₂ ja inkubaattorin 19,9 O₂ % happiatmosfääreissä. Lisäksi kussakin kaasupullossa oli 5 % CO₂ ja jäljelle jäävä osuus kaasupulloissa oli typpeä. Inkubaattori käytti suodatettua huoneilmaa, jonka hiilidioksidin osuus oli säädetty arvoon 5 %. Tämän jälkeen soluja pidettiin kytkettyinä kontrolloituihin kaasuihin neljän päivän ajan ja kuvattiin 24 tunnin välein.

Solujen proliferaatiota seurattiin ottamalla Zeissin Observer Z1 -käänteismikroskooppiin liitetyllä AxioCam 702 mono kameramoduulilla kuvia hypoksiakammioista säännöllisesti. Kuvat otettiin irrottamalla kaasuletku hypoksiakammioista ja kammio siirrettiin kokonaisuudessaan mikroskoopin automatisoidun ristisiirtopöydän päälle. Ensimmäisellä kuvauskerralla mikroskoopin kuvausohjelmaan tallennettu kuvausprotokolla kohdistettiin siten, että protokolla kuvaa koko kaivon. Mikroskooppiin asetettu kuvausprotokolla asetettiin kuvaamaan nelinkertaisella suurennoksella yhteensä 96 pientä kuvaa. Joka kuvan välissä mikroskooppi siirtää kaivoa mikroskoopin linssin päällä ristisiirtopöydän avulla ottaen kuvia kammioista siten, että 96 osakuvasta muodostuu kuvamatriisi, joka

kattaa koko kammion. Kuvat tallennettiin analysointia varten ja protokolla tallennettiin ensimmäisellä kerralla jokaiselle kammiolle, jolloin kaikkien hypoksiakammiot aikapisteiden kuvaaminen tehtiin samalla protokollalla. Tämä mahdollisti sen, että kammiot olivat samalla tavalla kohdistettu kuvamatriisiin ja nopeutti siten kuvaamisprosessia.

3.4 Kuva-analyysi

Soluviljelykokeiden tuloksena on jokaisesta kammiosta neljä aikapistevalokuvaa, joista yksittäisen valokuvan koko on noin 500 Mb. Kaikki mikroskooppikuvat jälkiprosessoitiin kuvien laadun parantamiseksi ja lopulta analysoitiin proliferaation määrittämiseksi.

Tässä luvussa on esitetty kuva-analyysin vaiheet pääpiirteittäin. Kuvien prosessointiparameterit, solulaskurin toimintaperiaate ja matlab-skriptin laskentaparametrit selviävät tässä luvussa.

3.4.1 Kuvien esikäsittely proliferaatioanalyysia varten

Kuvat käsiteltiin Zeiss:n omalla mikroskooppikuvien käsittelyyn tarkoitettulla ZEN 2 lite -ohjelmalla. Koska mikroskoopilla otetun kuvamatriisin yksittäiset kuvat menivät osittain päällekkäin toistensa kanssa, yhdistettiin kaikki 96 erillistä kuvaa ZEN:n avulla yhtenäiseksi kuvaksi, jossa kuvien rajat poistettu. Kuvien rajojen poistaminen onnistui siten, että mikroskoopilla otettujen kuvien reunat olivat 10 % toistensa päällä, jolloin ZEN-ohjelman työkaluilla päällekkäiset alueet onnistuttiin automaattisesti yhtenäistämään. Näin 96 kuvan mosaiikilta näyttävä matriisi muuttui yhtenäiseksi kuvaksi. ZEN-ohjelman avulla myös poistettiin epätasaisen valaistuksen aiheuttamat varjot kuvamaalla ensin tyhjä kaivo, jonka varjoista ZEN muodosti varjomaskin. Varjomaskin avulla ZEN suodatti kuvaolosuhteista johtuvan varjon hypoksiakammioiden kuvista ja teki solujen histogrammista homogeenisemmän, mikä on tärkeä yksityiskohta myöhemmin esiteltävän kuva-analyysin kannalta.

Solujen proliferaation määrittämiseksi toteutin Matlab-laskentaohjelmalla solujen pinta-alaa ja määrän arvioivan ohjelman. Ohjelma määrittää ensimmäisestä aikapisteestä solujen määrän. Ensimmäisessä aikapisteessä hiiren alkion fibroblastit ovat pyöristyneitä ja usein erossa toisistaan, jolloin ohjelman parametreja muuttamalla on mahdollista tunnistaa yksittäiset solut solujen koon perusteella. Jokaisesta kuvasta määritetään solujen peittävä pinta-ala, jonka avulla arvioidaan solujen proliferaatiota. Solujen jakautuessa solut täyttävät solukasvatuskaivon pohjaa, jolloin pinta-ala indikoi solujen nopeutta jakautua ja levittäytyä solukaivossa.

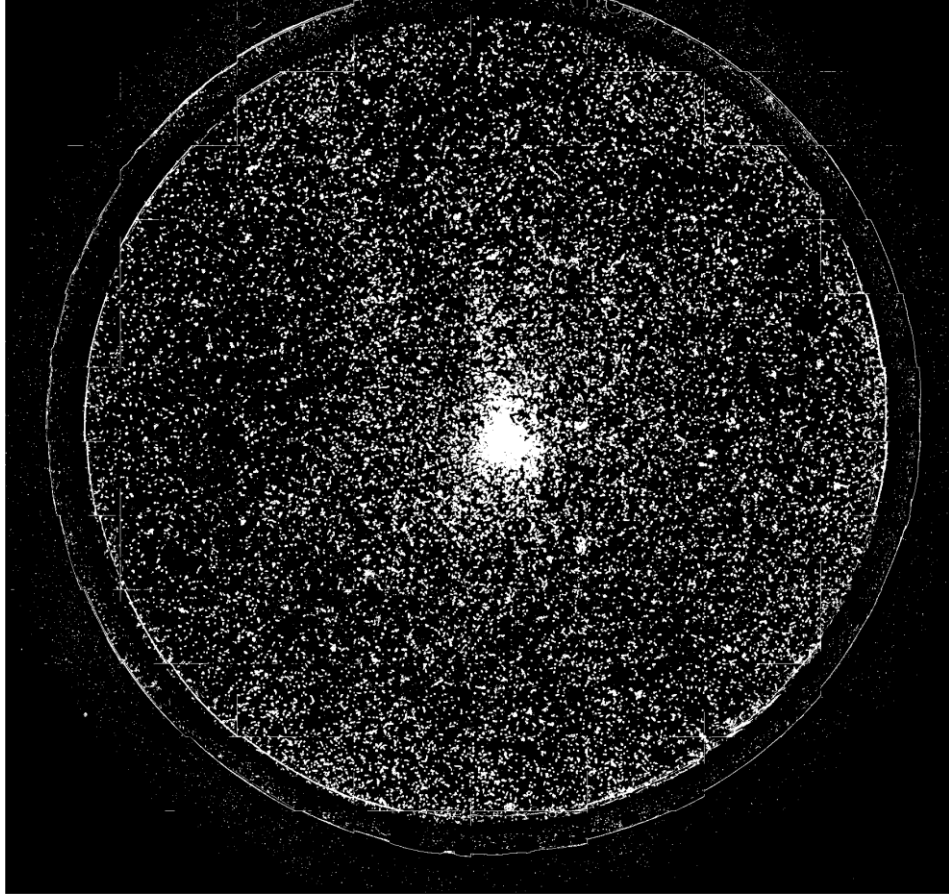
3.4.2 Kuvien analysointi

Kuvien analysointiin käytettiin tässä kappaleessa esitettyä Matlab-skriptiä. Ensimmäiseksi koodi lukee kuvat kohdekansioista, jossa on yhden kammion kuvat eri aikapisteissä. Lisäksi liitteessä esitetyssä ohjelmassa on alustettu myös muuttuja *names*, joka sisältää kaikki kohdekansion kuvat. Kuvat ovat kuvan 2 mukaisia ja tässä versiossa *names*-muuttuja on tarkoitettu käsittämään vain yhden mittausarjan kuvat. *Alat* on muuttuja, johon ohjelma tallentaa jokaisen kuvan solujen peittämän alan sekä pinta-alat-muuttujan, joka tallentaa muuttujaan jokaisen kuvan solujen peittämän pinta-alan. Ohjelma lukee kohdekansioista kuvat ja nykyisessä muodossaan ohjelmaan syötettävien kuva kansioiden on oltava sellaisia, että kansio sisältää yhden yksittäisen hypoksiakammion kaikkien aikapisteiden kuvat nuorimmasta kuvasta vanhimpaan.

3.4.3 Kuvan muuttaminen matriisiksi ja kuvan varianssisuodatus

Kuvien kursimisen jälkeen ohjelma luo matriisin *I*, jossa kuva muuttuu kokoiseksi matriisiksi. Jokaisen matriisin luku kuvaa pikselin arvoa kyseisessä kohdassa. *I* matriisin pohjalta ohjelma luo maskin, joka on binäärinen matriisi. Maskin arvoa voi säätää, mutta tässä versiossa maskin yksittäinen luku säilyttää arvon 1, kun matriisin *I* vastaava luku on suurempi kuin 7000. Tämä luku on saatu kokeilemalla sopivia arvoja ZEN-mikroskooppi ohjelmassa ja osoittautui, että solut saavat harmaasävykuvassa noin arvon 8000. Näin saadaan maskin avulla suodatettua kuvasta pois tausta. Toistaiseksi yläarvoa ei ole tarvinnut määrittää, sillä solut ovat kirkkaimpia pikseleitä harmaasävykuvassa.

Kuvan käsittelemiseen käytetään varianssisuodatusta, jolloin komennolla `stdfilt(I,ones(9))` suodattaa kuvan siten, että funktio vertaa alkuperäisen kuvan 9x9 alueeseen ja määrittää sen mukaan output kuvan (*J*) pikselin arvon varianssin avulla. Matlab-koodi on saatavilla liitteestä A. Varianssisuodatus poistaa kuvasta rakeet ja yksittäiset eri väriset pikselit ja siten parantavat ohjelman laskeman pinta-alan arviota.



Kuva 5. *Mikroskooppikuva varianssisuodatuksen jälkeen mustavalkoisena*

3.4.4 Soluproliferaation määrittäminen varianssisuodatetusta kuvasta

Kuvasta 5 voidaan nähdä, että kuvassa on vielä paljon kohinaa ja taustasta jääneitä pisteitä, jotka täytyy saada poistettua varianssisuodatetusta kuvasta. Solujen keskiarvoineen koko on noin 300 pikseliä, jolloin solun koon alarajaksi on valittu 150 pikselin aluaraja. Ensimmäiseksi varianssisuodatetun kuvan jälkeen kuvasta poistetaan alueet, jotka ovat pienempiä kuin 150 pikseliä. Tämän jälkeen kuvaa suodatetaan muutamien komennoin, kunnes rivillä 57 komennolla `solut = cBW.*~maski` suodattaa harmaasävykuvan mukaan tehdyn maskin avulla kuvasta alueet pois, joissa soluja ei ole. Tämän jälkeen solujen peittävä pinta-ala tallennetaan `pintaAla(t)`-muuttujaan, johon tallentuu jokaisen ohjelman käsittelemä kuvan arvo. Lopulliset ohjelman tuottamat kuvat esitetään Tulokset -luvussa.

Solulaskuri laskee jokaisen hypoksiakammionkuvasarjan ensimmäisestä kuvasta solujen lukumäärän. Lukumäärä lasketaan kahdessa vaiheessa. Ensimmäisenä lasketaan yksittäiset solut. Yksittäiset solut lasketaan suodattamalla *bwareafiltterin* avulla yksittäiset solut haarukoimalla 70-700 pikselin yhtenäiset alueet ja laskemalla niiden lukumäärät.

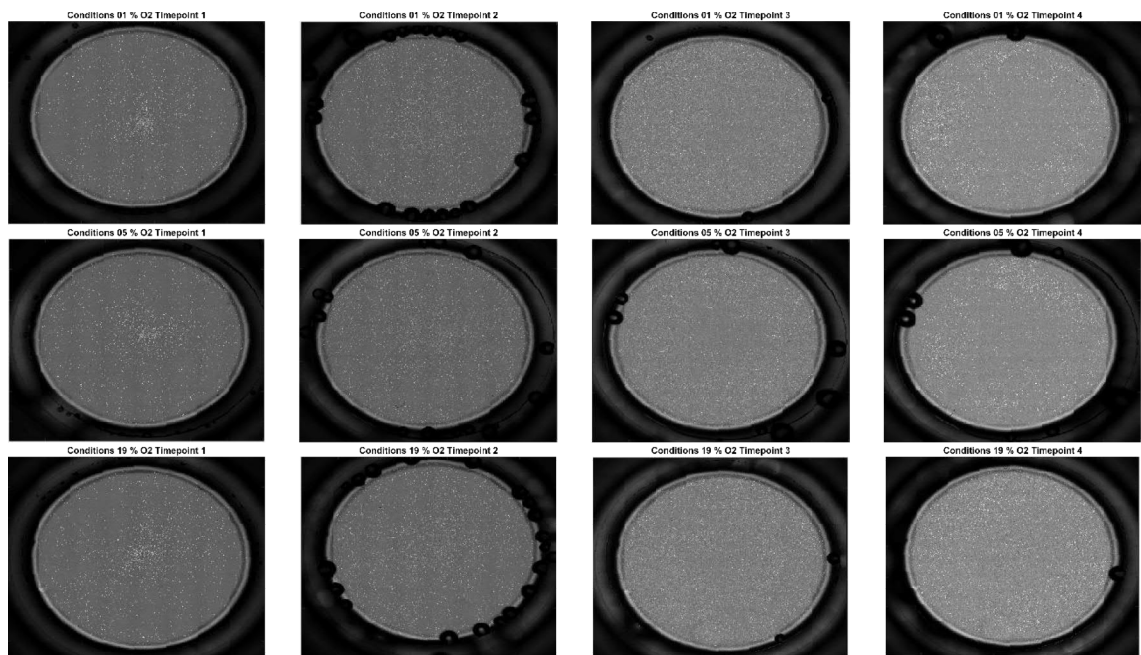
Soluja esiintyy kuitenkin myös toisiinsa liittyneinä, joten 700 pikseliä suuremmat alueet ovat yhteen liittyneitä soluja, joiden yhteispinta-ala lasketaan ja pinta-ala jaetaan yksittäisten solujen keskiarvolla, jotta saadaan arvio solulauttojen sisältämien solujen määrästä. Yksittäisten solujen keskiarvo on määritetty aikaisemmassa osiossa, jossa kaikista filtterin tunnistamista yksittäisistä soluista on otettu keskiarvo. Yksittäiset solut ja solumassasta arvioidut solumäärät summataan yhteen ja tallennetaan *solut_yhteensä*-muuttujaan. Näin saadaan ensimmäisen hypoksiakammion solumäärä talteen proliferaatiokäyriä varten.

4. TULOKSET

Tässä kohdassa on esitetty molemmista koesarjoista otettujen mikroskooppikuvien jälkiprosessoinnin tulokset. Kuvat analysoitiin Matlab:illa toteutetulla solulaskurilla ja tulokseksi saatiin solujen proliferaatiota kuvaavat pinta-ala arvot.

4.1 Ensimmäinen hypoksiakoesarja

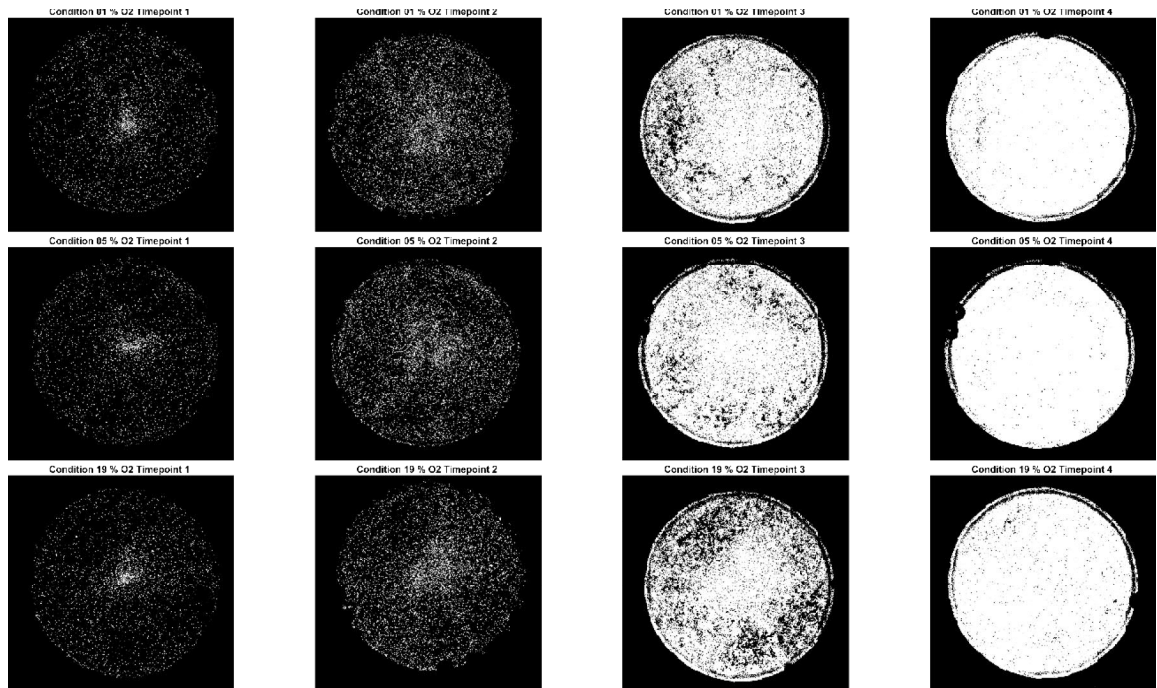
Mikroskoopilla otetusta kuva-aineistosta on esitetty otos 1 % O₂, 5 % O₂ ja 19 % O₂ happikonsentraatioissa kasvatetuissa kammioissa neljässä eri aikapisteessä kuvassa 7.



Kuva 6. Mikroskoopilla otetut esikäsitellyt kuvat 1. koesarjan 1. hypoksiakammiot 300 000 solulla

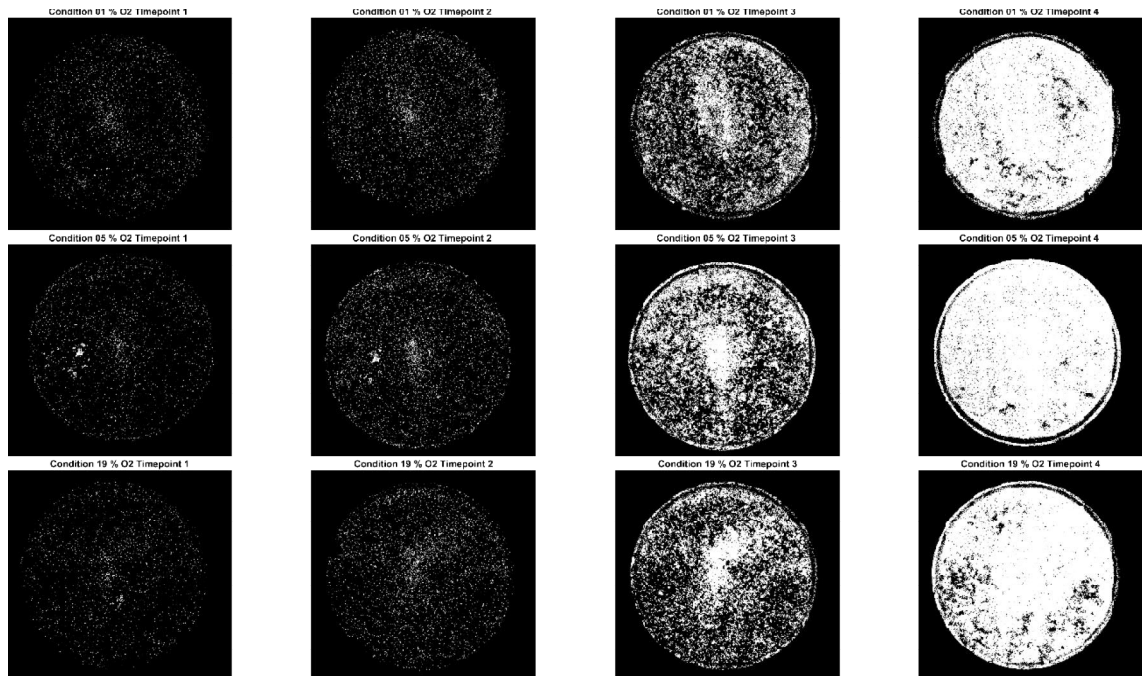
Kuvasta 6 nähdään raaka-aineisto kuva-analyysille. Kokeellisessa osuudessa mikroskoopilla kuvatut valokuvat käsiteltiin Matlab-skriptillä, jolloin tulokseksi saatiin mustavalkoinen binäärimatriisi. Muista koesarjoista ei ole esitettyä enää raakakuvaa vaan Matlab

-skriptillä luodut mustavalkokuvat. Binäärimatriisi analysoitiin luvussa 3.4 Kuva-analyysi esitetyn metodin avulla, jolloin solujen proliferaatiolle saatiin numeerinen arvio.



Kuva 7. *I. koesarjan H1. hypoksiakammioiden proliferaatio eri aikapisteissä 300 000 solulla*

Ensimmäisen kokeen hypoksiakammiot H1 on esitetty kuvassa 7. Kuvassa 7 on esitetty 1 % O₂, 5 % O₂ ja 19 % O₂ happikonsentraatioissa kasvatetut kammiot 4 eri aikapisteessä.

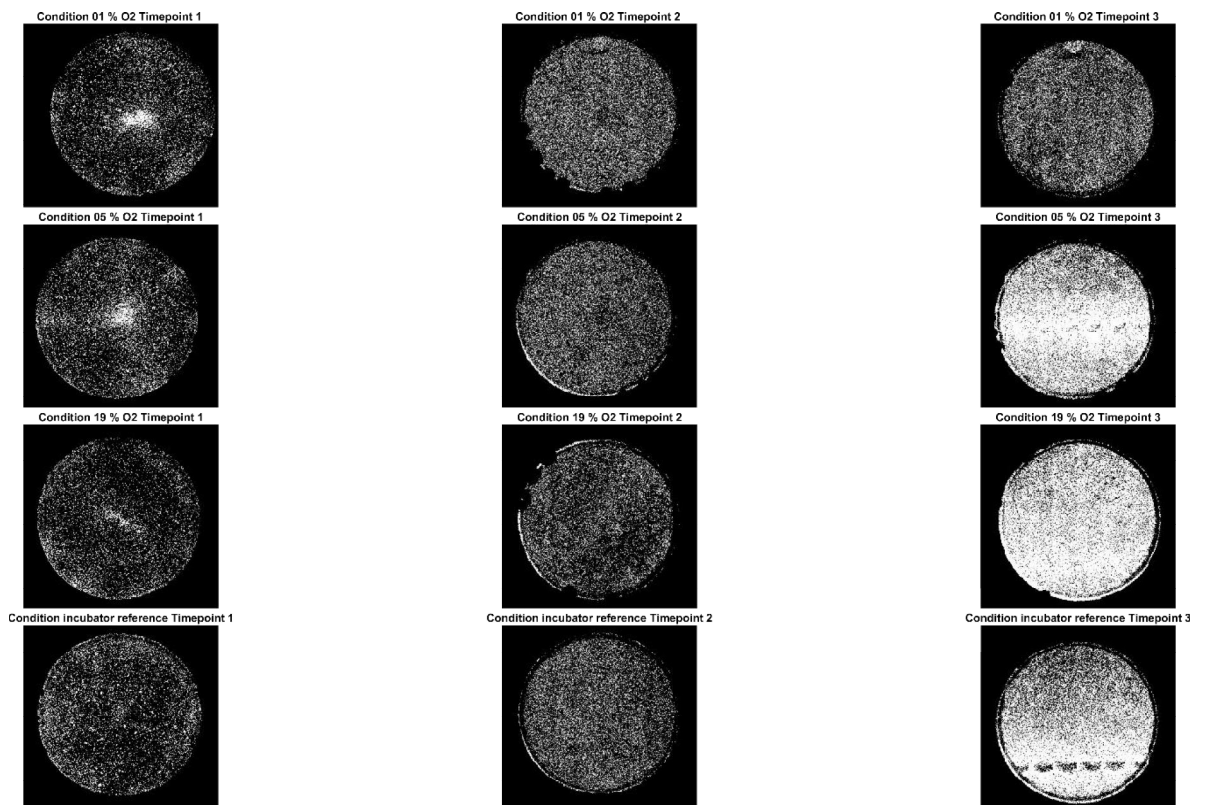


Kuva 8. *1. koesarjan H2. hypoksiakammioiden proliferaatio eri aikapisteissä 150 000 solulla*

Ensimmäisen kokeen hypoksiakammiot H2 on esitetty kuvassa 8. Kuvassa 8 on esitetty 1 % O₂, 5 % O₂ ja 19 % O₂ happikonsentraatioon asetetut kammiot neljässä eri aikapisteessä. Kuvat 7 ja 8 esittävät rinnakkaisten hypoksiakammioiden soluproliferaatiota.

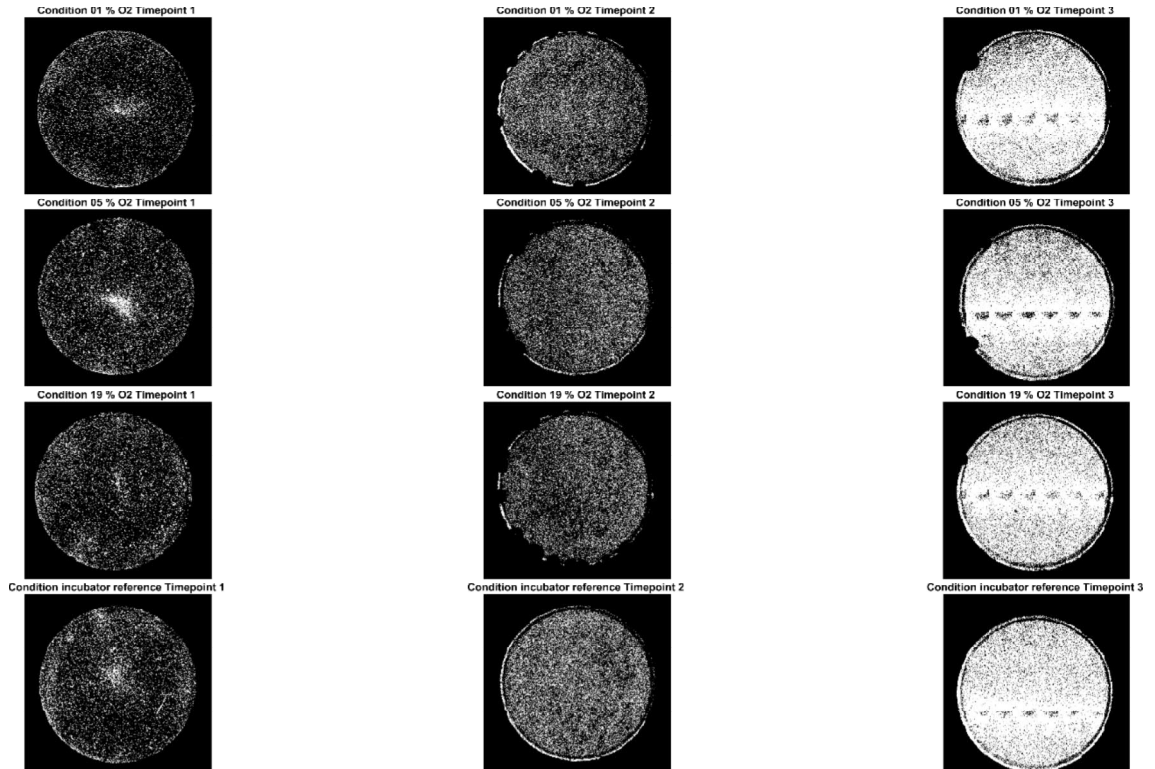
4.2 Toinen hypoksiakoesarja

Toisen soluviljely koesarjan rinnakkaisten hypoksiakammioiden analyysikuvat eri olosuhteissa kasvatetuissa hypoksiakammioista on esitetty tässä kappaleessa.



Kuva 9. *2. koesarjan H1. hypoksiakammioiden proliferaatio eri aikapisteissä 200 000 solulla*

Toisen kokeen hypoksiakammiot H1 on esitetty kuvassa 9. Kuvasta 9 on esitetty 1 % O₂, 5 % O₂ ja 19 % O₂ happikonsentraatioon asetetut kammiot neljässä eri aikapisteessä.



Kuva 10. 2. koesarjan H2. hypoksiakammioiden proliferaatio eri aikapisteissä 200 000 solulla

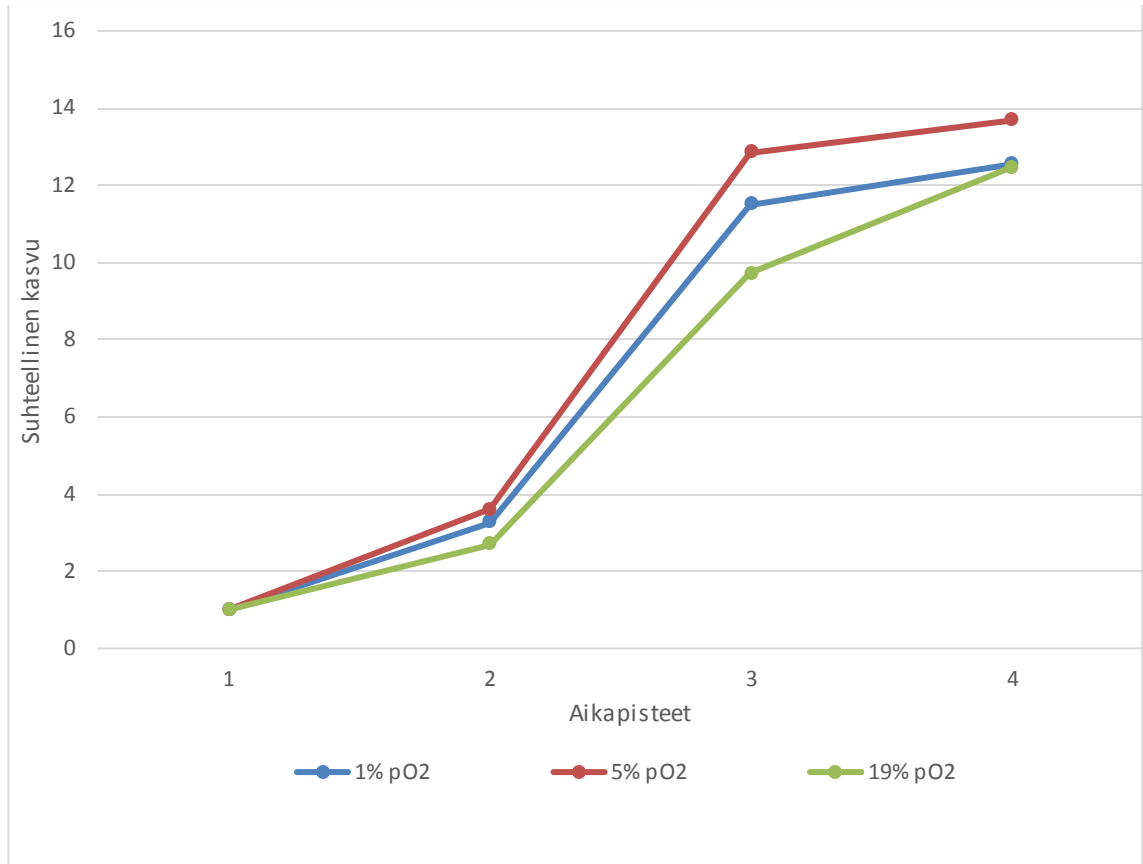
Toisen kokeen hypoksiakammiot H2 on esitetty kuvassa 10. Kuvasta 10 on esitetty 1 % O₂, 5 % O₂ ja 19 % O₂ happikonsentraatioon asetetut kammiot neljässä eri aikapisteessä.

4.3 Fibroblastien proliferaatiokäyrät

Kuvaajiin 12 -14 on piirretty proliferaatiokäyrät solujen peittämän pinta-alan perusteella. Proliferaatiokäyrät on laadittu vertaamalla yksittäisen kammion muita aikapisteitä ensimmäiseen aikapisteeseen suhteellisen kasvun määrittämiseksi seuraavan kaavan mukaisesti:

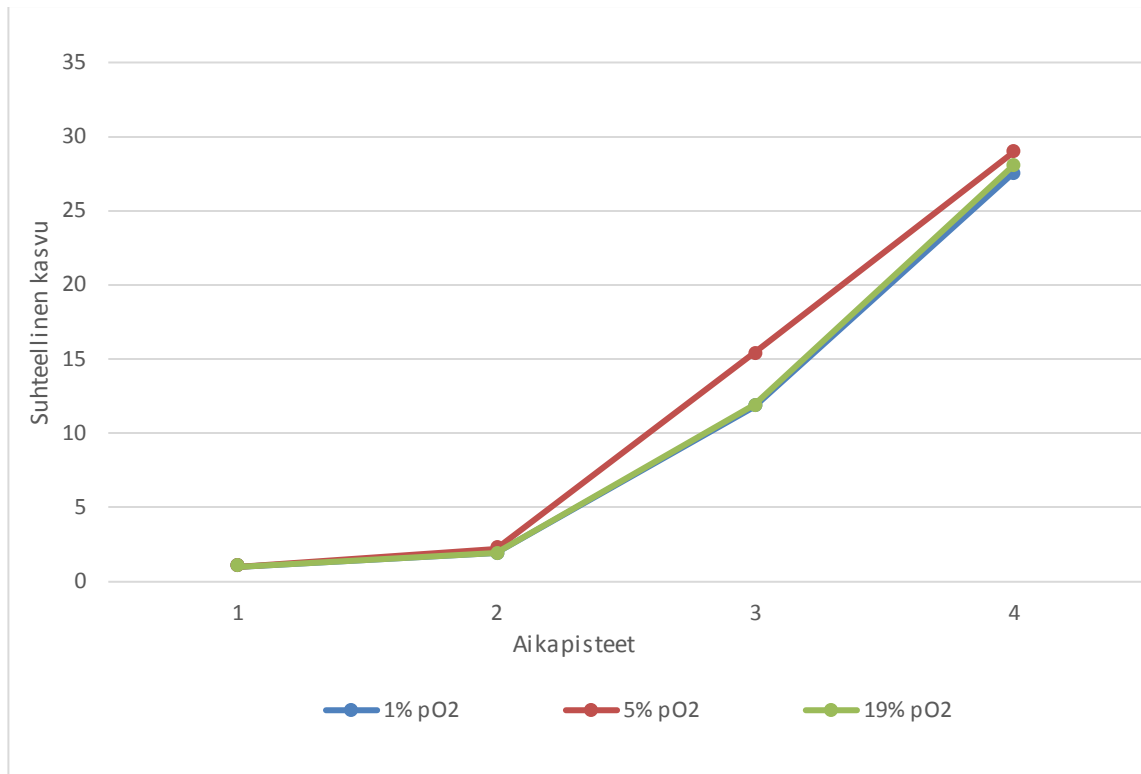
$$\text{Suhteellinen kasvu} = \frac{\text{Pinta-ala}(n)}{\text{Pinta-ala}(1)} \quad [5.1]$$

jossa Pinta-ala(n) on kyseisen aikapisteen solujen peittämä pinta-ala ja Pinta-ala(1) on ensimmäisen pisteen pinta-ala.



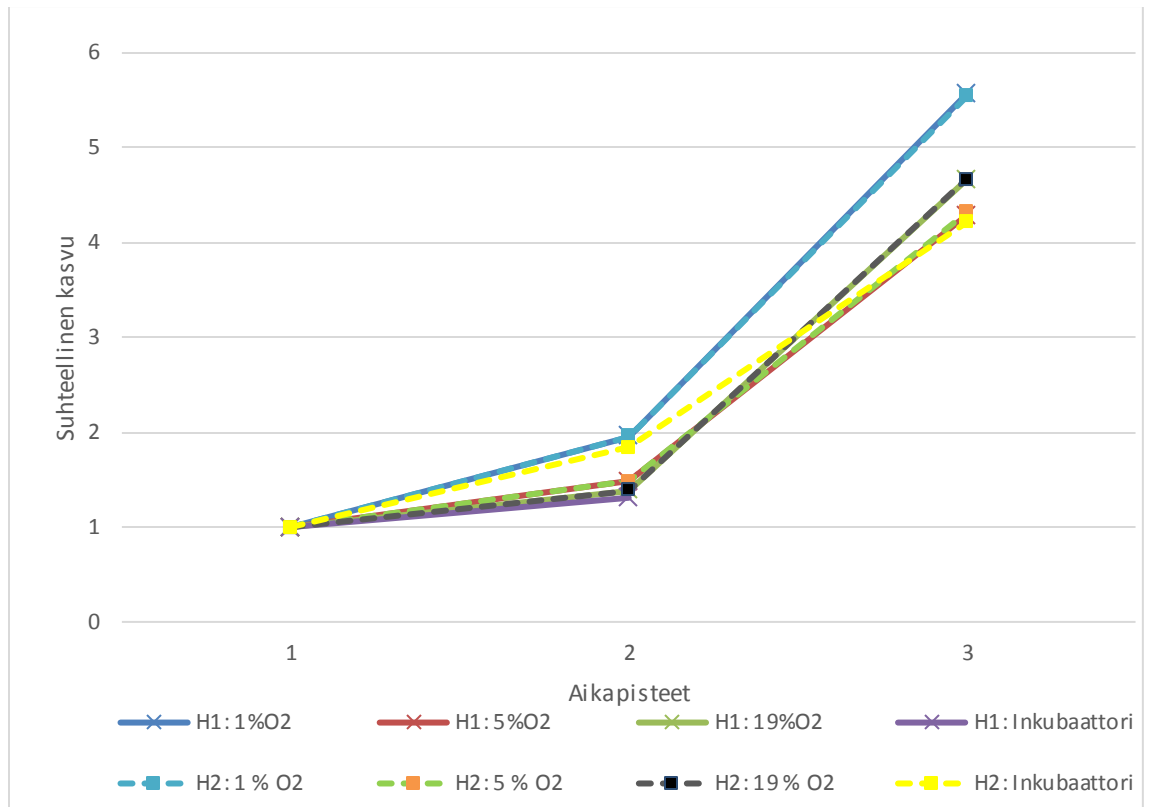
Kuva 11. Koesarja 1 hypoksiakammiot H1: Solujen suhteellinen kasvu aikapisteiden funktiona 300 000 solulla

Kuvaan 11 on piirretty ensimmäisen koesarjan hypoksiakammioiden H1 solujen suhteellista kasvua kuvaava proliferaatiokäyrä kullekin kammiolle ja siitä nähdään, että 5 % O₂ proliferoituu konfluenttiin 1 % O₂ ja 19 % O₂ olosuhteissa kasvaneita soluja nopeammin.



Kuva 12. Koesarja 1 hypoksiakammiot H2: Solujen suhteellinen kasvu aikapisteiden funktiona 150 000 solulla

Kuvassa 12 on esitetty ensimmäisen koesarjan rinnakkaiskammioiden H2 solujen suhteellista kasvua kuvaava proliferaatiokäyrä kullekin kammiolle. 5 % O₂ kasvaneet solut näyttävät kasvavan tässä koesarjassa hieman muita olosuhteita paremmin. Taulukossa 3 on esitetty Matlab-skriptin avulla lasketut solujen peittämät pinta-alat hypoksiakammioissa eri aikapisteissä.



Kuva 13. Koesarja 2 hypoksiakammiot H1 ja H2: Solujen suhteellinen kasvu aikapisteiden funktiona 200 000 solulla

Kuvaan 13 on piirretty toisen koesarjan hypoksiakammiot H1 ja H2 solujen suhteellista kasvua kuvaava proliferaatiokäyrät kullekin kammiolle ja siitä nähdään, että 1 % O₂ proliferoituu konfluenttiin nopeammin kuin 5 % O₂, 19 % O₂-olosuhteissa ja inkubaattoriolosuhteissa kasvaneita soluja nopeammin. Kuvasta 13 nähdään myös, että 19 % O₂ proliferoituu konfluenttiin nopeammin kuin 1 % O₂, 5 % O₂-olosuhteissa ja inkubaattoriolosuhteissa kasvaneita soluja nopeammin.

Toisessa koesarjassa oli ongelmia ensimmäisten rinnakkaishypoksiakammioiden mikroskooppikuvantamisen ja kuva-analyysin kanssa. Vaikka kuvan 10 kuvamatriisista nähdään, että 1 % O₂ konsentraation kolmas aikapiste näyttää harvaan kasvaneelta, niin todellisuudessa kammiot on täyteen kasvanut ja mikroskoopin tarkennus ei ole oikeassa tasossa vaan solumassa on sekoittunut osittain pikseleiden intensiteettien osalta taustan kanssa ja siksi analyysi ei anna oikeanlaista informaatiota 1 % O₂ kammion osalta. Tämän takia toisen koesarjan 1 rinnakkaishypoksiakammioiden arvoista ei voi tehdä keskinäistä vertailua.

5. TULOSTEN TARKASTELU

Tulosten tarkastelussa arvioidaan koesarjojen 1 ja 2 antamia tuloksia. Esille tuodaan poikkeamia mahdollisesti aiheuttavat virhelähteet ja verrataan MiniHypoxy-solukasvatuslaitteistoa markkinoilla jo oleviin vastaavaan tarkoitukseen käytettäviin laitteistoihin ja menetelmiin.

5.1 Koesarjojen tulosten arviointi

Ensimmäisessä koesarjassa asetettiin kasvamaan 300 000 solua kammiota kohden ja 150 000 solua kammiota kohden siten, että mitattavana oli kaksi toisilleen rinnakkaista soluviljelykaivosettä. Poikkeavat lähtötilanteet näkyvät ensimmäisen koesarjat kokoaissa kuvista 8 ja 9, missä etenkin rinnakkaisten kammioiden erot huomataan aikapisteessä kolme. Sama huomataan vertailemalla kuvien 11 ja 12 kasvukäyriä, että lähtötilanteessa enemmän soluja sisältävät kammiot saavuttivat nopeammin konfluentin, ja siten pienemmän määrän soluja sisältävät kammiot saavuttivat suuremman kasvunopeuden. Tämä johtuu, siitä että soluilla on enemmän tilaa jakautua ja voivat pidemmän aikaa pysyä eksponentiaalisen kasvun vaiheessa, ennen kuin tilan ja ravinnon puute alkavat hidastaa solujen jakautumista. Ensimmäisellä kokeella nähtiin myös, että mikäli tahdotaan tutkia solujen proliferaatiokäyrää, on parempi käyttää pienempää aloituslukumäärää.

Ensimmäinen koesarja osoitti, että hiiren alkion fibroblastit jakautuvat tehokkaimmin 5 % happikonsentraatiossa. Samankaltaisia tuloksia ovat myös muutkin tutkimukset osoittaneet. [2, 3, 45] Koesarjan mikroskoopilla otetut valokuvat ovat pääsääntöisesti hyvälaatuisia ja solujen asettaminen solukaivoon oli onnistunut hyvin, sillä solut olivat levittäytyneet tasaisesti ympäri kaivoa. Solujen sijoittuminen väljästi solukaivon pohjalle mahdollistaa fibroblastien nopean proliferaation, kun solujen ei tarvitse migraation avulla siirtyä tyhjiille alueille. Yhteen liittyneet solulautat myös hidastavat proliferaatiota sen takia, että soluilla ei tilan lisäksi ole niin paljon solukalvon pinta-alaa vastaanottaa ravinteita ympärillä olevasta mediumista. Tuloksista puuttuvat kuvat inkubaattorissa kasvatetuista, sillä inkubaattoreissa kasvatetut ensimmäisen koesarjan hypoksiakammiot sisälsivät pieniä kontaminaatioita jo toisessa aikapisteessä, jolloin kammiot jouduttiin hylkäämään tulostarkastelusta. Kontaminaatiot aiheutuivat todennäköisimmin siitä, että solukaivot olivat avonaisia petrialjoissa inkubaattoreissa ja saivat tällöin kontaminaation siirroissa inkubaattorista mikroskoopille ja takaisin.

Toisessa koesarjassa hypoksiakammioiden pohjalle asetettiin kasvamaan 200 000 solua ensimmäisen koesarjan antamien tulosten perusteella. 200 000 solun käyttäminen perusteltiin, sillä että kammion haluttiin kasvavan konfluenttiin neljän päivän sisällä. Neljän

päivän aikaraja asetui kasvatuslaitteiston mukaan. Käytetyt litran vetoiset kaasupullot riittivät juuri neljäksi vuorokaudeksi. Neljä päivää oli myös raja sille, että soluja pystyttiin kasvattamaan kasvatusmediumia vaihtamatta. Kuvissa 9 ja 10 esitetyistä hypoksiakammio kuvista nähdään, että ensimmäisestä koesarjasta poiketen aikapisteitä on neljän sijaan kolme, sillä solut kasvoivat konfluenttiin vastoin odotuksia jo kolmen päivän aikana. Tämä johtunee siitä, että toisessa koesarjassa oli käytössä eri solut, joiden jakaantumisluku oli matalampi verrattuna ensimmäiseen koesarjaan. Kuvista 10 ja 11 nähdään, että solut eivät ole levittäytyneet yhtä tasaisesti kaivojen pohjalle, vaan ovat takertuneet jo ensimmäisessä aikapisteessä toisiinsa ja muodostavat ison solulautan keskelle kaivoja. Poikkeamat koesarjojen kuvissa johtuvat siitä, että soluja oli viljelemässä eri henkilöt, jolloin kokemattomamman soluviljelijän harjaantumattomuus näkyy koesarjan 2 hypoksiakammioiden kuvakollaaseissa.

Toisen koesarjan tulokset poikkeavat hieman ensimmäisen koesarjan tuloksista. Tarkastelemalla kuvan 13 käyriä nähdään, että 5 % happikonsentraation sijaan 1 % happikonsentraatio näyttää olevan edullisempi solujen jakautumiselle. Sen sijaan pienellä marginaalilla 5 % happikonsentraatio jää analyysin mukaan myös 19 % O₂-olosuhdetta heikommaksi. Syynä poikkeamaan voi olla epätasainen solujen pipetointi kaivoon, jolloin eri olosuhteissa kasvatetut kammiot eivät ole täysin samoissa lähtökohdissa proliferaatiokokeeseen.

Molemmat koesarjat kuitenkin näyttävät, että proliferaatio on tehokkaampaa alemmissa happikonsentraatioissa. Tulos täyttää tämän työn hypoteesin, jonka mukaan matalat happikonsentraatiot kiihdyttävät hiiren alkion fibroblastien solujakautumista. Toisaalta koe myös osoitti myös sen, että tutkimuksessa käytetty MiniHypoxy-soluviljelylaitteisto kykenee luomaan erilaiset atmosfäärit hypoksiakammioiden välille ja atmosfäärien erot saatiin näkyviin solukasvatusten välillä.

5.2 Virhelähteitä

Yksinkertaisesta koejärjestelystä huolimatta on näissä kokeissa useita eri virhelähteitä. Useampaan kertaan esille tuotu solujen pipetointi kaivoihin vaikuttaa suurelta kuva-analyysiin vaikuttavalta tekijältä. Tätä virhelähdettä voidaan kuitenkin hallita kehittämällä hyvät työskentelymenetelmät solulaboratorio työskentelyyn. Samalla keinolla voidaan myös poistaa ongelmia solukasvatuksessa aiheutuneet kontaminaatiot. Mikroskooppityöskentely aiheutti hieman variaatioita mikroskooppikuviin. Mikroskoopin toimiessa sarjakuvaustilassa, mikroskoopin ristisiirtopöytä siirtyy nopeasti kuvien välillä. Tällöin pienet tärinät ja liikkeet mikroskoopin alustassa saattoivat vaikuttaa kuvanlaatuun ja sitä kautta kuva-analyysin tuloksiin.

Kuva-analyysissä käytettävää Matlab-skriptiä piti optimoida paljon, jotta se tunnistaisi solut mikroskooppikuvasta. Koska solujen tunnistaminen perustuu solujen histogrammiin, ovat muutokset kuvanpikselien intensiteetissä kriittisiä kuva-analyysityökalun kannalta. Näin ollen poikkeava valaistus tai eri kuvausprotokolla voi hävittää esimerkiksi kuvissa 8 ja 9 esitetyissä analyysikuvista informaatiota, sillä solujen intensiteetti huipun siirtyessä histogrammissa, kuva-analyysi edelleen suodattaa saman kohdan histogrammista analyysikuvaan. Kuvissa 9 ja 10 näkyvissä toisen koesarjan 3. aikapisteen kuvissa näkyy hypoksiakammion halki kulkeva toistuva varjokuvio, mikä viittaa siihen, että solukuvauksessa on tapahtunut jokin virhe. Todennäköisesti ZEN-ohjelman kuvien yhdistämistoiminnon asetuksissa on tapahtunut jokin muutos, mikä on ”polttanut” mikroskooppikuvaan toistuvan jäljen. Näin ollen Matlab-skriptissä on vielä kehitettävää, jos kuvausolosuhteita ja kuvan laadullisia ominaisuuksia ei pystytä pitämään samanlaisina.

6. YHTEENVETO

Tässä työssä tutkittiin uuden hypoksiasoluviljelymenetelmän kykyä luoda hiiren alkion fibroblasteille eri vähähappisia olosuhteita ja osoittaa laitteiston toimivuus vertaamalla tuloksia aiempien tutkimuksien tuloksiin. Tämä osoitettiin tekemällä selvitys aiemmista hypoksiatutkimuksista ja kokeellinen osuus, jossa kasvatettiin hiiren alkion fibroblasteja eri happikonsentraatioissa. Kokeellisessa osuudessa tutkittiin solujen hyvinvointia siten, että hyvinvoinnin mittarina käytettiin solujen jakautumiskykyä eli proliferaatiota. Kokeellinen osuus sisälsi solujen kasvattamisen, kuvaamisen mikroskoopilla ja kuva-analyysin solujen proliferaation määrittämiseksi. Tulokseksi saatiin, että vähähappisissa olosuhteissa, joissa hiiren alkion fibroblasteilla oli vain 1 % O₂ tai 5 % O₂ happea käytössään. Tulos on linjassa kirjallisuudesta etsittyihin tietoihin verrattuna, joita on käyty läpi kohdassa 2 Teoreettinen tausta.

Tulos osoittaa, että huoneilman happiosuutta huomattavasti alhaisemmat happiolosuhteet ovat soluille normaalimpia ja suotuisemmat solujen jakautumisen kannalta. Tämä tarkoittaa myös sitä, että solut todella reagoivat ympäröivään kaasu-ympäristöön. Näin ollen tulevaisuuden solututkimuksessa on tärkeää ottaa huomioon, minkälaisissa fysiologisissa ympäristöissä solut elävät ja pyrittävä saattamaan tutkimusolosuhteet fysiologisia vastaviksi. Näin voidaan varmistaa solujen oikeat reaktiot esimerkiksi lääkaineisiin tai säätelytekijöihin. Tämä luo tarpeen MiniHypoxy-solukasvatuslaitteiston kaltaisille laitteistoille, joiden avulla voi helposti tutkia soluja hypoksisissa olosuhteissa.

Työssä jäi useampi kehitysikkuna auki tulevaisuuden varalle. Kaksi koesarjaa on vielä vähän, kun yritetään osoittaa laitteiston toimivuutta, joten kokeita olisi hyvä tehdä vielä lisää ja todeta validointi suurempaan aineistoon perustuen. Toinen kehityssuunta on tämän työn varjossa syntyneen kuva-analyysityökalun kehittäminen. Kuva-analyysin luotettavuutta on vaikea arvioida ilman rinnakkaisia menetelmiä. Käytännössä kuva-analyysi antaa numeerisen arvon solujen peittämälle alueelle, mikä on parempi arvio solujen proliferaatiosta kuin perinteisesti käytetty silmämääräinen arvio. Näin ollen näitä kokeita varten valmistetun kuva-analyysin avulla voidaan solujen hyvinvointia seurata tarkemmin ja ennen kaikkea dokumentoida vertailukelpoisesti.

LÄHTEET

- [1] A.E. Greijer, P.v.d. Groep, D. Kemming, A. Shvarts, G.L. Semenza, G.A. Meijer, Wiel, M A van de, J.A.M. Belien, P.J.v. Diest, E.v.d. Wall, Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), *Journal of pathology*, Vol. 206, 2005, pp. 291. <http://www.narcis.nl/publication/RecordID/oairdSPACE.library.uu.nl:1874%2F21773>.
- [2] D.J. Manalo, A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B.D. Kelly, S.Q. Ye, J.G.N. Garcia, G.L. Semenza, Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1, *Blood*, Vol. 105, Iss. 2, 2005, pp. 659-669.
- [3] G.P. Elvidge, L. Glenny, R.J. Appelhoff, P.J. Ratcliffe, J. Ragoussis, J.M. Gleadle, Concordant Regulation of Gene Expression by Hypoxia and 2-Oxoglutarate-dependent Dioxygenase Inhibition, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, Iss. 22, 2006, pp. 15215-15226. <http://www.jbc.org/content/281/22/15215>.
- [4] A. Carreau, B.E. Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, C. Kieda, Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 15, Iss. 6, 2011, pp. 1239-1253. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>.
- [5] S. Parrinello, E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov, J. Campisi, Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts, *Nature cell biology*, Vol. 5, Iss. 8, 2003, pp. 741-747. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940195/>.
- [6] R.C. Roach, *Hypoxia*, Kluwer, New York, 2001, .
- [7] D.L. Nelson, D.L. Nelson, A.L. Lehninger, M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, W.H. Freeman, New York, 2008, .
- [8] *Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine*, in: *Cell*, 2012, pp. 399-408.
- [9] H. Zhu, T. Jackson, H.F. Bunn, Detecting and responding to hypoxia, *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, Vol. 17 Suppl 1, Iss. 90001, 2002, pp. 3-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812905>.
- [10] P. Michieli, Hypoxia, angiogenesis and cancer therapy: To breathe or not to breathe? *Cell Cycle*, Vol. 8, Iss. 20, 2009, pp. 3291-3296. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.8.20.9741>.
- [11] A. Facciabene, X. Peng, I.S. Hagemann, K. Balint, A. Barchetti, L. Wang, P.A. Gimotty, C.B. Gilks, P. Lal, L. Zhang, G. Coukos, Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and [T.sub.reg] cells, *Nature*, Vol. 475, Iss. 7355, 2011,

pp. 226. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=afh&AN=62668966&site=ehost-live&scope=site>.

- [12] A. Krtolica, S. Parrinello, S. Melov, E. Samper, J. Campisi, J. Goldstein, Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts, *Nature Cell Biology*, Vol. 5, Iss. 8, 2003, pp. 741-747. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1024>.
- [13] A.C. Guyton, J.E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Saunders, .
- [14] J. Dings, J. Meixensberger, A. Jäger, K. Roosen, Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes, *Neurosurgery*, Vol. 43, Iss. 5, 1998, pp. 1082-1095.
- [15] W.E. Hoffman, F.T. Charbel, G. Edelman, Brain tissue oxygen, carbon dioxide, and pH in neurosurgical patients at risk for ischemia, *Anesthesia and Analgesia*, Vol. 82, Iss. 3, 1996, pp. 582-586.
- [16] J. Meixensberger, J. Dings, H. Kuhnigk, K. Roosen, Studies of tissue PO₂ in normal and pathological human brain cortex, *Acta Neurochirurgica. Supplementum*, Vol. 59, 1993, pp. 58-63.
- [17] F. Assad, R. Schultheiss, E. Leniger-Follert, R. Wüllenweber, Measurement of Local Oxygen Partial Pressure (PO₂) of the Brain Cortex in Cases of Brain Tumors, in: Anonymous (ed.), *CNS Metastases Neurosurgery in the Aged*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1984, pp. 263-270.
- [18] Q. Le, E. Chen, A. Salim, H. Cao, C.S. Kong, R. Whyte, J. Donington, W. Cannon, H. Wakelee, R. Tibshirani, J.D. Mitchell, D. Richardson, K.J. O'Byrne, A.C. Koong, A.J. Giaccia, An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, Vol. 12, Iss. 5, 2006, pp. 1507-1514.
- [19] W Wang, C P Winlove, C C Michel, Oxygen partial pressure in outer layers of skin of human finger nail folds, *The Journal of Physiology*, Vol. 549, Iss. 3, 2003, pp. 855-863. <http://jp.physoc.org/content/549/3/855.abstract>.
- [20] M. Müller, E. Schindler, S. Roth, A. Schürholz, M. Vollerthun, G. Hempelmann, Effects of desflurane and isoflurane on intestinal tissue oxygen pressure during colorectal surgery, *Anaesthesia*, Vol. 57, Iss. 2, 2002, pp. 110-115.
- [21] M. Müller, R. Schück, U. Erkens, J. Sticher, C. Haase, G. Hempelmann, [Effects of lumbar peridural anesthesia on tissue pO₂ of the large intestine in man], *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS*, Vol. 30, Iss. 2, 1995, pp. 108-110.
- [22] M. Thermann, L. Jostarndt, F. Eberhard, H. Richter, W. Sass, [Oxygen supply of the human small intestine in mechanical ileus], *Langenbecks Archiv Fur Chirurgie*, Vol. 363, Iss. 3, 1985, pp. 179-184.

- [23] A.J. Brooks, J.S. Hammond, K. Girling, I.J. Beckingham, The effect of hepatic vascular inflow occlusion on liver tissue pH, carbon dioxide, and oxygen partial pressures: defining the optimal clamp/release regime for intermittent portal clamping, *The Journal of Surgical Research*, Vol. 141, Iss. 2, 2007, pp. 247-251.
- [24] A.J. Brooks, J. Eastwood, I.J. Beckingham, K.J. Girling, Liver tissue partial pressure of oxygen and carbon dioxide during partial hepatectomy, *British Journal of Anaesthesia*, Vol. 92, Iss. 5, 2004, pp. 735-737.
- [25] T.S. Leary, J.R. Klinck, G. Hayman, P. Friend, N.V. Jamieson, A.K. Gupta, Measurement of liver tissue oxygenation after orthotopic liver transplantation using a multiparameter sensor. A pilot study, *Anaesthesia*, Vol. 57, Iss. 11, 2002, pp. 1128-1133.
- [26] M. Müller, W. Padberg, E. Schindler, J. Sticher, C. Osmer, S. Friemann, G. Hempelmann, Renocortical tissue oxygen pressure measurements in patients undergoing living donor kidney transplantation, *Anesthesia and Analgesia*, Vol. 87, Iss. 2, 1998, pp. 474-476.
- [27] M. Brezis, S. Rosen, Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 332, Iss. 10, 1995, pp. 647-655.
- [28] G.I. Beerthuisen, R.J. Goris, F.J. Kreuzer, Skeletal muscle Po₂ during imminent shock, *Archives of emergency medicine*, Vol. 6, Iss. 3, 1989, pp. 172-182.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2675881>.
- [29] R.S. Richardson, S. Duteil, C. Wary, D.W. Wray, J. Hoff, P.G. Carlier, Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability, *The Journal of Physiology*, Vol. 571, Iss. Pt 2, 2006, pp. 415-424.
- [30] T. Kiaer, K.D. Kristensen, Intracompartmental pressure, PO₂, PCO₂ and blood flow in the human skeletal muscle, *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery. Archiv Fur Orthopadische Und Unfall-Chirurgie*, Vol. 107, Iss. 2, 1988, pp. 114-116.
- [31] D.G. Ikossi, M.M. Knudson, D.J. Morabito, M.J. Cohen, J.J. Wan, L. Khaw, C.J. Stewart, C. Hemphill, G.T. Manley, Continuous muscle tissue oxygenation in critically injured patients: a prospective observational study, *The Journal of Trauma*, Vol. 61, Iss. 4, 2006, pp. 790.
- [32] P. Boekstegers, R. Riessen, W. Seyde, Oxygen partial pressure distribution within skeletal muscle: indicator of whole body oxygen delivery in patients? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 277, 1990, pp. 507-514.
- [33] A.C. Bylund-Fellenius, P.M. Walker, A. Elander, S. Holm, J. Holm, T. Scherstén, Energy metabolism in relation to oxygen partial pressure in human skeletal muscle during exercise, *The Biochemical Journal*, Vol. 200, Iss. 2, 1981, pp. 247-255.
- [34] J.S. Harrison, P. Rameshwar, V. Chang, P. Bandari, Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers, *Blood*, Vol. 99, Iss. 1, 2002, pp. 394.

- [35] Y. Ishikawa, T. Ito, Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture, *European Journal of Haematology*, Vol. 40, Iss. 2, 1988, pp. 126-129.
- [36] M.C. Simon, B. Keith, The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 9, Iss. 4, 2008, pp. 285-296. <https://www.nature.com/articles/nrm2354>.
- [37] Y. Yoshida, K. Takahashi, K. Okita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, Vol. 5, Iss. 3, 2009, pp. 237-241. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590909003853>.
- [38] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family*, *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition, 2002, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26889/>.
- [39] L.X. Yin, K.M. Motz, I. Samad, M. Duvvuri, M. Murphy, D. Ding, A.T. Hillel, Fibroblasts in Hypoxic Conditions Mimic Laryngotracheal Stenosis, *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, Vol. 156, Iss. 5, 2017, pp. 886-892. <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0194599817697049>.
- [40] G.M. Cooper, *Cell Proliferation in Development and Differentiation*, *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition, 2000, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9906/>.
- [41] *Fundamental Techniques in cell culture*, *Cell culture handbook*, Sigma Aldrich, https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf.
- [42] R. Ananthkrishnan, A. Ehrlicher, The forces behind cell movement, *International journal of biological sciences*, Vol. 3, Iss. 5, 2007, pp. 303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589565>.
- [43] W.G. An, M. Kanekal, M. Simon, E. Maltepe, M.V. Blagosklonny, L.M. Neckers, Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 α , *Nature*, Vol. 392, Iss. 6674, 1998, pp. 405-408. <https://www.nature.com/articles/32925>.
- [44] C.S. Dawes, H. Konig, C. Lin, Enzyme-immobilized hydrogels to create hypoxia for in vitro cancer cell culture, *Journal of Biotechnology*, Vol. 248, 2017, pp. 25-34. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617301050>.
- [45] A.E. Greijer, P. van der Groep, D. Kemming, A. Shvarts, G.L. Semenza, G.A. Meijer, van de Wiel, M.A. J.A.M. Belien, P.J. van Diest, E. van der Wall, Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), *The Journal of Pathology*, Vol. 206, Iss. 3, 2005, pp. 291-304.
- [46] J. Lee, S. Bae, J. Jeong, S. Kim, K. Kim, Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions, *Experimental & Molecular Medicine*, Vol. 36, Iss. 1, 2004, pp. 1-12.

[47] C.S. Dawes, H. König, C. Lin, Enzyme-immobilized hydrogels to create hypoxia for in vitro cancer cell culture, *Journal of Biotechnology*, Vol. 248, 2017, pp. 25-34. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617301050>.

[48] Petaka3G - Cell Management Device, <http://www.medibena.at/life-science/petaka-g3.html>.

[49] Tri-gas CO2 Incubators, <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/lab-equipment/co2-incubators/direct-heat-co2-incubators/tri-gas-co2-incubators.html>.

[50] Precise Controlled Atmosphere Glove Boxes by Labconco, <https://www.terrauniversal.com/glove-boxes/precise-controlled-atmosphere-glove-boxes.php>.

[51] Bel-Art™ SP Scienceware™ Techni-Dome™ 360 Glove Chamber, <https://www.belart.com/techni-dome-360-glove-box-chamber.html>.

[52] H.E. Broxmeyer, H.A. O'Leary, X. Huang, C. Mantel, The importance of hypoxia and extra physiologic oxygen shock/stress for collection and processing of stem and progenitor cells to understand true physiology/pathology of these cells ex vivo, *Current Opinion in Hematology*, Vol. 22, Iss. 4, 2015, pp. 273-278.

[53] Kreutzer, J, Ylä-Outinen, L, Kärnä, P, Kaarela, T, Mikkonen, J, Skottman, H, Narkilahti, S & Kallio, P, Structured PDMS chambers for enhanced human neuronal cell activity on MEA platforms, *Journal of Bionic Engineering*, Vol. 9, Iss. 1, 2012, pp. 1-10.

LIITE A: KUVA-ANALYYSISSÄ KÄYTETTY MATLAB-KOODI

```

% Skripti Zeiss-mikroskoopin kuvien/videon lukemiseen
% Kohteena MEF -solut
% 08/07/2018

% PRESET SOLULASKURILLE
% Käytössä oleva lukufunktio toimii näin:
% CZI-kuvien sijainti
% vol = imreadBF(datname,zplanes,tframes,channel
p = 'D:\Hypoxia_kuvat\2_EXP_1357\'; % esim. 'D:\Hypoxia_ku-
vat\2_EXP_3_4_5p\' % Tähän tulee tiedostopolku, jossa sijaitsee yh-
den/useamman kaivon mittaussarjan kuvat

%Mustavalkokuvien tallennuskansio
%folder = 'D:\Hypoxia_kuvat\2_EXP_2468\BW_2468'; %esim. 'D:\Hy-
poxia_kuvat\2_EXP_1_2_1p\BW_images_1p'
%normfolder = 'D:\Hypoxia_kuvat\1_EXP_1_2_1p\BW_kuvat_1_2_3\harmaaku-
vat';
%nmbrlist:iin mittaussarjan ensimmäiset kuvat
% E = [1 3];
% nmbrstr = string(E);
tp = 3 ; %testisarjan pituus

names = dir([p '*.czi']);

Alat = [];
pinta_alat = [];
cnmbrlist = [];

for t = 1:length(names)

    name = names(t).name;

    %'Experiment-02-4-5p02-Stitching-12.czi';
    %Experiment_01_2_102.czi

    %Tiedoston kuvien stitchaaminen yhtenäiseksi kuvaksi ja taustan
    %poistaminen
    r = bfGetReader([p name]);
    I = bfGetPlane(r, 1);
    %Valikuva= I;
    % I = bfGetPlane(r, 1, 1, 1, 20, 20);
    % V = bfOpen3DVolume([p name]);

    % I = [V{1,1}{1}];
    %for yi = 1:12
    % Ix = [];
    % for xi = 1:8
    % Ix = [Ix V{xi+8*(yi-1),1}{1}];
    %end

```

```

        %I = [I; Ix];
    % end
    I = single(I);

    % I on valokuva muutettuna kuvamatriisiksi, jossa yksittäinen matrii-
    sin arvo on kuvan pikselin arvo

    %figure,hist(I(:),512);
    maski = I < 7000; % default 5000 //
    %figure,imagesc(I),colormap gray
    %G = single(imagesc(I));
    %G = imagesc(I), colormap gray;
    %imshow(G);
    %figure,imagesc(I.*~maski),colormap gray

    % lasketaan varianssisuodatettu-kuva
    J = stdfilt(I,ones(9)); % tähän voi kokeilla isompaa naapurustoa,
    default 3x3

    %figure,imagesc(J),colormap gray
    %figure,hist(maskiJ(:),0:6000)
    %Ibw = I < 6600 & I > 6000;
    Ibw = J > 150; % default 150
    %figure,imagesc(Ibw),colormap gray
    %figure,imagesc(~Ibw),colormap gray

    Ibw = bwmorph(Ibw, 'clean'); % Poistaa yksittäiset pikselit bi-
    näärimuotoisesta kuvasta
    se = strel('disk',3); % Luo disk-sovitteen, jossa diskin
    säde on 3 pikseliä
    cBW = imclose(Ibw,se); % Imclose täyttää disk elementin
    mukaisesti pieniä alueita
    cBW = bwmorph(cBW, 'clean'); %

    se = strel('disk',6); % Luo disk-sovitteen, jossa diskin
    säde on 6 pikseliä
    cBW = imerode(cBW,se); % "Luo" kuvan käyttäen disk ele-
    menttiä
    %figure,imagesc(cBW.*~maski),colormap gray
    solut = cBW.*~maski; % Suodattaa kuvasta maskin mukai-
    sesti solut binääri matriisiksi
    %im = imagesc(cBW.*~maski);
    im = cBW.*~maski;
    %figure,imagesc(im);
    pintaAla(t) = sum(solut(:));
    -----
    -----

    %Kuvien tallentaminen kansioon, EI TOIMI

    % Mustavalkokuvien nimeämiseen ja tallentamiseen käytettävä funktio
    %
    %% Mustavalkokuvan tallentaminen kohdekansioon
    % char = '%';
    %
    % if t <= tp
    % baseFileName = sprintf('Condition 01 %c 02 Timepoint %d
    .png',char, t);
    % fullFileName = fullfile(folder, baseFileName);
    % imwrite(im, fullFileName);

```

```

% %
% %
%     elseif t <= (2*tp)
%         baseFileName = sprintf('Condition 05 %c O2 Timepoint %d
.png',char, t-tp);
%         fullFileName = fullfile(folder, baseFileName);
%         imwrite(im, fullFileName);
% %
% %
%     elseif t <= (3*tp)
%         baseFileName = sprintf('Condition 19 %c O2 Timepoint %d
.png',char, t-(2*tp));
%         fullFileName = fullfile(folder, baseFileName);
%         imwrite(im, fullFileName);
% %
% %
%     elseif t <= (4*tp)
%         baseFileName = sprintf('Condition incubator reference
Timepoint %d .png', t-(3*tp));
%         fullFileName = fullfile(folder, baseFileName);
%         imwrite(im, fullFileName);
% %
% %
%     end

%

%Mustavalkokuvan tallentaminen kohdekansioon

%     baseFileName = sprintf(' Timepoint %d.tif', t);
%     fullFileName = fullfile(folder, baseFileName);
%     imwrite(im, fullFileName);

%     TOF = contains(nmbrstr, t);
% % -----
%SOLULASKURI
%Yksitäisten solujen laskeminen bwareafiltterin avulla
pinta_alat = [pinta_alat, sum(solut(:))];
lkm = bwareafilt(logical(solut), [50 700]);
alueet = regionprops(lkm, 'Area');
if t == 1||5||9 %TOF == 1
    alueet_lkm = length([alueet.Area]);
    Alat = [Alat, alueet_lkm];
    ka_alueet = mean(cell2mat(struct2cell(alueet)));

%Yhteenliittyneiden solulauttojen muodostamien alueiden
suuret_lkm = bwareafilt(logical(solut), [700 1000000000000]);
suuret_alueet =regionprops(suuret_lkm, 'Area');
sa_kok_ala = sum(cell2mat(struct2cell(suuret_alueet(:)))));
%disp(['Suuret alat=', sa_kok_ala, '[Area]']);
solut_suurella_alueella = sa_kok_ala/ka_alueet;

% Solut yhteensä
solut_yhteensa= solut_suurella_alueella + alueet_lkm;
disp(solut_yhteensa);
%     cnmbrlist = + solut_yhteensa, '\n';
end

```

```
end
%natsortfiles({folder});
figure,plot(pintaAla)          % Plottaa solujen peittämän pinta-alan
eri aikapisteissä
%-----
%TULOSTEN TALLENTAMINEN

% file = fopen( 'results.txt','wt');
% fprintf(file, 'Cell numbers \n');
% fprintf(file, cnmbrlist, '\n');
% fprintf(file, 'Hello \n');
% fclose(file);

disp('END');
%% Maskin ja filtterin optimointi
% Tämä osio tulostaa suurennettuja kuvia harmaakuvasta ja mustavalko-
kuvasta
% joiden avulla voi muokata maskia, tai filtterin arvoja
%
% slice1 = I([3000:3500],[7000:7500]);
% slice2 = lkm(3000:3500,7000:7500);
% figure
% imagesc(slice1),colormap gray
% figure
% imshow(slice2)
```