

**VEREN IMMUUNISOLUT YMPÄRISTÖTERVEYSTUTKIMUKSISSA
– PAKASTAMISEN JA NESTETYPESSÄ SÄILYTTÄMISEN
VAIKUTUKSET SOLUJEN RAKENTEELLISIIN JA
TOIMINNALLISIIN OMINAISUUKSIIN**

Eveliina Häkkinen

Veren immuunisolut ympäristöterveystutkimuksissa – Pakastamisen ja nestetyypessä
säilyttämisen vaikutukset solujen rakenteellisiin ja toiminnallisiin ominaisuuksiin

Pro Gradu -tutkielma

Ympäristötiede

Itä-Suomen yliopisto, Ympäristö- ja biotieteiden laitos

Joulukuu 2017

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Luonnontieteiden ja metsätieteiden tiedekunta

Ympäristötiede

Eveliina Häkkinen: Veren immuunisolut ympäristöterveystutkimuksissa – Pakastamisen ja nestetyössä säilyttämisen vaikutukset solujen rakenteellisiin ja toiminnallisiin ominaisuuksiin

Pro Gradu -tutkielma 50 sivua, 2 liitettä (2 sivua)

Tutkielman ohjaajat: Marjut Roponen (FaT), Maria-Viola Martikainen (FM)

Joulukuu 2017

Avainsanat: PBMC-solut, nestetyppi, CD80+, ILT4+, PMAIO, POLY(I:C), LPS

TIIVISTELMÄ

Väestötason ympäristöterveystutkimuksissa käytetään usein näyttemateriaalina verestä eristettyjä valkosoluja. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että käsittelymenetelmät ja siihen liittyvät tekijät (mm. käsittelyaika) vaikuttavat verestä eristettyjen tuoreiden solujen elävyyteen, ominaisuuksiin ja toimintoihin. Eristettyjä soluja voidaan myös pakastaa ja säilyttää hyvin alhaisissa lämpötiloissa (-80 °C – -196 °C) myöhempiä mittauksia varten. Pakastamisen ja säilyttämisen vaikutuksia soluihin ei kuitenkaan ole vielä paljon tutkittu. Tämän pro gradu-tutkielman tarkoituksena oli selvittää pakastamisen ja nestetyössä säilyttämisen vaikutuksia laskimoverestä eristettyjen PBMC-solujen rakenteellisiin ja toiminnallisiin ominaisuuksiin eri antigeenistimulaatioissa (PMAIO, POLY(I:C), LPS). Lisäksi haluttiin selvittää millaisia vaikutuksia eri altistepitoisuuksilla (LPS) oli PBMC-soluihin. PBMC-solut ovat veren mononukleaarisia valkosoluja (lymfosyytit, monosyytit, dendriittisolut), joilla on liuskoittumaton tuma.

PBMC-solut eristettiin aikuisten tutkimushenkilöiden (N=6) verinäytteistä Ficoll-Paque-sentrifugaatiomenetelmällä. Eristetyistä soluista osa pakastettiin ja säilytettiin kaksi viikkoa nestetyössä (-196 °C) ennen stimulointia ja osa stimuloitiin tuoreeltaan. Virtaussytometrillä stimuloituista soluista tunnistettiin B-solut, monosyytit, myeloidiset dendriittisolut (mDC) ja plasmasytoidiset dendriittisolut (pDC) sekä ne solut, jotka ilmensivät solukalvolla CD80- ja ILT4-reseptoreja.

Tuoreiden ja pakastettujen stimuloitujen solujen vasteprofiilit olivat pääosin samankaltaiset, mutta pakastettujen solujen vasteiden voimakkuudessa nähtiin joitain poikkeamia. Valkosolut ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa solukalv reseptorien ja sytokiiniin välityksellä. Pakastaminen tai nestetyössä säilyttäminen saattaa vaikuttaa valkosolutyyppien määriin, ominaisuuksiin tai toimintoihin ja näin vaikuttaa solujen väliseen vuorovaikutukseen.

Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella voidaan todeta, että pakastettuja PBMC-soluja voidaan käyttää ympäristöterveystutkimuksissa. Pakastamisen vaikutus mitattavien vasteiden absoluuttisiin tasoihin tulee kuitenkin huomioida tulosten tulkinnassa ja vertailussa muiden tutkimustuloksiin. Stimulaatioissa käytettävä altistepitoisuus ei näytä vaikuttavan merkittävästi PBMC-solujen elävyyteen tai ominaisuuksiin.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Science and Forestry

Environment

Eveliina Häkkinen: Circulating immune cells in environmental health research – The effects of freezing and cryopreservation on the structural and functional properties of the cells

Master's thesis 50 page, 2 appendix (2 page)

Supervisors: Marjut Roponen (FaT), Maria-Viola Martikainen (FM)

December 2017

Keywords: PBMCs, liquid nitrogen, CD80+, ILT4+, PMAIO, POLY(I:C), LPS

ABSTRACT

Blood samples and isolated leukocytes are typically used as a sample material in environmental health research. Previous studies have shown how treatment methods and related factors (i.a. treatment time) affect viability, properties and functions of fresh isolated cells. Isolated cells can also be frozen and stored in at very low temperatures (-80 °C – -196 °C). Cryopreservation gives the opportunity to analyze the cell samples later in one batch. However, the effect cryopreservation on the cell viability and other properties as compared to fresh cells have not been studied in detail. The aim of this master's thesis was to study how cryopreservation affects the structural and functional properties of isolated PBMCs in different antigen stimulations (PMAIO, POLY(I:C), LPS). Furthermore, the effects of different concentrations of LPS on PBMCs were studied. PBMCs are peripheral blood mononuclear cells (lymphocytes, monocytes, dendritic cells).

PBMCs were isolated from EDTA blood using Ficoll-Paque-centrifugation method. One part of the isolated cells were stimulated immediately and other part was frozen, stored in liquid nitrogen (-196 °C) for two weeks, thawed and stimulated. B-cells, monocytes, myeloid dendritic cells (mDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) were identified and expression of cluster of differentiation 80 (CD80) and immunoglobulin-like transcript 4 (ILT4) were analyzed by using a flow cytometry.

The response profiles of fresh and frozen stimulated cells were similar, but the intensity of the responses varied in some extent. The interaction between the white blood cells happens via receptors and cytokines. If freezing or storage in liquid nitrogen affect the number, properties or functions of white blood cells, these factors may affect cellular interactions.

Based on the results of this master's thesis, frozen PBMCs can be used in environmental health research. However, the effects of cryopreservation on the absolute levels of measurable responses should be taken into account when interpreting the results and when comparing them with results of other studies. The concentration of the stimulants does not significantly affect to viability and properties of PBMCs.

ESIPUHE

Tämä pro gradu-tutkielma on tehty Inhalaatiotoksikologian laboratorion tutkimusryhmässä Itä-Suomen yliopistolla.

Kiitos tästä mahdollisuudesta työskennellä osana tutkimusryhmää ja laatia pro gradu-tutkielmani tutkimusaineiston pohjalta. Kiitokset verinäytteiden luovuttajille ja niiden ottajalle, asiantuntevasta ohjauksesta ohjaajilleni Marjut Roposelle ja Maria-Viola Martikaiselle sekä tämän tutkielman tarkastajille.

Kiitokset myös vanhemmilleni ja Sepille, jotka tukivat minua omalla tavallaan koko graduprosessin ajan.

Kuopiossa joulukuussa 2017

Eveliina Häkkinen

LYHENNE LUETTELO

ABC	Antibodycoctail
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DC	Dendriittisolut
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DNase	Deoksiribonukleaasi
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
IFN	Interferoni
Ig	Immunoglobuliini
IL	Interleukiini
ILT	<i>Immunoglobulin-like transcript</i>
LPS	Lipopolysakkaridi
mDC	Myeloidiset dendriittisolut
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i>
NK-solut	Luonnolliset tappajasolut, <i>Natural killer cells</i>
PBMC	Perifeerisen veren mononukleaariset solut, <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
pDC	Plasmasytoidiset dendriittisolut
PMAIO	Forboli 12-myristaatti-13-asetatti ja ionomysiini
POLY(I:C)	Polyinosiini-polysytidyylihapponatrium
TLR	Toll-like reseptori
TNF	Tuumorinekroositekijä

SISÄLLYSLUETTELO

I KIRJALLISUUSOSUUS

1 JOHDANTO	8
2 IMMUNOLOGISET MITTAUKSET YMPÄRISTÖTERVEYSTUTKIMUKSISSA ..	9
2.1 Verenkierron ja imukudosten valkosolut	12
2.1.1 Valkosolujen muodostuminen ja luokittelu	12
2.2 Perifeerisen veren mononukleaariset solut (PBMC)	14
2.2.1 Lymfosyytit	14
2.2.2 Monosyytit	16
2.2.3 Dendriittisolut	16
2.3 Valkosolutyyppien kokonaismäärien vaihtelevuus	17
2.3.1 Valkosolujen välinen vuorovaikutus	17
3 KÄSITTELY- JA PAKASTAMISMENETELMÄN VAIKUTUKSET	
SOLUJEN OMINAISUUKSIIN	21
3.1 Elävien solujen kylmäsäilytysmenetelmän kehittyminen	21
3.2 Solujen säilyttämisen haasteet	22
3.2.1 Solujen eristysmenetelmä	22
3.2.2 Pakastusliuos ja sen lisäaineet	23
3.2.3 Solunäytteen jäätyminenopeus	24
3.2.4 Säilytyslämpötila	24
3.2.5 Sulatusmenetelmä	25

II KOKEELLINEN OSUUS

4 TUTKIMUKSEN TAUSTAA JA TAVOITTEET	27
5 MENETELMÄT	28
5.1 PBMC-solujen eristäminen	28
5.2 PBMC-solujen pakastaminen ja sulattaminen	29
5.3 PBMC-solujen stimulointi	29
5.4 PBMC-solujen immunofenotyypitys ja FACSCanto-virtaussytometri	29
5.5 Tilastolliset analyysit	31
6 TULOKSET	32
6.1 Pakastamisen vaikutukset B-solujen ominaisuuksiin	32
6.2 Pakastamisen vaikutukset plasmasytoidisten dendriittisolujen (pDC) ominaisuuksiin	34
6.3 Pakastamisen vaikutukset myeloidisten dendriittisolujen (mDC) ominaisuuksiin	36
6.4 Pakastamisen vaikutukset monosyyttien ominaisuuksiin	38
6.5 Altistepitoisuuden (LPS) vaikutukset PBMC-solujen ominaisuuksiin	40
7 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA	43
8 JOHTOPÄÄTÖKSET JA YHTEENVETO	46
LÄHDELUETTELO	47

LIITTEET

LIITE 1. LIUOKSET

LIITE 2. MERKKIAINEET JA NIISTÄ VALMISTETUT ANTIBODYCOCTAILIT

I KIRJALLISUUSOSUUS

1 JOHDANTO

Ympäristöterveys on monitieteellinen tutkimusala, jossa tutkitaan erilaisissa ympäristössä (mm. sisä- ja ulkoympäristö) esiintyvien biologisten, fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden mahdollisia terveysriskejä ja -vaikutuksia. Biologisille, fysikaalisille tai kemiallisille tekijöille altistumista ja niiden vaikutuksia voidaan esimerkiksi arvioida immunologisten mittausten avulla. Immunologisissa mittauksissa yleensä käytetään verinäytteitä ja veren immuunisoluja, sillä ne ovat helpommin saatavilla kuin muut elimistön immuunisolut. Veren immuunisolut ovat valkosoluja (granulosyytit, lymfosyytit, monosyytit ja dendriittisolut), jotka vastaavat elimistön immuunipuolustuksesta (Karhumäki E. ym. 2005).

Esimerkiksi epidemiologisissa tutkimuksissa verinäytteitä kerätään usein erilaisissa ympäristöissä ja näytteet kuljetetaan laboratorioon käsiteltäväksi ja analysoitavaksi. Kohortti- tai monikeskustutkimuksissa näytteitä halutaan analysoida kerralla isommissa erissä tai näytteet kuljetetaan muualle analysoitavaksi. Keskuslaboratoriossa kaikkien näytteiden käsittelyolosuhteet, -menetelmät ja -vaiheet ovat samanlaiset. Mittaustulosten vertailu on siis luotettavampaa, kun kaikki näytteet on käsitelty yhdessä laboratoriossa. Näytteistä eristettyjä soluja voidaan säilyttää pitkiäkin aikoja hyvin alhaisissa lämpötiloissa (-80 °C – -196 °C), mikä mahdollistaa solujen myöhemmän analysoimisen yhdessä erässä. Näytteistä eristettyjä soluja voidaan myös joutua kuljettamaan muualle analysoitavaksi, jonka ajaksi solut saatetaan pakastaa.

Pakastamisen ja hyvin alhaisten säilytyslämpötilojen vaikutuksia solujen elävyyteen, ominaisuuksiin ja toimintoihin ei ole vielä paljon tutkittu. Tässä opinnäytetyössä selvitettiin kirjallisuuden avulla, miten veren immuunisoluja on hyödynnetty ympäristöterveystutkimuksissa, kuinka solujen pakastamismenetelmät ovat kehittyneet ja mitä tiedetään käsittely- ja pakastamismenetelmien vaikutuksista solujen ominaisuuksiin. Työn kokeellisessa osassa selvitettiin pakastamisen ja nestetyössä säilyttämisen vaikutuksia veren immuunisolujen rakenteellisiin ja toiminnallisiin ominaisuuksiin.

2 IMMUNOLOGISET MITTAUKSET YMPÄRISTÖTERVEYSTUTKIMUKSISSA

Ympäristöterveystutkimukset arvioivat sisä- ja ulkoympäristöissä esiintyvien biologisten, fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden terveysriskejä ja -vaikutuksia. Ympäristötekijöille altistumista arvioidaan muun muassa immunologisilla mittauksilla. Immunologisissa mittauksissa esimerkiksi ympäristötekijöille altistumisesta aiheutuvia terveysvaikutuksia mitataan elävistä soluista ex vivo- tai in vitro-menetelmillä (Taulukko 1.). Näissä menetelmissä elävien solujen ominaisuuksia ja toimintoja mitataan niiden luonnollisen ympäristön ulkopuolella. Aikaisemmissa immunologisissa tutkimuksissa on muun muassa havaittu, että lapsuusajan maatalu-altistuminen vaikuttaa dendriittisolujen toimintoihin sekä suojaa astmalta (Kääriö H. 2015, Martikainen M.V. ym. 2015). Lisäksi myös on havaittu, että ilman ultrapienille hiukkasille (PM0.1) altistuminen tai tupakointi vaikuttavat veren valkosolujen ominaisuuksiin ja toimintoihin (Frampton M.W. ym. 2006, Ryder M.I. ym. 2002).

Veren immuunisolujen immuunivasteita mitataan myös jäljittelemällä bakteeritulehdusta tai virusinfektioita (Taulukko 2.). Lipopolysakkaridia (LPS) on yleisesti käytetty jäljittelemään bakteeritulehdusta ja polyinosiini-polysytidyylihapponatriumia (POLY(I:C)) jäljittelemään virusinfektiota. Näiden lisäksi forboli 12-myristaatti-13-asetaattia (PMA) käytetään mittauksissa aktivoimaan kaikki immuunijärjestelmän solut. Aikaisemmissa tutkimuksissa LPS:n on havaittu vaikuttavan muun muassa veren valkosolujen prosentuaaliseen jakautumiseen sekä dendriittisolujen ominaisuuksiin (Chowdhury F. ym. 2009, Yates D.T. ym. 2011).

Taulukko 1. Ympäristö tai ympäristötekijälle altistumisen vaikutukset valkosolujen suhteellisiin osuuksiin, ominaisuuksiin ja toimintoihin.

Tekijä(t) ja vuosi	Tutkimuksen otsikko	Mitatut solut	Altistuminen	Johtopäätös
Frampton M.W. ym. 2006	Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans	Lymfosyytit, monosyytit, granulotsyytit	Ultrapientenhiukkasten (PM0.1) vaikutus solujen toimintaan ja reseptorien ilmentymiseen soluissa	Fyysisen rasituksen aikana ultrapienille hiukkasille altistuminen vähensi monosyyttien, eosinofiilisten ja basofiilisten granulotsyyttien toimintaa sekä CD54- ja CD18-reseptorien ilmentymistä monosyyteissä ja granulotsyyteissä.
Järvelä M. ym. 2008	Työperäisen pienhiukkasaltistumisen sydän- ja verisuonivaikutukset	Lymfosyytit, monosyytit, neutrofiiliset ja eosinofiiliset granulotsyytit	Työperäinen altistuminen (hitsausaltistuminen)	Neutrofiilisten granulotsyyttien ja monosyyttien osuus veressä nousi hieman hitsausaltistuksen yhteydessä.
Kääriö H. 2015	The allergy and asthma protective effects of farm environment and pet animals – The role of immunomodulation	Myeloidiset (mDC) ja plasmasytoidiset (pDC) dendriittisolut	Maatila- ja eläinaltistumisen vaikutus dendriittisolujen suhteelliseen osuuteen ja sytokiinin tuotantoon (IL-10, IL-12, IFN- γ).	Lapsuusajan maatila-altistuminen lisäsi IL-10, IL-12 ja IFN- γ sytokiinin tuotantoa. Lapsuusajan lemmikkialtistuminen liittyi lisääntyneeseen sytokiini tuotantoon. Kissa-altistuminen lisäsi CXCL8 sytokiinin tuotantoa ja koira-altistuminen lisäsi IL-2 ja IL-1 β sytokiinin tuotantoa.
Martikainen M.V. ym. 2015	Farm exposure are associated with lower percentage of circulating myeloid dendritic cell subtype 2 at age 6	Myeloidiset (mDC) ja plasmasytoidiset (pDC) dendriittisolut	Maatila-altistumisen vaikutus dendriittisolujen suhteelliseen osuuteen ja toimintoihin sekä altistumisen yhteys astmaan	Maatila-altistuminen vähensi mDC-solujen (tyyppi 2) suhteellista osuutta ja oli havaittu antavan merkittävän suojan astmaa vastaan.
Ryder M.I. ym. 2002	Effects of tobacco smoke on the secretion of the secretion of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β from peripheral blood mononuclear cells	Monosyytit ja lymfosyytit	Tupakoinnin vaikutus solujen sytokiinin tuotantoon (IL-1 β , TNF- α , TGF- β)	Tupakointi nosti solujen IL-1 β ja TGF- β sytokiinin tuotantoa, mutta laski TNF- α sytokiinin tuotantoa.

Taulukko 2. Mitattujen solujen immuunivasteet eri stimulaatioissa.

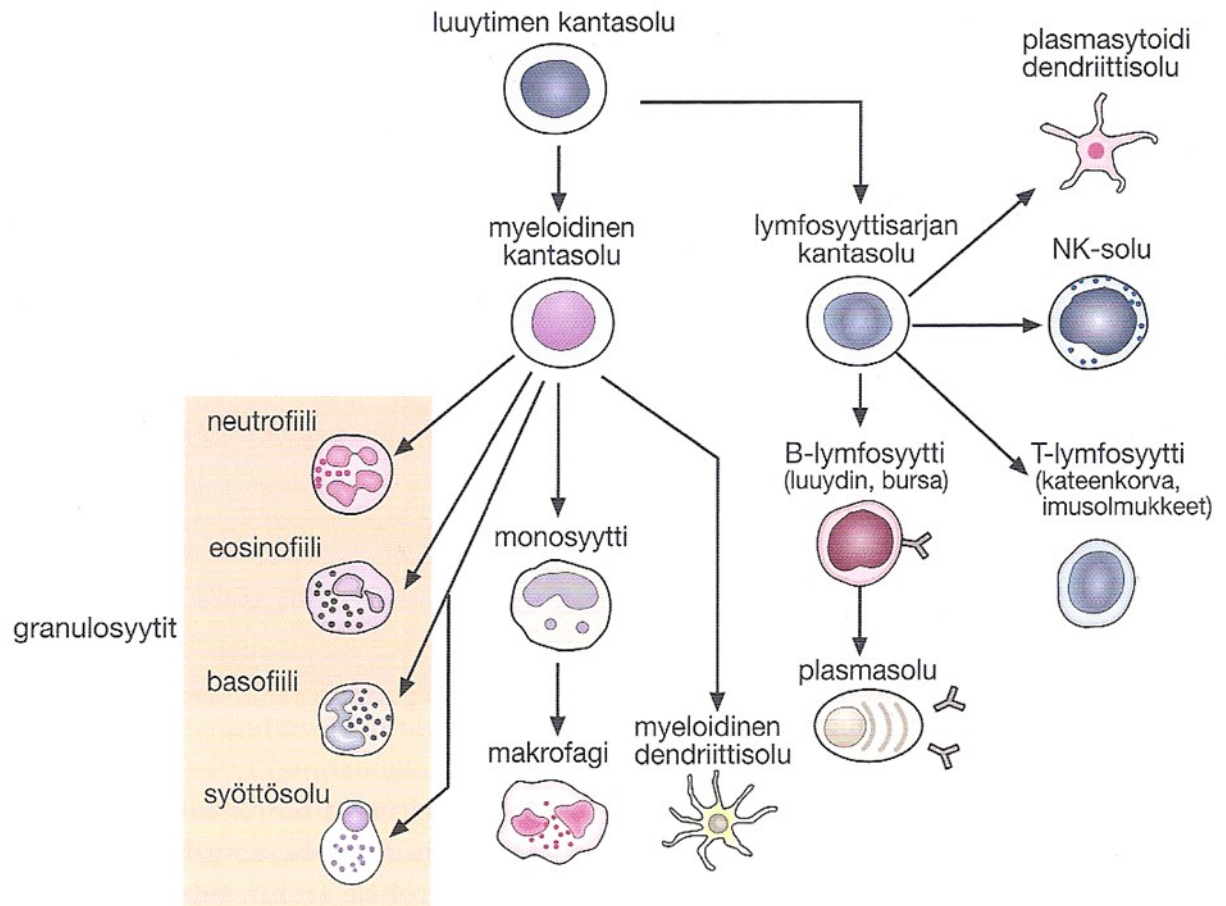
Tekijä(t) ja vuosi	Tutkimuksen otsikko	Mitatut solut	Stimulaatio	Johtopäätös
Chaung H. ym. 2010	Toll-like receptor expressions in porcine alveolar macrophages and dendritic cells in responding to POLY:IC stimulation and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection	Sian verestä eristetyt makrofagit sekä kypsymättömät ja kypsät myeloidiset dendriittisolut (mDC)	POLY(I:C)- ja PRRSV-stimulaatio	POLY(I:C) vähensi TLR7- ja TLR8-reseptorien ilmentymistä makrofageissa ja kypsymättömissä mDC-soluissa ja heikensi merkittävästi IL-10 ja IL-12 sytokiinin tuotantoa mDC-soluissa. PRRSV vähensi TLR3- ja TLR7-reseptorien ilmentymistä makrofageissa ja kypsymättömissä mDC-soluissa, mutta nosti solujen IL-10 ja IL-12p40 sytokiinin tuotantoa.
Chowdhury F. ym. 2009	Enumeration and Phenotypic Assessment of Human Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells in Whole Blood.	Dendriittisolut	LPS-stimulaatio	LPS-stimulaatio nosti solukalvon CD83-reseptorin ilmentymistä dendriittisoluihin.
Kim H.M. ym. 2000	Immunomodulating activity of a polysaccharide isolated from mori cortex radices	Pernan lymfosyytit	LPS- ja Concanavalin A-stimulaatio (ConA) PMA-stimulaation kanssa	PMA (0.1–100 µg/ml) lisäsi stimuloitujen (LPS, ConA) lymfosyyttien proliferaatiota (eli lisääntymistä ja kasvua). PMA (100 µg/ml) vähensi LPS stimuloitujen B-solujen vasta-aine tuotantoa, minkä vaikutus myös havaittiin T-soluissa.
Yates D.T. ym. 2011	Effects of bacterial lipopolysaccharide injection on white blood cell counts, hematological parameters and serum glucose, insulin, and cortisol concentrations in ewes fed low- or high-protein diets	Leukosyytit	LPS-stimulaatio	LPS ei vaikuttanut solujen määriin. LPS nosti neutrofiilisten granulosityttien ja monosyyttien osuutta ja lymfosyyttien osuus aluksi kasvoi, mutta sitten väheni.

2.1 Verenkierron ja imukudosten valkosolut

Tärkeimpiä elimistön immuunijärjestelmän puolustussoluja ovat vapaasti verenkierrossa ja imukudoksissa liikkuvat valkosolut eli leukosyytit, jotka puolustautuvat elimistöön tunkeutuvia antigeenejä vastaan (Hedman K. ym. 2011, Karhumäki E. ym. 2005). Elimistön immuunijärjestelmä jaetaan synnynnäiseen ja hankittuun immuunipuolustukseen, jotka kytkeytyvät toisiinsa valkosolujen toimintojen kautta (Sand O. ym. 2014). Synnynnäinen immuunipuolustus muodostuu elimistön fyysisistä esteistä (iho, limakalvot) sekä verenkierron että imukudosten valkosoluista (neutrofiiliset granulosyytit, monosyytit, makrofagit, NK-solut, dendriittisolut) (Abbas A.K. ym. 2007, Sand O. ym. 2014). Hankittu immuunipuolustus jaetaan edelleen vasta-ainevälitteiseen ja soluvälitteiseen immuunipuolustukseen, joissa B-solut vastaavat vasta-ainevälitteisestä ja T-solut soluvälitteisestä immuunipuoluksesta (Vierimaa H. ja Laurila M. 2011).

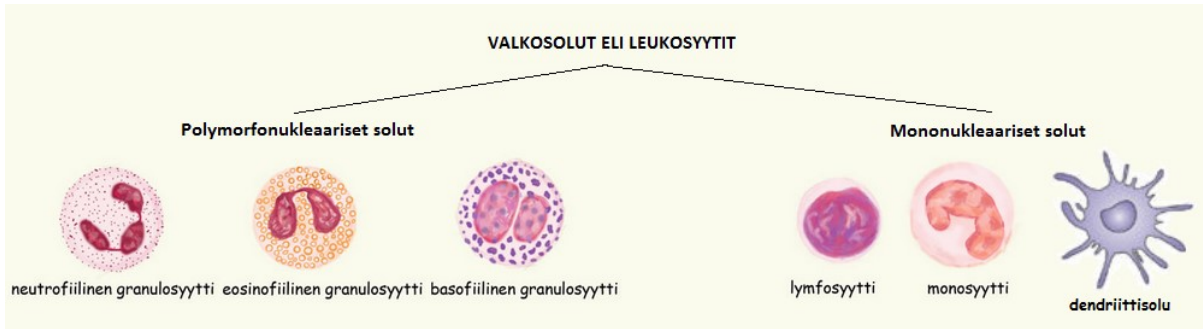
2.1.1 Valkosolujen muodostuminen ja luokittelu

Elimistön valkosolut syntyvät veren kantasoluista joko myeloidisesta tai lymfaattisesta solulinjasta (Kuva 1.) useiden solunjakautumisten lopputuloksena (Hedman K. ym. 2011, Sand O. ym. 2014). Veren kantasolut sijaitsevat punaisessa luuytimessä, jota aikuisella ihmisellä on rintalastassa, suoliluussa ja raajojen pitkien luiden päissä sekä vartalon että pään luissa (Vierimaa H. ja Laurila M. 2011). Solujen lopullinen kypsyminen tapahtuu joko primaarisissa tai sekundaarisissa imukudoselimissä (Hedman K. ym. 2011). Epäkypsät lymfosyytit kypsyvät primaarisissa imukudoselimissä, B-solut luuytimessä ja T-solut kateenkorvassa, mistä kypsyneet solut siirtyvät imukudoksiin, imusolmukkeisiin ja pernaan (Abbas A.K. ym. 2015, Hedman K. ym. 2011, Sand O. ym. 2014). Verenkierron kautta epäkypsät monosyytit sekä dendriittisolut siirtyvät erilaistumaan kudoksiin (sekundaarinen imukudoselin) (Hedman K. ym. 2011, Sand O. ym. 2014).



Kuva 1. Elimistön valkosolujen solulinjat (muokattu Hedman Y. ym. 2011).

Valkosolut ovat tumallisia verisoluja, mikä erottaa ne tumattomista punasoluista ja verihiutaleista (Vierimaa H. ja Laurila M. 2011, Sand O. ym. 2014). Tuman rakenteen perusteella valkosolut jaetaan polymorfonukleaarisiin ja mononukleaarisiin soluihin (Kuva 2.) (Sand O ym. 2014, Solunetti 2006a). Polymorfonukleaarisilla soluilla eli granulosyyteillä on liuskoittunut tuma ja paljon solunsisäisiä rakkuloita (Sand O. ym. 2014). Granulosyytit jaetaan rakenteen mukaan edelleen neutrofiilisiin, eosinofiilisiin ja basofiilisiin granulosyytteihin (Sand O. ym. 2014). Mononukleaarisilla soluilla on liuskoittumaton tuma ja solunsisäisiä lysosomeja (Solunetti 2006a). Näihin soluihin kuuluvat lymfosyytit (T-, B-, ja NK-solut), monosyytit, dendriittisolut ja makrofagit (Solunetti 2006a).



Kuva 2. Valkosolujen luokittelu (muokattu Solunetti 2006a).

2.2 Perifeerisen veren mononukleaariset solut (PBMC)

2.2.1 Lymfositytit

Lymfositytit ovat hankitun immuunipuolustuksen soluja, jotka puolustautuvat elimistöön tunkeutuneita antigeenejä vastaan tuottamallaan sytokiineilla tai vasta-aineilla (Karhumäki E. ym. 2005, Turunen S. 2011). Lymfositytit jaetaan sekä pintarakenteen että toiminnallisten ominaisuuksien mukaan B- ja T-lymfositytteihin (B- ja T-solut) sekä luonnollisiin tappajasoluihin eli NK-soluihin (*natural killer cells*) (Hedman K. ym. 2011, Nienstedt W. ym. 2000). Verenkierron lisäksi lymfosityttejä esiintyy imukudoksissa ja NK-soluja yksittäisissä elimissä (mm. maksa ja perna) (Abbas A.K. ym. 2015, Sand O. ym. 2014). Lymfosityttien osuus veren valkosoluista on 25-33 %, joista noin kymmenesosa on NK-soluja (Nienstedt W. ym. 2000, Sand O. ym. 2014). Imukudoksissa ja verenkierrossa esiintyvistä lymfosityteistä osa voi elää jopa useita vuosia (Sand O. ym. 2014). Kypsät lymfositytit ja NK-solut ilmentävät solukalvolla useita antigeenin tunnistusreseptoreita ja -molekyylejä (Abbas A.K. ym. 2007, Hedman K. ym. 2011). Näiden lisäksi lymfositytit ilmentävät muun muassa kemokiinireseptoreita ja NK-solut sekä aktivoivia että estäviä reseptoreita (Abbas A.K. ym. 2007, Hedman K. ym. 2011). Spesifisiä reseptoreja ilmentävät sekä sytokiineja tuottavat yksittäiset lymfositytit kykenevät puolustautumaan vain yhtä tiettyä antigeeniä vastaan (Sand O. ym. 2014).

B-solut erilaistuvat vielä vasta-aineita eli immunoglobuliineja (Ig) tuottaviin plasmakomposoluihin sekä muistisoluihin (Karhumäki E. ym. 2005, Turunen S. 2011). B-solujen tehtävänä on puolustautua elimistöön tunkeutuneita antigeenejä vastaan tuottamallaan spesifisillä vasta-aineilla (Solunetti 2006e). Kypsät B-solut ilmentävät solukalvolla CD-reseptorien (*Cluster*

of differentiation, mm. CD80) ja MHC II-molekyylin (*major histocompatibility complex*) lisäksi muun muassa Ig- ja CXRC5-reseptoria (Abbas A.K. ym. 2007, Abbas A.K. ym. 2015, Sand O. ym. 2014, Solunetti 2006f).

T-solut jaetaan vielä CD-reseptorien ilmentymisen mukaan CD4-reseptoria ilmentäviin auttaja-T-soluihin ja CD8-reseptoria ilmentäviin tappaja-T-soluihin sekä muistisoluihin (Hedman K. ym. 2011, Solunetti 2006d). Solujen tuottamilla sytokiineilla auttaja-T-solut ohjaavat ja aktivoivat muita immuunijärjestelmän soluja ja tappaja-T-solut torjuvat virusinfektioita (Hedman K. ym. 2011, Karhumäki E. ym. 2005, Solunetti 2006b). Voimistamansa immuunireaktion ja tuottamiensa sytokiinien perusteella auttaja-T-solut jaetaan edelleen Th1- ja Th2-soluihin (Hedman K. ym. 2011). Th1-solut voimistavat soluvälitteistä immunitettä ja tuottavat interleukiineja (mm. IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27) ja interferoneja (mm. IFN- α , IFN- γ). Th2-solut voimistavat vasta-ainevälitteistä immunitettä ja tuottavat interleukiineja (mm. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) (Hedman K. ym. 2011). Kypsät T-solut ilmentävät solukalvolla CD-reseptorien lisäksi muun muassa MHC I- tai MHC II-molekyylä (Abbas A.K. ym. 2015, Sand O. ym. 2014).

NK-solujen tehtävänä on immuunipuolustuksessa tuhota virusten infektoimat solut (Hedman K. ym. 2011). Tämä kuitenkin edellyttää NK-solujen aktivoitumisen sytokiinien (mm. IL-2, IL-12) avulla. Aktivoituneet NK-solut vapauttavat rakkuloidensa sisältämät yhdisteet (mm. perforiini ja seriiniesteriaasientsyymit) kohdattuaan ja tunnistettuaan infektoituneet solut (Hedman K. ym. 2011). NK-solut tunnistavat infektoituneet solut muun muassa MHC I-molekyylin perusteella (Abbas A.K. ym. 2007, Hedman K. ym. 2011). Rakkuloiden yhdisteet rikkovat kohdesolun solukalvon, minkä seurauksena kohdesolu tuhoutuu (Hedman K. ym. 2011, Sand O. ym. 2014). Tunnistaessaan infektoituneet solut NK-solut tuottavat myös sytokiineja (mm. IFN- γ), mitkä aktivoivat makrofageja ja lisäävät soluvälitteisen immunitetin kehitystä (Abbas A.K. ym. 2007, Hedman K. ym. 2011). Solukalvolla NK-solut ilmentävät monen tyyppisiä tunnistusreseptoreita ja -molekyylejä, kuten CD56- ja CD16-reseptoreja, joista CD16-reseptorit ovat mukana plasmakalvokompleksien vasta-aineilla merkittyjen antigeenien tunnistamisessa (Abbas A.K. ym. 2015). Lisäksi NK-solut ilmentävät solukalvolla immunoglobuliini- ja lektiinityyppisiä aktivoivia ja estäviä reseptoreja (Hedman K. ym. 2011).

2.2.2 Monosyytit

Verenkierron monosyytit ovat valkosoluista kookkaimpia (Vierimaa H. ja Laurila M. 2011). Niiden osuus veren valkosoluista on 2-6 % (Sand O. ym. 2014). Solukalvollaan monosyytit ilmentävät muun muassa CD- (mm. CD14, CD80) ja inhibitorisia reseptoreja (mm. ILT4) (Abbas A.K. ym. 2007, Allan D.S.J. ym. 2000, Thompson C.B. 1995). Kypsymättömät monosyytit kiertävät hetken verenkierrossa ennen siirtymistään kudoksiin, missä niiden kypsyminen tapahtuu (Sand O. ym. 2014). Laboratoriossa verestä eristetyistä monosyyteistä voidaan myös viljellä kypsiä dendriittisoluja monomeeristä glykoproteiinia GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) ja sytokiineja (mm. IL-4, TNF- α) sisältävissä mediumissa (Hori S. ym. 2004). Kun verenkierron monosyytit siirtyvät kudoksiin, niiden koko ja ominaisuudet muuttuvat (Sand O. ym. 2014). Kudoksiin siirtyneitä monosyyttejä kutsutaan makrofageiksi (Sand O. ym. 2014).

Makrofagit voivat elää kudoksissa jopa useita vuosia ja niillä on tärkeä merkitys elimistön immuunijärjestelmässä (Sand O. ym. 2014). Kudosten makrofagit ovat tehokkaita fagosyyttejä, joiden tehtävänä on tuhota mikrobeja, puhdistaa elimistöä muista partikkeleista ja huolehtia vaurioituneiden omien solujen eliminaatiosta (Hedman K. ym. 2011, Sand O. ym. 2014). Solukalvollaan makrofagit ilmentävät muun muassa MHC II-molekyylä sekä CD- (mm. CD14, CD80) ja inhibitorisia reseptoreja (mm. ILT4) (Abbas A.K. ym. 2007, Allan D.S.J. ym. 2000, Sand O. ym. 2014). Makrofageja esiintyy muun muassa imukudoksissa, imusolmukkeissa, keuhkorakkuloissa ja yksittäisissä elimissä (mm. maksa, perna) (Hedman K. ym. 2011, Sand O. ym. 2014).

2.2.3 Dendriittisolut

Dendriittisolut ovat synnynnäisen immuunipuolustuksen soluja, jotka yhdistävät synnynnäisen ja hankitun immuunipuolustuksen aktivoimalla T-soluja (Abbas A.K. ym. 2007, Nairn R. ja Helbert M. 2002). Dendriittisolujen osuus elimistön valkosoluista on noin 0.48 % (Miltenyi Biotec 2017). Dendriittisolut ovat liikkuvia fagosyyttejä, joita esiintyy veren ja imunesteen lisäksi lymfoidisissa elimissä (mm. imukudos), ihossa ja yksittäisissä elimissä (mm. sydän) (Nairn R. ja Helbert R. 2002). Dendriittisolut ilmentävät solukalvolla useita erilaisia antigeenin tunnustusreseptoreita ja -molekyylejä, kuten CD- (mm. CD80), Toll-like (mm. TLR-3, TLR4, TLR-7, TLR-8, TLR-9), ja inhibitorisia reseptoreja (mm. ILT4) sekä MHC II-molekyylä

(Abbas A.K. ym. 2015, Allan D.S.J. ym. 2000, Janeway C.A. ym. 2001, Nair R. ja Helbert R. 2002).

Verenkierron kautta dendriittisolut siirtyvät kudoksiin erilaistumaan (Hedman K. ym. 2011). Dendriittisolut jaetaan kehityslinjansa mukaan kahteen päätyyppiin, myeloidisesta kehityslinjasta syntyviin myeloidisiin dendriittisoluihin (mDC) ja lymfaattisesta solulinjasta syntyviin plasmasytoidisiin dendriittisoluihin (pDC) (Hedman K. ym. 2011). Myeloidiset dendriittisolut tuhoavat elimistöön tunkeutuvia bakteereja ja aktivoivat T-soluja esittelemällä solukalvon MHC II-molekyylisiin sitoutunutta antigeenipeptidiä (Abbas A.K. ym. 2007, Hedman K. ym. 2011). Plasmasytoidiset dendriittisolut tunnistavat viruksen infektoimat solut ja aktivoivat T-soluja tuottamallaan sytokiineilla (mm. IFN-1) (Abbas A.K. ym. 2007, Hedman K. ym. 2011).

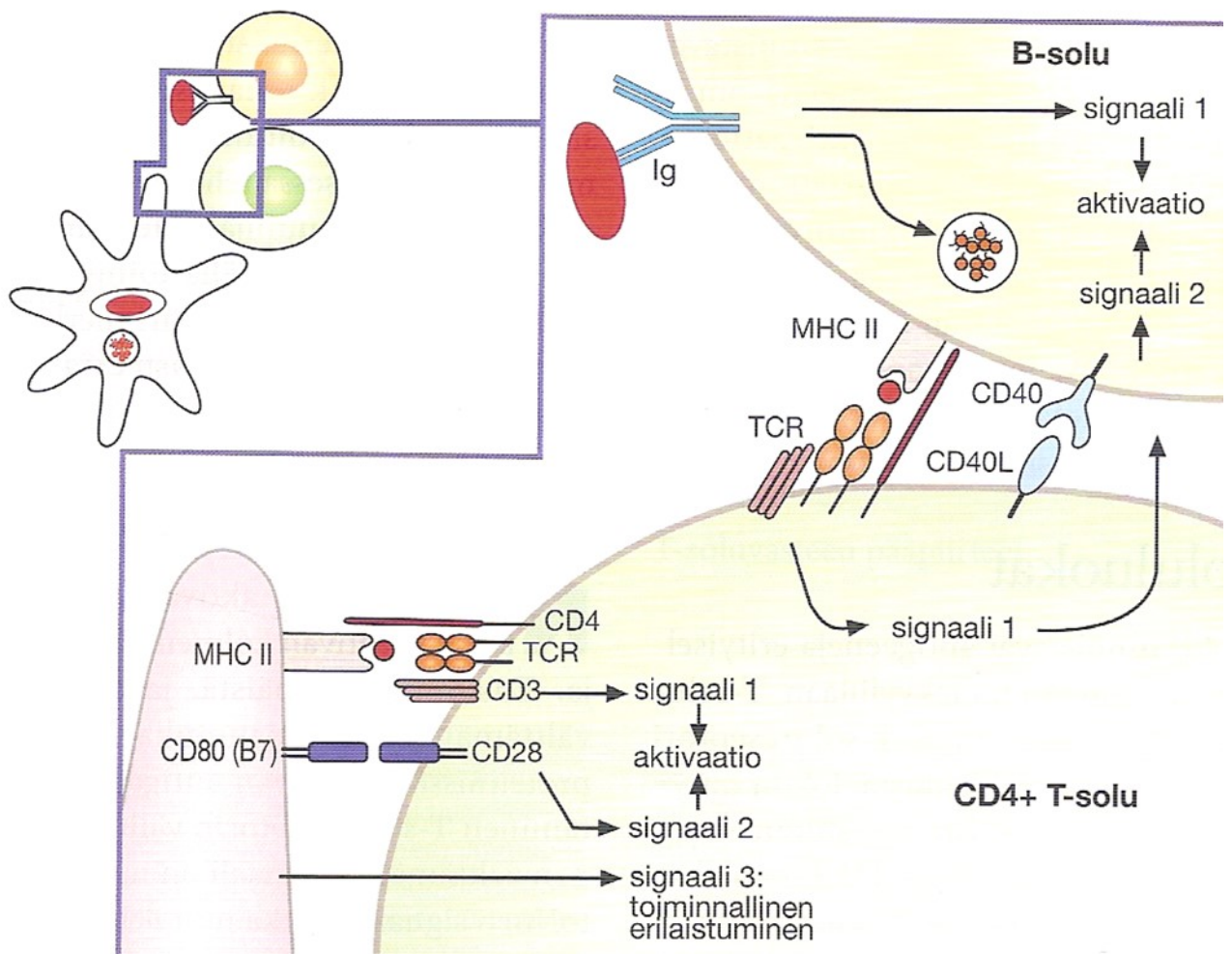
2.3 Valkosolutyypien kokonaismäärien vaihtelevuus

Verenkierrossa ja imukudoksissa valkosolutyypien prosentuaalinen jakautuminen vaihtelee. Valkosolujen osuuteen vaikuttaa ihmisen eliniän lisäksi myös elimistöä uhkaavat tulehdukset ja infektiot (Nienstedt W. ym. 2000). Infektion uhatessa luuytimeen varastoituneita valkosoluja vapautuu verenkiertoon, jolloin valkosolujen kokonaismäärät vaihtelevat suuresti (Sand O. ym. 2014).

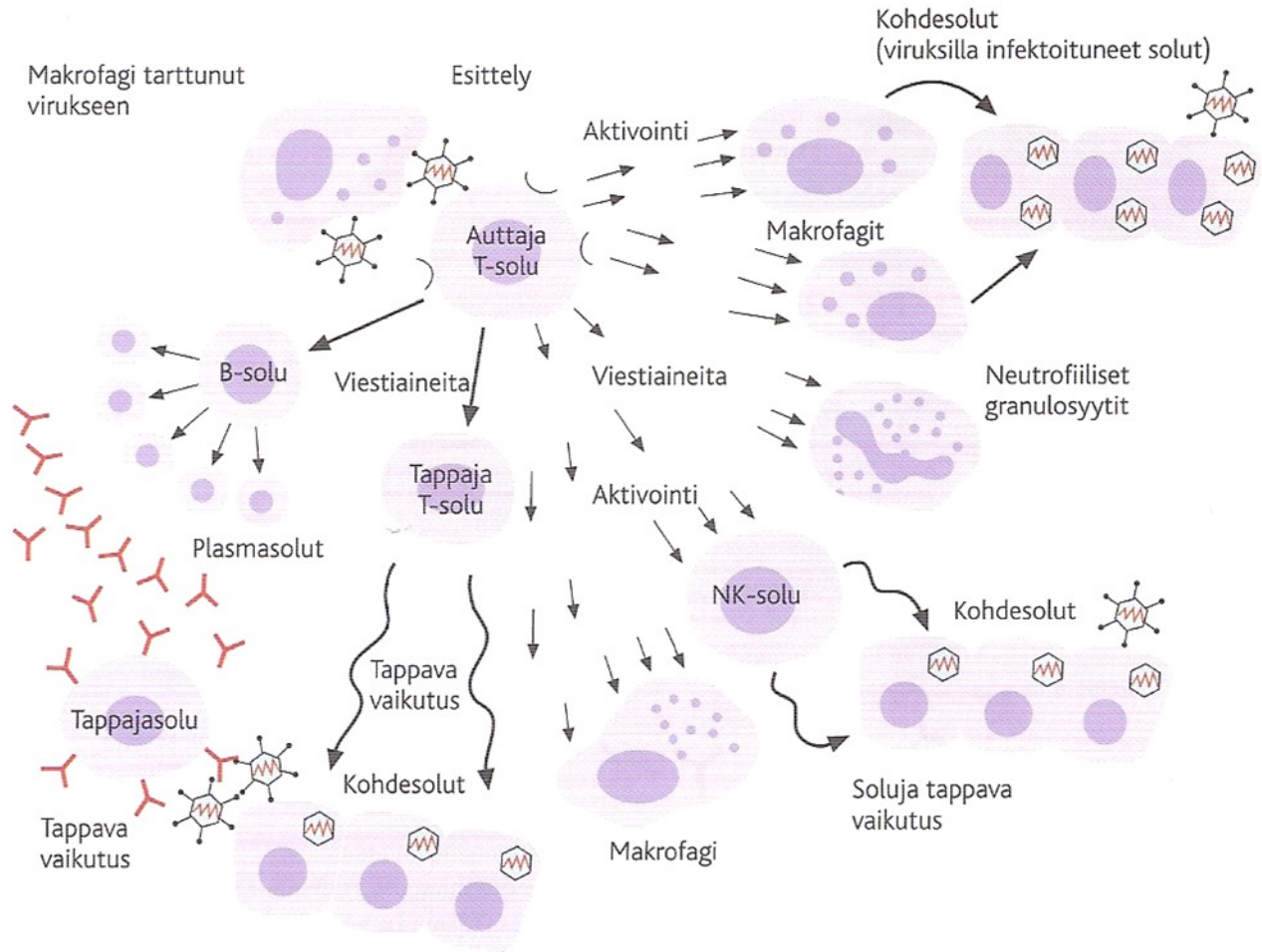
2.3.1 Valkosolujen välinen vuorovaikutus

Immuunipuolustus perustuu valkosolujen väliseen vuorovaikutukseen ja niiden toimintoihin (Karhumäki E. ym. 2005). Jos antigeeni pääsee tunkeutumaan synnynnäisen immuunipuolustuksen fyysisten esteiden (iho, limakalvot) läpi, immuunipuolustukseen kuuluvat valkosolut (neutrofiiliset granulositytit, makrofagit, NK-solut) yrittävät eliminoida tunkeutuneen antigeenin (Sand O. ym. 2014). Fagosytoitavan antigeenin koosta riippuen neutrofiiliset granulositytit sekä makrofagit tuhoavat fagosytoimansa antigeenin solunsisäisten rakkuloidensa yhdisteillä (Hedman K. ym. 2011, Sand O. ym. 2014). Sitä vastoin NK-solut tuhoavat virusten infektoimien solujen solukalvon solunsisäisten rakkuloidensa yhdisteillä ja aktivoivat tuottamiensa sytokiinien (mm. IFN- γ) avulla makrofageja (Hedman K. ym. 2011).

Jos synnynnäinen immuunipuolustus ei kykene tuhoamaan antigeeniä, hankittu immuunipuolustus aktivoituu (Vierimaa H. ja Laurila M. 2011). Hankitun immuunipuolustuksen auttaja-T-solut aktivoituvat antigeenejä esittelevien solujen (mm. dendriittisolut) toimesta (Hedman K. ym. 2011). Antigeenejä esittelevät solut hajottavat fagosytoimansa antigeenin ja sitovat antigeenipeptidin solukalvolla olevaan MHC II-molekyylisiin, jonka auttaja-T-solut tunnistavat solukalvon tunnistusreseptorillaan. Auttaja-T-solujen aktivaatiota ohjataan sekä solukalvoreseptorien, että tuotettujen sytokiinienvälityksellä. Antigeenejä esittelevien solujen solukalvon CD80-reseptori sitoutuu auttaja-T-solujen solukalvon CD28-reseptoriin (Kuva 3.) (Hedman K. ym. 2011). Aktivoituneet auttaja-T-solut ohjaavat ja aktivoivat muiden immuunijärjestelmän solujen (mm. makrofagit, B-solut, NK-solut, neutrofiiliset granulosityytit, tappaja-T-solut) toimintaa tuottamallaan sytokiineilla (mm. interferonit, interleukiinit) (Kuva 4.) (Abbas A.K. ym. 2007, Hedman K. ym. 2011, Karhumäki E. ym. 2005).



Kuva 3. Antigeenipeptidin esittely auttaja-T-solulle (muokattu Hedman K. ym. 2011).



Kuva 4. Valkosolujen välinen vuorovaikutus (Karhumäki E. ym. 2005).

B-solut aktivoituvat auttaja-T-solujen avustuksella ja aktivaatiota ohjataan sekä solukalvoreseptorien että tuotettujen sytokiinien välityksellä (Hedman K. ym. 2011). B-solut esittelevät aktivoituneille auttaja-T-soluille solukalvon MHC II-molekyylisiin sitoutunutta antigeeni-peptidiä. B-solujen solukalvon CD40-reseptori sitoutuu auttaja-T-solujen solukalvon CD40-ligandiin (CD40L) (Kuva 3.) (Hedman K. ym. 2011). Aktivoituneet B-solut erilaistuvat plasma- ja muistisoluiksi (Vierimaa H. ja Laurila M. 2011). Plasmasolut tuottavat vasta-aineita, jotka kiinnittyvät elimistöön tunkeutuneen antigeenin pintaan. Vasta-aineet vaurioittavat antigeenin pintarakennetta, houkuttelevat fagosytoivia soluja paikalle ja merkitsevät antigeenin fagosytoiville soluille (Vierimaa H. ja Laurila M. 2011). Jos antigeeni on tunkeutunut solun sisään, vasta-aineet eivät enää kykene havaitsemaan sitä (Sand O. ym. 2014). Solun sisään tunkeutuneiden antigeenien tuhoaminen on tappaja-T-solujen tehtävä (Sand O. ym. 2014).

Tappaja-T-solujen aktivaatio tapahtuu samalla tavalla kuin auttaja-T-solujen, mutta antigeenejä esittelevien solujen solukalvolla on MHC I-molekyylit (Hedman K. ym. 2011). Tappaja-T-solut tunnistavat virusten infektoimat solut niiden solukalvon MHC I-molekyyliin sitoutuneiden antigeeni-peptidien perusteella (Sand O. ym. 2014). Aktivoituneet tappaja-T-solut tuottavat perforiinia ja grantsyymejä (Hedman K. ym. 2011). Perforiini puhkaisee reikiä infektoituneen solun solukalvoon, jolloin grantsyymit pääsevät kohdesolun sisään käynnistämään ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin (Hedman K. ym. 2011). Tämän jälkeen plasmansolujen vasta-aineet tai fagosytoivat solut tuhoavat viruksen (Sand O. ym. 2014). Tappaja-T-solut voivat myös voimistaa sytokiinin avulla infektoituneen solun kykyä rajoittaa viruksen rakenteiden tuotantoa ja siten torjua virusinfektioita niin että infektoituneet solut eivät kuole (Hedman K. ym. 2011).

3 KÄSITTELY- JA PAKASTAMISMENETELMÄN VAIKUTUKSET SOLUJEN OMINAISUUKSIIN

Verinäytteiden käsittelyyn ja pakastamiseen liittyy useita vaiheita, jotka voivat vaikuttaa tutkittavien solujen elävyyteen ja muihin ominaisuuksiin. Verinäytteet otetaan antikoagulanttia (veren hyytymistä hidastava aine, mm. EDTA tai hepariini) sisältävään näyteputkeen, josta PBMC-solut eristetään esimerkiksi Ficoll-Paque-sentrifugaatiomenetelmällä. Verinäytteiden käsittelyssä antikoagulantin, sentrifugointi ajan tai -nopeuden ei ole todettu aiheuttavan merkittäviä muutoksia pakastettujen PBMC-solujen elävyyteen tai saantoprosenttiin (Bull M. ym. 2007, Disis M.L. ym. 2007). On kuitenkin suositeltavaa käyttää samaa antikoagulanttia sisältäviä näyteputkia koko tutkimuksen ajan, koska myeloidisten ja plasmasytoidisten dendriittisolujen välillä on havaittu pieniä tilastollisesti merkityksettömiä eroja solukalvotreseptorien (mm. CCR7, CD83) ilmentymisessä eri antikoagulantteja käytettäessä (Chowdhury F. ym. 2009). Myös aika verinäytteiden ottamisen ja käsittelyn välillä vaikuttaa pakastettujen PBMC-solujen elävyyteen ja toimintoihin (Bull M. ym. 2007). Käsittelyviiveen kasvaessa 8 tunnista 24 tuntiin solujen elävyys laski noin 8 % ja T-solujen IFN- γ sytokiinin tuotanto laski 36-56 % käytetystä antikoagulantista ja eristysmenetelmästä riippumatta (Bull M. ym. 2007). Verinäytteiden käsittelyn jälkeen eristettyjä PBMC-soluja säilytetään tarvittaessa usein pitkiäkin aikoja hyvin alhaisissa lämpötiloissa (-80 °C – -196 °C), joka voi vaikuttaa solujen ominaisuuksiin ja toimintoihin.

3.1 Elävien solujen kylmäsäilytysmenetelmän kehittyminen

Christopher Polgen tavoite elävien solujen ja kudosten säilyttämisestä hyvin alhaisissa lämpötiloissa vuonna 1949 johti kylmäsäilytysmenetelmän kehittymiseen (Polge C. ym. 1949). Kylmäsäilytysmenetelmässä soluja, kudoksia sekä solujen tuottamia entsyymejä ja välittäjäaineita säilytetään hyvin alhaisissa lämpötiloissa (-80 °C – -196 °C) myöhempää analysointia varten. Näytteiden säilyttäminen hyvin alhaisissa lämpötiloissa mahdollistaa esimerkiksi kohortti- tai monikeskustutkimuksissa kerättyjen näytteiden analysoimisen yhdessä erässä tai niiden siirtämisen toiseen laboratorioon analysoitavaksi. Lisäksi näytteille on mahdollista tehdä täydentäviä analyysejä uusien hypoteesien ja tekniikoiden kehittyessä (Mallone R. ym. 2010). Tarpeeksi alhaisessa lämpötilassa kaikki solun entsyymaattiset ja kemialliset solua vahingoittavat toiminnot hidastuvat tai loppuvat. Esimerkiksi

dendriittisolujen enstymaattiset ja kemialliset toiminnot loppuvat vasta $< -132\text{ °C}$:ssa (Mallone R. ym. 2010).

3.2 Solujen säilyttämisen haasteet

Pakastamisen on todettu laskevan PBMC-solujen elävyyttä ja vaikuttavan solutyypin ominaisuuksiin sekä toimintoihin, kuten solukalvoreseptorien ilmentymiseen ja sytokiinin tuotantoon (Chowdhury F. ym. 2009, Mallone R. ym. 2010, Shreffler W.G. ym. 2006, Verschoor C.P. ym. 2017). James Lovelock esitti 1950-luvulla, että punasolujen vaurioituminen pakastamisen aikana johtui osmoottisesta stressistä ja että solun kasvava suolapitoisuus jäätyksen aikana saattaa vahingoittaa solua (Lovelock J.E. 1953). Näiden lisäksi pakastamisen aikana solu voi kärsiä myös muun muassa mekaanisesta vahingoittumisesta (muodostuneet jääkiteet), oksidatiivisesta stressistä, solurakenteiden fysikaalisten ominaisuuksien muutoksista, osmoottisista vammoista tai häiriintyneestä ioni homeostaasista (Mallone R. ym. 2010). Pakastamisen on myös havaittu aiheuttavan soluissa apoptoosia (ohjelmoitu solukuolema) (Mallone R. ym. 2010). Apoptoosi käynnistyy, mikäli solu saa riittävästi apoptoosia indusoivia viestejä (mm. kaspasientsyymi) (Solunetti 2006c). Kaspasiiaktivaation estämisen on todettu suojaavan soluja solukuolemalta, mutta tätä ei ole kuitenkaan tutkittu PBMC-solujen kohdalla (Mallone R. ym. 2010, Solunetti 2006c).

3.2.1 Solujen eristysmenetelmä

Solujen eristysmenetelmän ja säilytyslämpötilan yhteisvaikutuksella on havaittu olevan joitain tilastollisesti pieniä vaikutuksia pakastettujen solujen elävyyteen, saantoprosenttiin ja solukalvoreseptorien ilmentymiseen (Bull M. ym. 2007, Chowdhury F. ym. 2009, Gerrits J. ym. 2006). Ficoll-menetelmällä eristettyjen ja nestetyössä (-196 °C) säilytettyjen PBMC-solujen elävyys oli korkeampi kuin kuivajäissä (-78 °C) tai -70 °C :ssa säilytettyjen solujen (93,8 % vs. 91,4 % vs. 90,6 %) (Bull M. ym. 2007). Vastaava ilmiö oli havaittu myös saantoprosentissa (92,3 % vs. 87,5 % vs. 80,0 %) (Bull M. ym. 2007). Ficoll-menetelmällä eristettyjen ja syväjäälämpötilassa (-80 °C) säilytettyjen dendriittisolujen (mDC, pDC) suhteelliset osuudet kasvoivat, mutta CCR5-kemokiinireseptorin ilmentyminen oli alhaisempi tuoreisiin soluihin verrattuna (Gerrits J. ym. 2006). Samanlaista merkittävää muutosta ei

kuitenkaan havaittu CCR7- ja CXCR4-kemokiinireseptorien ilmentymisessä dendriittisoluiissa, mutta Lymphoprepi-eristyksen ja nestetyessä säilyttämisen yhteisvaikutuksesta CCR7-kemokiinireseptorin ilmentyminen kasvoi dendriittisoluiissa (Chowdhury F. ym. 2009, Gerrits J. ym. 2006). Lisäksi myös plasmasytoidisten dendriittisolujen suhteellinen osuus väheni Lymphoprepi-eristyksen ja nestetyessä säilyttämisen yhteisvaikutuksesta (Chowdhury F. ym. 2009).

3.2.2 Pakastusliuos ja sen lisäaineet

Pakastettavien solujen solutiheyden (solua/ml) ei ole havaittu vaikuttavan solujen elävyyteen, mutta suositeltava määrä on $< 3 \times 10^7$ solua millilitrassa (Disis M.L. ym. 2006, Mallone R. ym. 2010). Solut pakastetaan pakastusliuoksessa, joka sisältää pääasiassa DMSO:ta ja joitain lisäaineita (Mallone R. ym. 2010). Pakastusliuoksen koostumus voi vaihdella laboratorioittain. Solujen pakastamisessa pakastusliuos estää jääkiteiden muodostumisen sekä ehkäisee osmoottiset vauriot (Mallone R. ym. 2010).

Aikaisemmissa tutkimuksissa on vertailtu useiden eri koostumuksen omaavien pakastusliuosten vaikutusta pakastettujen PBMC-solujen elävyyteen (Bull M. ym. 2007, Disis M.L. ym. 2006). Kaikki tutkitut pakastusliuokset sisälsivät 10 % DMSO:ta, mutta niissä oli lisäksi eri lisäaineita (mm. FBS, human AB-seerumia tai HSA ja RPMI-1640). Tutkimuksissa havaittiin, että pakastusliuoksen lisäaineet saattavat vaikuttaa solujen elävyyteen. Pakastusliuos joka sisälsi lisäaineena FBS:ää tai HSA:ta säilytti solujen elävyyden yhtä suurena (< 90 %) (Bull M. ym. 2007, Disis M.L. ym. 2006). Yllättäen human AB-seerumia sisältävä pakastusliuos oli selvästi muita pakastusliuoksia huonompi (n. 77 %) (Disis M.L. ym. 2006). Lisäksi pakastusliuos ja sen lisäaineet saattavat myös vaikuttaa pakastettujen solujen ominaisuuksiin ja toimintoihin, kuten solukalvon molekyylien ja reseptorien ilmentymiseen ja sytokiinien tuotantoon (Mallone R. ym. 2010).

Ennen pakastusliuoksen lisäämistä solususpensioon, sekä solut että pakastusliuos yleensä jäähdytetään jääkaapissa tai jäähauteessa. Solususpension lämpötilan (25 °C vs. 4 °C) on havaittu vaikuttavan nestetyessä säilytettyjen PBMC-solujen saantoprosenttiin (84 % vs. 54 %), kun käytetään huoneenlämpöistä pakastusliuosta (Kreher C.R. ym. 2003). Samankaltaista tutkimusta ei ole vielä tehty käyttämällä jäähdytettyä pakastusliuosta.

3.2.3 Solunäytteen jäätymisnopeus

Solunäytteiden pakastamisessa pyritään saavuttamaan alhainen lämpötila aiheuttamatta soluille lisävaurioita, mitkä aiheutuvat usein joko liian nopeasta tai liian hitaasta jäätymisestä. Liian nopeassa jäätymisessä jäätä muodostuu solun sisäpuolelle ja liian hitaassa jäätymisessä jäätä muodostuu solun ulkopuolelle (Mallone R. ym. 2010). Soluja pakastettaessa lämpötilaa tulee laskea asteittain soluvaurioiden välttämiseksi (Mazur P. 1963). Tyypillinen jäätymisnopeus on 1 °C minuutissa kryoproteiini käsittelyn (mm. DMSO) jälkeen (Mazur P. 1963). Asteittaisessa pakastamisessa hyödynnetään 2-propanolia eli isopropanolia (Mallone R. ym. 2010). Soluputket pakastetaan ensin isopropanoliastiassa syväjäähäarkussa (-70 °C – -80 °C) ja 24–72 tunnin kuluttua soluputket siirretään nestetyppisäiliöön (-196 °C). Vielä ei ole tutkittu missä lämpötilassa isopropanolia sisältävä astia tulisi säilyttää (4 °C vs. huoneenlämpötila) ennen pakastettavien soluputkien asettamista siihen (Mallone R. ym. 2010).

3.2.4 Säilytyslämpötila

Useissa tutkimuksissa on vertailtu säilytyslämpötilan vaikutusta solujen ominaisuuksiin, toimintoihin ja elävyyteen (Shreffler W.G. ym. 2006, Verschoor C.P. ym. 2017). Syväjäälämpötilassa (-80 °C) säilytetyissä soluissa on havaittu eroja sytokiinien tuotannossa tuoreisiin soluihin verrattuna (Shreffler W.G. ym. 2006). Syväjäälämpötilassa säilytetyt solut tuottivat huomattavasti enemmän TNF- α sytokiinia kuin tuoreet solut. Säilyttämisen havaittiin myös vähentävän IL-10 sytokiinin tuotantoa PHA- ja LPS-stimuloituissa soluissa (Shreffler W.G. ym. 2006).

Säilytyslämpötila ei vaikuta pakastettujen solujen elävyyteen niin merkittävästi kuin säilytysaika. Solujen säilyttäminen kolmen päivän ajan kuivajäähässä (-78 °C) tai nestetyypessä (-196 °C) säilytti solujen elävyyden yhtä suurena (>95 %) (Disis M.L. ym. 2005). Sitä vastoin pitkäaikainen (4 vuotta) säilyttäminen nestetyypessä vähensi merkittävästi valkosolujen (CD45+) (58 % vs. 96 %) ja monosyyttien (CD14+) elävyyttä (68 % vs. 98 %) tuoreisiin soluihin verrattuna (Verschoor C.P. ym. 2017). Nestetyypessä säilyttämisen on myös havaittu laskevan (CD4+, CD8+) T-solujen solukalvon CD62-ligandin (CD62L) ja CCR5-kemokiinireseptorin ilmentymistä (Constantini A. ym. 2003). Sitä vastoin nestetyypessä säilyttämisen ei ole havaittu vaikuttavan T-solujen IFN- γ , IL-2, IL-4 ja IL-5 sytokiinien

tuotantoon tai solukalvon CD95-, CD28-, CD38-reseptorien ja HLA-DR-molekyylin (*human leukocyte antigen – antigen D related*) ilmentymiseen (Constantini A. ym. 2003, Kreher C.R. ym. 2003). PBMC-solujen pitkäaikaiset säilytykset on kuitenkin suositeltu tehtäväksi nestetyessä, koska syväjäälämpötilassa säilytettyjen solujen elävyys ja saantoprosentti heikkenevät merkittävästi yli viikon säilytyksen jälkeen (Bull M. ym. 2007, Mallone R. ym. 2010,).

3.2.5 Sulatusmenetelmä

Nestetyssä säilytetyt (-196 °C) solut sulatetaan yleensä nopeasti +37 °C:ssa vesihauteessa, kämmissä, jääkaapissa tai jäähauteessa (Mallone R. ym. 2010). On osoitettu, että sulatuslämpötilan vaikuttaa pakastettujen solujen elävyyteen (Disis M.L. ym. 2005). Kun sulatuslämpötilan laski +37 °C:sta +4 °C:een, solujen elävyys laski vastaavasti >95 %:sta <70 %:iin (Disis M.L. ym. 2005).

Vaikka pakastusliuoksen DMSO suojaa soluja pakastamisesta aiheutuilta vammoilta, se on eläville soluille haitallinen aine (Mallone R. ym. 2010). Siksi sulatusprosessin pitää olla nopea ja DMSO:ta sisältävä pakastusliuos pitää laimentaa ja pestä pois. Pakastusliuoksen tavanomainen DMSO-pitoisuus (10-15 %) ei vaikuta pakastettujen solujen elävyyteen, mutta korkeampi pitoisuus alentaa pakastettujen solujen elävyyttä (Nazarpour R. ym. 2012). Myös pesukertojen määrä vaikuttaa solujen elävyyteen (Ramachandran H. ym. 2012). Kaksi pesukertaa lisää merkittävästi solujen elävyyttä yhteen pesukertaan verrattuna (>95 % vs. 85-95 %). Tämän lisäksi myös solujen sulatuksen ja pesun välisen ajan kasvattaminen laskee solujen elävyyttä. Sulatuksen jälkeen välittömästi pestyjen solujen elävyys oli 96,6 %, mutta ajan kasvattaminen laski jonkin verran solujen elävyyttä (30 min. 94,2%; 60 min. 93,0%) (Ramachandran H. ym. 2012).

Pakastettujen solujen sulatuksen jälkeen havaitaan usein solurykelmiä. Solurykelmät ovat eläviä soluja kiinnittyneenä hajonneen solun vapautuneeseen DNA:han. Solunäytteeseen muodostuneet solurykelmät johtavat elävien solujen menetykseen (Mallone R. ym. 2010). On tutkittu, että DNase-käsittelyn (deoksiribonukleasi) sisällyttäminen sulatusmenetelmään estäisi solurykelmien muodostumisen (Garcia-Pineros A.J. ym. 2006). Solunäytteen DNase-

käsittely ei aiheuta muutoksia solujen elävyyteen, solukalvoreseptorien ilmentymiseen tai sytokiinien tuotantoon (Garcia-Pineres A.J. ym. 2006).

II KOKEELLINEN OSUUS

4 TUTKIMUKSEN TAUSTAA JA TAVOITTEET

PBMC-solut (*peripheral blood mononuclear cells*) ovat vapaasti verenkierrrossa liikkuvia lymfosyyttejä, monosyyttejä ja dendriittisoluja, joilla on liuskoittumaton tuma. PBMC-solut ovat tärkeitä immuunipuolustuksen soluja, jotka ovat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa tuottamiensa sytokiinien ja solukalvoreseptorien välityksellä. Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin PBMC-soluista B-soluja, monosyyttejä ja dendriittisoluja sekä näistä soluista niitä soluja, jotka ilmensivät solukalvollaan CD80- ja ILT4-reseptoreja. CD80-reseptorit (*cluster of differentiation 80*) ovat immunogeenisiä reseptoreja, jotka tunnistavat ja aktivoivat T-soluja niiden spesifisten reseptorien (mm. CD28, CD152) välityksellä (Abbas A.K. ym. 2007). Sitä vastoin ILT4-reseptorit (*immunoglobulin-like transcript 4*) ovat tolerogeenisiä reseptoreja, jotka estävät soluissa kostimulatoristen molekyylien (mm. antigeenejä esittelevien solujen erittämät molekyylit) ilmentymistä ja ohjelmoivat ne tolerogeeniseen tilaan (Abbas A.K. ym. 2007, Manicassamy S. ja Pulendran B. 2011).

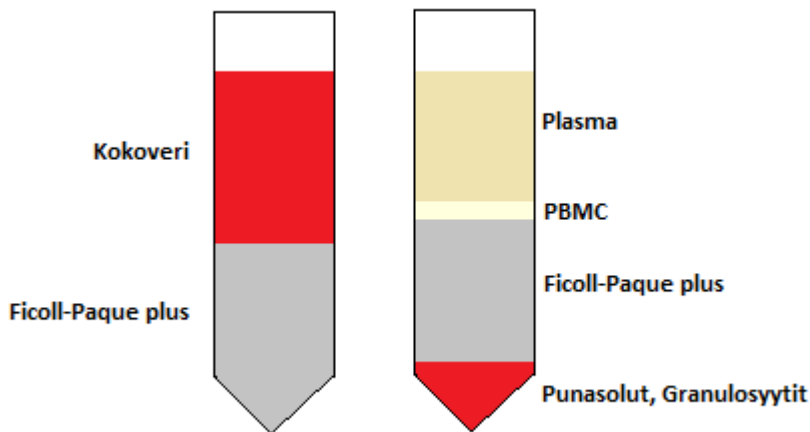
Pakastamisen ja nestetyössä säilyttämisen vaikutuksista solujen ominaisuuksiin ja toimintoihin ei ole vielä paljon tutkittu, pakastamisen on kuitenkin todettu vaikuttavan solujen elävyyteen (Mallone R. ym. 2010). Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää pakastamisen ja nestetyössä säilyttämisen vaikutuksia laskimoverestä eristettyjen PBMC-solujen rakenteellisiin ja toiminnallisiin ominaisuuksiin eri antigeenistimulaatioissa. Lisäksi haluttiin selvittää, millaisia vaikutuksia eri altistepitoisuuksilla (LPS) oli PBMC-soluihin.

5 MENETELMÄT

5.1 PBMC-solujen eristäminen

Verinäytteet otettiin tutkimuksessa mukana olleilta tutkimushenkilöiltä (N=6). Tutkimushenkilöt olivat terveitä aikuisia, joista viisi oli miehiä. EDTA-putkiin (10 ml, Vacutainer, BD, Plymouth, UK) otetut verinäytteet asetettiin hetkeksi tasosekoittajalle, minkä jälkeen verinäytteet laimennettiin (1:1) pesumediumilla (Liite 1. Liuokset).

EDTA-verestä PBMC-solut eristettiin Ficoll-Paque-sentrifugaatiomenetelmällä (1500 rpm, 30 min, 23–24 °C, ilman jarrutusta) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Ruotsi). PBMC-solukerros (Kuva 5.) eroteltiin pipetoimalla puhtaaseen putkeen ja pestiin sekä pesumediumilla että RPMI-mediumilla (1400 rpm, 10 min, 23–24 °C). Lopuksi PBMC-solut resuspensoitiin ja laimennettiin FBS-viljelymediumilla (Liite 1. Liuokset) tarvittavaan pitoisuuteen (20 milj. solua/ml). Laimennetut solususpensiot jaettiin kahteen osaan. Toinen osa pakastettiin (ks. Kpl 5.2) ja toinen osa stimuloitiin tuoreeltaan (ks. Kpl 5.3).



Kuva 5. PBMC-solukerros eristysputkessa.

5.2 Solujen pakastaminen ja sulattaminen

Jäähdytetyn solususpension päälle pipetoitiin jäähdytettyä pakastusliuosta (Liite 1. Liuokset). Sen jälkeen soluputket siirrettiin 2-propanolia sisältävään astiaan. Astiaan säilytettiin ensin -80 °C:ssa noin 24 tuntia, minkä jälkeen pakastusputket siirrettiin nestetyyppisäiliöön (-196 °C) kahdeksi viikoksi.

Pakastetut solususpensiot sulatettiin ja niihin lisättiin FBS-viljelymediumia (Liite 1. Liuokset). Sen jälkeen solususpensiot pestiin pesumediumilla (1300 rpm, 10 min, 23–24 °C) (Liite 1. Liuokset). Lopuksi solupelletit suspensoitiin ja laimennettiin human AB-viljelymediumilla (Liite 1. Liuokset) tarvittavaan pitoisuuteen (1×10^6 solua/ml).

5.3 PBMC-solujen stimulointi

Toiminnallisten ominaisuuksien mittausta varten tuoreet ja pakastetut solususpensiot stimuloitiin joko PMAIO:lla (5 ng/ml PMA, 1 µg/ml IO), POLY(I:C):llä (50 µg/ml) tai kolmella eri LPS-pitoisuudella (0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml) 19 tuntia inkubaattorissa (+37 °C, 5 % CO₂-pitoisuus). Stimuloitujen solususpensioiden mediumia kerättiin talteen myöhempää sytokiinianalyysiä varten (sytokiinitulokset eivät ole mukana tässä pro gradu-tutkimuksessa). Stimuloidut solususpensiot pestiin FACS-puskuriliuoksella (Liite 1. Liuokset) (1300 rpm, 5 min, +4 °C), minkä jälkeen solut suspensoitiin human ab FACS-puskuriin (Liite 1. Liuokset).

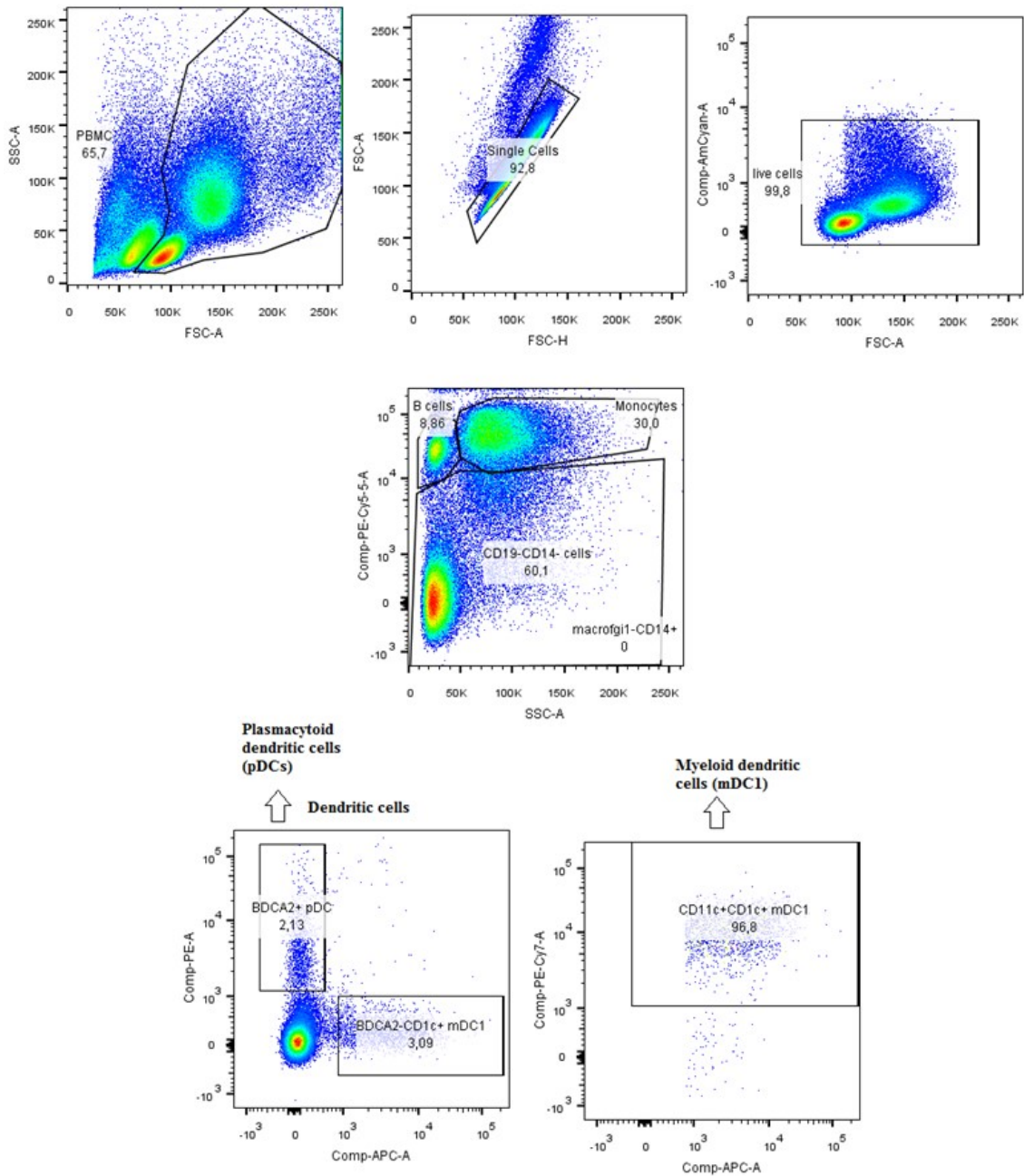
5.4 PBMC-solujen immunofenotyyppitys ja FACSCanto-virtaussytometri

PBMC-solujen immunofenotyyppitystä varten solususpensiot värjättiin antibodycoctailleilla, jotka valmistettiin fluorokromeilla leimatuista vasta-aineista (Liite 2. Merkkiaineet ja niistä valmistetut antibodycoctailit). Solususpensiot inkuboitiin pimeässä (20 min, +4 °C) ja pestiin FACS-puskuriliuoksella (Liite 1. Liuokset) (1400 rpm, 5 min, +4 °C). Lopuksi solut suspensoitiin FACS-puskuriliuoksella ja siirrettiin pimeään (+4 °C) odottamaan analysointia.

Immunofenotyyppitys tehtiin BD FACSCanto II-virtaussytometrillä (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) ja FACSDiva-ohjelmistolla v. 8.0.1 (BD Biosciences) Itä-Suomen

yliopistolla. Solususpensionäytteistä ajettiin keskimäärin 50 000–100 000 solua. Virtaussytometrin tuloksia analysoitiin edelleen FlowJo 10.2 ohjelmistolla (Treestar, Ashland, OR, USA) Windows 10 –työasemalla.

Immunofenotyyppitetyistä PBMC-soluista tunnistettiin B-solut, monosyytit ja dendriittisolut (mDC, pDC) (Kuva 6.). Solujen suhteelliset osuudet laskettiin vertaamalla tunnistettujen solujen lukumääriä PBMC-solujen kokonaismäärään. Lisäksi PBMC-soluista tunnistettiin ne solut, jotka ilmensivät solukalvolla CD80- ja ILT4-reseptoreja. CD80- ja ILT4-reseptoreja ilmentävien solujen suhteelliset osuudet laskettiin vertaamalla reseptorille positiivisten solujen määrää kyseisten solujen kokonaismäärään. Solujen tunnistamisessa käytettiin apuna FMO (*fluorescence minus one*) kontrolliputkia. Kuolleet solut rajattiin pois käyttämällä Fixable Viability Dye (eBioscience) –väriä.



Kuva 6. Solunäytteiden immunofenotyyppien tunnistaminen.

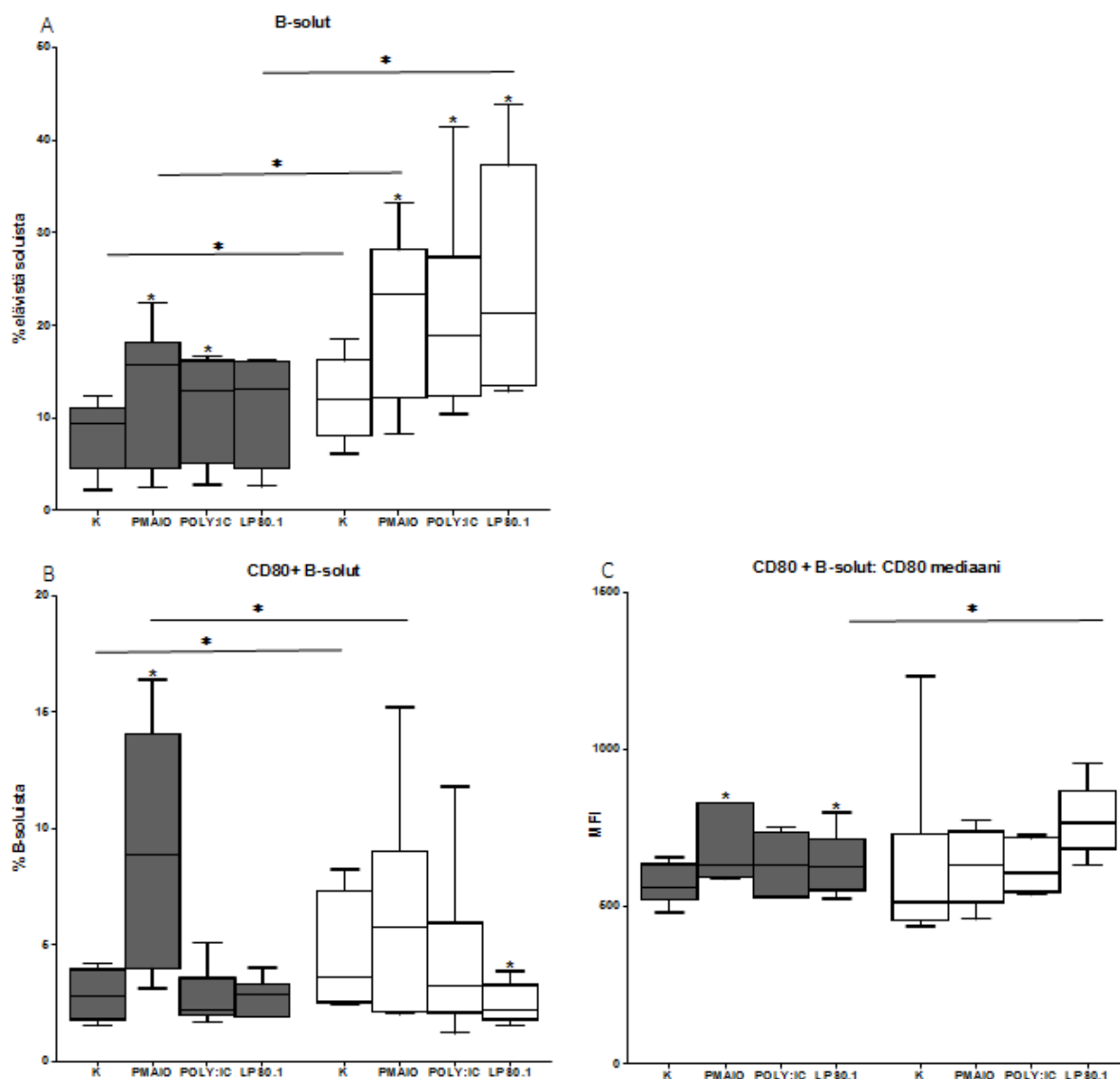
5.5 Tilastolliset analyysit

Tilastolliset analyysit tehtiin GraphPad Prism v. 5.03 ohjelmistolla (GraphPad Software, Inc.) Windows 7 –työasemalla. Tilastollisesti merkitseviksi katsottiin tulokset, joiden p-arvo oli <0.05 . Tulosten tilastollisen merkitsevyyden analysointiin käytettiin Wilcoxon matched-pairs signed rank testiä.

6 TULOKSET

6.1 Pakastamisen vaikutukset B-solujen ominaisuuksiin

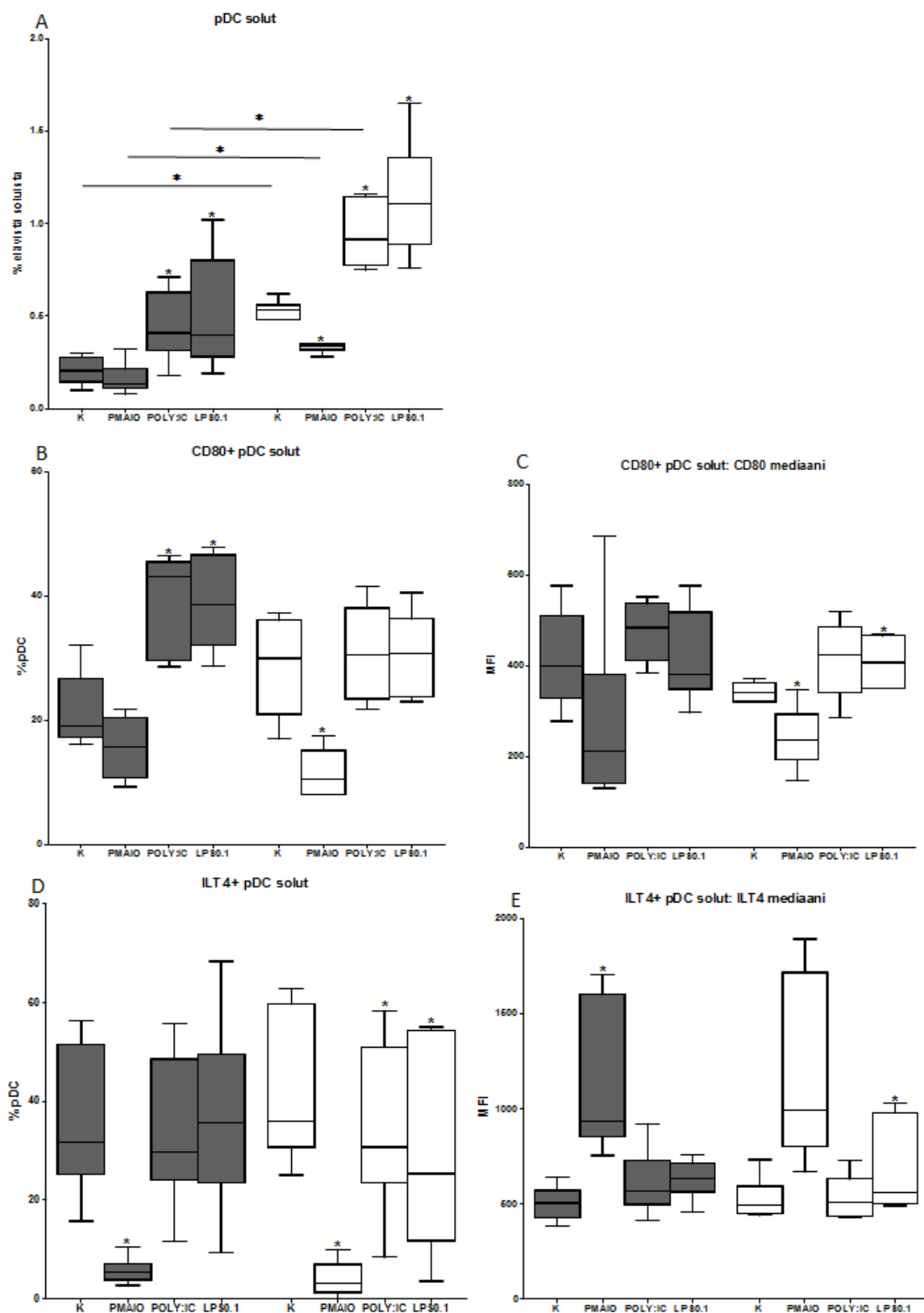
Pakastetuissa soluissa stimuloimattomien B-solujen ja CD80-reseptoria ilmentävien B-solujen suhteellinen osuus oli korkeampi kuin tuoreissa soluissa (Kuva 7A-B). PMAIO stimuloi tuoreita B-soluja voimakkaimmin (Kuva 7A-C). Tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteprofiilit olivat pääosin samankaltaiset (Kuva 7A-C). Pakastaminen kuitenkin lisäsi LPS-stimulaatiossa B-solujen suhteellista osuutta ja CD80-reseptorien ilmentymistä CD80+ B-soluissa sekä heikensi CD80-reseptoria ilmentävien B-solujen suhteellista osuutta (Kuva 7A-C). Pakastaminen myös lisäsi B-solujen suhteellista osuutta ja heikensi CD80-reseptoria ilmentävien B-solujen suhteellista osuutta PMAIO-stimulaatiossa.



Kuva 7. Pakastamisen vaikutus B-solujen ominaisuuksiin. (A) B-solujen %-osuus elävistä soluista, (B) CD80-reseptoria ilmentävien B-solujen %-osuus B-soluista ja (C) CD80-reseptorin ilmentyminen CD80+ B-soluissa. Kuvissa harmaat palkit ovat tuoreita ja valkoiset pakastettuja soluja. Palkeissa suurimman ja pienimmän arvon sekä mediaanin poikkiviivat. Tähtimerkki ilmoittaa tilastollisesti merkittävää ($p < 0.05$) tulosta kontrolliin (*) tai tuoreisiin soluihin (-*-) verrattuna.

6.2 Pakastamisen vaikutukset plasmasytoidisten dendriittisolujen (pDC) ominaisuuksiin

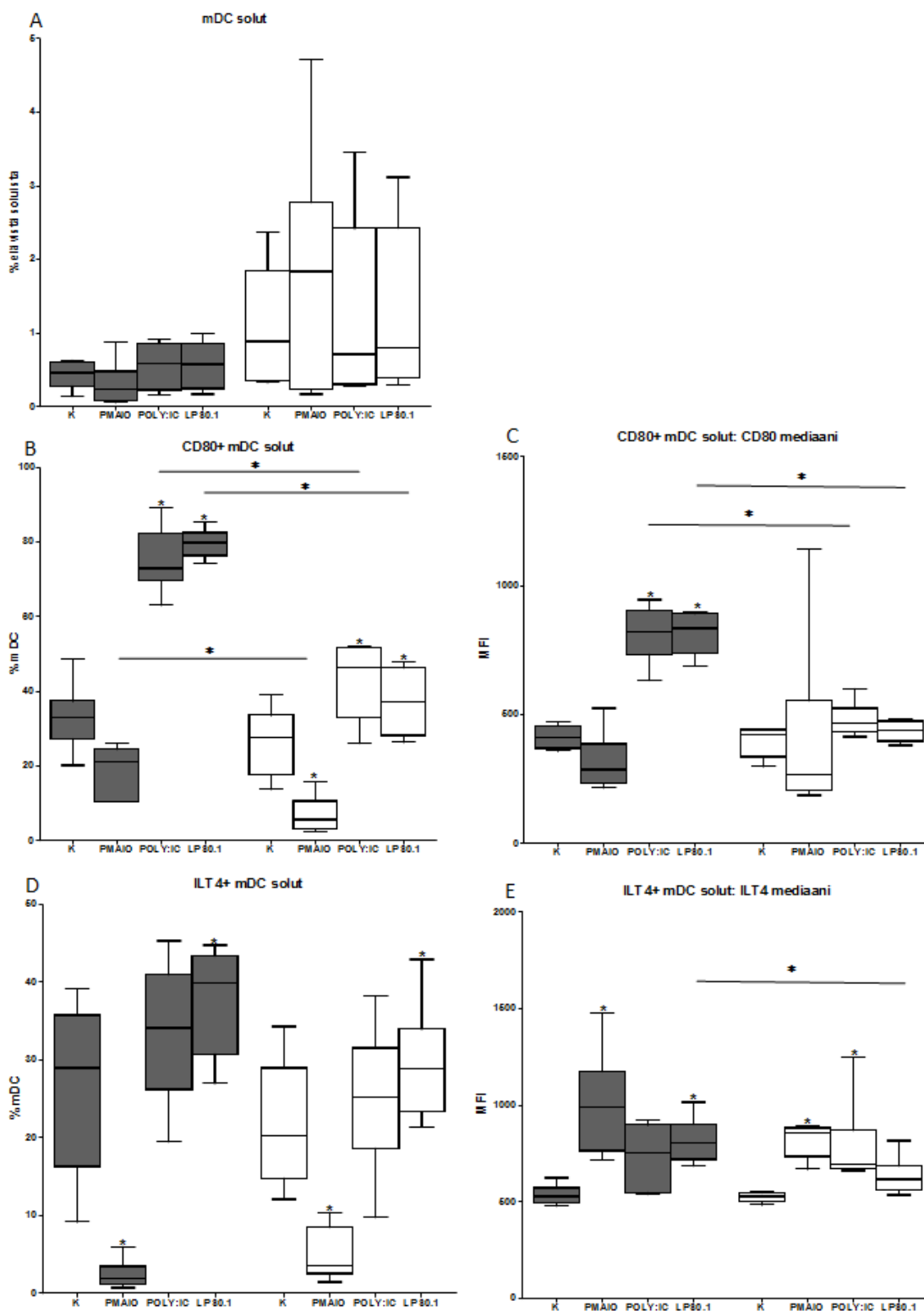
Pakastaminen nosti stimuloimattomien pDC-solujen suhteellista osuutta (Kuva 8A). Tuoreiden POLY(I:C) ja LPS stimuloitujen pDC-solujen ja CD80-reseptoria ilmentävien pDC-solujen suhteellinen osuus oli korkeampi kuin stimuloimattomilla soluilla (Kuva 8A-B). Tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteprofiilit olivat pääosin samankaltaiset, mutta joitakin eroja nähtiin erityisesti POLY(I:C)- ja LPS-stimulaatioissa (Kuva 8A-E). POLY(I:C)- ja LPS-stimulaatiossa pakastettujen pDC-solujen suhteellinen osuus oli korkeampi kuin tuoreissa soluissa (Kuva 8A). Pakastamisen nähtiin myös lisäävän CD80-reseptorien ilmentymistä CD80+ pDC-soluissa ja ILT4-reseptorien ilmentymistä ILT4+ pDC-soluissa LPS-stimulaatiossa (Kuva 8C ja Kuva 8E). Sitä vastoin pakastaminen heikensi CD80-reseptoria ja ILT4-reseptoria ilmentävien pDC-solujen suhteellista osuutta sekä POLY(I:C)- että LPS-stimulaatiossa (Kuva 8B ja Kuva 8D).



Kuva 8. Pakastamisen vaikutus pDC ominaisuuksiin. (A) pDC %-osuus elävistä soluista, (B) CD80-reseptoria ilmentävien pDC %-osuus pDC:sta (C) CD80-reseptorien ilmentyminen CD80+ pDC:ssa, (D) ILT4-reseptoria ilmentävien pDC %-osuus pDC:sta ja (E) ILT4-reseptorien ilmentyminen ILT4+ pDC:sta. Kuvissa harmaat palkit ovat tuoreita ja valkoiset pakastettuja soluja. Palkeissa suurimman ja pienimmän arvon sekä mediaanin poikkiviivat. Tähtimerkki ilmoittaa tilastollisesti merkittävää ($p < 0.05$) tulosta kontrolliin (*) tai tuoreisiin soluihin (-*-) verrattuna.

6.3 Pakastamisen vaikutukset myeloidisten dendriittisolujen (mDC) ominaisuuksiin

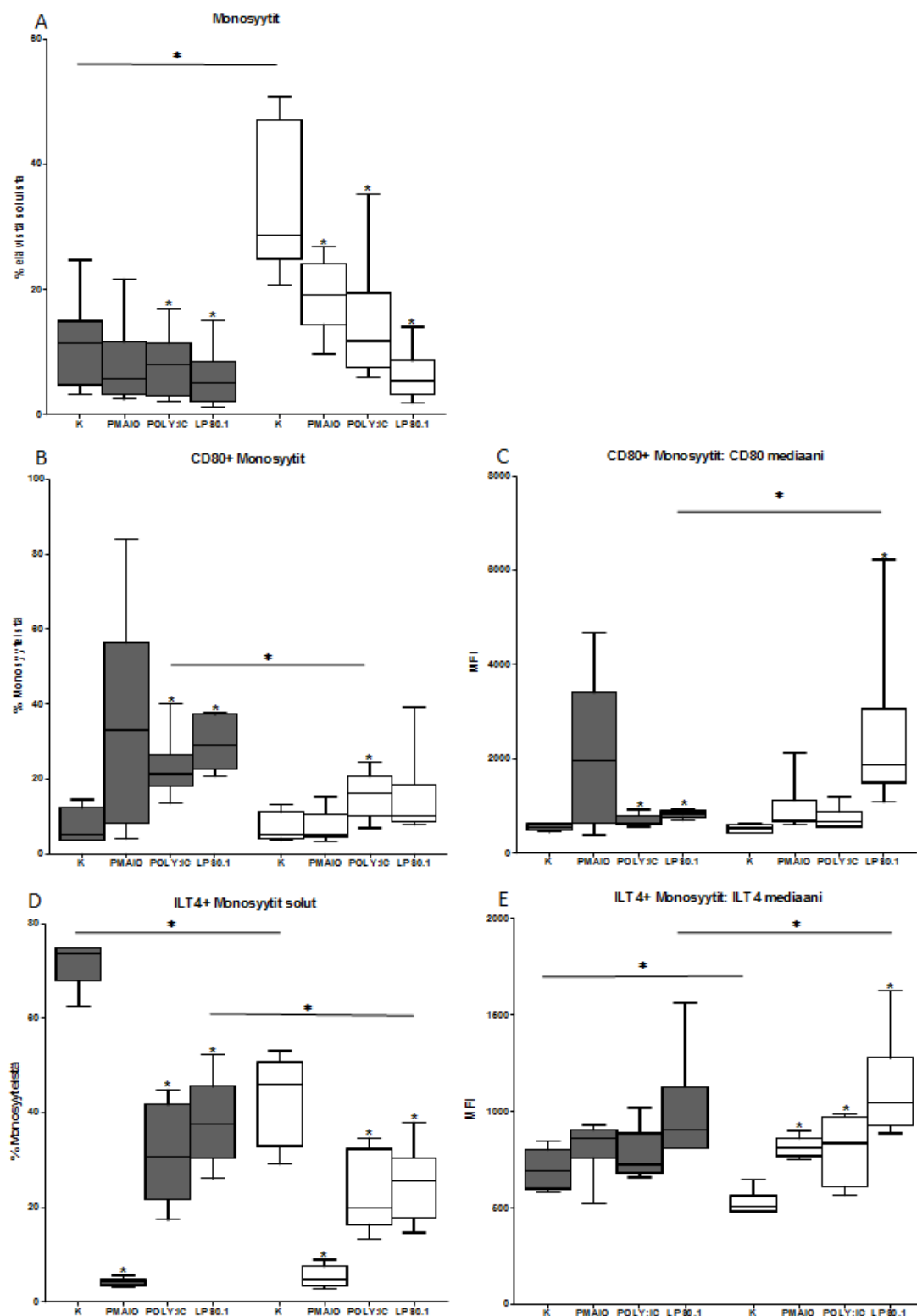
Pakastamisen ei nähty muuttavan stimuloimattomien mDC-solujen suhteellisia osuuksia (Kuva 9A-E). Tuoreissa soluissa POLY(I:C) ja LPS stimuloivat CD80-reseptoria ilmentäviä mDC-soluja voimakkaimmin (Kuva 9B-C). Tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteprofiilit olivat pääosin samankaltaiset. Pakastaminen kuitenkin heikensi POLY(I:C) ja LPS-stimulaatiossa CD80-reseptoria ilmentävien mDC-solujen suhteellista osuutta ja CD80-reseptorien ilmentymistä CD80+ mDC-soluissa (Kuva 9B-C). Pakastaminen myös heikensi ILT4-reseptorien ilmentymistä ILT4+ mDC-soluissa LPS-stimulaatiossa (Kuva 9E).



Kuva 9. Pakastamisen vaikutus mDC ominaisuuksiin. (A) mDC %-osuus elävistä soluista, (B) CD80-reseptoria ilmentävien mDC %-osuus mDC:sta, (C) CD80-reseptorien ilmentyminen CD80+ mDC:ssa, (D) ILT4-reseptoria ilmentävien mDC %-osuus mDC:sta ja (E) ILT4-reseptorien ilmentyminen ILT4+ mDC:sta. Kuvissa harmaat palkit ovat tuoreita ja valkoiset pakastettuja soluja. Palkeissa suurimman ja pienimmän arvon sekä mediaanin poikkiviivat. Tähtimerkki ilmoittaa tilastollisesti merkittävää ($p < 0.05$) tulosta kontrolliin (*) tai tuoreisiin soluihin (-*-) verrattuna.

6.4 Pakastamisen vaikutukset monosyyttien ominaisuuksiin

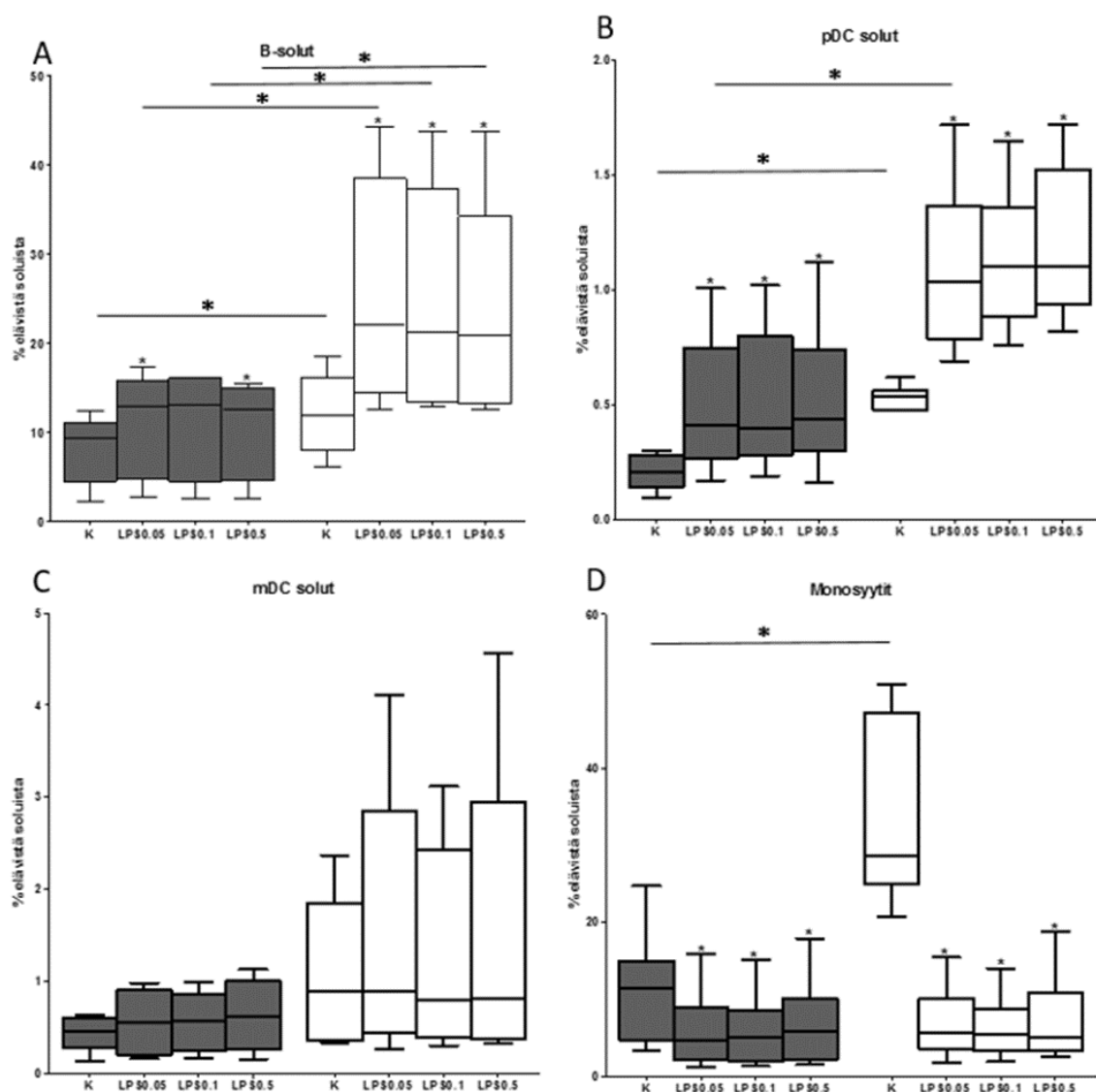
Pakastaminen nosti stimuloimattomien monosyyttien suhteellista osuutta, mutta laski ILT4-reseptoria ilmentävien monosyyttien suhteellista osuutta ja ILT4-reseptorien ilmentymistä ILT4+ monosyyteissä (Kuva 10A ja Kuva 10D-E). Tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteprofiilit olivat pääosin samankaltaiset (Kuva 10A-E). Pakastaminen kuitenkin heikensi LPS-stimulaatiossa CD80-reseptoria ja ILT4-reseptoria ilmentävien monosyyttien suhteellista osuutta sekä lisäsi CD80-reseptorien ilmentymistä CD80+ monosyyteissä että ILT4-reseptorien ilmentymistä ILT4+ monosyyteissä (Kuva 10B-E). Pakastaminen myös heikensi CD80-reseptoria ilmentävien monosyyttien suhteellista osuutta POLY(I:C)-stimulaatiossa (Kuva 10B).



Kuva 10. Pakastamisen vaikutus monosyyttien ominaisuuksiin. (A) monosyyttien %-osuus elävistä soluista, (B) CD80-reseptoria ilmentävien monosyyttien %-osuus monosyyteistä, (C) CD80-reseptorin ilmentyminen CD80+ monosyyteissä, (D) ILT4-reseptoria ilmentävien monosyyttien %-osuus monosyyteistä ja (E) ILT4-reseptorien ilmentyminen ILT4+ monosyyteistä. Kuvissa harmaat palkit ovat tuoreita ja valkoiset pakastettuja soluja. Palkeissa suurimman ja pienimmän arvon sekä mediaanin poikkiviivat. Tähtimerkki ilmoittaa tilastollisesti merkittävää ($p < 0.05$) tulosta kontrolliin (*) tai tuoreisiin soluihin (-*-) verrattuna.

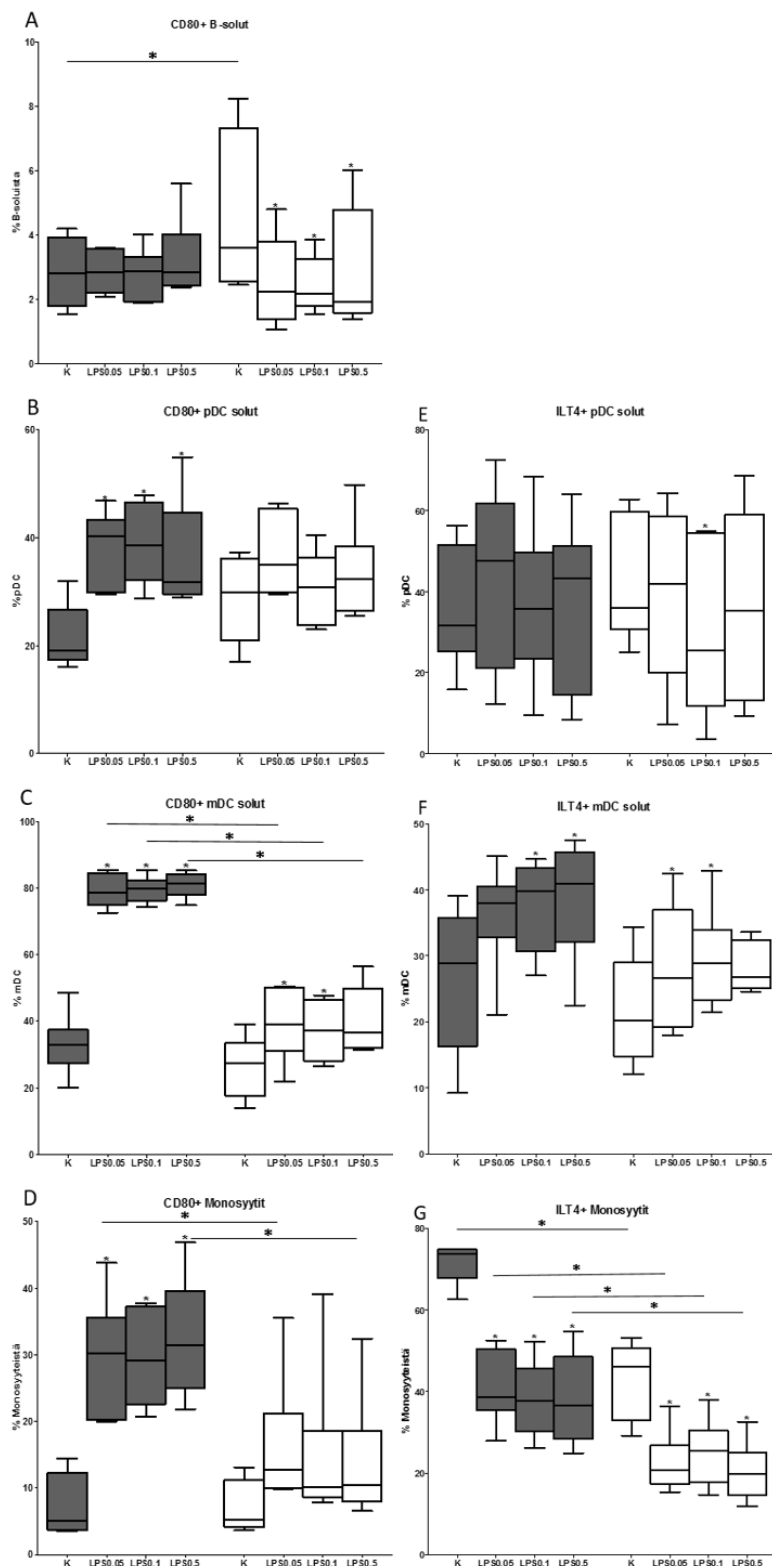
6.5 Altistepitoisuuden (LPS) vaikutukset PBMC-solujen ominaisuuksiin

Altistepitoisuuden (LPS) ei havaittu vaikuttavan tuoreiden PBMC-solujen suhteellisiin osuuksiin (Kuva 11A-D). Tuoreet PBMC-solut reagoivat samankaltaisesti käytetystä altistepitoisuudesta (LPS) riippumatta. Pakastamisen ei myöskään nähty vaikuttavan solujen suhteellisiin osuuksiin LPS-stimulaatioissa. Tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteprofiilit olivat pääosin samankaltaiset (Kuva 11A-D).



Kuva 11. Altistepitoisuuden (LPS 0.05, 0.1 ja 0.5 $\mu\text{g/ml}$) vaikutus PBMC-solujen elinkykyyn, missä (A) B-solut, (B) pDC-solut, (C) mDC-solut ja (D) monosyytit. Kuvissa harmaat palkit ovat tuoreita ja valkoiset pakastettuja soluja. Palkeissa suurimman ja pienimmän arvon sekä mediaanin poikkiviivat. Tähtimerkki ilmoittaa tilastollisesti merkittävää ($p < 0.05$) tulosta kontrolliin (*) tai tuoreisiin soluihin (-*) verrattuna.

Tuoreissa soluissa altistepitoisuuden (LPS) ei nähty aiheuttavan muutoksia stimuloitujen CD80-reseptoria ja ILT4-reseptoria ilmentävien PBMC-solujen suhteellisiin osuuksiin (Kuva 12A-G). Tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteprofiilit olivat pääosin samankaltaiset, mutta joitakin pieniä eroja nähtiin pakastetuissa soluissa (Kuva 12A-G). Pakastaminen heikensi LPS-stimulaatiossa CD80-reseptoria ja ILT4-reseptoria ilmentävien PBMC-solujen suhteellista osuutta (Kuva 12A-G).



Kuva 12. Altistepitoisuuden (LPS 0.05, 0.1 ja 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vaikutus CD80- ja ILT4-reseptoria ilmentävien PBMC-solujen suhteellisiin osuuksiin, missä (A)-(D) CD80-reseptoria ilmentävien ja (E)-(G) ILT4-reseptoria ilmentävien PBMC-solujen %-osuus. Kuvissa harmaat palkit ovat tuoreita ja valkoiset pakastettuja soluja. Palkeissa suurimman ja pienimmän arvon sekä mediaanin poikkiviivat. Tähtimerkki ilmoittaa tilastollisesti merkittävää ($p < 0.05$) tulosta kontrolliin (*) tai tuoreisiin soluihin (-*-) verrattuna.

7 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että käsittelyyn ja pakastamiseen liittyvät tekijät (mm. käsittelyaika ja säilytyslämpötila) voivat vaikuttaa merkittävästi solujen elävyyteen ja muihin toimintoihin. Sen sijaan pakastamisen vaikutusta sellaisenaan solujen ominaisuuksiin ja toimintoihin tuoreisiin soluihin verrattuna ei ole vielä paljon tutkittu. Elävien solujen pitkäaikaiset säilytykset on suositeltu tehtäväksi nestetyössä (-196 °C), koska syväjäälämpötilassa (-80 °C) kaikkien immuunijärjestelmän solujen entsyymaattiset ja kemialliset toiminnot eivät hidastu tai lopu (Mallone R. ym. 2010). Soluja pakastettaessa solujen entsyymaattiset ja kemialliset toiminnot voivat vahingoittaa soluja, ja näin heikentää sulatettujen solujen elävyyttä, saantoprosenttia ja sytokiinien tuotantoa (Bull M. ym. 2007, Shreffler W.G. ym. 2006).

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että solujen pakastaminen tai nestetyössä säilyttäminen vaikuttivat jossain määrin tutkittujen PBMC-solujen ja solukalvoreseptoreja (CD80+, ILT4+) ilmentävien solujen suhteellisiin osuuksiin. Antigeenistimulaatioissa pakastettujen solujen vasteprofiilit vastasivat pääsääntöisesti tuoreiden solujen vasteprofiileja, mutta vasteiden voimakkuudessa oli jonkin verran eroja. Erityisesti CD80-reseptorin ilmentymisessä nähtiin eroja pakastettujen ja tuoreiden solujen välillä. Etenkin LPS-stimulaatioissa pakastaminen tai nestetyössä säilyttäminen joko lisäsi tai vähensi pakastettujen solujen vasteiden voimakkuutta tuoreiden solujen vasteisiin verrattuna. Sitä vastoin LPS-pitoisuudella ei ollut vaikutusta solujen elävyyteen tai rakenteellisiin ja toiminnallisiin ominaisuuksiin.

PBMC-solut ovat vuorovaikutuksessa keskenään ja toisiin soluihin solukalvoreseptorien ja sytokiinien välityksellä. Jos pakastaminen tai nestetyössä säilyttäminen vaikuttavat muiden kuin tutkittujen solujen elävyyteen, ominaisuuksiin ja toimintoihin, ne saattavat myös vaikuttaa solujen väliseen vuorovaikutukseen. Lisäksi kaikki valkosolutyypit eivät välttämättä kestä pakastamista tai nestetyössä säilyttämistä yhtä hyvin. Tämä voi muuttaa myös niiden solujen suhteellista osuutta, joihin pakastaminen ei itsestään vaikuta. Nämä tekijät selittäisivät tässä tutkimuksessa havaitut poikkeamat tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteprofiileissa. Mainittuja tekijöitä tarkastellaan tarkemmin seuraavissa kappaleissa.

Tässä tutkimuksessa pakastamisen ja nestetyössä säilyttämisen havaittiin vaikuttavan jossain määrin PBMC-solujen ja solukalvoreseptoreja (CD80+, ILT4+) ilmentävien solujen

suhteellisiin osuuksiin. Nestetydessä säilyttämisen on havaittu vaikuttavan T-solujen solukalvoreseptorien (CD62L, CCR5) ilmentymisen, mutta ei niinkään sytokiinien (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5) tuotantoon (Constantini A. ym. 2003, Kreher C.R. ym. 2003). Antigeenejä esittelevät solut (mm. dendriittisolut, makrofagit, B-solut) ovat vuorovaikutuksessa T-solujen kanssa solukalvoreseptorien ja sytokiinien välityksellä. Jos pakastaminen vähentää niiden T-solujen solukalvoreseptorien ilmentymistä joihin antigeenejä esittelevät solut ovat vuorovaikutuksessa, antigeenejä esittelevien solujen reagoitokyky heikkenee tuoreisiin soluihin verrattuna. Tämä voi muuttaa myös tutkittujen solujen suhteellista osuutta, joihin pakastaminen itsessään ei ole vaikuttanut.

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että LPS ja POLY(I:C) stimuloivat voimakkaimmin tuoreita mDC- ja pDC-soluja, jotka ilmensivät solukalvolla CD80-reseptoria. Pakastaminen ja nestetydessä säilyttäminen kuitenkin vähensivät CD80-reseptoria ilmentävien mDC- ja pDC-solujen suhteellista osuutta sekä LPS- että POLY(I:C)-stimulaatioissa. Dendriittisolut tunnistavat LPS:n TLR-4-reseptorien kautta, mikä nostaa solujen CD80-reseptorien ilmentymistä ja IFN- α sytokiinin tuotantoa (Janeway C.A. ym. 2001). Tutkimuksessa havaittu solujen suhteellisen osuuden lasku tuoreisiin soluihin verrattuna voi johtua myös pakastamisen ja nestetydessä säilyttämisen vaikutuksista itse tutkittuihin soluihin. On siis mahdollista, että TLR-4-reseptoria ilmentävät dendriittisolut eivät kestä muiden solujen tavoin yhtä hyvin pakastamista ja sulatusta tai säilytystä nestetydessä.

Tässä tutkimuksessa havaittiin myös, että tuoreiden antigeenistimuloitujen monosyyttien suhteellinen osuus väheni stimuloimattomiin soluihin verrattuna ja pakastaminen vielä edelleen lisäsi tätä laskua. Osa pakastetuista monosyyteistä on voinut kuolla apoptoottisen tai nekroottisen prosessin kautta, koska pitkäaikaisen nestetydessä säilyttämisen on todettu vähentävän monosyyttien elävyyttä (Verschoor C.P. ym. 2017). Solut ovat voineet myös muuntua toisen tyyppiseksi soluksi (dendriittisolu, makrofagi), koska monosyytit erilaistuvat makrofageiksi ja monosyyteistä on mahdollista viljellä kypsiä dendriittisoluja (Hori S. ym. 2004, Sand O. ym. 2014).

Tehty tutkimus onnistui laaditun tutkimussuunnitelman mukaisesti, mutta ulkopuoliset tekijät saattoivat vaikuttaa tutkimustuloksiin. Jokaisella ihmisellä on yksilöllinen immunitetti. Immunitetti kehittyy koko elämän ajan ja immunitetin kehitykseen vaikuttaa muun muassa

elinympäristö (Karhumäki E ym. 2005, Kääriö H. 2015, Martikainen M.V. ym. 2015). Tutkimuksessa mukana olleen pienen otantajoukon (N=6) vuoksi yksilölliset vaihtelut voivat näkyä tuloksissa.

Virtaussytometrillä pyrittiin analysoimaan näytteissä olleet solut (n. 50 000–100 000 solua). Näytteiden solumääriin kuitenkin saattoi vaikuttaa useampi mahdollinen virhelähde. Solujen stimuloinnin jälkeen kaikkia soluja ei mahdollisesti saatu kerättyä kuoppalevyiltä, vaikka niitä suspensoitiin useamman kerran. Osa soluista oli kiinnittyneenä kuoppalevyyn ja erityisesti pakastettujen solujen havaittiin tarttuneen tiukemmin kiinni kuoppalevyille. Pakastettujen solujen sulatuksen jälkeen solulaskun aikana havaittiin osan soluista kiinnittyneen toisiinsa muodostaen solurykelmiä, mikä mahdollisesti esti niiden luotettavan analysoinnin virtaussytometrillä.

Jatkotutkimuksissa voisi selvittää vastaavatko tuoreiden ja pakastettujen PBMC-solujen vasteet paremmin toisiaan, jos pakastettuja soluja lepuutetaan sulatuksen jälkeen yön yli ennen mittausta. Lepuutuksen merkitys on havaittu aiemmin T-solujen kohdalla (Mallone R. ym. 2010). Tämän lisäksi voisi selvittää saadaanko pakastettujen PBMC-solujen elävyys- ja saantoprosenttia kasvatettua, jos sulatusprosessissa solurykelmien muodostumien estettäisiin DNase-käsittelyllä ja pakastetuissa solunäytteissä tapahtuvaa ohjelmoitua solukuolemaa vähennettäisiin estämällä solujen kaspasiaktivaatio. Lisäksi voisi tarkastella pakastusliuoksen eri lisäaineiden ja pakastusliuoksen sekä solususpension lämpötilan vaikutuksia pakastettujen solujen elävyyteen, saantoprosenttiin, ominaisuuksiin ja toimintoihin. Olisi myös mielenkiintoista tarkastella eri ympäristötekijöille altistumisesta aiheutuvia vaikutuksia verinäytteistä eristettyjen immuunisolujen ominaisuuksiin ja toimintoihin, sekä selvittää näkyvätkö altistumisesta aiheutuneet erot pakastetuissa soluissa samalla tavalla kuin tuoreissa soluissa.

8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän opinnäytetyön tulosten perusteella voidaan todeta, että pakastettuja PBMC-soluja voidaan käyttää ympäristöterveystutkimuksissa. Pakastamisen vaikutus mitattavien vasteiden absoluuttisiin tasoihin tulee kuitenkin huomioida tulosten tulkinnassa ja vertailussa muiden tutkimustuloksiin. Stimulaatiossa käytettävä altistepitoisuus ei näytä vaikuttavan merkittävästi PBMC-solujen elävyyteen ja ominaisuuksiin.

LÄHDELUETTELO

Abbas A.K., Lichtman A.H. ja Pillai S. 2007. Cellular and molecular immunology, s. 3-241. 6Th edition, SAUNDERS ELSEVIER.

Abbas A.K., Lichtman A.H. ja Pillai S. 2015. Cellular and molecular immunology, s. 3-198. 8Th edition, ELSEVIER SAUNDERS.

Allan D.S.J., McMichael J. ja Braud V.M. 2000. The ILT family of leukocyte receptors. *Immunobiology* 202(1): 34-41.

Bull M., Lee D., Stuvky J., Chiu Y., Rubin A., Horton H. Ja McElrath M.J. 2007. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *Journal of Immunological Methods* 322: 57-69.

Chaung H., Chen C., Hsieh B. ja Chung W. 2010. Toll-like receptor expressions in porcine alveolar macrophages and dendritic cells in responding to poly IC stimulations and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33(3): 197-213.

Chowdhury F., Johnson P. ja Williams A.P. 2009. Enumeration and phenotypic assessment of human plasmacytoid and myeloid dendritic cells in whole blood. *Cytometry PARTA Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. 77A: 328-337

Constantini A., Mancini S., Giuliodoro S., Butini L., Regnery C.M., Silvestri G. Ja Montroni M. 2003. Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *Journal of Immunological Methods* 278: 145-155.

Disis M.L., dela Rosa C., Goodell V., Kuan L., Chang J.C.C., Kuus-Reichel K., Clay T.M., Lysterly H.K., Bhatia S., Ghanekar S.A., Maino V.C. ja Maecker H.T. 2006. Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *Journal of Immunological Methods* 308: 13-18.

Frampton M.W., Stewart J.C., Oberdörster G., Morrow P.E., Chalupa D., Pietropaoli A.P., Frasier L.M., Speers D.M., Cox C., Huang L. ja Utell M.J. 2006. Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans. *Environmental Health Perspectives* 114: 51-58.

Garcia-Pineros A.J., Hildesheim A., Williams M., Trivett M., Strobl S. ja Pinto L. 2006. DNase treatment following thawing of Cryopreserved PBMC is o procedure suitable for lymphocyte functional studies. *Journal of Immunological Methods* 313: 209-213.

Gerrits J.H., Athanassopoulos P., Vaessen L.M.B., Klepper M., Weimar W. ja van Besouw N.M. 2006. Peripheral blood manipulation significantly affects the result of dendritic cell monitoring. *Transplant Immunology* 17: 169-177.

Hedman K., Heikkinen T., Huovinen P., Järvinen A., Meri S. ja Vaara M. 2011. Immunologia, mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 2, s. 18-147. 1.painos, DUODECIM.

Hori S., Heike Y., Takei M., Maruyama M., Inoue Y., Lee J., Kim H., Harada Y., Kawai H., Shimosaka A., Kami M., Tanosaki R., Wakasugi H., Saito S., Takaue Y. ja Kakizoe T. 2004. Freezing-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14⁺ monocytes. *J Immunother* 27: 27-35.

Janeway C.A., Travers P., Walport M. ja Shlomchik M. 2001. *Immunobiology the immune system in health and disease*, s. 308-309. 5Th edition, Garland Publishing.

Järvelä M., Hannu T., Engström B., Kauppi P., Lindholm H., Lindholm T., Luukkonen R. ja Tuomi T. 2008. Työperäisen pienhiukkasaltistumisen sydän- ja verisuonivaikutukset. Työterveyslaitos Helsinki 2008.

Karhumäki E., Jonsson A. ja Saros M. 2005. Mikrobit hoitotyön haasteena, s. 40-46. 1.painos, Edita Prima Oy.

Kim H.M., Han S.B., Lee K.H., Lee C.W., Kim C.Y., Lee E.J. ja Huh H. 2000. Immunomodulating activity of a polysaccharide isolated from *Mori Cortex Radicis*. *Arch Pharm Res* 23(3): 240-242.

Kreher C.R., Dittrich M.T., Guerkov R., Boehm B.O. ja Tary-Lehmann M. 2003. CD4⁺ and CD8⁺ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *Journal of immunological methods* 278: 79-93.

Kääriö H. 2015. The allergy and asthma protective effects of farm environment and pet animals – The role of immunomodulation. Publications of the University of Eastern Finland, Dissertations in Forestry and Natural Sciences No 205.

Lovelock J.E. 1953. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* 10: 414-426.

Mallone R., Mannering S.I., Brooks-Worrell B.M., Durinovic-Belló I., Cilio C.M., Wong F.S. ja Schoot N.C. 2010. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clinical & Experimental Immunology* 163(1): 33-49.

Manicassamy S. ja Pulendran B. 2011. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews* 241(1): 206-227.

Martikainen M.V., Kääriö H., Karvonen A., Schröder P.C., Renz H., Kaulek V., Dalphin J.C., von Mutius E., Schaub B., Pekkanen J., Hirvonen M.R. ja Roponen M. 2015. Farm exposure are associated with lower percentage of circulating myeloid dendritic cell subtype 2 at age 6. *Allergy* 70 (2015) 1278-1287.

Mazur P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 47: 347-69.

Miltenyi Biotec 2017. Blood dendritic cell enumeration kit human. Data sheet Miltenyi Biotec www.sivuilta.

<http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001100/IM0001156.ashx>
(Luettu 15.11.2017).

Nairn R. ja Helbert M. 2002. Immunology for medical students, s. 71-94. 1Th edition, Mosby.

Nazarpour R., Zabihi E., Alijanpour E., Abedian Z., Mehdizadeh H. ja Rahimi F. 2012. Optimization of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cryopreservation. *Int J Mol Cell Med* 1(2): 88-93.

Nienstedt W., Hänninen O., Arstila A. ja Björkqvist S. 2000. Ihmisen fysiologia ja anatomia, s. 173-175. 12-13.painos, WSOY.

Polge C., Smith A.U. ja Parkes A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.

Ramachandran H., Laux J., Moldovan I., Caspell R., Lehmann P.V. ja Subbramanian R.A. 2012. Optimal thawing of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for use in high-throughput human immune monitoring studies. *Cells* 1(3): 313-324.

Ryder M.I., Saghizadeh M., Ding Y., Nguyen N. ja Soskolne A. 2002. Effects of tobacco smoke on the secretion of the secretion of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β from peripheral blood mononuclear cells. *Molecular oral microbiology* 17(6): 331-336.

Sand O., Sjaastad Q.V., Haug E., Bjälle J.G. ja Toverud K.C. 2014. Ihminen, fysiologia ja anatomia, s. 322-325, 334-349. 8-11.painos, Sanoma Pro Oy.

Shreffler W.G., Visness C.M., Burger M., Cruikshank W.W., Lederman H.M., de la Morena M., Grindle K., Calatroni A., Sampson H.A. ja Gern J.E. 2006. Standardization and performance evaluation of mononuclear cell cytokine secretion assays in a multicenter study. *BMC Immunology* 7: 29.

Solunetti 2006a. Leukosyytit eli valkosolut. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/leukosyytit/>
(Luettu 21.1.2017).

Solunetti 2006b. Auttajasolut. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/auttaja-t-solut/2/>
(Luettu 21.1.2017).

Solunetti 2006c. Kaspaasiaktivaatio.
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/apoptoosin_aktivaatio/
(Luettu 10.8.2017).

Solunetti 2006d. Lymfosyytti. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/lymfosyytti/>
(Luettu 10.8.2017).

Solunetti 2006e. B-solut. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/b-solut/2/>
(Luettu 21.1.2017).

Solunetti 2006f. Lymfosyytti. <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/lymfosyytti/3/>
(Luettu 10.8.2017).

Turunen S. 2009. *Biologia ihminen*, s. 32, 130-133. 5.-8.painos, WSOYpro Oy.

Thompson C.B. 1995. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation. *Cell* 81: 979-982.

Vierimaa H. ja Laurila M. 2011. *Keho, anatomia ja fysiologia*, s. 89-95, 254-258. 1.-2.painos, WSOYpro Oy.

Verschoor C.P., Kohli V. ja Balion C. 2017. A comprehensive assessment of immunophenotyping performed in cryopreserved peripheral whole blood. *Cytometry part B Clinical Cytometry*. Julkaistu Wiley Online Library DOI: 10.1002/cyto.b.21526.

Yates D.T., Löest C.A., Ross T.T., Hallford D.M., Carter B.H. ja Limesand S.W. 2011. Effects of bacterial lipopolysaccharide injection on white blood cell counts, hematological parameters and serum glucose, insulin, and cortisol concentrations in ewes fed low- or high-protein diets. *J Anim Sci* 89(12): 4286-4293.

LIITTEET

LIITE 1. LIUOKSET

Pesumedium

(RPMI-1640 + 1 % L-glutamine + 1 % antibiotic/antimycotic)

500 ml RPMI-1640

5 ml L-glutamine

5 ml antibiotic/antimycotic

FBS-viljelymedium

(RPMI-1640 + 1 % glutamine + 10 % FBS Gold + 1 % antibiotic/antimycotic)

5 ml FBS Good

45 ml pesumediumia

Human AB-viljelymedium

(RPMI-1640 + 1 % glutamine + 10 % human AB seerumi + 1 % antibiotic/antimycotic)

4 ml human ab seerumia

36 ml pesumediumia

Pakastusliuos

(15 % DMSO in HI-FCS)

17 ml FBS Good

3 ml DMSO

0.02 % Natriumatsidi-liuos

(0.02 % NaN₃-liuos)

0.01 g natriumatsidia

500 ml DPBS

Human AB FACS-puskuri

(10 % human AB in PBS + 0.02 % natriumatsidi)

1 ml human AB seerumia

9 ml 0.02 % natriumatsidiliuosta

FACS-puskuri

(5 % FBS in PBS + 0.02 % natriumatsidi)

25 ml FBS Good

500 ml 0.02 % natriumatsidiliuosta

LIITE 2. MERKKIAINEET JA NIISTA VALMISTETUT ANTIBODYCOCTAILIT

Taulukko 3. Merkkiaineet ja niistä valmistetut antibodycoctailit (ABC).

Analyysiputket	Merkkiaine								
	ILT4 (CD85d), FITC	BDCA-2 (CD303) PE	CD14 PE-CY5.5	CD19 PE-Cy5.5	CD11c PE-Cy7	CD1c (BDCA.1) APC	CD80-APC-H7	FVD-e-fluor506	Human ab-FACS
ABC 1	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ABC 2		*	*	*	*		*	*	*
ABC 3	*		*	*	*	*	*	*	*
ABC 4		*	*	*		*	*	*	*
ABC 5		*	*	*	*	*		*	*
ABC 6	*	*			*	*		*	*
ABC 7		*	*	*	*	*	*		*
ABC 8									*

*antibodycoctailien sisältämät vasta-aineet

Taulukko 4. Merkkiaineiden tarkoitus ja valmistaja.

Merkkiaine	Tarkoitus	Valmistaja
ILT4 (CD85d), FITC	Tolerogeeniset ominaisuudet	eBioscience (San Diego, CA, USA)
BDCA-2 (CD303) PE	pDC:n merkkiaine	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
CD14 PE-CY5.5	Monosyyttien merkkiaine	Invitrogen (Camarillo, CA, USA)
CD19 PE-Cy5.5	B-solujen merkkiaine	Invitrogen (Camarillo, CA, USA)
CD11c PE-Cy7	mDC1:n merkkiaine	eBioscience (San Diego, CA, USA)
CD1c (BDCA.1) APC	mDC1:n merkkiaine	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
CD80-APC-H7	Immunogeeniset ominaisuudet	BD Biosciences
FVD-e-fluor506	Kuolleisuusväri	AHD