

**MANGANIPARTIKKELEIDEN KÄYTTÖ KONTRASTIAINEENA
MRI-KUVAUKSESSA**

Korpela, Tuukka
Syventävien opintojen tutkielma
Lääketieteen tutkinto-ohjelma
Lääketieteellinen tiedekunta
Oulun yliopisto
Helmikuu 2018
Ohjaaja: Blanco-Sequeiros, Roberto

OULUN YLIOPISTO
Lääketieteellinen tiedekunta
Lääketieteen tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Korpela, Tuukka: Manganipartikkeleiden käyttö kontrastina
MRI-kuvauksessa

Syventävien opintojen tutkielma: 19 sivua

Kantasolujen käyttö sairauksien hoidossa on paljon tutkittu aihe, jolle etsitään koko ajan uusia sovellutuksia. Yksi kehitettävistä sovellutuksista on solujen seuraamisen mahdollistaminen kajoamattomasti kuvantamisella sekä soluterapian antamisen yhteydessä että hoidon seurannan aikana. Magneettikuvaus (MRI) on käyttökelpoinen kuvantamismenetelmä tähän. MRI-kuvaukseen ei liity haitallista ionisoivaa säteilyä ja sillä on myös useita muita etuja toisiin kuvantamismenetelmiin verrattuna, minkä vuoksi sen kehittäminen soluterapian seuraamista varten on hyödyllistä. MRI-kuvausta varten solut voidaan leimata kontrastina niiden havainnoinnin parantamiseksi. Uusia MRI-solukuvauksen kontrastina etsitään koko ajan. Mangaanioksidi on uusi ja yksi lupaavimmista kehitetyistä kontrastina.

Tässä tutkimuksessa pyrittiin saamaan lisätietoa mangaanioksidin toksisuudesta ihmisen kantasolujen leimaamisessa. Tutkimuksessa tutkittiin kahta erilaista mangaanioksidista valmistettua partikkelia. Tavoitteena oli selvittää, miten ihmisen kantasolut selviävät 3 ja 5 viikkoa mangaanioksidilla leimaamisen jälkeen. Saatujen tulosten perusteella solujen elinvoimaisuus ja erilaistumiskyky säilyivät molempien ajanjaksojen ajan.

Tutkimuksessa selvitettiin myös miten eri leima-ainekonsentraatioilla leimatut solut erottuvat MRI-solukuvauksessa eli minkälainen kontrasti leimaamisella saadaan aikaiseksi. Havaittiin, että jo hyvin pienetkin leima-ainekonsentraatiot saavat aikaan merkittävän kontrastin paranemisen.

Avainsanat: kontrastina, mangaanioksidi, MRI, soluleimaus

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	4
1.1 SOLUTERAPIA	4
1.2 MRI-SOLUKUVAUS	4
1.3 KONTRASTIAINEET	5
1.3.1 Rautaoksidit	5
1.3.2 Mangaanioksidi	6
1.4 TUTKIMUKSEN LÄHTÖKOHTA JA TAVOITE.....	6
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	7
2.1 MANGAANIOKSIDIPARTIKKELEIDEN VALMISTUS	7
2.2 TUTKITUT PARTIKKELIT	7
2.2.1 Relaksaatio-ominaisuudet ja kuvan kontrasti.....	7
2.2.2 Solun kestävyys	8
2.3 SOLUJEN HANKKIMINEN, LEIMAUUS JA KASVATUS.....	8
2.4 KESTÄVYYS- JA ERILAISTUMISKOKEET	10
2.5 EROTTUMINEN MRI-KUVAUKSESSA	10
2.6 MRI-KUVAUKSEN SUORITTAMINEN	12
3. TULOKSET	13
3.1 ERILAISTUMINEN JA TOKSISUUS.....	13
3.2 KONTRASTI.....	14
4. POHDINTA.....	17
5. LÄHDELUETTELO.....	19

1. JOHDANTO

1.1 Soluterapia

Soluterapian eri muodot ovat lupaavia menetelmiä useiden eri sairauksien hoidossa. Luontaisen kudoksia korjaavan kykynsä vuoksi erilaistumiskyvyltään multi- ja pluripotenttien kantasolujen käyttö on jo antanut lupaavia tuloksia sairauksien hoidossa (Yan ym. 2007). Geneettisesti muokattujen ja autologisten, eli potilaasta itsestään kerättyjen, kantasolujen käyttö eläin- ja kliinisissä kokeissa on ollut onnistunutta kardiomyopatiassa, diabeteksessa, lupuksessa (SLE), sekä haiman ja maksan sairauksissa. Kantasoluilla on jo suoritettu useita potilaskokeita koronaaritaudin hoitamiseksi (Azene ym. 2014). Kantasolujen käyttöä on tutkittu myös nivelrikon hoidossa (Gupta ym. 2012).

Soluterapiahoitojen toteuttamisessa on eduksi, jos siirrettyjä soluja pystytään seuraamaan kohdekudoksessa. Näin voidaan todentaa siirresolujen sijainti oikeassa hoitokohteessa sekä seurata kohteessa tapahtuvia mahdollisia toiminnallisia ja fysiologisia muutoksia. Magneettikuvaus (MRI) on lupaava menetelmä soluterapian seurantaan ja sen toimivuuden arviointiin. MRI-kuvauksen hyvä pehmytkudoksen erotuskyky, ionisoivan säteilyn puuttuminen ja kajoamattomuus toimenpiteiden yhteydessä ovat merkittäviä etuja muihin menetelmiin nähden.

1.2 MRI-solukuvaus

Jotta magneettikuvausta voidaan käyttää soluterapiassa siirrettyjen solujen seuraamiseen, tulee solut leimata kontrastiaineella. Tavallisesti kontrastiaineet ovat magneettisia tai paramagneettisia nanopartikkeleita. Kontrastiaineet voivat vaikuttaa joko vain pitkittäiseen, vain poikittaiseen tai molemminsuuntaiseen relaksaatioon. T1-painotukseen vaikuttavat kontrastiaineet yleensä lyhentävät veden protonien pitkittämän relaksaation aikaa, tuottaen kuvaan kirkkaan signaalin. T2-painotukseen vaikuttavat kontrastiaineet lyhentävät veden protonien poikittaisen relaksaation aikaa johtaen signaalin madaltumiseen ja näkymiseen tummana kuvassa. T2-painotukseen vaikuttavat kontrastiaineet ovatkin hyviä käytettäessä soluterapiaa elimissä, jotka näkyvät kuvassa kirkkaina, esimerkiksi munuaiset tai imukudokset. (Li ym. 2013)

MRI:n käyttöön kantasolujen seuraamisessa liittyy myös haasteita. Vääriä tuloksia voidaan saada jo kuolleista soluista vapautuneen leiman vuoksi. Lisäksi leima-aine ei jakaudu tasaisesti jakautuvien solujen mukana ja siten jakautuneita ja erilaistuneita soluja ei pystytä enää seuraamaan. (Yan ym. 2007)

1.3 Kontrastiaineet

1.3.1 Rautaoksidit

Perinteisiä ja käytetyimpiä kontrastiaineita solujen MRI-kuvauksessa ovat olleet erilaiset rautaoksidit ja niiden johdannaiset. Niiden käyttöön liittyy samanlaisia ongelmia kuin yleisemminkin kantasolujen seuraamiseen. Ensinnäkin rautaoksidipartikkelitkin jakautuvat jakautuvien solujen mukana ja siten niiden tuottama MRI-kontrasti hiljalleen heikkenee. Toiseksi leimattujen kantasolujen vaeltaessa elimistössä solujen tiheys pienenee ja samalla erotettavuus MRI-kuvassa heikkenee. MRI-kuvasta ei myöskään pystytä päättämään millaiseksi soluksi kantasolu mahdollisesti on erilaistunut. (Ferreira ym. 2008)

Rautaoksidien valmistukseen, kuvantamiseen ja mittaamiseen liittyy myös rautaoksidien ominaisuuksista aiheutuvia haasteita. Yleisin tapa valmistettaessa rautaoksidipartikkeleita MRI-kontrastiaineeksi on ollut veden ja rautaionien kemiallinen reaktio eli hydrolyysi. Samalla rautaoksidipartikkelit kuorrutetaan pinnoitusaineella. Näissä prosesseissa reaktioliuoksen pH ja pinnoitusaineen läsnäolo ovat oleellisessa osassa. Valmistetuissa rautaoksidipartikkeleissa on ollut merkittävää vaihtelua erityisesti magneettisuudessa. Tämä johtuu usein epäpuhtauksista, jotka häiritsevät partikkeleiden rakennetta. (Sun ym. 2008) Lisäksi valmistettujen rautaoksidipartikkeleiden koko ja kiteisyys ovat vaihdelleet suuresti. Valmistetut partikkelit ovat myös usein vesipakoisia joten ne tulee käsitellä ennen kuin niitä voidaan käyttää. (Wan ym. 2007) Mittaamisen kannalta ongelmallista on, että rautaoksidipartikkeleita ei mitata suoraan vaan epäsuorasti mikroskooppisia magneettikentän häiriöitä mittaamalla. Tämän vuoksi seurattavien solujen lukumäärää on vaikea arvioida signaalin perusteella. (Ferreira ym. 2008) Näitä haasteita on pyritty ratkaisemaan esimerkiksi partikkeleiden pinnoituksella sekä uudenlaisien rautaoksidipartikkeleiden valmistusmenetelmien kehittämisellä. Myös kokonaan uusien kontrastiaineden kehittämisellä soluleimaukseen pyritään ratkaisemaan rautaoksidipartikkeleihin liittyviä ongelmia sekä kehittämään MRI-solukuvausta.

1.3.2 Mangaanioksidi

Mangaanioksidi on yksi lupaavimmista tutkituista nanomateriaaleista MRI-solukuvaukseen. Siitä on aiemmin kehitetty kaksi hyvin erilaista nanorakennetta ihmisen kantasolujen leimaamiseen (Rosenholm ym. 2015). Tässä tutkimuksessa selvitetään edelleen näiden mangaanioksidipartikkeleiden soveltuvuutta käytettäväksi kontrastiaineena magneettikuvauksessa ja erityisesti kantasolujen leimaamista niillä MRI-solukuvausta silmällä pitäen. Ennen kuin nanopartikkeleita voidaan käyttää kudoksessa tulee selvittää niiden vaikutukset soluun. Erityisesti partikkeleiden toksisuus ja mahdollinen vaikutus kantasolujen erilaistumiseen tulee selvittää *in vivo* ja *in vitro*. Samoin on selvitettävä miten ja millä partikkelipitoisuudella leimatut solut erottuvat parhaiten MRI-kuvauksessa.

1.4 Tutkimuksen lähtökohta ja tavoite

Lähtökohtana tutkimukselle oli oletus, että amorfisessa muodossa olevaa mangaanioksidia voidaan käyttää solujen leimaukseen MRI-kuvauksessa. Tutkimuksessa verrattiin amorfisessa muodossa olevia mangaanioksidipartikkeleita kidemuotoisiin mangaanioksidipartikkeleihin toksisuuden ja MRI-kontrastin osalta. Tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää molempien partikkeleiden osalta niiden mahdollinen toksisuus ihmisen kantasoluille, miten kantasolut kestävät leimaamista, säilyykö kantasolujen erilaistumiskyky leimaamisen jälkeen ja miten eri partikkelipitoisuuksilla leimatut kantasolut erottuvat MRI-kuvassa. Erityisesti haluttiin selvittää amorfisten mangaanioksidipartikkeleiden eri pitoisuuksien vaikutus MRI-kuvan kontrastiin.

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Mangaanioksidipartikkeleiden valmistus

Mangaanioksidin synteesi tehtiin mikroaaltoreaktorissa, jossa pystyttiin kontrolloimaan synteesin lämpötilaa ja kestoja kohdistetuilla mikroaalloilla (Discover SClass, CEM, USA). Tyypillisessä synteesissä 12 mmol natriumasetaattia liuotettiin 30 ml:aan etyleeniglykolia varovasti lämmittämällä, ultraäänellä ja sekoittamalla. Liukenemisen jälkeen liuokseen lisättiin 4 mmol $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ja liuotettiin vastaavasti. Syntyneitä liuosta käytettiin joko sellaisenaan tai siihen lisättiin kuorutusaineita poly acrylic acid (PAA) tai poly vinyl pyrrolidone (PVP) suhteessa $\text{Mn}^{2+}:\text{PAA}/\text{PVP} = 1:2$ (8 mmol kuorutusainetta). Erilaiset reaktioseokset sulatettiin mikroaalloilla eri lämpötiloissa (200°C, 220°C ja 240°C) ja eri reaktioajoilla (5-50 min). Reaktion jälkeen suoritettiin nopea jäähdytys korkeapaineisella ilmavirralla. Syntyneet partikkelit saostettiin lisäämällä 15 ml etyyliasetaattia ja 3 ml absoluuttista etanolia ja erotettiin sentrifugoimalla 7000 rpm 10 minuutin ajan. Lopulliset partikkelit kerättiin kolmella peräkkäisellä pesulla etanolissa, minkä jälkeen partikkelit liuotettiin etanoliin myöhempää käyttöä varten. ICP-mittauksia varten 100 µl suspensiota liuotettiin konsentroitua HNO_3 :n ja laimennettiin 5ml:aan ddH₂O:lla. (Rosenholm ym. 2015)

2.2 Tutkitut partikkelit

Tässä tutkimuksessa käytetyt partikkelit olivat kiteinen (valmistettu 240°C:ssa 30 minuutin reaktioajalla ilman lisäaineita) ja amorfisessa muodossa oleva (valmistettu 240°C:ssa 20 minuutin reaktioajalla lisäaineena PAA) mangaanioksidi. Näitä partikkeleita oli jo aiemmin tutkittu Rosenholmin (2015) tutkimuksessa.

2.2.1 Relaksaatio-ominaisuudet ja kuvan kontrasti

Partikkeleiden soveltuvuutta MRI-kuvaukseen on tutkittu selvittämällä niiden relaksaatioajat T1- ja T2-kuvauksessa (Rosenholm ym. 2015). T1 ja T2 kuvaavat pitkittäistä ja poikittaista protonien palautumista eli relaksaatiota magneettikentän aiheuttamasta viritystilasta.

Amorfisessa muodossa olevien partikkeleiden relaksaatioajat olivat lyhyempiä kuin kiteisten partikkeleiden relaksaatioajat (ajat erittäin lyhyitä: T1 alle 20ms ja T2 alle 10ms

suurilla mangaanioksidin konsentraatioilla). Eron epäiltiin johtuvan amorfisen materiaalin avoimemmasta rakenteesta, joka saattaa mahdollistaa vesimolekyylien paremman pääsyn paramagneettisiin mangaanirakenteisiin. Kiteisten partikkelien ongelmana vedessä on huonompi liukoisuus, jolloin partikkelit saostuvat herkästi. Jo MRI-kuvaukseen kuluvana aikana huomattiin kiteiden sakkautuvan näytteen pohjalle. Siten mitatun relaksaatioajan arvo riippuu suuresti valitusta mittauskohdasta näytteessä. Amorfisessa muodossa olevat mangaanioksidipartikkelit taas pysyvät paremmin liuenneina veteen, jolloin mittausarvo on tasaisempi riippumatta mittauskohdasta. Agarosiin valettuja partikkeleita kuvattaessa eri partikkeleille saatujen relaksaatioaikojen välinen ero oli merkittävästi pienempi, sillä agarosissa partikkelit eivät pääse liikkumaan ja siten pysyvät tasaisemmin jakautuneina näytteisiin.

Amorfisessa muodossa olevalla mangaanioksidilla leimattujen solujen MRI-kuvauksissa on aiemmin saatu selkeitä merkkejä siitä, että leima-aineen konsentraatio vaikuttaa kuvan kontrastiin. Mangaanioksidipartikkeleiden vaikutus näytti myös olevan suurempi T2- kuin T1-relaksaatioaikaan, vaikka aiemmin mangaanioksidia on pidetty lähinnä T1-kuvauksen kontrastiaineena.

2.2.2 Solun kestävyys

Käytettyjen mangaanioksidipartikkeleiden vaikutuksia solujen kasvuun ja kehitykseen on tutkittu jo aiemmin ihmisen kantasoluilla (Rosenholm ym. 2015). Tuossa työssä havaittiin, että 24 tunnin kuluessa leimattujen solujen elinkelpoisuus heikkeni vain hieman leimaamattomiin verrattuna. Tämä heikkeneminen yhdistettiin leimattujen solujen proliferaation hidastumiseen, joka oli vähäisempää pienillä leimojen konsentraatioilla (10 µg/ml). Amorfisessa muodossa olevalla mangaanioksidilla leimatut solut olivat elinvoimaisempia kuin kiteisillä partikkeleilla leimatut solut.

2.3 Solujen hankkiminen, leimaus ja kasvatus

Tutkimuksessa käytetyt ihmisen mesenkymaaliset kantasolut kerättiin lonkkaleikkauksissa otetuista luuydinnäytteistä. Jokaiseen näytteenottoon oli potilaiden kirjallinen suostumus. Näytteiden keräämiseen oli eettisen toimikunnan lupa. Näytteet käsiteltiin ja solut esikasvatettiin kuten on aiemmin kuvattu (Leskelä ym. 2003).

Soluja kasvatettiin 24-kuoppalevyillä (10 000 solua/kuoppa) antaen niiden kiinnittyä ja kasvaa; käytössä oli kahden eri potilaan kantasolunäytteet. Molemmista näytteistä tehtiin kaksi sarjaa, toinen alkalisen fosfaatin (AFOS), toinen kalsiumin (Ca) määrityksiä varten. Kiinnittymisen jälkeen solut leimattiin mangaanioksidipartikkeleilla lisäämällä kasvatusliuokseen mangaanioksidia konsentraatioon 10 µg/ml saakka. Molemmissa sarjoissa näytteet jaettiin kontrolliryhmään ja testiryhmään. Ryhmissä 1/3 soluista jätettiin leimaamatta, 1/3 leimattiin amorfisessa muodossa olevalla ja 1/3 kiteisellä mangaanioksidileimalla. Leiman annettiin vaikuttaa kaksi tuntia, jonka jälkeen kasvatusliuos poistettiin ja solut pestiin fosfaattipuskuroidulla saliinilla (PBS) kolme peräkkäistä kertaa. Pesun jälkeen solumateriaaliin lisättiin kasvatusliuoksia. Kontrollisoluryhmä sai peruskasvatusliuosta (PM) ja testisoluryhmä osteoinduktiokasvatusliuosta (OS). PM oli koostumukseltaan ”Minimum Essential Medium Eagle alpha modification”, jossa oli 10% naudan sikiön seerumia, 2 mM L-glutamiinia, 100 U/ml penisilliiniä, 0,1 g/l streptomysiiniä ja 20 mM HEPES. OS koostumus oli sama kuin PM, lisättyinä 100 nM dexametasonia, 50 µM askorbiinihappoa ja 10 mM betaglyserolifosfaattia.

Kasvatusliuoksilla oli tarkoitus saada eroteltua solujen käyttäytymistä. PM säilyttää kantasolun ominaisuuksia, kun taas OS erilaistaa kantasolua luusoluksi.

Leimaamisen jälkeen soluja kasvatettiin 24-kuoppalevyillä soluviljelyinkubaattorissa, jossa oli 5% hiilidioksidia. Kasvatusliuos vaihdettiin kaksi kertaa viikossa. Toisen näytteen AFOS-määrityksiä varten tarkoitettussa sarjassa havaittiin 16 päivän kohdalla kontaminaatio kahden leimaamattoman näytteen kuopassa, minkä vuoksi valmistelua päätettiin aikaistaa. Toinen näyte valmisteltiin suunnitellun 21 päivän kasvatuksen jälkeen. Valmistelussa kasvatusliuokset imettiin pois, pestiin kolme kertaa PBS:llä ja AFOS-levyjen kuoppiin lisättiin 200 µl AFOS-lyysipuskuria (0,1% Triton X). Tämän jälkeen levyt pakastettiin -70°C pakastimeen odottamaan määrityksiä. Ca-levyjen soluja kasvatettiin 35 päivää leimaamisen jälkeen. Tämän jälkeen Ca-levyt pakastettiin kuivina. Määrityksiä edeltävänä päivänä Ca-levyt otettiin sulamaan, kuopille lisättiin 0,6 M HCl ja annettiin sen liuottaa kalsiumia yön yli.

2.4 Kestävyy- ja erilaistumiskokeet

AFOS-määrittelyssä tehtiin sekä entsyymiaktiivisuus- että proteiinimittaukset, eli mitattiin näytteiden spesifistä aktiivisuutta. Näitä varten näytteet sulatettiin pakkasesta ja jokaisesta näytteestä pipetoitiin kaksi rinnakkaista näytettä, jotta jokaisesta saatiin kaksi rinnakkaista arvoa. Proteiinipitoisuudet mitattiin BioRadin DC Protein Assay kitillä ja AFOS-aktiivisuus mitattiin 4-para-nitrofenyylifosfaatti-menetelmällä. Näytteiden absorbanssit mitattiin Victor2 -levylukijalla ja proteiinipitoisuudet laskettiin vähentämällä näytteiden nolla näytteiden absorbanssista. AFOS-arvo saatiin vähentämällä absorbanssista nollanäytteen absorbanssi (Triton-lyysipuskuri) ja laskemalla kahden rinnakkaisen näytteen arvojen keskiarvo. Spesifinen AFOS-aktiivisuus saatiin suhteuttamalla AFOS-arvo proteiinipitoisuuteen. Saatuja AFOS-aktiivisuuksia verrattiin PM- ja OS-kasvatusliuksissa kasvatettujen samoilla konsentraatioilla leimattujen näytteiden kesken, jotta nähtiin miten erilaistuminen muuttuu leima-aineen vaikutuksesta. AFOS-levyjen soluja oli kasvatettu 3 viikkoa, joten niiden tulokset kertovat solujen tilanteesta kolme viikkoa leimaamisen jälkeen.

Kalsiummäärittelyssä näytteistä tehtiin pelkästään Ca-pitoisuuden määrittely Roche Diagnosticsin Ca-kitillä. Tämä tehtiin myös Victor2 -levylukijalla vertaamalla näytteiden absorbanssia standardi näytteiden absorbansseista tehtyyn standardikuvaajaan ja määrittämällä siten Ca-pitoisuus. Jokaisesta näytteestä pipetoitiin kaksi rinnakkaista näytettä absorbanssimäärittystä varten ja näiden kahden arvon keskiarvoa käytettiin näytteen arvona. Saatuja Ca-pitoisuuksia vertailtiin vastaavasti PM- ja OS-liuksissa kasvatettujen samoilla konsentraatioilla leimattujen näytteiden kesken, jolloin nähtiin millainen OS-liuksessa kasvatettujen näytteiden Ca-pitoisuus oli vastaaviin PM-liuksessa kasvatettujen näytteiden Ca-pitoisuuksiin verrattuna. Ca-levyjen soluja oli kasvatettu 5 viikkoa, joten niiden tulokset kertovat solujen tilanteesta viisi viikkoa leimaamisen jälkeen.

2.5 Erottuminen MRI-kuvauksessa

Toinen tutkimuksen kohde oli selvittää kuinka leimatut solut erottuvat MRI-kuvauksessa ja onko kiteisellä tai amorfisessa muodossa olevalla mangaanioksidimerkkiaineella eroa keskenään sekä miten eri konsentraatiot vaikuttavat kuvan kontrastiin.

Tutkimuksessa käytettiin ihmisen mesenkymaalaisia kantasoluja, jotka oli hankittu aiemmin kuvatulla tavalla. Tarkoituksena oli jakaa 100 000 solua/näyte ja ottaa näistä sekä kontrollinäyte leimaamattomia soluja että kolme näytettä molemmilla leima-aineilla leimattuna ja kasvattaa niitä 0, 1 ja 3 päivää leimaamisesta. Leimaus suoritettiin lisäämällä 6-kuoppalevyillä kasvavien solujen päälle leimaliuosta 10 µg/ml ja annettiin leiman vaikuttaa kaksi tuntia. Tämän jälkeen leimaliuos imettiin pois ja näytteet pestiin PBS:llä 3 kertaa. Pesun jälkeen 0-päivän leimatut näytteet irrotettiin trypsiinillä, fuugattiin pelletiksi, imettiin kuivaksi ja valmisteltiin agarosiin valua varten. Muiden näytteiden kanssa oli määrä toimia samoin 1 ja 3 päivän jälkeen, mutta tuntemattomasta syystä ne olivat kontaminoituneet ja näytteet jouduttiin lopulta tuhoamaan. Myös 0-päivän näytteissä oli hienoista kasvua kontaminaatioon viitaten, mutta nämä päädyttiin säästämään kuvaamista varten.

Eri leima-aineiden vertailun lisäksi leiman konsentraation merkityksen selvittämiseksi luotiin toinen sarja näytteitä pelkästään amorfisessa muodossa olevalla mangaanioksidileimalla leimattuja soluja. Tähän käytettiin toisen potilaan kantasoluja. Leimaaminen ja näytteeksi valmistaminen toteutettiin samoin kuin edellisessä kappaleessa esitettyssä tapauksessa ja käytössä oli 100 000 solua/näyte. Käytetyt amorfisen leimaliuoksen konsentraatiot olivat 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml ja 10 µg/ml. Leimattujen solujen lisäksi tästäkin sarjasta otettiin kontrollinäyte leimaamattomia soluja. Solut irrotettiin heti 2 tunnin leimauksen jälkeen kasvualustoistaan, siirrettiin Eppendorf-putkiin, pelletoitettiin, kuivattiin ja valmisteltiin agarosiin valua varten.

Leimauksen jälkeisessä solujen irrottamisessa kasvualustastaan tehtiin huomio, että 7,5 µg/ml ja 10 µg/ml liuoksilla leimatut solut olivat selvästi tiukemmin kiinni alustoissaan kuin muut näytteet. Kaikki solut saatiin kuitenkin irrotettua toisella trypsinointi käsittelyllä.

Sekä 10 µg/ml amorfisessa muodossa olevalla ja kiteisellä mangaanioksidilla leimatut, että jälkimmäisenä kuvattu amorfisen leiman sarjan näytteet kontrolleineen valettiin Eppendorf-putkissa agarosiin niiden MRI-kuvausta varten. Mukana oli myös kontrollina pelkällä agarosilla täytetty putki.

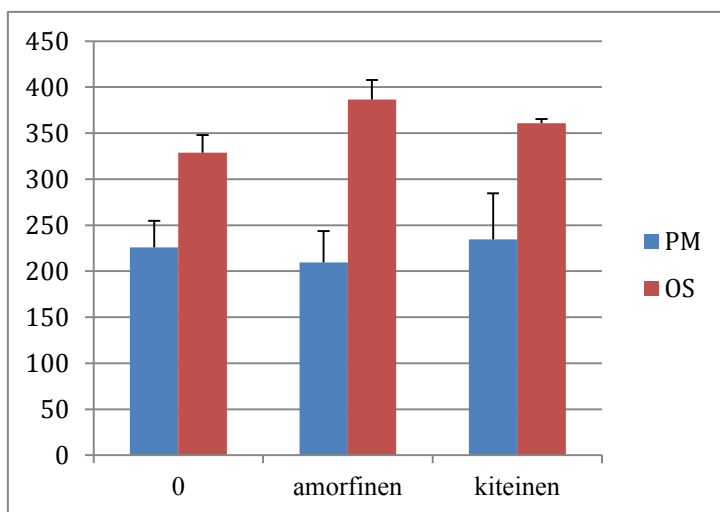
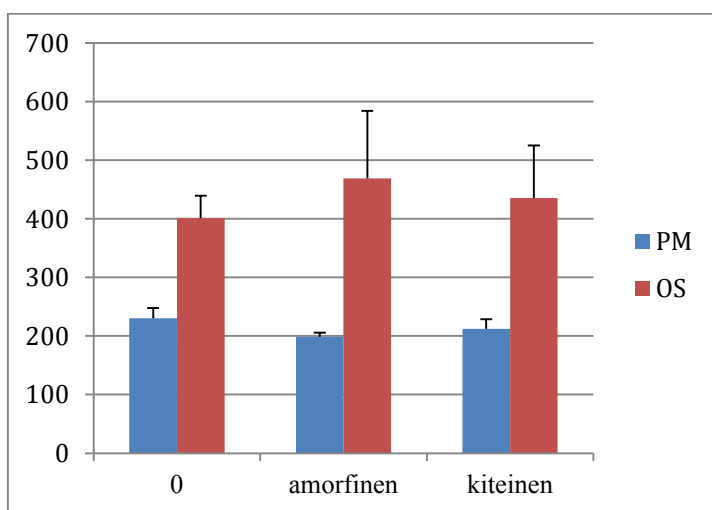
2.6 MRI-kuvauksen suorittaminen

Kaikista agarosiin valetuista näytteistä mitattiin niiden T1- ja T2-relaksaatioajat käyttäen 3 T kliinistä MRI-laitetta (Siemens Magnetom Skyra, Siemens Healthcare, Erlangen, Saksa) sekä 8-kanavaista vain vastaanottavaa pieneläinkelaa (RAPID Biomedical GmbH, Rimpur, Saksa). T1-relaksaatioajat mitattiin käyttämällä single slice inversion recovery fast spin echo sekvenssiä (TR 10 000 ms, TE 8,6ms, 10 TI:tä välillä 50 - 9500 ms, FOV 12cm, matriisikoko 256 x 256, joka tuotti 0,47 mm resoluution leiketasossa, leikepaksuus 3 mm, ETL 8, NEX 1). T2-relaksaatioajat mitattiin käyttäen multi-slice multi echo spin echo sekvenssiä (TR 1680 ms, 12 TE:tä välillä 11,5 - 138 ms, ETL 5; FOV, matriisikoko ja leikepaksuus olivat muuttamattomia). Leikkeet asetettiin putkien pitkittäisleikkauksen suuntaisiksi (kuva 5). Jokaisesta putkesta valittiin kolmion muotoinen mitattava alue, jolta laskettiin relaksaatioajat pikseleittäin epälineaarilla sovittamisella ja olettaen monoeksponentiaalinen relaksaatio. Laskut suoritettiin MATLAB ohjelmalla (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Jokaiselle näytteelle laskettiin keskiarvo (mean) ja keskihajonta (SD).

3. TULOKSET

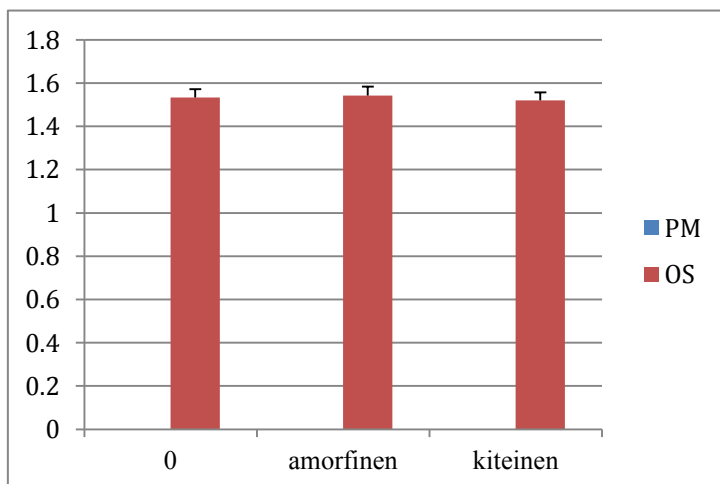
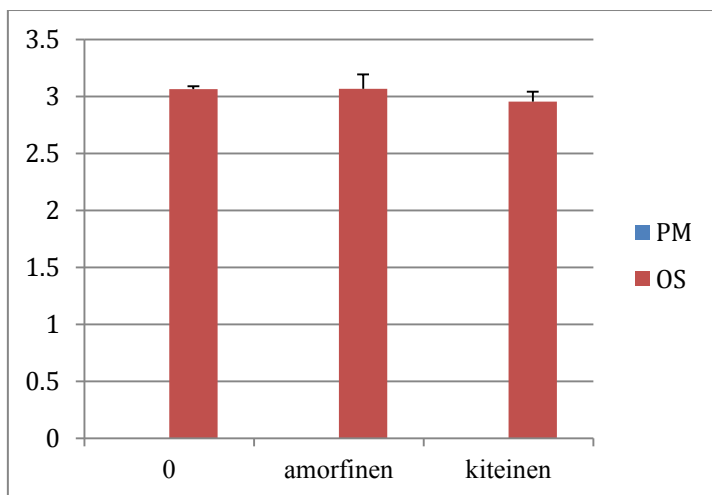
3.1 Erileistuminen ja toksisuus

AFOS-aktiivisuuden mittausten perusteella saatiin selville, että 10 µg/ml konsentraatio amorfisessa muodossa olevaa tai kiteistä mangaanioksidia ei vaikuta solujen erilaistumiseen kolmen viikon jälkeen leimaamisesta. Leimattujen solujen AFOS-aktiivisuus ei pienentynyt leimaamattomiin soluihin verrattuna kolmen viikon aikana leimaamisesta OS-liuoksessa kasvatettujen solujen osalta (kuvat 1 ja 2).



Kuvat 1 ja 2. AFOS-aktiivisuus/mg proteiinia. Potilaan 1 solunäyte yllä ja potilaan 2 näyte alapuolella. 0 = leimaamaton solunäyte, amorfinen = 10 µg/ml amorfisessa muodossa olevalla mangaanioksidilla leimattu solunäyte, kiteinen = 10 µg/ml kiteisellä mangaanioksidilla leimattu solunäyte.

Kalsiummäärityksissä nähtiin, ettei solujen erilaistuminen viidessä viikossa heikentynyt leimattujen solujen osalta, sillä Ca-pitoisuus leimatuissa näytteissä oli samalla tasolla leimaamattomien kontrollinäytteiden kanssa (kuvat 3 ja 4). PM-näytteiden Ca-pitoisuus on hyvin lähellä nollaa, eivätkä niiden palkit siksi erotu kuvissa.



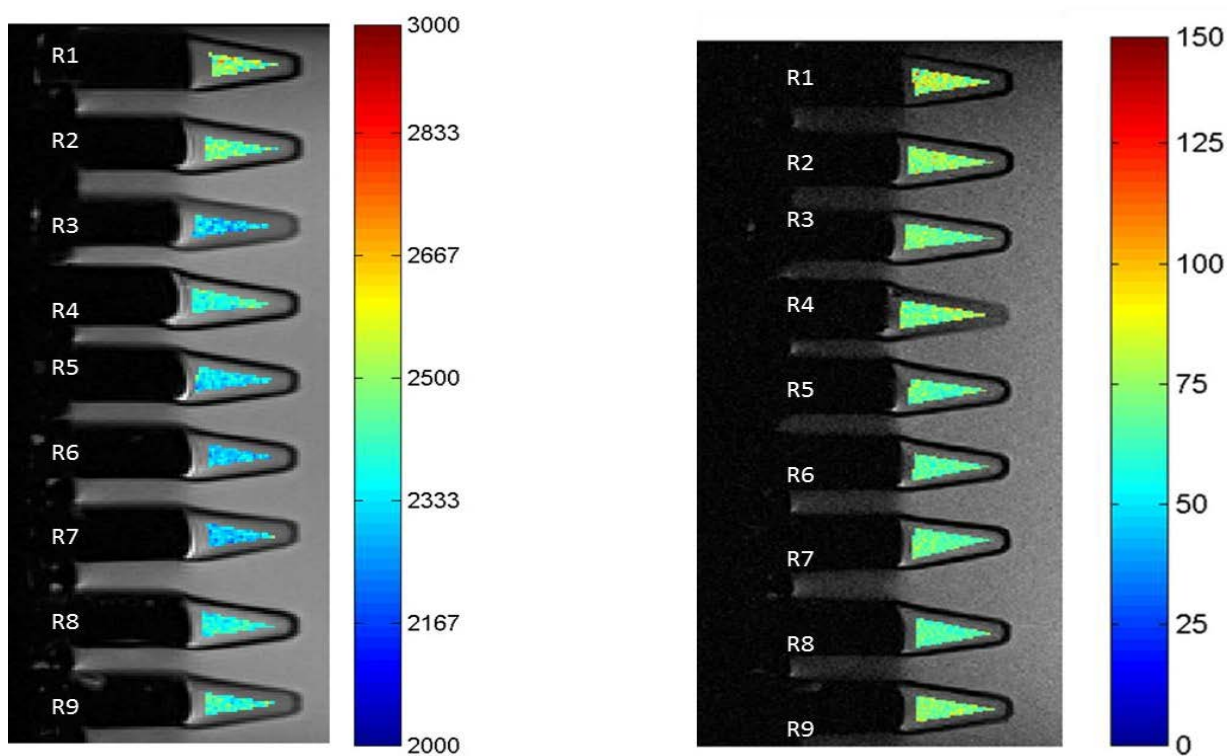
Kuvat 3 ja 4. Ca-pitoisuus mmol/l. Potilaan 1 solunäyte yllä ja potilaan 2 näyte alapuolella. 0 = leimaamaton solunäyte, amorfinen = 10 µg/ml amorfisessa muodossa olevalla mangaanioksidilla leimattu solunäyte, kiteinen = 10 µg/ml kiteisellä mangaanioksidilla leimattu solunäyte.

3.2 Kontrasti

MRI-kuvauksessa mangaanioksidilla leimatut solut kuvattiin kolmen teslan kenttävoimakkuudella. Kuten aiemmin kuvattiin, näytteistä valittiin kolmionmuotoiset alueet (kuva 5), joista laskettiin kantasolunäytteiden T1- ja T2-relaksaatioajat (taulukko 1).

Taulukko 1. Leimattujen kantasolunäytteiden relaksaatioajat 3 T MRI-kuvauksessa

	T1 (ms)		T2 (ms)	
	mean	SD	mean	SD
agaroosi	2503,01	87,08	80,73	13,98
leimaamaton I	2462,17	59,09	76,4	9,42
kiteinen 10	2324	56,28	72,08	7,73
amorfinen 10	2407,92	48,21	73,86	10,01
leimaamaton II	2343,48	48,09	69,09	7,88
amorfinen 2,5	2317,8	36,17	68,77	6,86
amorfinen 5	2311,42	47,88	69,92	6,86
amorfinen 7,5	2388,72	42,03	67,02	6,47
amorfinen 10	2415,07	50,8	74,64	7,86



Kuva 5. Värikarttaesitys kuvattujen näytteiden relaksaatioajoista millisekunteina. Vasemmalla T1-painotteisen kuvauksen värikartta ja oikealla T2-painotteisen kuvauksen värikartta. Leikkeet asetettiin putkien pitkittäisleikkauksen suuntaisiksi. Jokaisesta putkesta valittiin kolmionmuotoinen mitattava alue, joka kuvissa näkyy värikoodattuna. Ylin putki on agarooosi ja järjestys alaspäin on sama kuin taulukossa 1 ilmoitettu.

Molemmilla painotuksilla kuvattaessa sarjoissa nähdään odotetusti pisin relaksaatioaika pelkkää agarosia sisältävässä putkessa ja leimaamaton kantasolunäyte I antaa lähes saman relaksaatioajan kuin agarosiputki. Jostain syystä leimaamaton kantasolunäyte II poikkeaa kuitenkin selvästi näytteestä I.

T2-painotteisessa kuvassa kaikilla konsentraatioilla leimattujen kantasolujen relaksaatioaika on selvästi lyhyempi kuin leimaamattomien ja siten voidaan olettaa, että sopivalla sekvensoinnilla leimatut solut erottuvat MRI-kuvassa hyvin. Kohina, jota SD kuvastaa, on noin 9-17% kunkin näytteen keskiarvosta, joten leima-aineiden eri konsentraatioiden väliset kontrastierot saattavat kuitenkin hukkaa kohinaan.

T1-painotteisessa kuvassa löydökset ovat pääosin T2-painotteista kuvaa vastaavat. Absoluuttisina arvoina relaksaatioaikojen ero on kuitenkin T1-painotteisessa kuvassa suurempi ja siten kuvakontrasti voi olla helpommin erotettavissa. Muutoksen suuruus ja kohinan osuus ovat kuitenkin pääosin samaa luokkaa.

Odottamattomasti amorfisessa muodossa olevan mangaanioksidin suurimmalla konsentraatiolla leimatut solunäytteet saavat leimatuista soluista pisimmät relaksaatioajat molemmissa kuvissa. Tämän voi aiheuttaa osittain kohina ja osittain mahdolliset virhelähteet.

4. POHDINTA

Saadut tulokset osoittavat, että sekä kiteinen että amorfisessa muodossa oleva mangaanioksidi ovat käyttökelpoisia nanopartikkeleita kantasolujen leimaamiseen MRI-kuvausta varten. Kantasolut kestävät molemmilla partikkeleilla 10 µg/ml konsentraatiolla leimaamista niin, että solujen elinvoimaisuus ja erilaistumiskyky säilyvät kolmen ja viiden viikon ajan leimaamisen jälkeen. Kummallakaan leima-aineella ei näytä olevan negatiivista tai positiivista vaikutusta soluihin. On muistettava, että AFOS on epäspesifi merkkiaine, jonka arvoihin voi vaikuttaa myös esimerkiksi pelkkä stressi. Koska PM-näytteiden AFOS-arvot leimatuilla soluilla pysyvät normaaleina, voidaan kuitenkin päätellä, että kokeissa ei ole merkittävää stressireaktiota. Vaikka osassa kasvatetuissa soluissa havaittiin kontaminaatio, silti mitatuissa kuopissa ei näkynyt AFOS nousua, eikä siten voitu havaita muutoksia soluissa.

MRI-kuvauksessa nähtiin, että jo pienemmillä konsentraatioilla amorfisessa muodossa olevaa mangaanioksidia saadaan leimatut solut erottumaan sekä T1- että T2-painotteisessa MRI-kuvassa. Relaksaatioajat lyhenevät merkittävästi kaikilla käytetyillä konsentraatioilla siten, että kontrasti-kohina suhdetta optimoimalla MRI-kuvassa ne aiheuttavat riittävän kontrastin solujen erottamiseksi leimaamattomista soluista. Eroja eri konsentraatioiden välille kontrastissa on kuitenkin vaikea saada, sillä kohina peittää erot herkästi. Myös 10 µg/ml kiteinen mangaanioksidi antaa riittävän kontrastin kantasolujen erottamiseksi MRI-kuvauksessa.

Saavutettavan kontrastin puolesta molemmat käytetyt partikkelit siis vaikuttavat sopivilta MRI-solukuvauksen kontrastiaineilta. Käytettävyyden kannalta amorfisessa muodossa oleva mangaanioksidi vaikuttaa kuitenkin soveltuvammalta ja lupaavammalta partikkelilta. Tähän viittaa Rosenholmin (2015) tutkimuksen tulokset kiteisen mangaanioksidin heikosta liukenevuudesta veteen sekä herkästä saostumisesta.

Tutkimukseen sisältyviä mahdollisia virhelähteitä voivat olla ainakin kuvattaessa vaikuttava taustakohina sekä mahdollinen muutaman näytteen kontaminaatio. Näiden virhelähteiden vaikutus kuitenkin pyrittiin minimoimaan ja esimerkiksi

kontaminaatioepäilyyn reagoitiin välittömästi. MRI-kuvauksen epäjohdonmukaisuudet voivat kuitenkin johtua juurikin epäilystä kontaminaatiosta, jossa amorfisessa muodossa olevalla ja kiteisellä mangaanioksidilla 10 µg/ml konsentraatiolla leimattujen näytteiden epäiltiin kontaminoituneen. Lisäksi tulee muistaa, että sekä 7,5 µg/ml että 10 µg/ml amorfisessa muodossa olevalla mangaanioksidilla leimatut solut jälkimmäisenä leimatusta nousevasta sarjasta olivat tiukemmin kiinni kasvualustoissaan verrattuna leimaamattomiin soluihin ja 2,5 µg/ml ja 5 µg/ml konsentraatiolla leimattuihin soluihin ja ne jouduttiin irrottamaan kahdella trypsiinipesulla. Tämäkin voi osaltaan aiheuttaa virhettä tuloksiin.

Sekä amorfisessa muodossa olevan mangaanioksidin että kiteisen mangaanioksidin siedettävyyden kannalta tutkimus antoi varsin vakuuttavan näytön, eikä solujen elinvoimaisuus tai erilaistumiskyky vaikuta häiriintyvän leimaamisesta. Kontrastiaineina molemmat tutkitut partikkelit toimivat MRI-kuvauksessa hyvin sekä T1- että T2-painotteisissa kuvissa.

Solujen kestävyyttä on syytä tutkia vielä suuremmilla otosko'oilla. Samoin MRI-kuvakontrastia lienee syytä vielä selvittää. Tässä tutkimuksessa oli alun perin tarkoitus selvittää myös kuinka leimaamisen jälkeen muutaman päivän ajan kasvatetut solut erottuvat MRI-kuvauksessa. Kontaminaation vuoksi tätä ei kuitenkaan saatu selville. Jatkossa on syytä siis selvittää, kuinka leimatut solut erottuvat useamman päivän kasvatuksen jälkeen kuvattaessa. Tämä on mangaanioksidipartikkeleiden kliinisen käytettävyyden kannalta yksi oleellinen asia.

5. LÄHDELUETTELO

- Azene N, Fu Y, Maurer J & Kraitchman DL (2014). Tracking of stem cells in vivo for cardiovascular applications. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 16(1): 7.
- Ferreira L, Karp JM, Nobre L & Langer R (2008). New Opportunities: The Use of Nanotechnologies to Manipulate and Track Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3: 136-146.
- Gupta PK, Das AK, Chullikana A & Majumdar AS (2012). Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy* 3(4): 25.
- Leskelä HV, Risteli J, Niskanen S, Koivunen J, Ivaska KK & Lehenkari P (2003). Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311: 1008-1013.
- Li L, Jiang W, Luo K, Song H, Lan F, Wu Y, ym (2013). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as MRI contrast agents for Non-invasive Stem Cell Labeling and Tracking. *Theranostics* 3(8): 595-615.
- Rosenholm JM, Korpi RM, Lammentausta E, Lehtonen S, Lehenkari P, Niemi R, ym (2015). Novel, Fast-Processed Crystalline and Amorphous Manganese Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling. *Inorganic Chemistry Frontiers* 2(7): 640-648.
- Sun C, Lee JSH & Zhang M (2008). Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(11): 1252-1265.
- Wan J, Cai W, Meng X & Liu E (2007). Monodisperse water-soluble magnetite nanoparticles prepared by polyol process for high-performance magnetic resonance imaging. *Chemical Communications* 47: 5004-5006.
- Yan L, Han Y, He Y, Xie H, Liu J, Zhao L, ym (2007). Cell Tracing Techniques in Stem Cell Transplantation. *Stem cell reviews* 3(4): 265-9.