

TARTU ÜLIKOOL
Loodusteaduste valdkond
Füüsika instituut
Materjaliteaduse õppekava

Rasmus Liira

**Rakukultuuriks sobilike fiibriliste želatiinmaatriksite valmistamise
metoodika väljaarendamine**

Lõputöö

Juhendaja: Martin Järvekülg, PhD

Tartu 2018

Infoleht

Rakukultuuriks sobilike fiibriliste želatiinmaatriksite valmistamise meetodika väljaarendamine

Käesolevas bakalaureusetöös anti ülevaade rakkude käitumistest fiibrilistel struktuuridel, ekstratsellulaarsete maatriksite tähtsusest rakkudele ning erinevustest kahe- ja kolmedimensionaalsete kasvukeskkondade vahel. Töö eksperimentaalses osas määrati üldised parameetrid elektroktramise protsessile ning kasutatavale polümeerilahusele optimaalsete želatiinmaatriksite valmistamiseks. Töötati välja protseduur želatiinfiibrите kandmiseks klaasile rakukultuuri jaoks sobilikul kujul ning viidi läbi esimesed vaatlused mattidele külvatud rakkudega.

CERCS: T390, Polümeeride tehnoloogia, biopolümeerid

Märksõnad: želatiin, glükoos, fiiber, ekstratsellulaarne maatriks, rakud, fibroblastid, SEM, 3D kasvukeskkond

Developing the method of preparing fibrillose gelatine matrices suitable for cell culture

The work at hand provided an overview of cell behaviour on fibrous structures, the importance of extracellular matrices for cells and the differences of two- and three-dimensional growth environments. In the experimental part general parameters for the electrospinning process and the polymer solution were set for optimal gelatine matrix preparation. A procedure was developed for transferring gelatine fibres on a glass in a form suitable for cell culture and first observations made of the cells seeded on the mats.

CERCS: T390, Polymer technology, biopolymers

Keywords: Gelatine, glucose, fibre, extracellular matrix, cells, fibroblasts, SEM, 3D growth environment

SISSEJUHATUS	4
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Biopolümeerid ja želatiini valik	7
1.2. Elektroketrus	8
1.3. Ekstratsellulaarne maatriks	8
1.4. Raku kuju seos selle kasvu, füsioloogia ning kasvukeskkonnaga	9
2. Metoodika	12
2.1. Želatiinmaatriksi valmistamine	12
2.2. Kasutatud tehnikad	13
3. Eksperimentaalne osa	14
3.1. Üldparameetrite seadmine	14
3.2. Želatiini valik	22
3.3. Glükoosisisalduse valik	27
3.4. Mattide ettevalmistamine rakkude külvamiseks	29
3.5. Rakkude mattidel kasvatamine ning meetodi variatsioonide võrdlus	31
3.6. Suspensiooni klaasile kandmise arendamine ning kontsentratsiooni mõju	38
4. Järeldused ja arutlus	43
KOKKUVÕTE	45
SUMMARY	46
KASUTATUD KIRJANDUS	47

SISSEJUHATUS

Paljud inimkonna poolt vajatavad või soovitatavad materjalid või meetodid on olulisemalt kompleksemal kujul juba ammu looduses kasutuses. Biomimeetika on kasvav valdkond, mille tehnoloogiate arendamiseks kasutatakse bioloogia ning nanotehnoloogia tööriistu, püüdes imiteerida aegade vältel looduse poolt välja töötatud süsteeme [1]. Superhüdrofoobsed pinnad järgivad putukatiibade [2], veealused liimid merekarpide [3] ning kontrollitavad ravimitranspordi süsteemid viiruste eeskujul [4]. Samuti on meil vaja jälgendada loodust, et me saaksime seda paremini uurida, näiteks on tehnilikult loodud koed abiks haiguste mehhanismide välja selgitamisel [5] ning ravimiarenduses [6].

Täpse pildi saamiseks organismis elavatest rakkudest, tuleb neid kasvatada keskkonnas, kus need on igas kasvujärgus vaadeldavad. Seni on see protsess leidnud aset kahedimensionaalsetel (2D) substraatidel, nagu koekultuuri polüstüreen (TCPS)[7]. Juba veerand sajandit tagasi tõestati aga selgelt, et inimese rinna epiteelrakud arenevad 2D pindadel nagu vähirakud, kuid naasevad tavalisele kasvukäitumisele oma mikrokeskkonna 3D analoogidel [8]. Selle ja paljude sellele järgnevate tööde tulemusel on mõistetud juba valdkonnaüleselt, et karkass rakkude ümber ei ole vaid passiivne struktuur. Mikrokeskkond pakub rakule lisaks kasvufaktoritele ja teistele molekulaarsetele signaalidele mehaanilisi ja ruumilisi mõjureid. Rakke katvad adhesioonretseptorid annavad ümbritseva struktuuriga reageerides rakule edasi keemilisi signaale, mille mõjul suunatakse rakk diferentseeruma, paljunema migreeruma, geeniekspressioonini või hoopis rakusurma. [7]

Kollageen on kõige levinum polümeer inimese kehas, olles naha ning muu muskoskeletaalse koe peamiseks komponendiks. Kuna loomulik ECM koosneb paljudes kudedes, on see ideaalne materjal ka koetehnilisteks rakendusteks. Põhiliselt kollageenist valmistatud ekstratsellulaarsed maatriksid (ECM) on naturaalseks substraatideks rakkude kinnitumiseks, vohamiseks ning diferentseerumiseks, mis tõttu on see ideaalne materjal koetehnilisteks rakendusteks.[9] Kollageeni hüdrolüüsitud vormi, želatiini on juba mõnda aega kasutatud nanofiibritest mattide loomiseks. Sellised matid omavad mitmeid sarnasusi kehas endis leiduvate fiibrimaatriksitega. [10]

Tänu kõrgele reaktiivsusele on seda võimalik ristsidestada valiku erinevate vahenditega. Kaido Siimon tõi oma 2016 aasta doktoritöös välja, et just glükoosiga ristsidestatud elektrokedratud želatiin on eriti sobiv regeneratiivse meditsiini rakendusteks. [11]. Käesolevas lõputöös

arendatakse süsteemi glükoosiga ristsidestatud želatiinfiibritest rakukultuuris sobilike materjalide valmistamiseks ja kasutamiseks. Kirjanduse ning katsete abil leitakse üldised fiibrite valmistamiseks sobilikud lahuste ja elektroketruse seadme parameetrid. Nendest fiibritest luuakse erinevaid meetodeid testides käsnaalaadse struktuuriga poorsed materjalid. Lõpuks külvatakse loodud fiibrilistele substraatidele inimese naha fibroblastide ning viiakse läbi vaatlused saadud materjalide sobivuse esmaseks hindamiseks.

Käesolevas bakalaureusetöös koostas autor kirjanduse ülevaate, katsetas välja seadme ja lahuse parameetrid, mõtles välja ja testis uusi meetodeid mattide kandmiseks esitamiseks sobivale pinnale ja teostas mattide vaatlused skaneeriva elektronmikroskoobiga. Rakkude külvamine toimus autori abistamisega Paula Reemanni teostusel. Martin Järvekülg teostas skaneeriva elektronmikroskoobiga pildid mattidele kantud rakkudest, Paula Reemann koos Aigar Ottasega teostasid konfokaal fluoretsentsmikroskoobiga pildid värvitud rakkudest fiibrimatil.

Töö eesmärgid

- Üldparameetrite ja lahuse omaduste seadmine rakkudele sobilike fiibrite elektroketramiseks.
- Uurida parameetrite ja lahuste omaduste mõju fiibrite diameetritele, kinnituspunktide tihedusele ning fiibrite asetsemise tihedusele.
- Arendada välja meetod rakukülvamiseks valmis fiibrimattide loomiseks.
- Uurida, kas fiibrimatid omavad rakkude kasvuks soovitud kolmedimensionaalse kasvupinna omadusi.

Töös kasutatavad lühendid

SEM – Skaneeriv elektronmikroskoop

PBS – Fosfaatpuhverdatud soolalahus

Glc – Glükoos

ECM – Ekstratsellulaarne maatriks

2D – 2-dimensionaalne

3D – 3-dimensionaalne

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Biopolümeerid ja želatiini valik

Inimese kehas on kollageen kõige laialdasemalt esinev valk, olles peamiseks naha ja muskuloskeletaalkudede komponendiks. Kollageen on pulkjat tüüpi polümeer, ligi 300 nm pikk molekulmassiga 300 kDa. Kollageen on happelistes vesilahustes lahustuv ja seda on võimalik töödelda erinevatele kujudele, nagu lehed, käsnaad, vahud, nanofiibrilised maatriksid, pulbrid, viskoossed lahused ja dispersioonid. [9]

Kollageeni suure reaktiivsuse tõttu, mis tuleneb erinevate funktsionaalsete rühmade sisaldusest, on seda võimalik ristsidestada suure valiku ainetega, nagu aldehüüdid, karbodiimiidid ja polüepoksü ühendid. Ristsidestamine võib toimuda termo või kiiritustöötlusel, või keemilisel modifitseerimisel. Poorsuse, tiheduse ja lagunemise kiirust kontrollides on võimalik kontrollida ka näiteks kollageenil põhinevate materjalide sisse laetud ravimite manustamist. Peamised kollageeni allikad praegu biomeditsiinilises kasutuses on sea või veise nahk. [9]

Želatiin, mida saadakse kollageeni osalise hüdrolyüüsi teel, on tuntud biosobiva, kollageenist odavama ning hästi töödeldava materjalina. Želatiini molekulid on väga erinevate pikkustega. Kuigi kollageeni esineb mitmel erineval kujul siis želatiini toodetakse vaid Tüüp I kollageenist, mis tavaliselt ei sisalda tsüsteini. Nii kollageen kui ka želatiin on laialt kasutuses biopolümeeridena, kuid želatiin on osutunud populaarsemaks valikuks. Želatiini kasuks räägib ka sellel tööil nii hind, lihtsam töödeldavus, materjali suurem kasutatus seotud töödes ning võimalus valida erinevate geelitugevuste vahel. [10-12]

Kollageeni hüdrolyüüsituse astmest sõltub tekkivate želatiinivalkude suurus. Nende suurusest sõltub aga geelitugevus, mis on Bloomi numbrites mõõdetav geeli pinna läbimiseks vajaminevat jõudu iseloomustav suurus. Geelitugevus kasvab lineaarses korrelatsioonis Bloomi numbriga. [12]

1.2. Elektroketrus

Elektroketramine on tõhus meetod polümeeridest nanofiibrite loomiseks, mis kasvava huviga nanotehnoloogia vastu on leidnud ühe enam kasutust. Antud töös kasutatud seadet ning ketramise läbiviimist kirjeldatakse töö Meetodite osas.

Elektroketramise meetodi korral on väga oluline asjaolu, et kuigi see tehnoloogia on olnud olemas juba üle poole sajandi, siis ei ole siiani eriti konkreetseid andmeid selle parameetrite ega nende mõju fiibritele kohta. [13]

Probleem seisneb muudetavate ja ka raskesti kontrollitavate tegurite mitmuses. Mõju on lahuse ja polümeeri omadustel nagu viskoossus, polümeeri molaarmass, kontsentratsioon, lahuse juhtivus, kasutatava polümeeri kvaliteet ja omadused, lahuse vanus ja muud. Lihtsamalt varieeritavad on seadme parameetrid nagu elektrivälja tugevus, kaugus nõela ja kollektori vahel, nõelaotsa kuju ning diameeter ning lahuse väljutamise kiirus. Eriti keeruline on kontrollida aga atmosfäärilisi mõjusid nagu temperatuur, õhuniiskus, ja -rõhk. Seniks kuni ei ole teada täpseid suhteid kõikide nende parameetrite omavaheliste suhete vahel ning kuni ei ole seadet, mis võimaldab kõiki neist jääb elektroketramise protsessi sisse mõningane juhuslikkus. [11,13]

Kirjandusest võib leida üldiseid kirjeldusi mõnede parameetrite mõjule. Fiibrite läbimõõtu tõstab viskoossuse tõstmine, polümeeri kontsentratsiooni tõstmine, kõrgema pinge rakendamine. Kõigil neist on aga konkreetsest polümeerist ja muudest parameetritest sõltuv lagi, mida ületades tõuseb defektide arv või esineb muid probleeme. [13] Polümeerlahuse seistes sellest loodavate fiibrimaatriksi mehaaniline tugevus langeb kiirelt [11].

1.3. Ekstratsellulaarne maatriks

Ekstratsellulaarne mikrokeskkond, mis rakke ümbritseb ja molekulaarseid signaale sisaldab on võrgustik kolme peamise mõjuteguriga: lahustumatud hüdraatunud makromolekulid (fibrillaarsed proteiinid nagu kollageen, glükoproteiinid nagu elastiin ja laminiin ning hüdrofiilsed proteoglükaanid); lahustuvad makromolekulid (kasvufaktorid, kemokinees, tsütokinees) ja naaberrakkudel olevad valgud. Seega on raku otsus diferentseeruda, paljuneda,

migreeruda, apoptoosi minna või teisi spetsiifilisi funktsioone teostada koordineeritud vastus molekulaarsetele mõjudele nende ECM mõjuteguritega. [14]

http://dspace.ut.ee/bitstream/handle/10062/41981/2014_Patrael_Kristiina.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Struktuuri poolest võib ECM-e vaadelda geelidena, mis koosnevad erinevates proteiini fibrillidest ja fiibritest, mis on seotud kokku hüdraatunud glükosaminoglükaani ahelate võrgustiku abil. Kõige elementaarsemaks on struktuurne funktsioon. Kombineerituna interstitsiaalse vedelikuga suudavad need taluda fibrillide abil tõmbe ja hüdraatunud võrgustiku abil survejõude. Väärrib märkimist, et nendes mehaaniliselt küllaltki robustsetes struktuurides on tahket materjali tihti vaja alla 1%. [14]

Struktuuriliste proteiinide hulgas on kollageenid, millest osad on pikad ja jäigad ning omavad struktuurilisi funktsioone, samas kui mõned on siduvate ja tuvastamise funktsioonidega. Raku pinnal olevad retseptorid loovad tiheda ühenduse tsütoskeleti ja ECM vahel, mille kaudu saab rakk mehaanilisi signaale oma keskkonnalt. Sellest tulenevalt mõjutavad ECM biofüüsilised omadused otseselt rakkude erinevaid funktsioone nagu adhesioon ja migratsioon. [15]

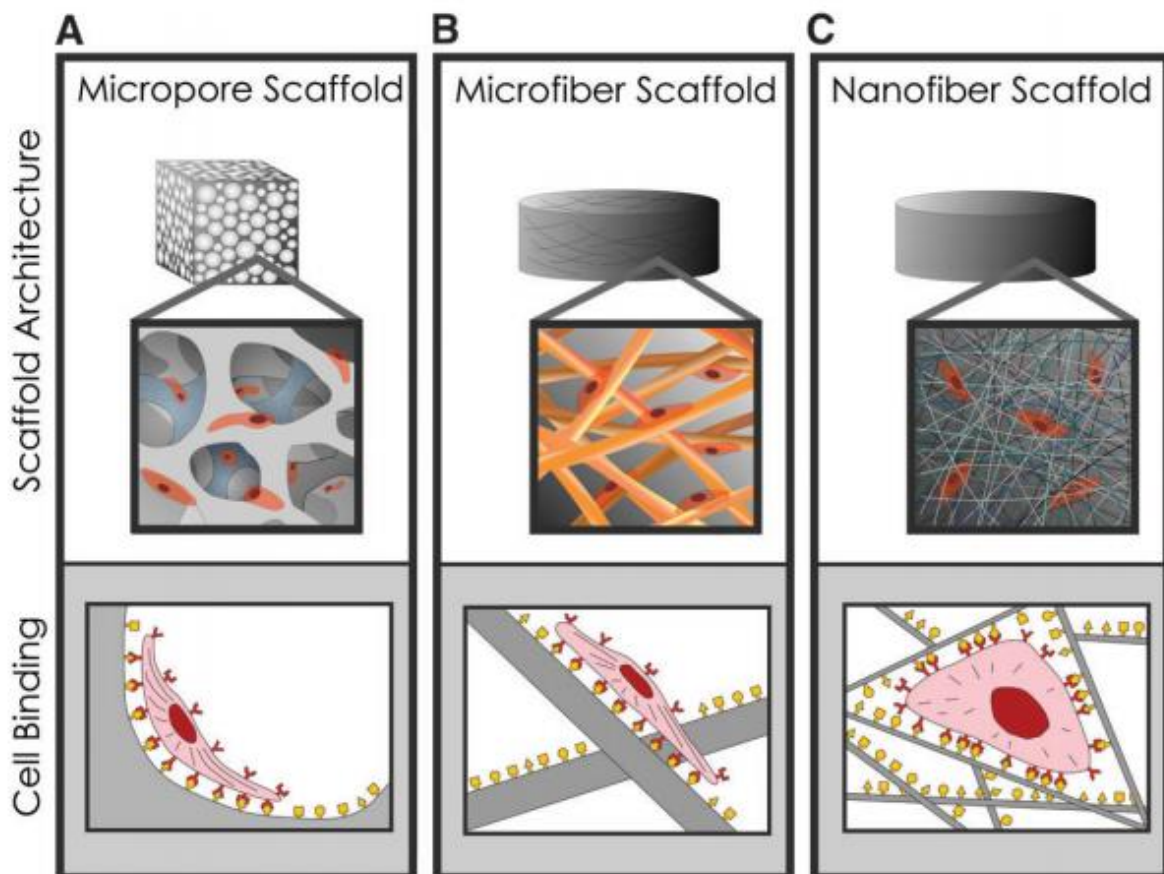
Rakkude ja kudede kasve toetavaid kunstlikke biomaterjalide võrgustikke luues on tavapäraselt üritatud sobitada omadusi päris organites olevatega makroskoopilisel tasandil. Kehas pakub aga ECM struktuur nanoskaalas rakkude toetamiseks ja käitumise juhendamiseks keerulisi nanofiibrite võrgustikke. [16]

1.4. Raku kuju seos selle kasvu, füsioloogia ning kasvukeskkonnaga

Arusaam, et rakkude käitumise uurimiseks on tarvis spetsiifilisi mikrokeskkondi on saanud juba ammu. Rakkude kasvatamise süsteemid imiteerivad *in vivo* olukordi, kuid märkimisväärselt vähendavad nende kompleksust. Mitmetes rakukultuuride uuringutes on veel kasutusel 2D *in vitro* proove, kuid on kasvanud nõusolek, et 3D maatriksite kasutamine pakub füsioloogilisteks uuringuteks paremat mudelsüsteemi. Seda tõendab mitmete rakuprotsesside, nagu morfogenees, organogenees ja kasvajate areng, toimumine vaid ruumilistes struktuurides. [14]

Raku kuju on raku kasvu ja füsioloogia tugev regulaator. Näiteks on muutused rakukujus välja toodud kui potentsiaalsed müokardilist arengut mõjutav mehhanism ja kapillaarsete endoteelrakkude kasv ja diferentseerumine on mõjutatud ECM esile kutsutud muudatuste poolt raku kujus. [17]

Kõige tavalisemad näited raku kuju mõjust diferentseerumisele on välja tulnud 3D kultuuride arengust, mis tavaliselt kutsuvad esile ümaramad, kerakujulised rakumorfoloogiad, võrreldes standardse 2D kultuurisüsteemiga. Näiteks viib kondrotsüütide kasvatamine 2D kultuuris lameda kujuni ning kondrotsüütiline fenotüüp liigub rohkem fibroblastilise suunas, samas kui see fenotüüp säilib 3D kujul kasvatades rakke graanulitena või geelikapslites. [17]



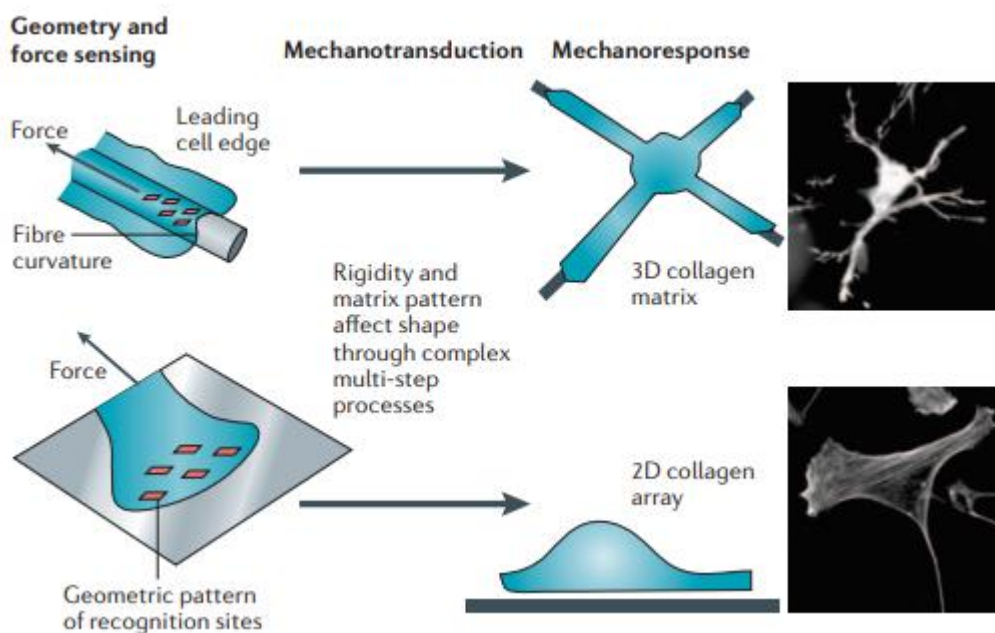
Joonis 1 Karkassi mõju rakkude kinnitumisele ja hajumisele. [18]

Rakud, mis kinnituvad mikroskaalas olevale karkassile lähevad lamedaks ning levivad sarnaselt tasasel pinnal kasvamisele (vt Joonis 1a ja 1b) nanoskaalalise ehituse puhul on valke adsorbeeruv pind suurem, pakkudes mitmeid seondumiskohti rakumembraani retseptoritele (vt Joonis 1b). [18]

Selliseid ehitusi saab saavutada kasutades naturaalselt saadud biopolümeere nagu elastiin ja kollageen. Nende abil elektrokedratud nanofiibrid võimaldavad integreeritud 3D nanokiududest maatriksite tootmist, millel on kõrge poorsus, suur ruumiline seonduvus, ja kontrollitud kiudude joonduvus raku orientatsiooni ja migratsiooni juhtimiseks. [18]

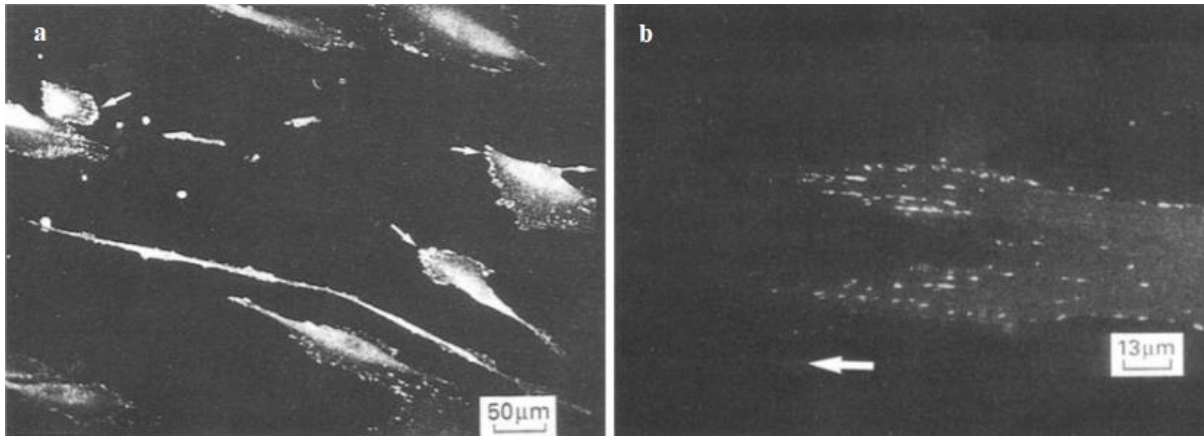
3D rakukultuur pakub 2D keskkonna suhtes lisadimensiooni välisteks mehaanilisteks sisenditeks ja raku kleepumiseks, mis mõjutab väga palju integriinide sidumist, rakkude kokku tõmbumist ja nendega seotud rakkudevahelist signaliseerimist. [16]

Rakud pingestavad maatriksid koe ümbertegemisel, morfogeneesis ja diferentseerumisel. Maatriksi jäikus, lisaks integriin-ligand sidemetele, mis rakk oma ümbritsevaga loob, dikteerib ulatuse, millega rakk suudab ümbritsevat kokku tõmmata, selles migreeruda ning kui suurt rakkudevahelist pinget need suudavad genereerida. Mida jäigem on maatriks seda keerulisem on rakkudel seda kokku tõmmata, mis toetab osasid rakufunktsioone ja inhibeerib teisi. [16]



Joonis 2 Inimese fibroblasti käitumine kollageenkiul ja kollageeniga kaetud alustel [19]

Eukariootsete rakkude kuju on defineeritud tsüklilise mehaanilise pinge tajumise, tõlgendamise ja sellele reageerimise teel. Lokaalsed jõu või geomeetria tajumine tõlgendatakse biokeemiliseks signaaliks, mis kutsub esile reaktsioone raku. Need reaktsioonid mõjutavad rakkude kasvu, diferentseerumist, kuju muutusi ja rakusurma. [19]



Joonis 3 Inimese fibroblastid struktureeritud silikoonil [20]. Valged täpid tähistavad fokaalkontakte

Struktureeritud kasvupinna korral orienteeruvad rakud „kontaktse juhtimise“ teel mööda pinnastruktuure. Sellised pinnad võivad fibroblasti oluliselt välja venitada (vt Joonis 3a). Mööda struktuuri ronimiseks seovad fokaalkontaktides olevad retseptorid raku struktuuriga, rakule järele liikumisel saavutab järgmine kontakt puute struktuuriga. Orienteerituse puudumisel (vt Joonis 2) vajub samasugune fibroblast pinnale ühtlaselt laiali, keskele jääb rakutuuma sisaldav kühm. [20]

2. Metoodika

2.1. Želatiinmaatriksi valmistamine

Töös kasutati Sigma-Aldrichist ostetud A tüüpi seanahast toodetud želatiini, glükoosi ja äädikhapet. Enamik protsessiparameetreid võeti üle Kaido Siimoni 2016 doktoritööst [11] ja täiendati Martin Järjekülje poolt enne töö algust. Želatiinlahuse valmistamiseks lisati 3.2 ml 10M äädikhappe vesilahusel 1g želatiini ja 0.2g glükoosi. Eksperimentide hilisemas järgus loodi proove ka madalama ja kõrge glükoosisisaldusega.

Süstal lahusega asetati New Era Pump Systems NE-511 pumbale. Süstla nõelalt viiliti ära teravik ning ääred siledaks, võimalikult ühtlaseks tilga käitumiseks. Süstla täitmisel eemaldati sellest õhumullud, et need protsessi segama ei jääks. Pumpa kasutati kiirustel 4-10 $\mu\text{l}/\text{min}$ ning rakendati kõrgeid pingeid (17-20 kV). Maandatud kollektor asetati 15 – 25 cm kaugusele nõela otsast. Elektroktramist sooritati õhukeste klaase katvate mattide puhul 10 minutit, purustamisele minevate fiibrite puhul kuni kaks tundi.



Joonis 4 Tartu Ülikooli Nanostruktuuride labori elektroktramise seade

Mikropumba ühtlasel lahuse väljutamisel (vt Joonis 4c) tekib nõela otsa tilk, mis laadub kõrge pinge abil (vt Joonis 4b). Laetud juhtiva lahuse juga tõmmatakse maandatud juhtivale kollektorile (vt Joonis 4a) ja moodustub želatiinmaatriks.

Glükoosi ristsidemete loomiseks hoiti želatiinmaatrikseid 1 tund 180C ahjus.

2.2. Kasutatud tehnikad

Fiibrimattide vaatlemiseks kaeti need kulla ja pallaadiumi 4-6 nm kihiga ning analüüsiti Tescan Vega SEM all.

Rakkudega kaetud mattide vaatlemiseks viidi läbi etanooligradient ja kriitilise punkti kuivatus CO₂-ga. Läbi viidi 50 tsükli, et tagada proovi võimalikult vähene deformeerumine. Pind kaeti 5 nm kulla ja pallaadiumi kihiga. Kasutati täisautomaatset kriitilise punkti kuivatit Leica CPD300.

Fiibrite purustamine sooritati IKA T25 digitaalse ULTRA-TURRAX mikseriga 23kHz pööratel.

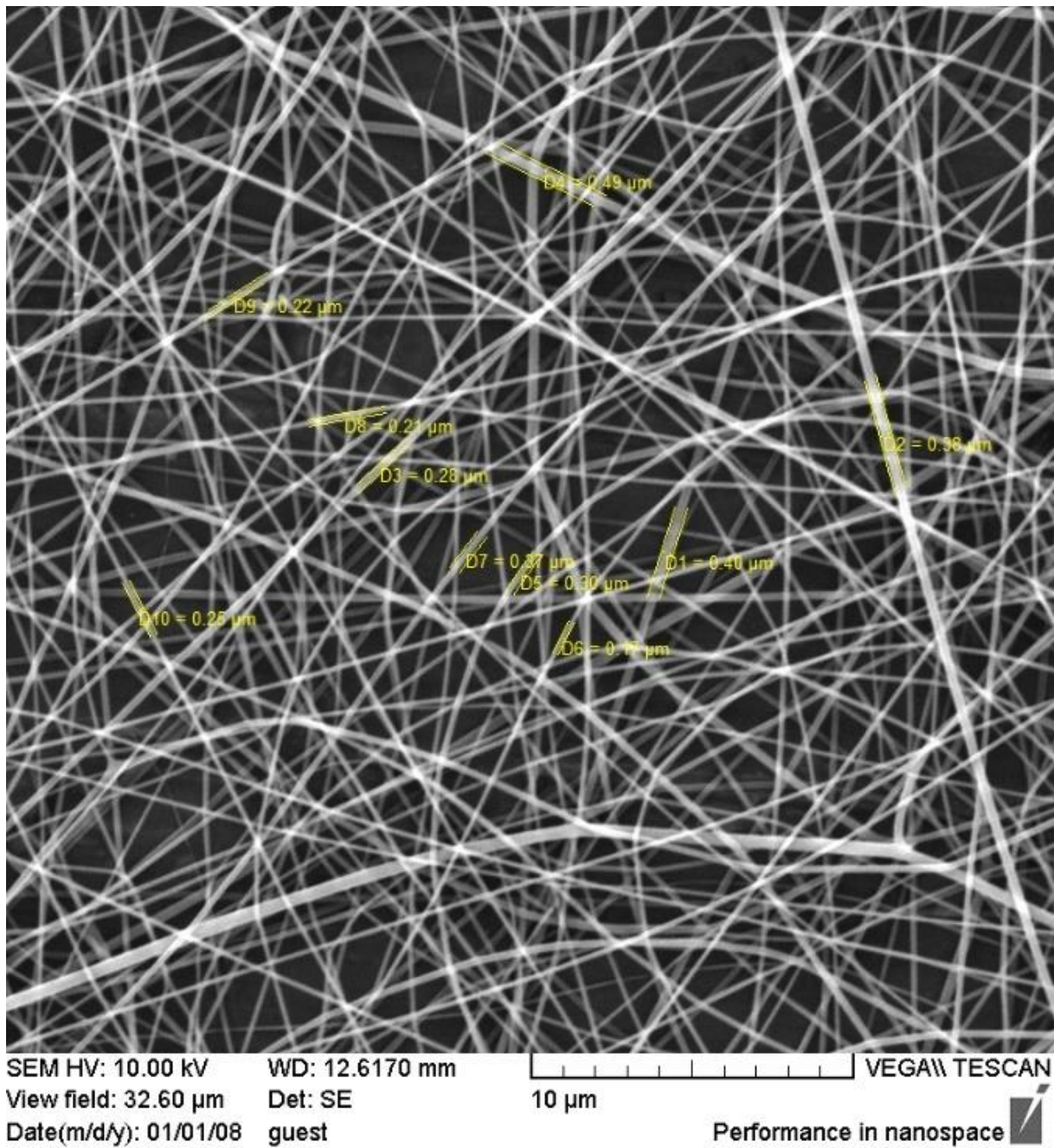
3. Eksperimentaalne osa

3.1. Üldparameetrite seadmine

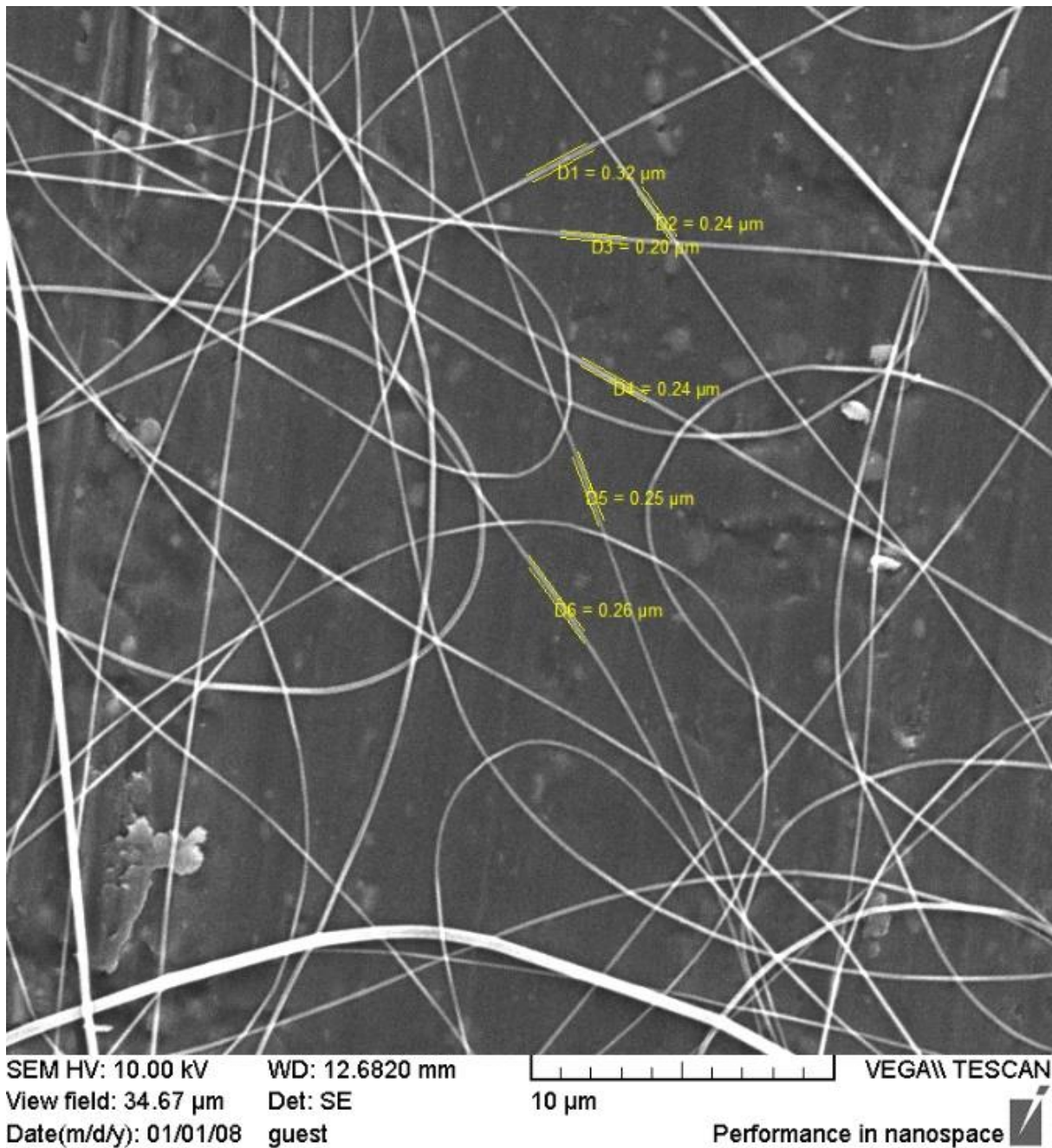
Kirjandusest võib leida konkreetseid katselisel teel leitud elektroketrusel kasutatavaid parameetreid ja suuruseid, mis on välja toodud ka töö metoodika osas. Kuna elektroketruse protsessi mõjutab üheaegselt mitmeid tegureid, mis võivad erinevatel aegadel ka täpselt samade seadmete puhul erinevates laborites varieeruda, siis on enamasti vajalik parameetrite peen-justeerimine eksperimendi käigus..

Fiibrimati valmistamisel võib peamiseks tehnilisteks suurusteks lugeda maandatud aluse kaugust pingestatud nõela otsast, nõelale rakendatavat pinget ja lahuse nõelast väljutamise kiirust (voolukiirust). Esimese ülesandena mattide arendustöökis viidi läbi nende optimeerimine.

Optimaalse kauguse määramiseks kasutati lahuses 1g 90 – 110B želatiini, 0.2g glükoosi ning 3.2ml 10M AcOH vesilahust. Pingeks seati 18 kV ning voolukiiruseks 10 µl/min. Testitavad kaugused olid 15; 20 ja 25 cm. Valik katab ära nii kirjandusest kui laboripraktikast väljatuleva ulatuse, ei leitud aga mõtet protsessi selles järgus aga sammu väga väikeseks teha, kuna teiste parameetrite muutmisel võis eeldada tulevast vajadust kaugust samuti korrigeerida. Testitavate kaugustega plaaniti saada parem pilt antud parameetri mõjust antud lahusele ja olukorrale. Kollektorina kasutati toidukilega kaetud fooliumalust. Kedrati 10 minutit.



Joonis 5 SEM pilt fiibrimatist elektroktramisel süstla ja kollektori 15 cm vahekaugusel.



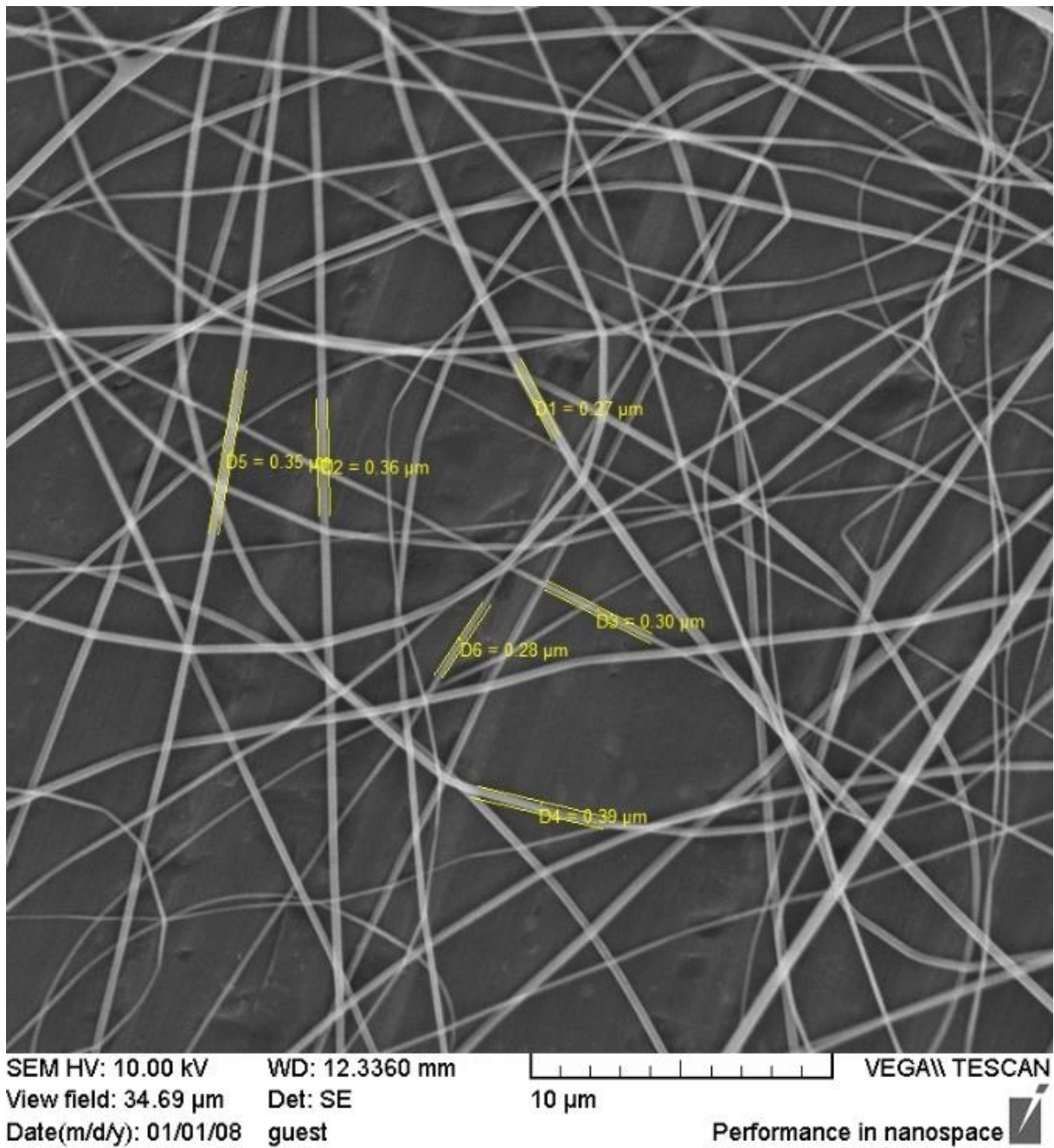
Joonis 6 SEM pilt fiibrimatist elektroktramisel süstla ja kollektori 25 cm vahekaugusel.

Lähedal kedratud fiibrid (vt Joonis 5) olid suuremate, sobivamate diameetritega, kuid fiibrid kinnitusid ristumiskohtades mitmekesi üksteise peale, mis fiibrite tükides lõikamisel hiljem probleeme võivad tekitada. Lisaks leidus matil oluliselt suurema diameetriga, tõenäoliselt lindiks tõmmatud fiibreid, mis üldist homogeensust vähendavad ja on etteaimatu mõjuga mati funktsiooni suhtes. Lintide tekkimine tulenes tõenäoliselt liiga tugevalt lahuse alusele tõmbamisest, mis lühikese lennutee ja tugeva jõu tõttu ei võta soovitud kuju.

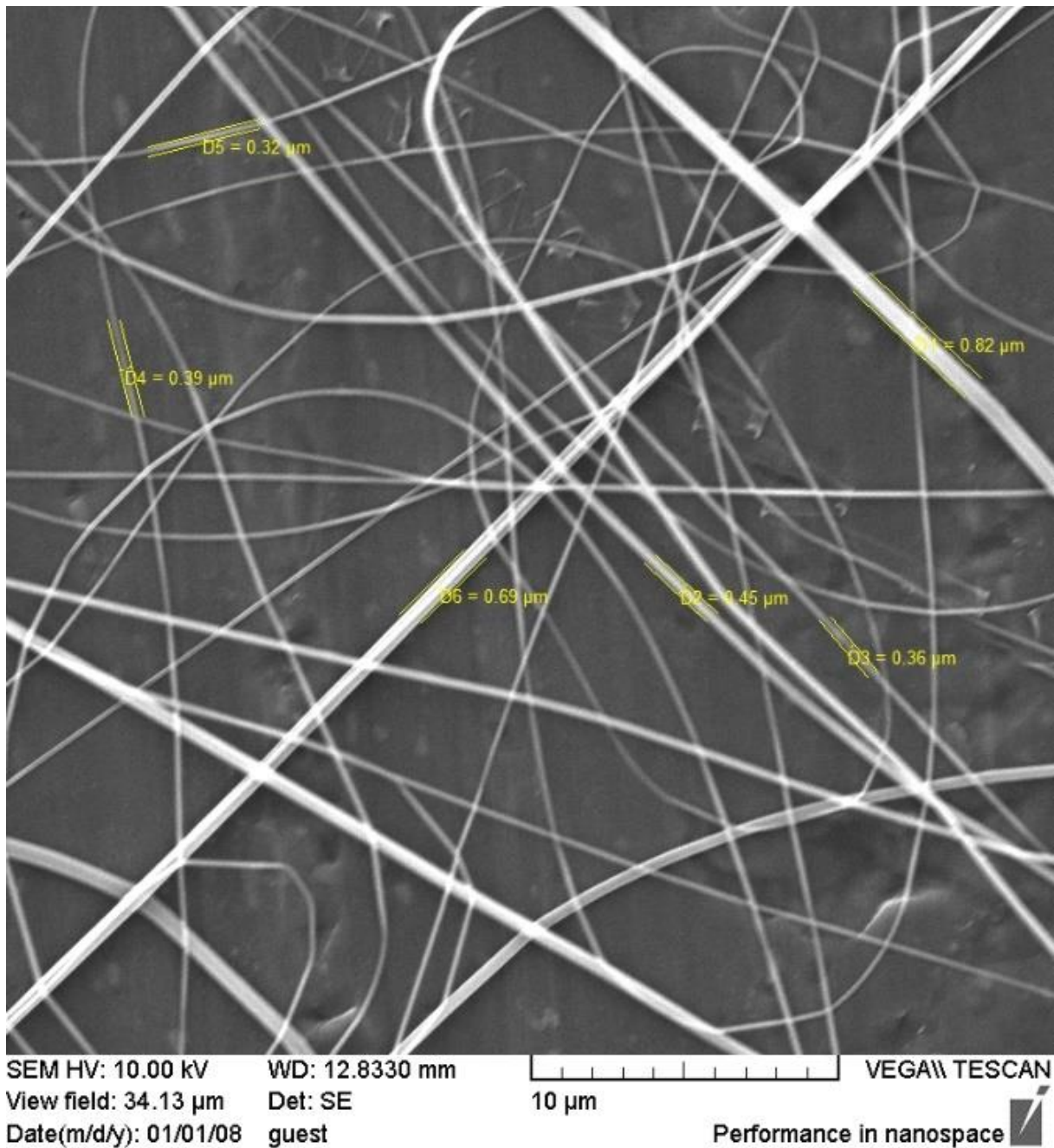
Suuremal kaugusel ketramine (vt Joonis 6) hästi ei toiminud, fiibreid matile jõudis vähe ning need ei olnud ühtlase suurusega. Lisaks olid üldiste mattide diameetrid väiksemad. Sellisel kaugusel paistis, et kuigi lahusest tõmmati fiiber, ei jõua enamik neist aluseni välja lennata, vaid kukuvad laua pinnale. Lisaks tekkis ketramise ajal pinge väiksema tõmbava mõju tõttu suurem tilk, mis tahkus nõela otsa ning millest lahust tõmmati ebaühtlaselt, tõmmates vahepeal lahti suurema tilga ning siis jälle fiibreid vähem tõmmates tilgaks nõela otsa kogunedes.

Ootuspäraselt kõige sobivamaks osutus keskmiselt, 20 cm kauguselt ketramine – esines 15cm kaugusega võrreldes vähem fiibrite kuhjumist ristumispunktides, kuid fiibrite diameetrid jäid võrdlemisi sarnaseks, matt oli kasvanud võrdlemisi sama paksuks ning ei olnud silmajäävaid eripärase suuruse või kujuga fiibreid. See kaugus võetakse edasises töös kasutusele.

Seades nõela esimeses leitud sobivaimale 20 cm kaugusele, katsetati rakendatavate pingete mõju. Pingeteks valiti 17; 18; 19 ja 20kV. Lahuse voolukiirus vähendati 8 μ l/min peale. Voolukiirust vähendati, kuna esimeste katsete käigus oli ilmne, et fiibrite tõmbamise kiirus on oluliselt madalam voolukiirusest – lahust tilkus nõelalt maha ning nõelaots vajab pidevat tahkunud lahuse eemaldamist. Ketramise ülejäänud tingimused ning lahus hoiti samad kauguse leidmise katsega.

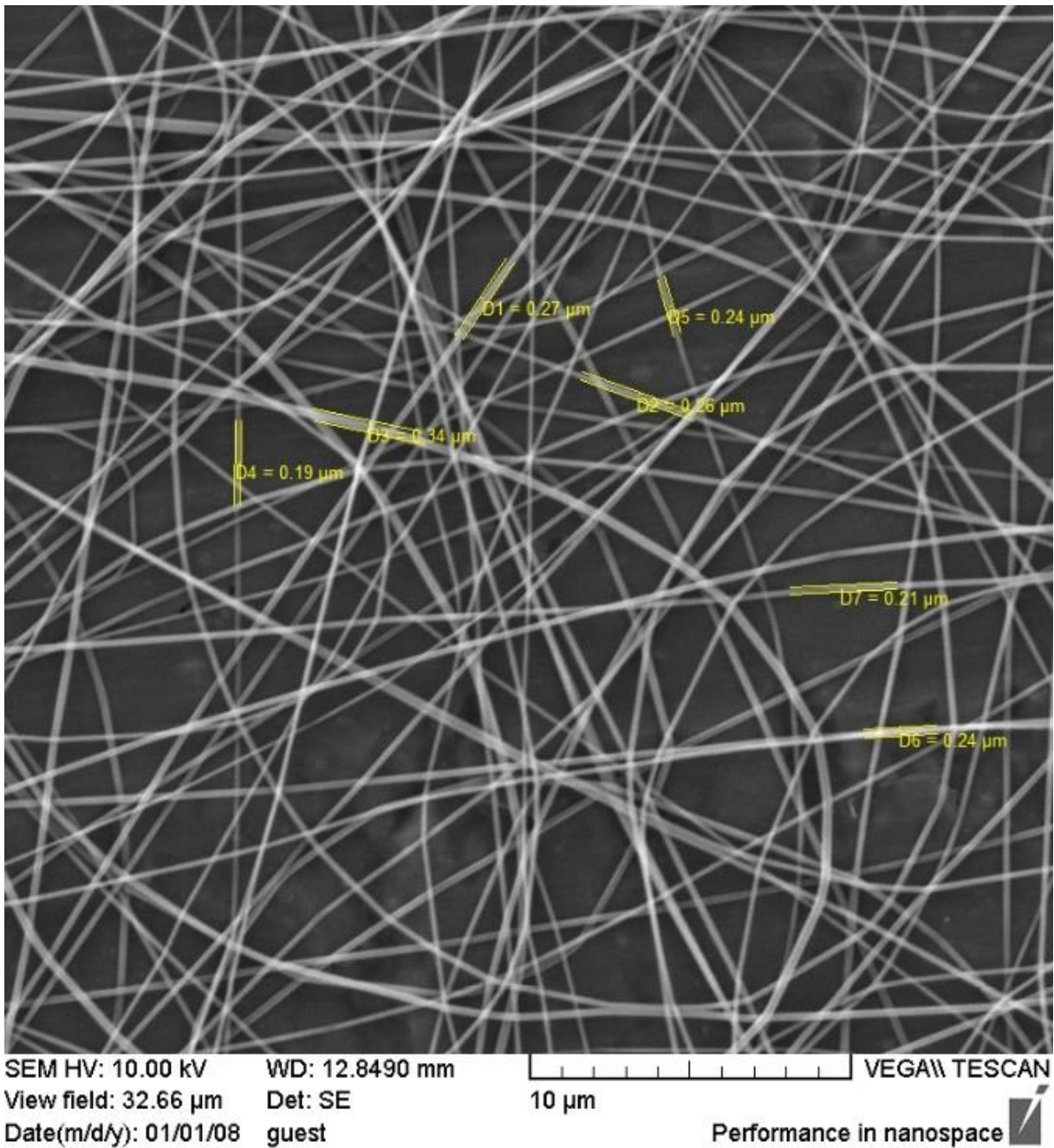


Joonis 7 SEM pilt fiibrimatist elektetroketramisel süstlale 17kV pinge rakendamisel.

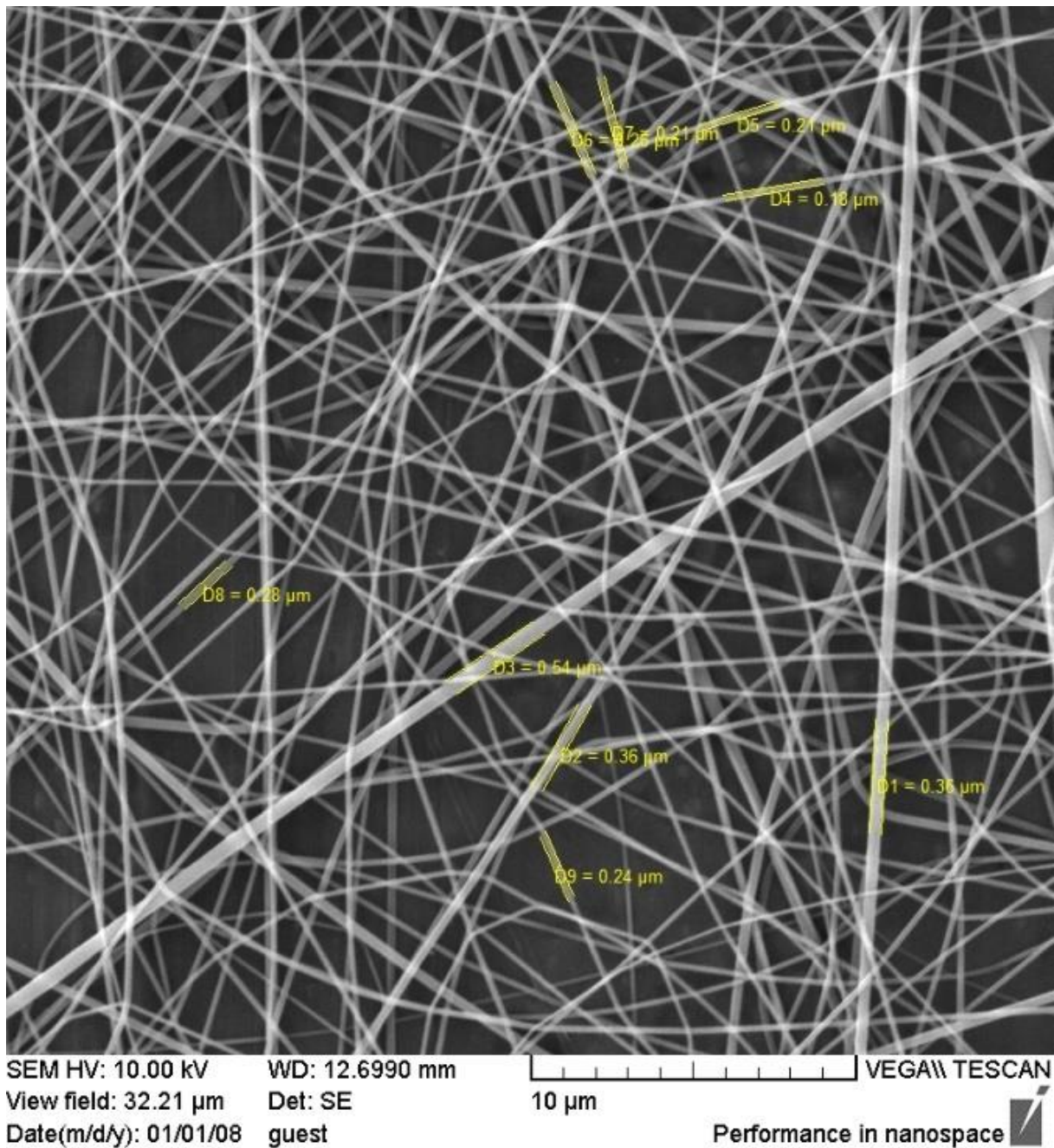


Joonis 8 SEM pilt fiibrimatist elektetroketramisel süstlale 18kV pingel rakendamisel

Madalamad pinged (vt Joonis 7 ja 8) jäeti kohele kõrvale, kuna mati ketramise kiirus oli äärmiselt aeglane, mis muudab nende pingete kasutamise kohele ebapraktiliseks. Sellele lisaks olid fiibrid 18kV puhul äärmiselt varieeruvate diameetridega, kuid siin võib eeldada veel mingisugust muud lisaprobleemi mati moodustamisel, kuna sarnaseid probleeme ei esine ei madalamal ega kõrgemal pingel.



Joonis 9 SEM pilt fiibrimatist elektetroketramisel süstlale 19kV pinge rakendamisel



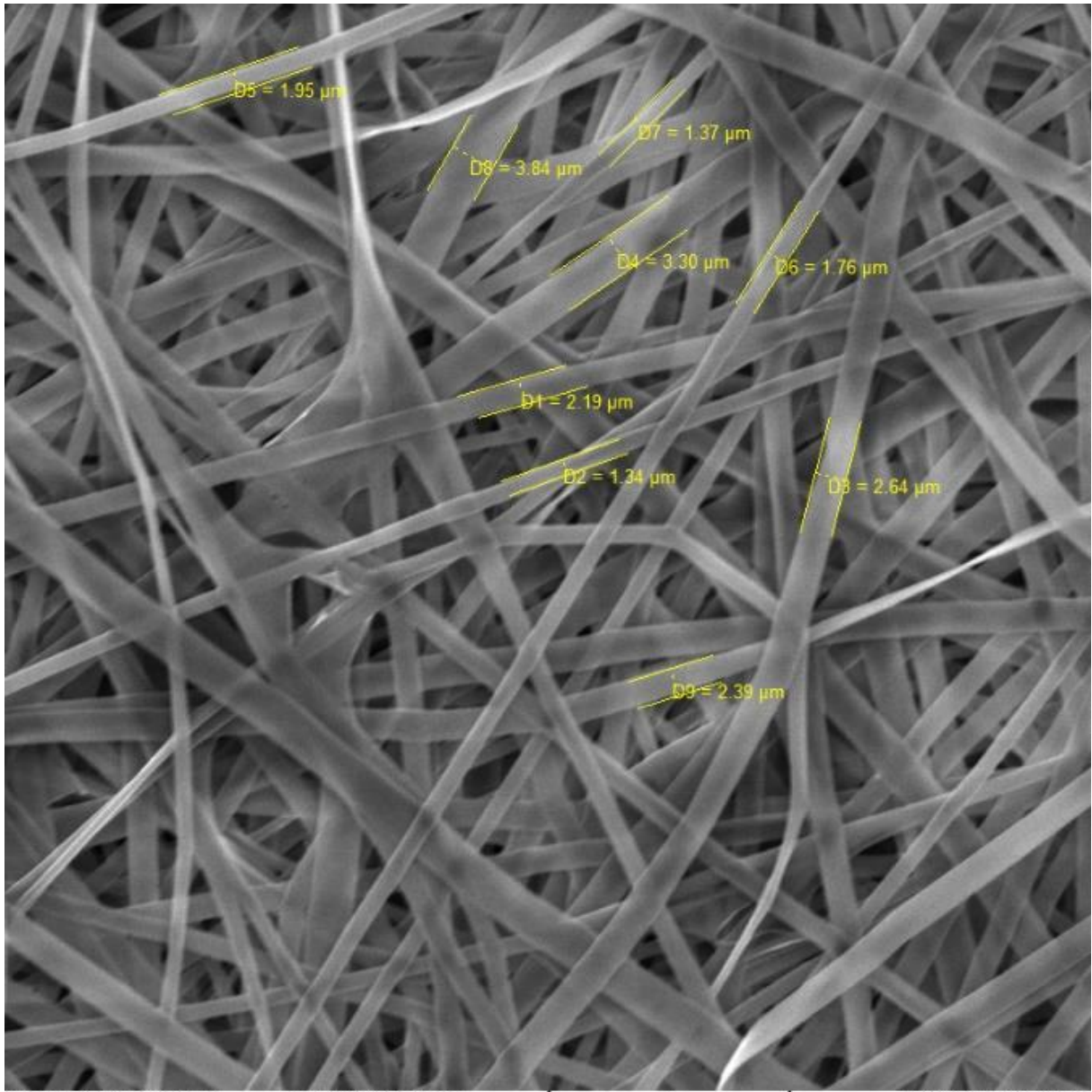
Joonis 10 SEM pilt fiibrimatist elektroktramisel süstlale 20kV pingel rakendamisel

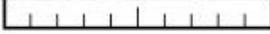

Kõrgematel pingetel (vt Joonis 9 ja 10) oli mati moodustumise kiirus oluliselt parem. 20 kV juures oli mati ketramise kiirus selgelt kiirem, kuid esinesid taaskord suurema diameetriga linnid. Lisaks rääkis suurema pingega vastu varasem kogemus –pingetel üle 20 kV oli seadmel tekkinud läbilööki nõelalt pumpa, mis nii pumpa kui juhtmestikku kahjustab. 19 kV juures tekkinud matt ei tekkinud küll kõike optimaalsema kiirusega, kuid paistab küllaltki ühtlane ning selle kasutamine tundus olemasoleva seadme juures mõistlikum.

Ka pinge katses oli lahuse voolukiirus jäänud selgelt liiga kõrgeks, mis tõttu jätkati selle vähendamist. Vahepeal valmistati mitmeid proove kasutamiseks ja uurimiseks muudes laborites, mille käigus järjest korrigeeriti lahuse voolukiirust, kuni jõuti umbes 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ juurde. Seda voolukiirust korrigeeriti jooksvalt veel 3.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ juurde, üritades hoida võimalikult suurt voolukiirust, nii et oleks võimalikult pikad perioodid ketramise ajal, kus nõela otsas püsiks ühtlane tilk, millest fiibreid tõmmatakse. Valitud voolukiirusel saavutati selline olukord kuni pooleks tunniks korraga, edasine voolukiiruse langetamine võiks hakata aga piirama juba mati moodustamise kiirust ning ei paistnud otseselt tilga omadusi parandama.

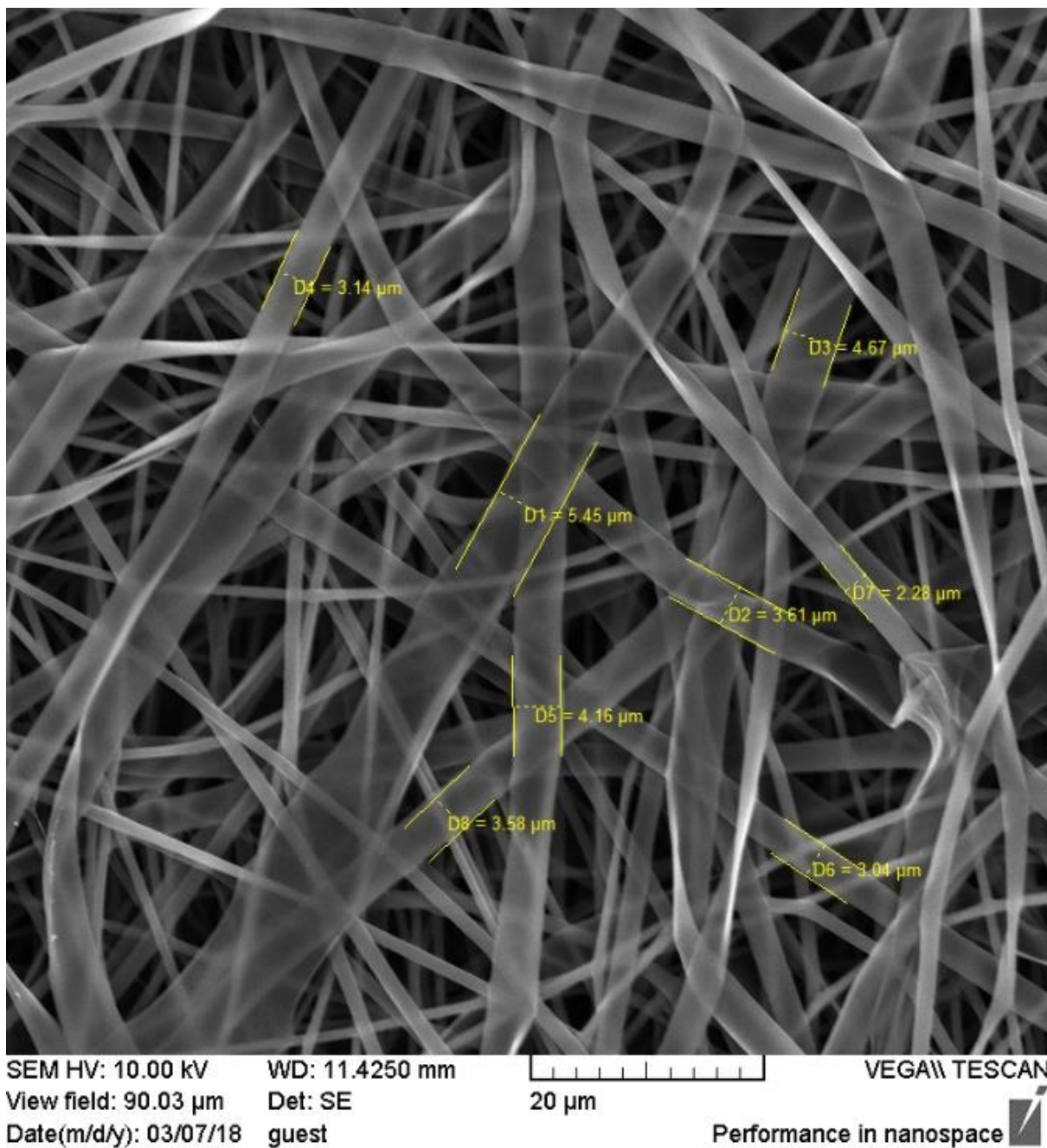
3.2. Želatiini valik

Varasemast laboripraktikast oli seni kasutusel olnud olemasolevast valikust madalaima, 90-110 bloomi geelitugevusegaželatiin. Järgmise sammuna sai töös määratud, milline on meie tööks kõige sobivam. Selles etapis eelistasime suuremat, ligi mikroni suurust fiibri diameetrit, sest see võiks eelduste kohaselt sobida hõredamate substraatmaterjalide valmistamiseks.



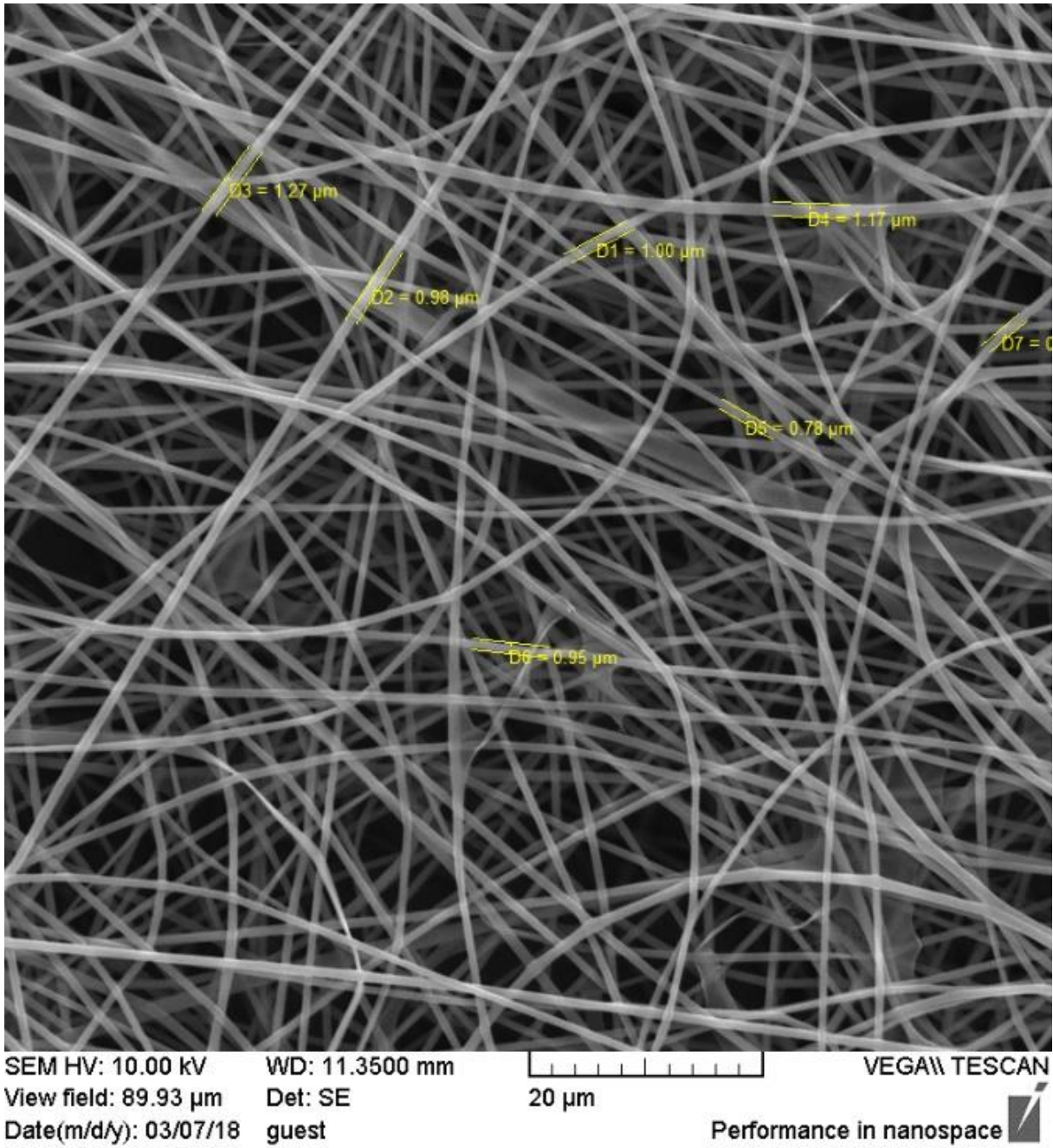
SEM HV: 10.00 kV WD: 11.4510 mm  VEGA\\ TESCAN
View field: 90.11 μm Det: SE 20 μm
Date(m/d/y): 03/07/18 guest Performance in nanospace 

Joonis 11 SEM pilt geelitugevusega 300 bloomi kedratud matist

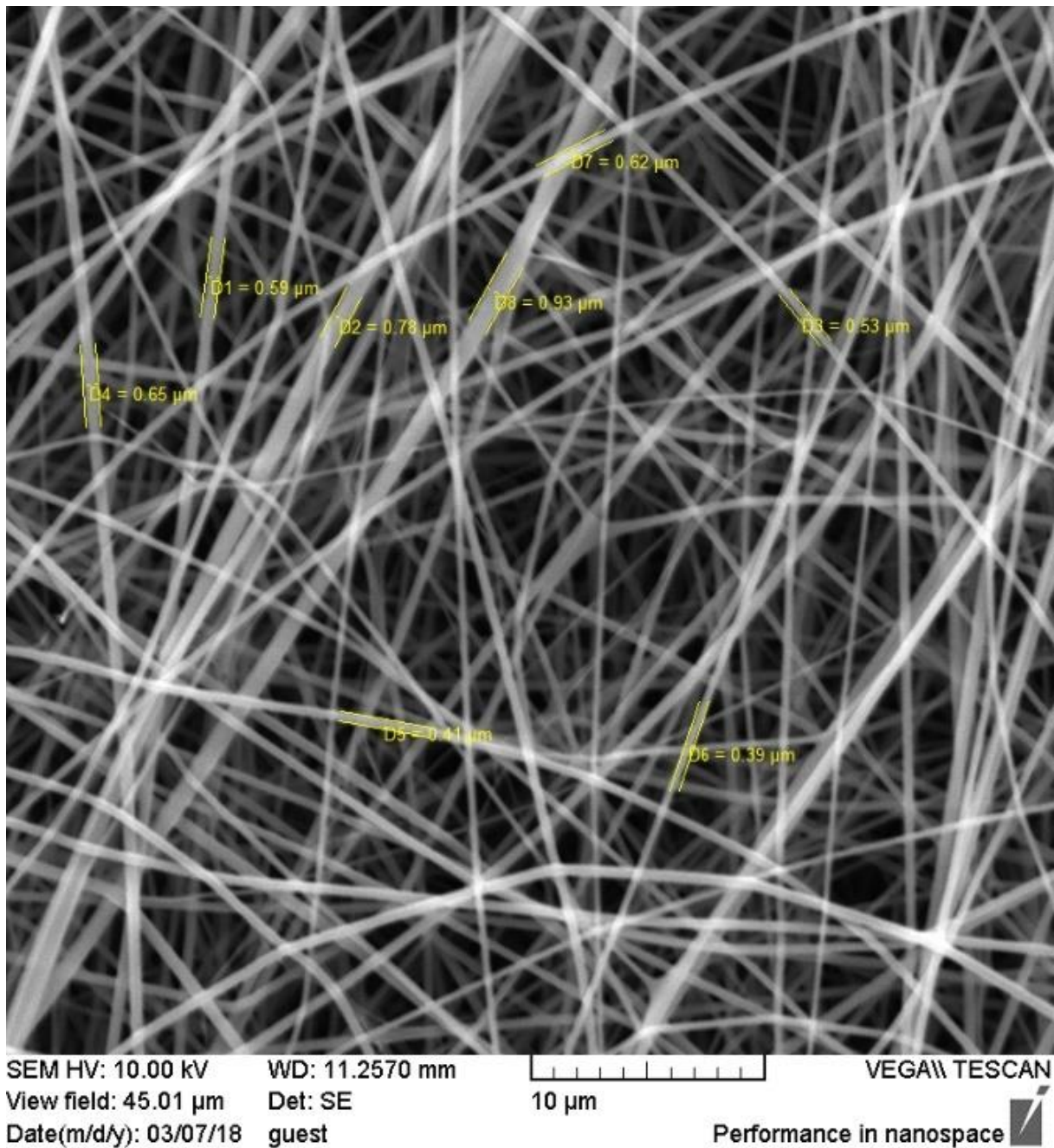


Joonis 12 SEM pilt geelitugevusega 240 – 270 bloomi kedratud matist

Pikemate polüpeptiidide (vt Joonis 11 ja 12) korral tekkisid fiibrite asemel selgelt lintjad ribad, mis ei ole antud töös kuidagi sobivad, mis tõttu nende kasutamine vähemalt seni valitud parameetrite korral välistati. Antud lahused olid väga kõrge viskoossusega ning on võimalik, et näiteks happelahuse lisamise abil saab seda korrigeerida sobivamaks ketramise jaoks.



Joonis 13 SEM pilt geelitugevusega 170-195 bloomi kedratud matist.

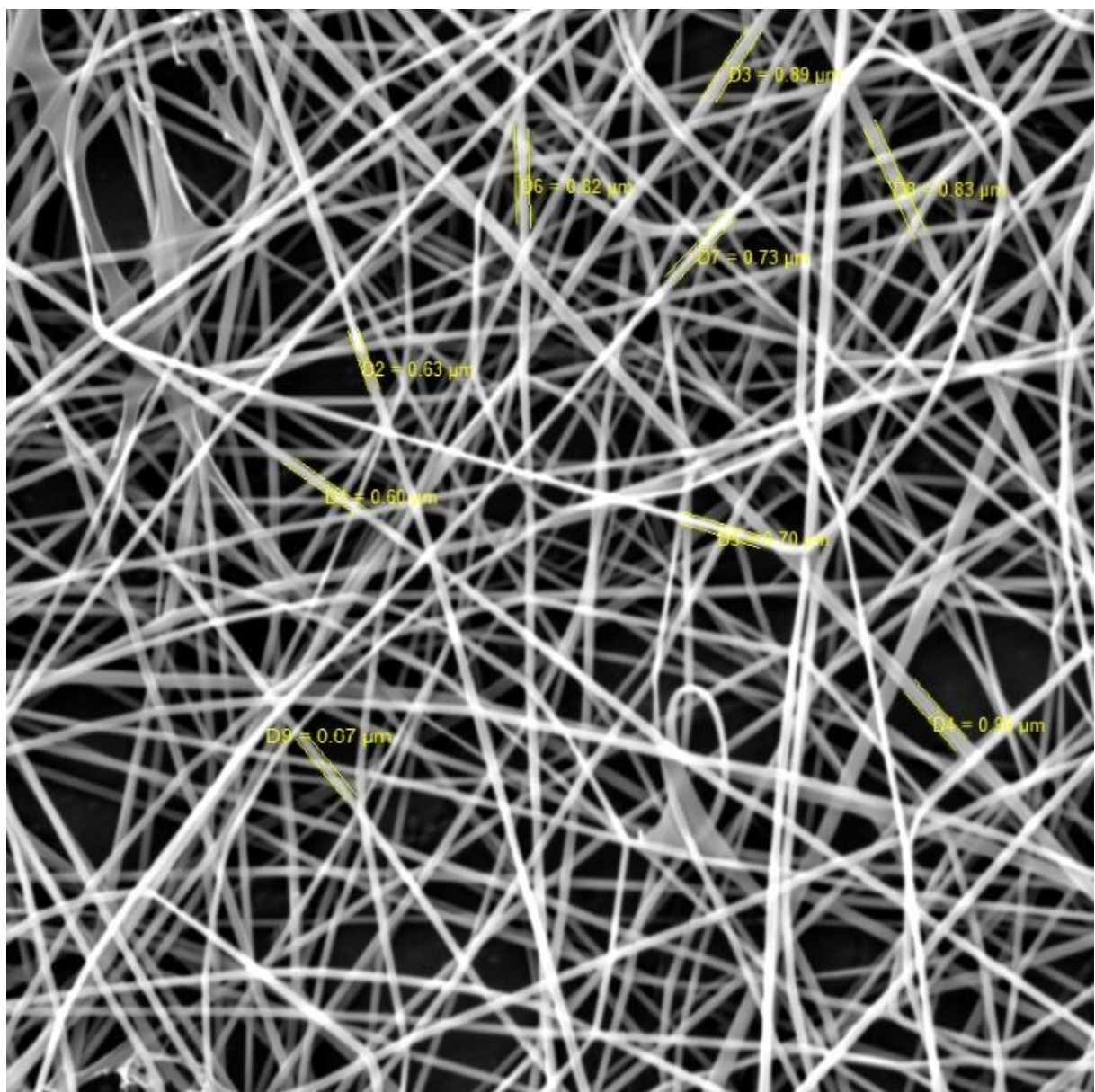


Joonis 14 geelitugevusega 90 – 110 bloomi kedratud matist.

Kõike lühemate peptiidahelatega želatiini kasutamisel (vt Joonis 14) on tekkinud küll fiiberstruktuur, kuid diameeter jääb väiksema poole ning fiibrite suurused varieeruvad. Geelitugevuse 170 – 195 bloomi kasutamine tõstis fiibri diameetrid ligikaudu 1 μm juurde ehk soovituks. Kuigi matil on siiski veel üksikuid ebaühtlaseid fiibreid, oli üldine pilt oluliselt homogensem ja see želatiin paistis tol hetkel matile esitatud nõuete alusel sobiv kasutamiseks edasiseks tööks.

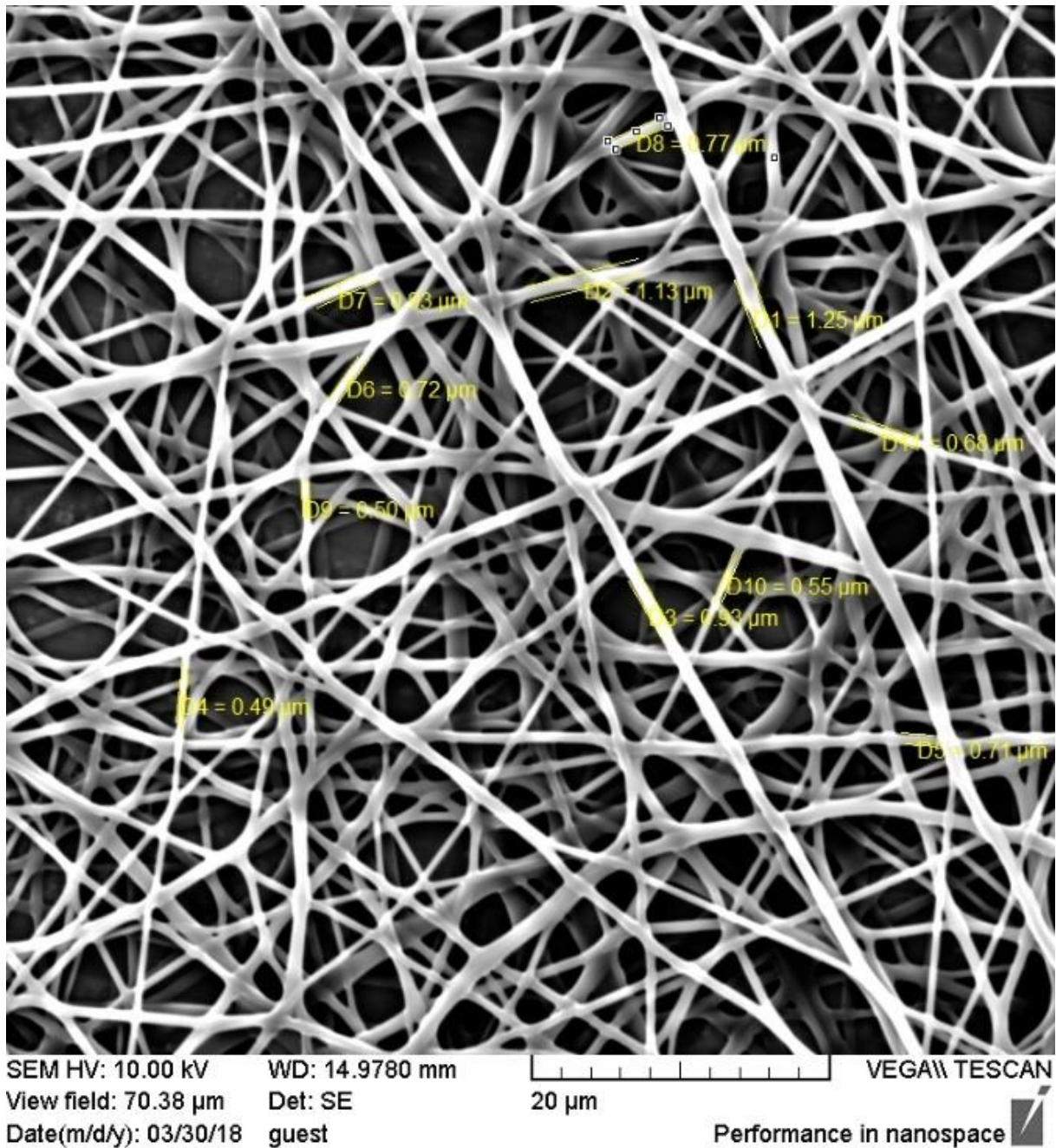
3.3. Glükoosisalduse valik

Kirjandusest on teada, et mehaanilisi omadusi mõjutab oluliselt ristsidet loov komponent, milleks antud töös on glükoos. Antud töös ei ole oluline saada aga ühtegi konkreetset mehaanilist tugevust, vaid mati sobivus rakkude kasvatamiseks. Kui seni tehtud katsetes moodustas glükoos 17% massist, siis pakkus huvi, kas ja millist mõju annavad suure ja väikese koguse glükoosi kasutamine matile töö eesmärkide seisukohast. Seetõttu valmistati töös leitud parameetreid kasutades 5% ja 30% glükoosisaldusega želatiinmatid. Esialgu spinniti neid ainult vaatluseks ilma tükkideks purustamata.



SEM HV: 10.00 kV WD: 14.5850 mm VEGA\\ TESCAN
View field: 63.72 μm Det: SE 20 μm
Date(m/d/y): 03/22/18 guest Performance in nanospace

Joonis 15 SEM pildid ahjus küpsetatud 5% glükoosisisaldusega želatiinmaatriksist



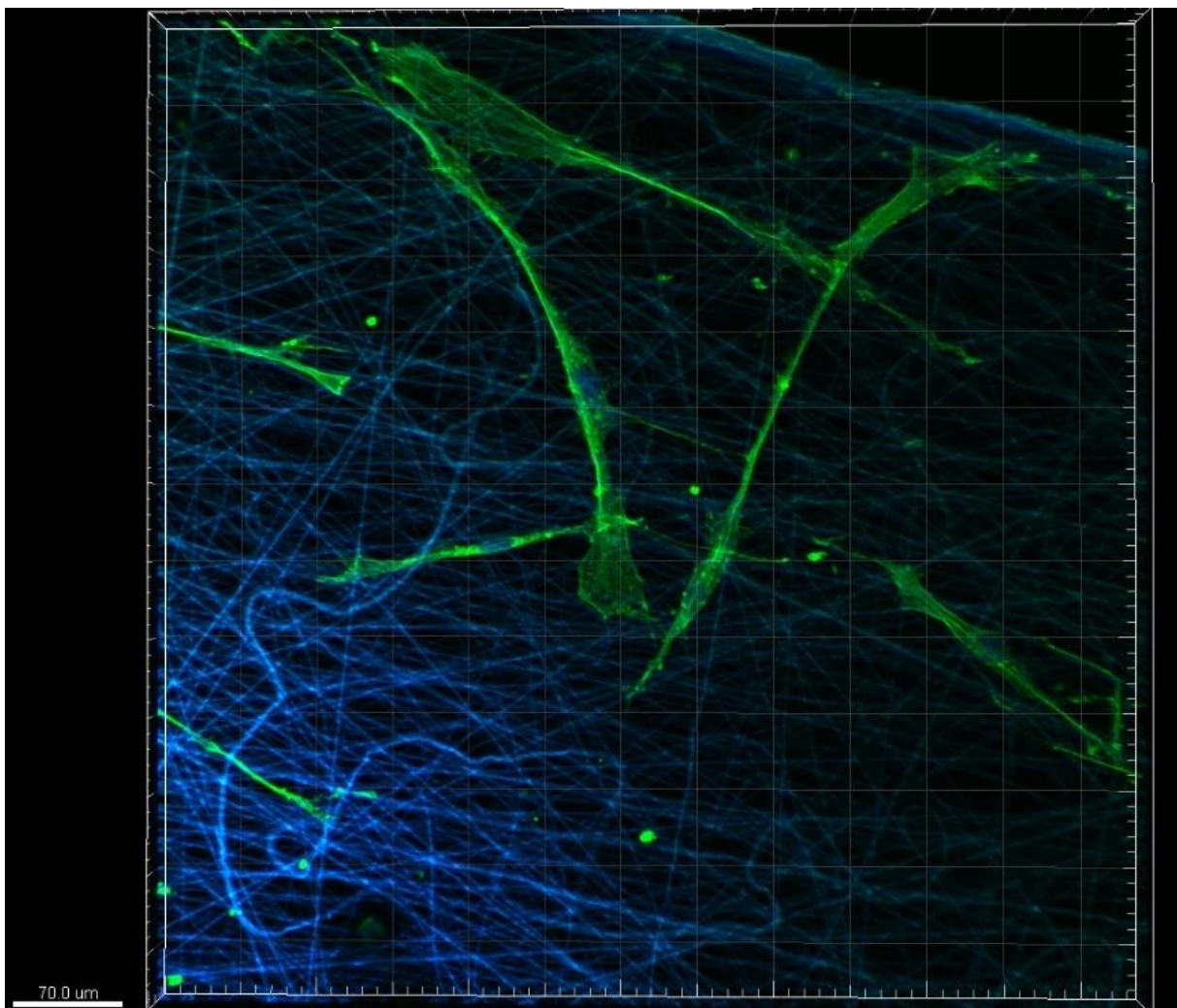
Joonis 16 SEM pildid ahjus küpsetatud 30% Glc želatiinmaatriksist

Glükoosisisaldus ei paistnud mõju omavat fiibrile ega tihedusele (vt Joonis 15 ja 16). Küll aga on oluliselt erinevad fiibrile vahelised kinnituspunktid, mis kõrgema sisalduse korral on suured ja tihtipeale moodustunud rohkem kui kahest fiibrile, samas kui väikese glükoosisisaldusega selliseid jämedaid ühenduskohti ei ole tekkinud üldse. See annab põhjust arvata, et 5% glükoosisisaldusega fiibrimatt võib olla rakkude kasvatamiseks sobivaim, eriti

arvestades, et väiksema ristsidestuse korral on matt mehaaniliselt nõrgem ja seetõttu rakkude poolt paremini kujundatav.

3.4. Mattide ettevalmistamine rakkude külvamiseks

Loodavad matid peavad olema valmist kasutamiseks võimalikult praktilisel kujul. Rakukultuuri laborites kasutatakse proovide tegemisel rakukannusid, kuhu meie loodud matt tuleks kasutamiseks asetada. Sellel eesmärgil asetati matid 12 mm klaasidele, mida on võimalik siis vastavalt vajadusele liigutada ja mahuvad kannudesse hästi. Otse klaasile fiibreid kedrates jäävad need sinna väga hästi kinni, kuid tekkiv matt on orienteeritud vaid piki klaasi pinda (vt Lisa), ketramise käigus vertikaalseid fiibreid ei jää, mis tõttu rakud liiguvad mööda fiibreid pinnaga paralleelseid, selle asemel et sügemale liiguda. Tekkinud fiibrid sarnasesid väga teoreetilises osas näidatud fibroblastidele struktureeritud tasasel pinnal (vt Joonis 3)



Joonis 17 DAPiga värvitud fibroblastid klaasile spinnitud fiibritel, pilt tehtud TÜRMR konfokaal-fluorestsentsmikroskoobiga Paula Reemanni ja Aigar Ottase poolt

Et tekiks juurde ka sügavuskomponent loobuti otse klaasile ketramisest ning selle asemel valmistati matt fooliumile, koguti sealt seejärel noaga ja lisati veevabasse etanooli. Seejärel purustati matitükid etanoolis purustati suurt nihkepinget tekitava segistiga 23 kHz juures. Saavutati vaadeldes ühtlase koostisega fiibrisuspensioon, kus olevate fiibrите pikkused peaksid korreleeruma fiibrите kinnituskohtade vaheliste kaugustega.

Selle suspensiooni klaasile panemiseks katsetati mitmeid meetodeid. Ühe variandina kedrati klaasile õhukene kiht fiibreid, mille peale lisati pipetiga suspensiooni. Teise variandina puhastati alusklaas plasmapuhastiga nii puhta pinna saamiseks kui klaasi pinna märgavuse suurendamiseks, et suspensioon paremini mööda klaasi pinda laiiali jaotuks. Fiibriga matile kuivas suspensioon küllaltki hästi, kuid puhtal klaasil toimus kuivamine väga ebaühtlaselt.

Kuivamisprotsessi parandamiseks testiti seda erinevate temperatuuride juures. Esialgu testiti temperatuure 50C ja 110C kui toatemperatuurist kõrgemat ning keemistemperatuurist kõrgemat olukorda. 50C puhul nähti oluliselt ühtlasemat kuivamist, kuid 110C osutus liiga kõrgeks ning lõi klaase kuivamise käigus töölaualt minema.

Seejärel testiti temperatuure 55C; 60C; 65C ja 75C. Kuivamine toimus kõige paremini 55C ja 60C juures, SEM piltidelt paistis aga 60C kõige parem variant, kuna oli veidi hõredam ja nägi ühtlane välja.

Kuigi matt jäi puhtale klaasile selle meetodiga näiliselt hästi peale, jäänud niimoodi ettevalmistatud fiibrid klaasi külge ka pärast ahjus kuumutamist kinni, mis on aga küllaltki tõsine probleem nii klaaside liigutamisel, kui ka rakkude kasvatamisega kaasa käiva pideva lahuse vahetamise tõttu, mille puhul matt ringi hakkaks liikuma ja oma kuju kaotaks.

Et otse klaasile spinnides jäävad fiibrid klaasi pinnale kinni hästi, oli sellisele klaasile suspensiooni kuivatamine parem variant, kuna sadenenud fiibrid löid ahjus sidemeid klaasil olevate fiibrитеga ja seetõttu kinnitusid sinna. Kõrgemal temperatuuril kuivatamine mõjus hästi aga ka fiibrikihil kuivamisel, seega võeti 60C kasutusele kõikideks edasisteks fiibrите klaasidele sadestamisteks.

3.5. Rakkude mattidel kasvatamine ning meetodi variatsioonide võrdlus

Pindade testimiseks valmistati ette proovid Siirdemeditsiini Keskuses Paula Reemanniga koostöös testimiseks. Katsetamiseks loodi selles töös siiani väljatestitud tingimusi ja kedrati klaasidele 5%, 17% ja 25% Glc želatiinmaatriksid. Vastavatele alusmattidele sadestati peale samade glükoosisaldustega purustatud fiibrisuspensioonid. Võrreldavuse säilitamiseks võeti kõik suspensioonid sellised, et lasti neil seistes vajuda kokku ning eemaldati kõik üleliigne lahusti.

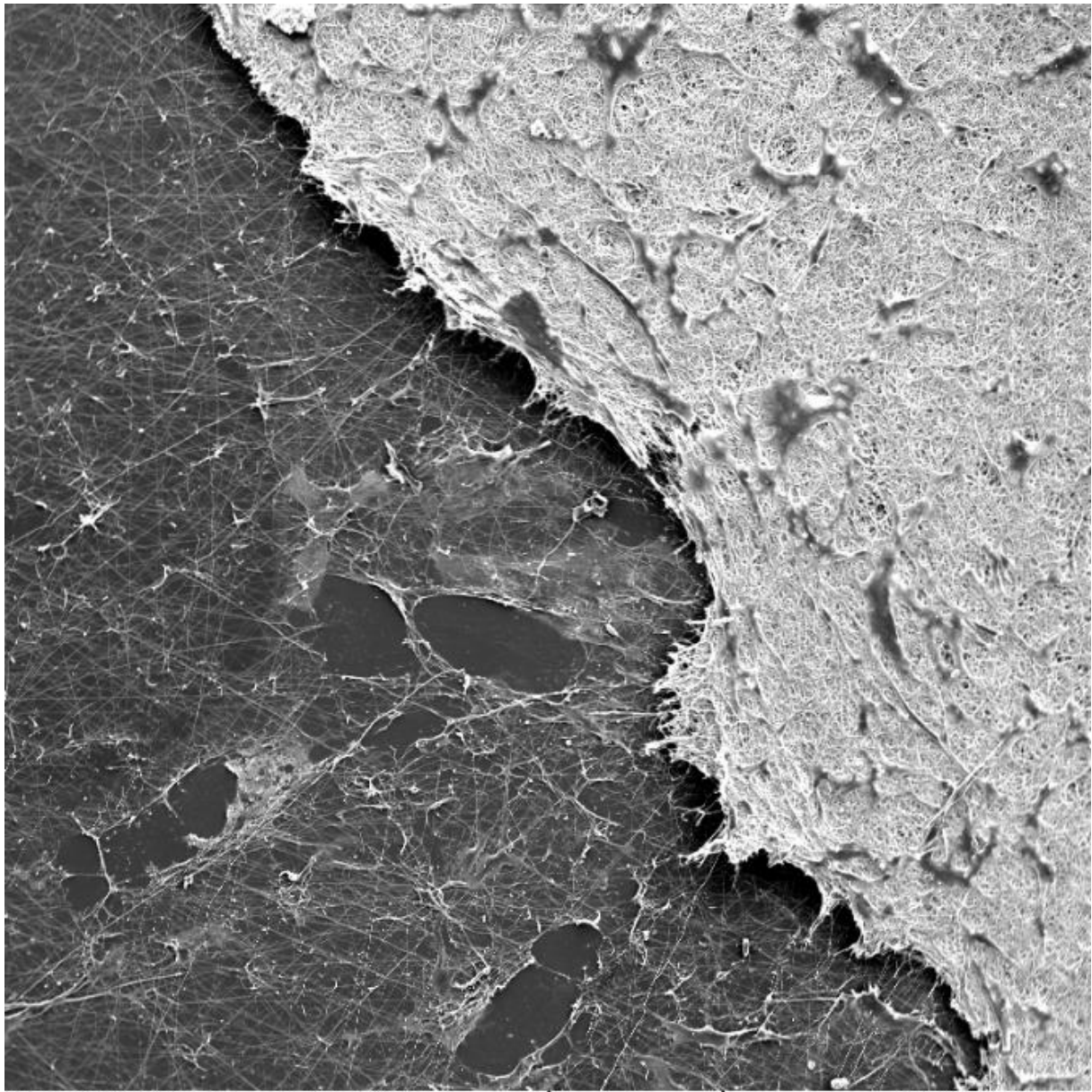
Lisaks pandi kõrvale 17% Glc alusmattidega klaasid, ning valmistati veel üks 17% želatiinmatt. Selle proovi ideeks oli proovida rakkusid segada fiibrisuspensiooniga kokku juba enne klaasile sadestamist, et rakud satuksid juba kohe mitmesse kihti ja oleksid kindlasti fiibrите poolt ümbritsetud.

Purustamata matt, alusmattidega klaasid ning kõik suspensiooniga sadestatud klaasid käisid ahjust läbi, misjärel purustati matt etanoolis nii, nagu tehti töös varasemalt.

. Enne rakukultuurikatseid vahetati kõik etanoolilahused välja PBS soolalahuse vastu. Kasutati nahakoest eemaldatud inimese primaarseid fibroblaste.

Töö käigus ilmnis juba mitmeid probleeme. Lahuste pideva vahetamise käigus tulid matid klaasi küljest kas osaliselt või täielikult lahti, mis muutis edasise lahuste vahetamise keerulisemaks. Samas ei olnud probleem nii suur kui oli esialgu karta – lahti tulnud matid ei kleepunud iseendaga kokku, vaid olid selles lahuses küllaltki elastsed, liigutatavad ja hoidsid kuju.

Elektronmikroskoopia abil proovide uurimisel ilmnis see, et matid on tõmmanud kokku, kuid siinkohal on raske tuua välja otsest põhjust. Seda võis põhjustada aeg, mattide halb kinnituvus alusele, märgumine, kuivamine või hoopis rakkude fikseerimise protsessis kasutatavad kemikaalid. Samuti on SEM puhul küllaltki keeruline eristada ECM rakkudest ja piltidel ei ole head kontrasti ei väga arusaadavaks vaatluseks ega raku sügavusse minemise vaatlemiseks. Esialgsed vaatlused ja üldine iseloomustamine on piltidelt võimalik, kuid proovide vaheliste erinevuste väljatoomiseks on vaja kasutada muid vaatlusmeetodeid.



SEM HV: 10.00 kV

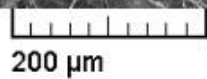
WD: 4.5835 mm

View field: 1.25 mm

Det: SE

Date(m/d/y): 06/01/18

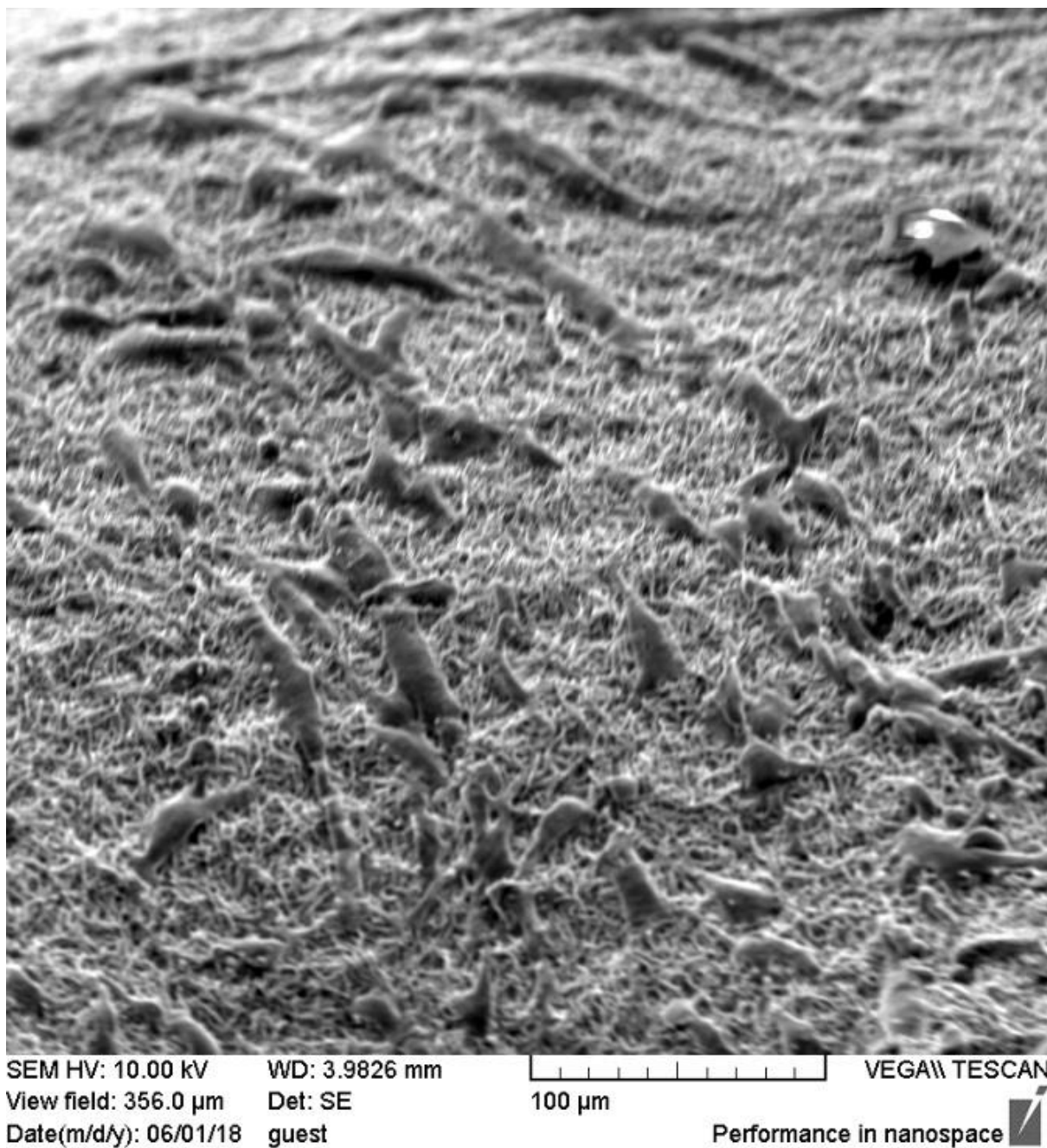
guest



VEGA\\ TESCAN

Performance in nanospace

Joonis 18 SEM pildid rakkudega 5% Glc želatiinmati äärealast



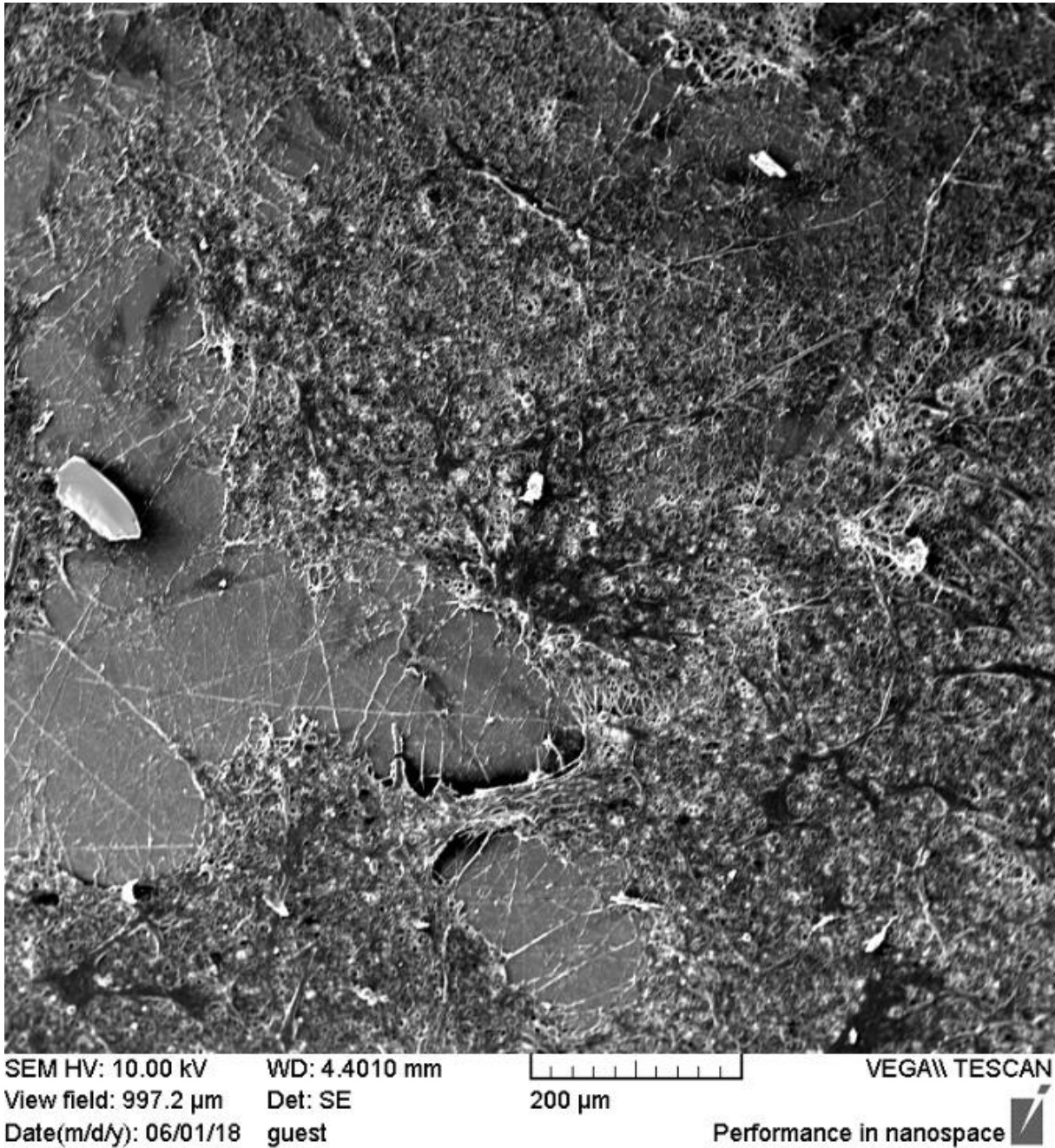
Joonis 19 SEM pildid rakkudega 5% Glc želatiinmatist kalde all

Vaatlusel on näha tumedamat tooni rakke fiibrimattidel. Ääreala jälgimisel (vt Joonis (a)) on näha selgelt, kuidas fiibrimatt on ennast lahti tõmmanud mingisuguse kokku tõmbumise tõttu. Näha on alusmatiga ühendavaid fiibreid, mis tõendab meetodi puhul alusmatiga kinnitumist pärast sadestamist alust leidval ristsidestamisel. Rakkude või muude tõmbavate mõjude tõttu on rebenenud ka alusmatt klaasil endal.

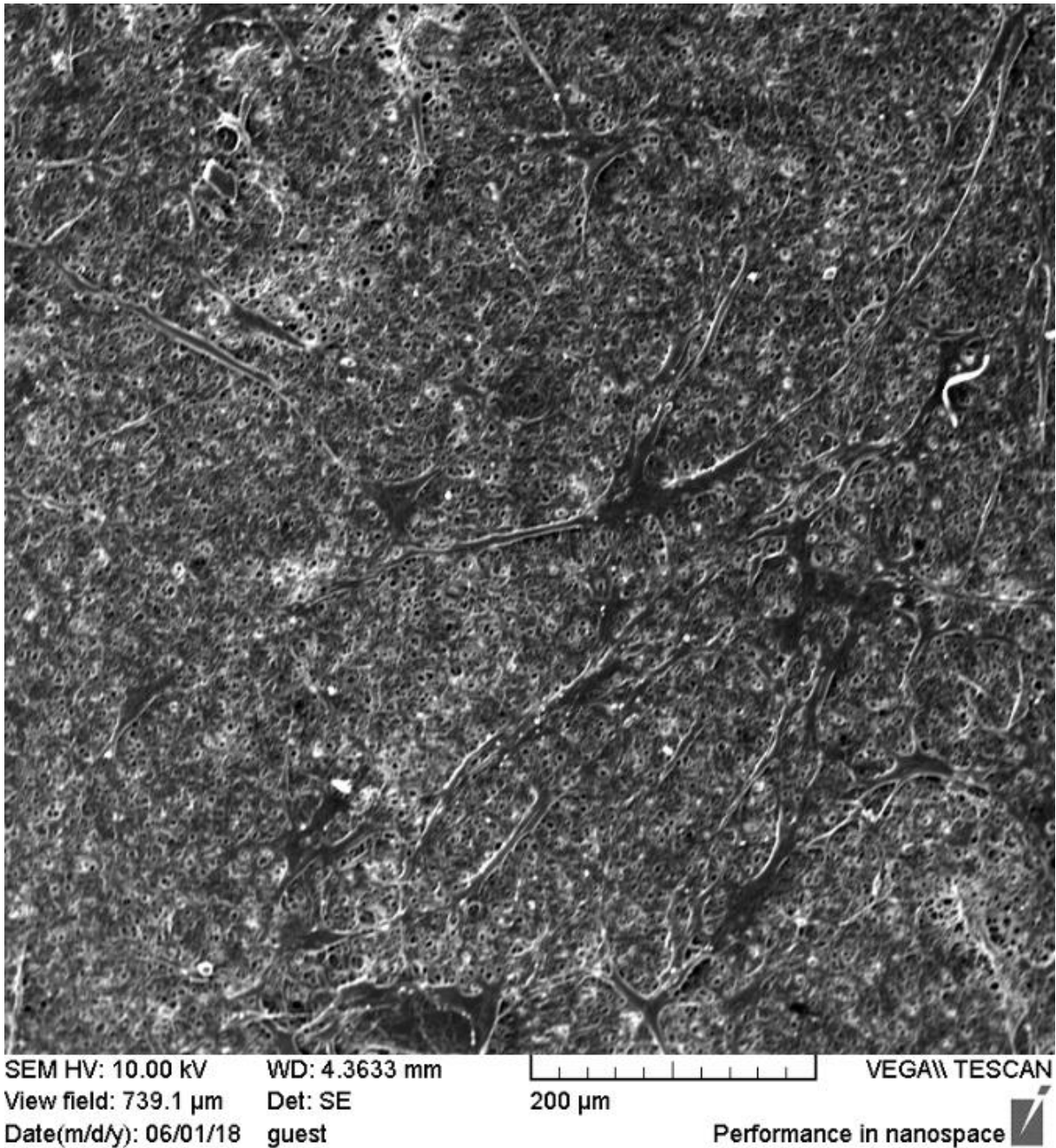
Kalde all (vt Joonis (b)) on paremini arusaadav rakkude kuju matil, mida on hea võrrelda teoreetilisega). Fibroblastid on kõik pikliku kujuga ning väljaulatunud dendriitidega. Ei ilmne,

et rakud oleksid omavahel erinevates 2D pinnal esinevates migratsiooniga seotud olekutes – ei ole näha lamedateks plaatideks vajunud fibroblaste. Kuigi antud meetodiga oleks selle vaatlemine ka keeruline, siis ei ole hetkel näha ka rakkude sisenemist fiibrите vahele.

17% Glc mattide puhul oli toimunud rakkude väga ulatuslik levimine ning pildilt paistis vaid mass rakke, mis pildil omavahel väga ei eristu (vt Lisa). See tulenes võimalikest rakkudega seotud probleemidest ning ei tasu tõlgendada kui midagi mis iseloomustaks matti ennast.

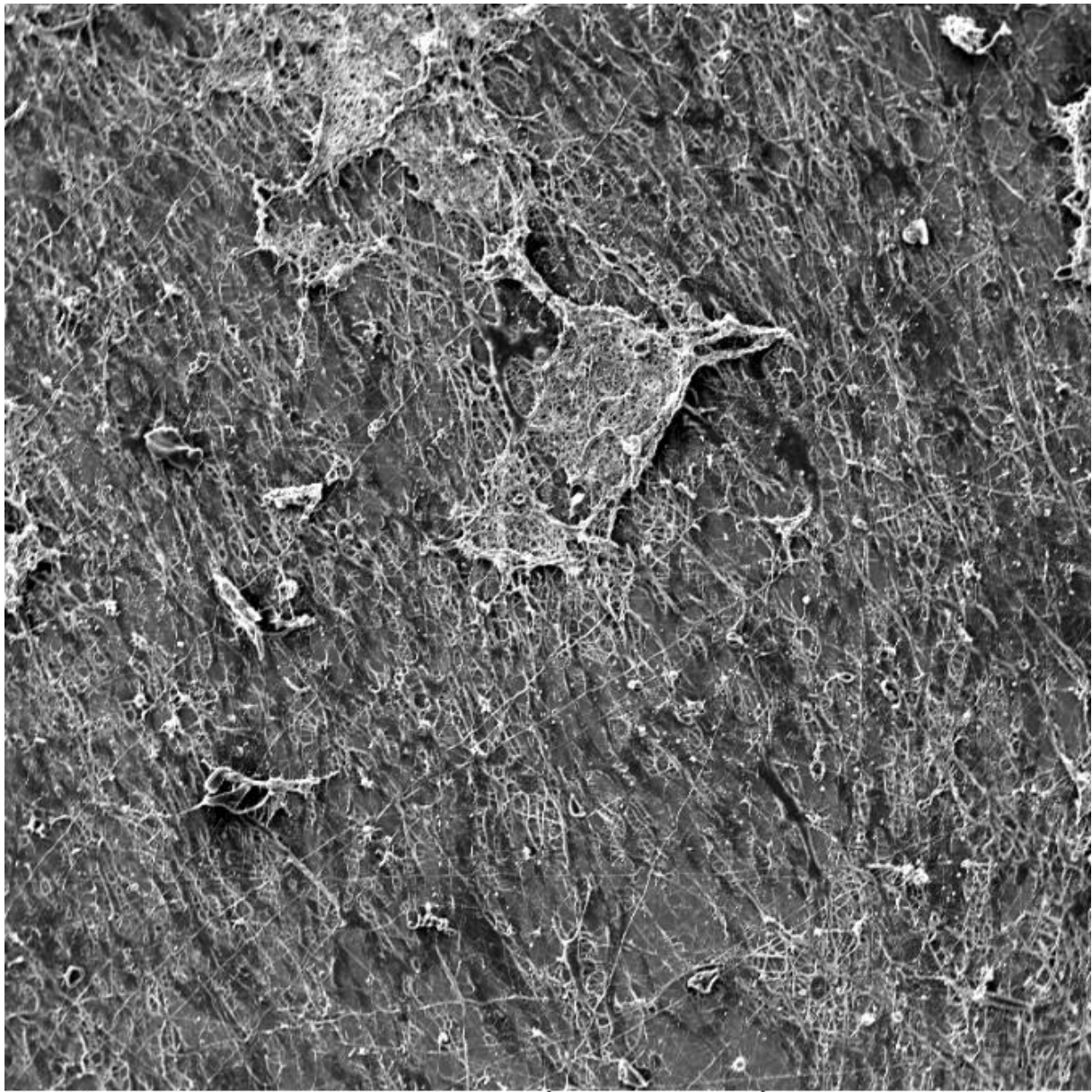


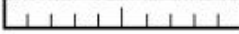

Joonis 20 SEM pilt rakkudega kaetud 25% Glc sisaldustega fiibrimattidest.



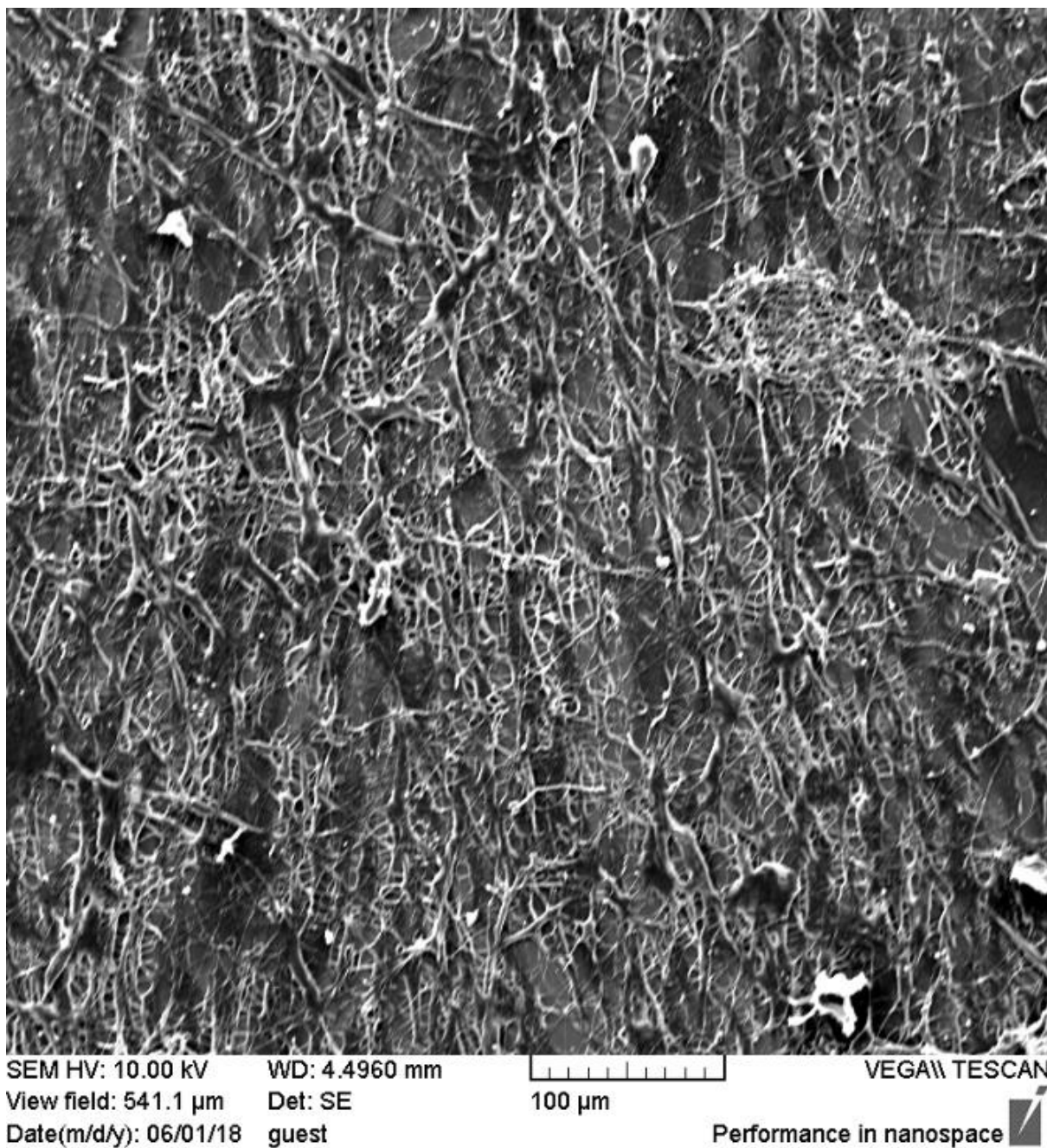
Joonis 21 SEM pilt rakkudega kaetud 25% Glc sisaldustega fiibrimattidest.

25% Glc mattide puhul paistsid fibroblastid rohkem pikemaks veninud välja, mis sarnaneb veidi otse klaasipinnale kedratud mati puhul toimunule. Jällegi ei ole midagi, mis kinnitaks rakkude sisenemist mattidesse. Võib oletada, et suuremast ristsidestamise hulgast põhjustatud jäikus muudab mati rakkude jaoks sarnasemaks 2D pinnaga, mistõttu ka pikaks venimine niiviisi toimub. Samuti on näha lamedamaid raku kujusid ning rakkude kuud on väga varieeruvad, mis võib olla märk migreerumise staadiumitest, mis esineksid 2D pinnal.



SEM HV: 10.00 kV WD: 4.2373 mm  VEGA\\ TESCAN
View field: 1.02 mm Det: SE 200 μ m
Date(m/d/y): 06/01/18 guest Performance in nanospace 

Joonis 22 SEM pilt enne klaasile kandmist kokkusegatud 17% Glc fiibrisuspensiooni ja rakkude kandmisest õhukese matiga kaetud klaasplaadile.



Joonis 23 SEM pilt enne klaasile kandmist kokkusegatud 17% Glc fiibrisuspensiooni ja rakkude kandmisest õhukese matiga kaetud klaasplaadile.

Rakkudega enne klaasile kandmist kokku segatud küpsetatud 17% Glc fiibrisuspensiooni matt oli väga ebahütlane, oli erinevaid tasandeid ja õhemaid ning paksemaid piirkondi. Tekkisid omalaadsed helbed. Sellised ebahütlused ei ole tingimata probleemiks, seni kuni rakud satuvad just fiibrите vahele, mitte selle all olevale klaasipinda kandvale orienteeritud matile. Antud juhul olid ebahütlasused aga sellised, et seda loota ei saa. Kuna pind oli väga varieeruv, oli SEM all veel raskem kontrastseid pilte luua (vt Joonis 22).

Ometi on sellisel lahendusel näha ka rakkude mitmel tasandil asetsemist. Joonis (a) puhul on näha mati erinevaid paksuseid, kuid igal kihil on näha ka peal häguseid tumedamaid regioone, rakke. Joonis 23 puhul on paremini näha, kuidas rakud erinevatel kõrgustel on. Allpoole jäävad rakud on näha hägusemate tumedate aladena, kõrgematel olevatel rakkudel on joonistunud selgemad kujud.

Rakkudele pinna sobivust on antud vaatluste juures raske hinnata, kuigi paistab, et vähemalt 5% Glc puhul on rakkude kuju erinev sellest, mis see oleks 2D pinna puhul.

3.6. Suspensiooni klaasile kandmise arendamine ning kontsentratsiooni mõju

Fiibrimassi paremaks kuivamiseks otsustati katsetada teistsuguseid meetodeid. Selle asemel, et panna fiibrimass peale kasutades pipetti ning lastes kuivamisest tekkinud efektidel suurt mõju omada fiibrите asetusele klaasil oleva tilga kuivades asetati fiibrid õhukese matiga klaasid kannude põhja ning kaeti kannu sisemus fiibrisuspensiooniga. Katsetuste käigus testiti ka erinevate fiibrikontsentratsioonide mõju suspensioonis, et näha kas see omab mõju mati makro- ja mikrostruktuurile.

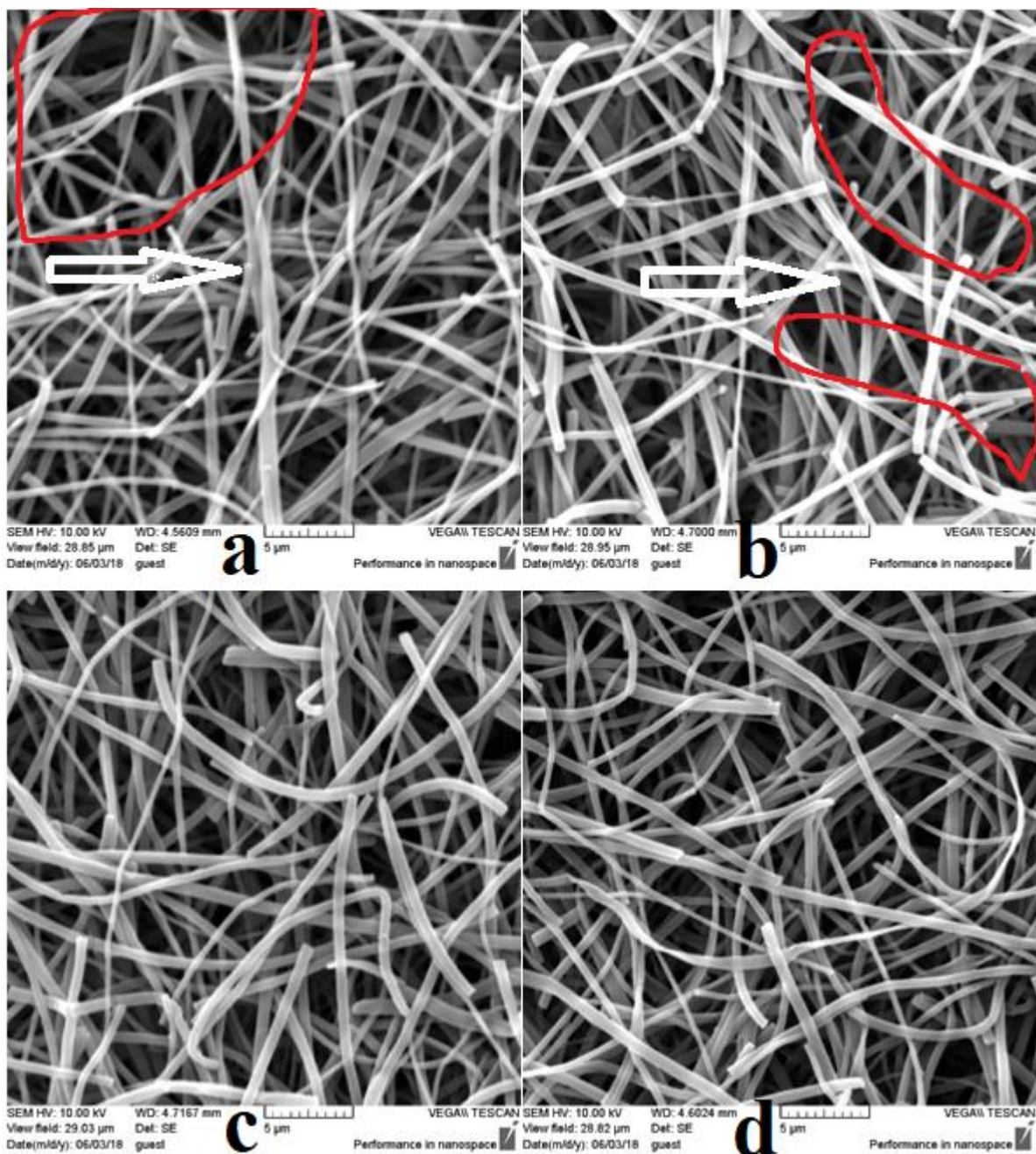
Katsetati nelja erinevat kontsentratsiooni, mida mõõdeti iga proovi loomise ajal kõrvalepandud lahuse kuivmassi leidmisega. Kontsentratsioonid proovides olid 2.4 mg/ml; 6.3 mg/ml; 7.3 mg/ml ja 8.9 mg/ml. Kontsentreerimiseks suspensiooni tsentrifugeeriti, eemaldati supernatanti ning suspenderiti ühtlaseks. Probleemid protsessis ilmnevad peamiselt väga väikestest kogustest – antud meetodil on suuri, paremini mõõdetavaid koguseid väga ajakulukas toota. Seetõttu ei tohi mõõdetud kontsentratsioone kindlasti käsitleda andmetena, vaid lihtsalt suspensiooni iseloomustavatena. Väga suuri kadusid tekitab näiteks suspensiooni kaalumiseks tõstmine – fiibritükid suspensioonist kleepuvad pipetiotsiku külgedele ning jäävad otsa kinni. Tõstmise lihtsustamiseks löigati pipetiotsikust tükk ära, kuid see muutis ebatäpsemaks pipeti enda mahu. Suurematel fiibrikontsentratsioonidel oli tekkiv viga eriti suur.

Kannudesse kanti kogus suspensiooni, mis kataks ära kogu aluspinna. Selleks koguseks oli algselt 75 ul, kuid suurematel kontsentratsioonidel ilmnis vajadus seda suurema viskoossuse tõttu tõsta 100 ul juurde.



Joonis 24 Kannudes olevatele klaasidele suspendeeritud ning küpsetatud (a) 2.4 mg/ml matt, (b) 6.3 mg/ml matt, (c) 7.3 mg/ml matt ja (d) 8.9 mg/ml matt.

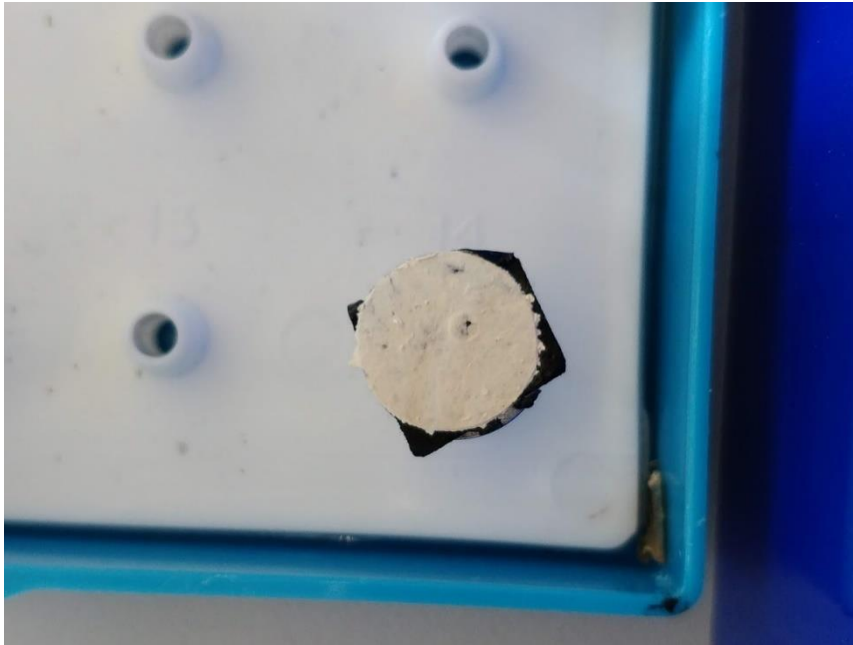
Selged erinevused on tekkinud mattide pinnal (vt Joonis), kus kontsentratsiooni tõstmine on siledust silmnähtavalt vähendanud. Seda võib tõlgendada, kui suuremat kokkupuudet fiibrite vahel kuivamisel, mille tõttu fiibrid ei saa üksteise vahele kokku vajuda vaid jäävad üksteise taha kinni juba kuivamise algjärgus. Kuigi tekivad matid on oluliselt ühtlasemalt kaetud, kui seda olid klaasile asetatud tilgast kuivanud matid, esines uus probleem. Nimelt kattub matiga ka klaasi ümbritsev regioon Kannus, kuid selle sees on klaasi väljalõikamine oluliselt raskendatud. Seetõttu olid matid oluliselt üle klaasi ääre ning ükski mattidest ei jäänud nende kannust väljavõtmisel alusmati külge kinni, mida ei parandanud ka ahjus ristsidemete moodustamine.



Joonis 24 SEM pildid (a) 2.4 mg/ml, (b) 6.3 mg/ml, (c) 7.3 mg/ml ja (d) 8.9 mg/ml mattidest. Valge nool tähistab fiibrите üksteise külge kinnitumist, punane ala neid ümbritsevaid hõredaid fiibriregioone.

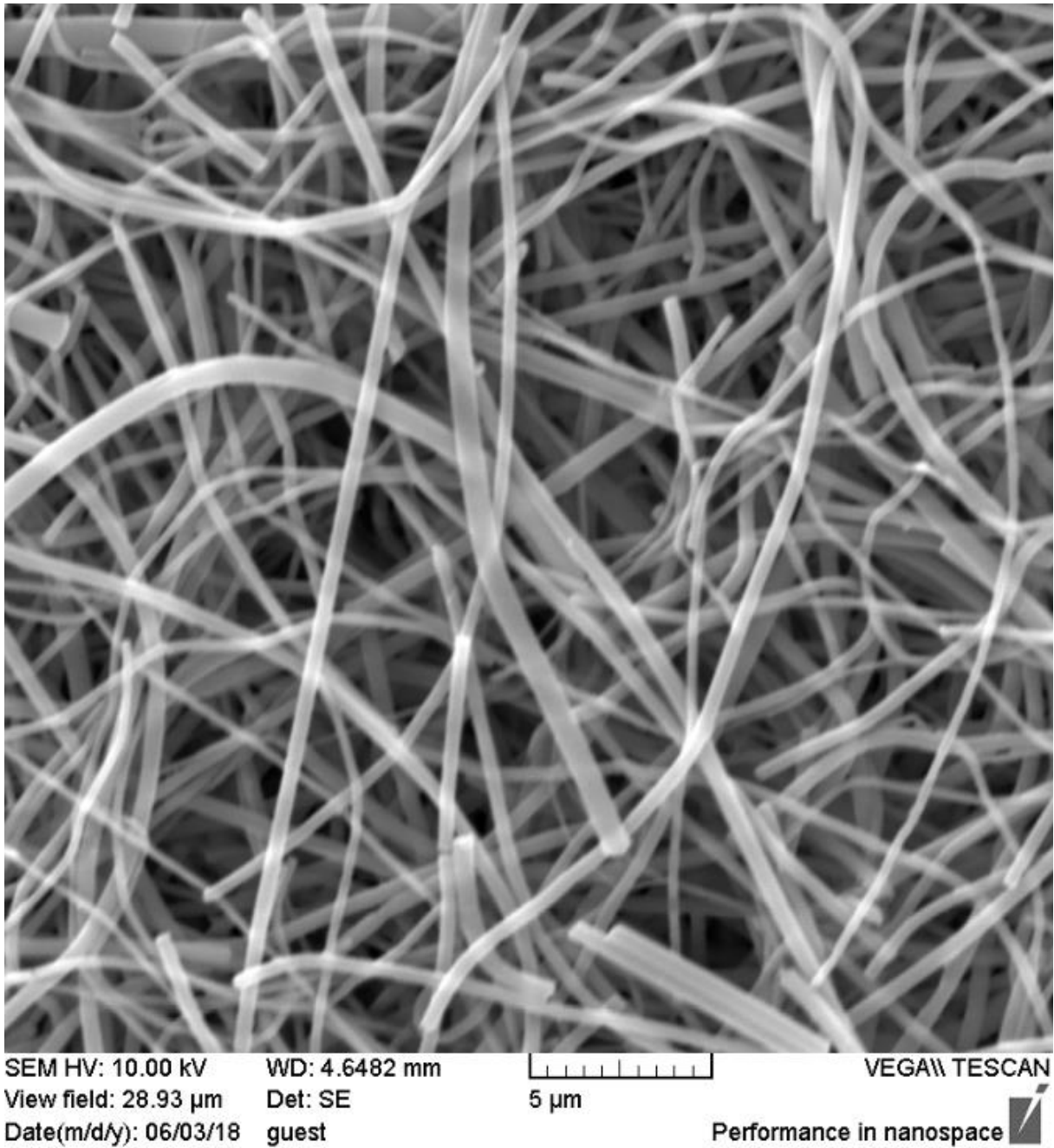
Mikrostruktuurides olulisi erinevusi ei ilmne. Võib märgata, et madalamal kontsentratsioonil paistavad fiibrid omavahel rohkem põimitud, mis tekitab väga tihedaid regioone matil. Kontsentratsiooni kasvades paistab fiibrите аsetus muutuma ühtlasemaks ja põimumist leiab аset vähem. See oleks kooskõlas аsjaoluga, et suuremal kontsentratsioonil on fiibritel väiksem vabadus kuivamisel kokku minna, kuna fiibrid jäävad juba algjärgus üksteise таhа kinni.

Kannude kasutamise katse juba näitas, et suspensiooni kuivamine on oluliselt ühtlasem, kui see ei toimu tilgast nagu esimestel töö katsetel. Matiga klaasi kannust kättesaamise probleemi lahendamiseks otsustati asetada klaasid lihtsalt Petri tassi põhja ning katta kogu Petri tass lahusega, et näha kas sel juhul on võimalik kätte saada korralikult matiga kaetud klaas. See lahendus toob aga kaasa ühe ilmse probleemi, mis on lahuse kadu.



Joonis 25 Petri tassile kuivatatud suspensioonist lahti löigatud želatiinmatiga klaas.

Petri tassi valati 2 ml suspensiooni, mis oli fiibrisisalduselt sarnane proovidega, kuhu külvati peale rakke. Suspensioon kattis hästi ära kogu pinna ning kuivamine toimus ühtlaselt. Suspensiooni kogus ja/või kontsentratsioon jäi antud olukorras väikeseks ning seetõttu tekkisid pinnasel mõned augud. Klaas sai kaetud aga väga hästi, kuivamisest ei tekkinud fiibri klaasile ebäühtlast asetumist ning pealmine matt oli kindlalt alusmati küljes kinni.



Joonis 26 SEM pilt Petri tassile kantud suspensioonist klaasile loodud matist

SEM pildilt ei paista ühtegi probleemi (vt Joonis). Fibiidid ei ole omavahel kokku kleepunud, pilt paistab ühtlane, mis on julgustav meetodi edasiseks katsetamiseks.

4. Järeldused ja arutlus

Katsetamiste käigus leiti olemasoleva informatsiooni järgi sobivad parameetrid edasiseks fiibri valmistamiseks. 20 cm vahekauguse, 19 kV pinge, 170 – 195 Bloomi geelitugevusega želatiintooraine ning 3.9 µl/min lahuse väljutamise kiiruse kasutamisel olid tekkivad fiibrimatid võrdlemisi ühtlased, ilma fiibrите omavahelise pundumisteta ning läbimõõduga, mis jäi vaid veidi alla rakukultuurist soovitud juhendava 1 mikroni. Leitud parameetrite juures oli lahuse nõelalt maha tilkumine minimaalne, mis vähendas ka defekte tekitavate tilkade lendumist matile.

Pidevama polümeerijoa moodustumine tõstis ka lahuse pumpamise kiiruse vähendamisest hoolimata želatiinmati kasvamise kiirust, kuna visuaalselt nähtav kiht tekkis juba esimestel minutitel, võrreldes varasema ligikaudu 5 minutiga, mis mati nähtavaks muutumiseks kulus. Sellest tulenevalt võib antud üldparameetreid kasutada edasistel katsetamistel sarnase funktsiooni jaoks ning ei vaja muutmist, kuni saadakse teada täpsemad nõuded rakkude poolt fiibrитеle.

Glükoosisisalduste uurimisel ilmnes, et 30% glükoosilahuse kasutamisel tekib maatriksile juurde mitmest fiibrist moodustunud suuremaid kinnituspunkte, mis eeldatavasti lisavad maatriksile jämedaid tükke ning vähendavad purustamisel tekkivate fiibrите pikkuseid. 5% glükoosilahusega tehtud maatriksil sellised jämedad kinnitused puudusid. Teooriast on teada, et väiksema ristsidestuse ulatuse tõttu on matt mehaaniliselt nõrgem ja seega võib rakkudele olla potentsiaalselt sobiv, mistõttu edasistel katsetamistel võiks seda antud töös standardsena käsitletud 17% glükoosisisaldusega lahuse kõrval kasutada.

Suuremate kontsentratsioonide kasutamine purustatud fiibrите suspensioonide klaasile kandmisel paistis kuivamine toimuvat eelistatumalt – tekkiv matt oli silmaganähtavalt karedam ning SEM vaatlusel paistis homogeensem. See järeldus vajab aga konkreetsemat katset enne kui seda tõsiselt saab võtta.

Tööst ilmnes, et otse klaasile kedratud maatriks ei ole sobilik rakkude kasvatamiseks, kuna rakud käsitlevad seda kui struktureeritud, kuid lamedat pinda. See jätab täitmata eesmärgi saavutada mattidel kolmedimensiooniline rakkude areng. Samuti võis kõrvale jätta paljale klaasile purustatud fiibrите sadestamise, sest kinnituvust ei tekkinud ja seetõttu ei saa sellist varianti kasutada. Suspensiooni klaasidele panemisel leiti selle töö kaudu aga kasu pinna katmisest 60 kraadise pliidi peal, mis on ka edaspidi hea viis ühtlasema mati saamiseks proovil.

SEM all vaadeldud maatriksitele külvatud rakkude puhul oli põhjust arvata, et rakud ei pidanud kasvupinda tasaseks pinnaks, fibroblastide kuju oli piklik ning mitte liigselt väljavenitatud. Loodud fiibrimattide sobivuse lõplikuks teadasaamiseks tuleb neid vaadelda lisaks SEM-le ka teistel meetoditel, näiteks konfokaal fluorestsentsmikroskoobi abil, et saada paremat rakkude kujudest ning võimalikust fiibrimattide kihtide vahele liikumisest.

Purustatud fiibrите suspensiooni enne klaasile kandmist üleviimine PBS soolalahusesse ning rakkudega kokkusegamine vajab praktilisi korrektsioone, et tekkiv matt oleks ühtlasem ja rohkem ühes tükis. Üheks potentsiaalseks lahenduseks võib olla testitud Petri tassi põhja katmine proovi klaasidega ning siis kogu pinnale suspensiooni kandmist. Meetodiga kaasnevad aga suuremad materjalikaod ning vajab lisasamme, kuna peale petri tassi suspensiooni katmist

tuleks prooviklaasid sealt eemaldada, et edasises töös ei satuks proovide hulka rakke, mis on kasvanud Petri tassi tasapinnal fiibrimaatriksi asemel.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös anti ülevaade rakkude käitumistest fiibrilistel struktuuridel, ekstratsellulaarsete maatriksite tähtsusest rakkudele ning erinevustest kahe- ja kolmedimensionaalsete kasvukeskkondade vahel.

Eksperimentaalse osa esimeses pooles katsetati ning valiti välja rakukultuuriks sobivate želatiinfiibrile elektroktramise protsessiks edasiseks katsetamiseks sobivad üldised parameetrid. Nendeks sobis ketramine 20 cm kauguselt, 19 kV pinge kasutamine ning voolukiirus 3.9 µl/min. Sobiva lahustena on töö põhjal 170 – 195 bloomi geelitugevusega želatiin lahus, kus glükoosisisaldus on 5% või 17%. Sellistel parameetritel tekib meetodi kohta küllalt kiirelt kasvav matt, mille fiibri diameeter alla mikroni ning milles ei esine erilisi defekte.

Eksperimentaalse osa teises pooles arendati välja protseduur fiibrile purustamiseks ning saadud lühikeste fiibrile kandmiseks eelnevalt õhukese fiibrikihiga kaetud klaasidele. Antud proovide sobivust rakukultuuriks uuriti SEM-ga ja järeldused, mida piltidest oli võimalik teha, olid küll lubavad, kuid korralike järelduste tegemine on ennatlik ning tarvis on vaadelda proove sobivama vaatlusseadmega. Selle tegemine on järgmise sammuna juba planeeritud konfokaal fluorestsentsmikroskoobiga.

Rakukultuuri katseks kasutatud proovide puhul esinenud probleemidele, nagu ebaühtlane kuivamine ja nõrk kinnitumine alusmatile, katsetati erinevaid lahendusi, mida oleks tarvis järgmise sammuna testida edasiste rakkude külvamise protseduuri optimeerimise ja vaatlusega.

SUMMARY

The work at hand provided an overview of cell behaviour on fibrous structures, the importance of extracellular matrices for cells and the differences of two- and three-dimensional growth environments.

In the first part of the experiment, the general parameters for the gelatine fibre electrospinning process were experimented and chosen for the coming tests. The work found the distance of 20 cm, the electric potential of 19 kV and the flow rate of 3.9 $\mu\text{l}/\text{min}$ to be suitable. The solutions made with gel strength 170 – 195 bloom gelatine and 5% or 17% glyucose were also chosen as appropriate. Using these parameters the mat growth was relatively fast for the method, fibre diameters were just under a micron and no particular defects were observed.

In the second half of the experiment a procedure was developed for dispersing the fibres into a suspension and for transferring the fibre pieces on a glass covered with a thin fibre layer. The sample compatibility for cell culture was examined with SEM and the conclusions that could be made were promising, however still premature. A better observation must be performed with a more suitable method. This step is planned to be made with a confocal fluorescence microscope.

To fix the problems manifested in the samples used for the cell culture experiment, such as uneven drying and weak adhesion to the base mat, different solutions were tried, which require further testing through future cell growth procedure optimization and observation.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A. K.-Y., Schulten, K., & Baneyx, F. (2003). Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials*, 2(9), 577–585. <https://doi.org/10.1038/nmat964>
2. Lee, Y., Yoo, Y., Kim, J., Widhiarini, S., Park, B., Park, H. C., ... Byun, D. (2009). Mimicking a Superhydrophobic Insect Wing by Argon and Oxygen Ion Beam Treatment on Polytetrafluoroethylene Film. *Journal of Bionic Engineering*, 6(4), 365–370. [https://doi.org/10.1016/s1672-6529\(08\)60130-4](https://doi.org/10.1016/s1672-6529(08)60130-4)
3. Adhesive protein from mussels: possibilities for dentistry, medicine, and industry. (1986). *The Journal of the American Dental Association*, 112(6), 879. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1986.0116>
4. Yoo, J.-W., Irvine, D. J., Discher, D. E., & Mitragotri, S. (2011). Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(7), 521–535. <https://doi.org/10.1038/nrd3499>
5. Haes, A. J., Chang, L., Klein, W. L., & Van Duyne, R. P. (2005). Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *Journal of the American Chemical Society*, 127(7), 2264–2271. <https://doi.org/10.1021/ja044087q>
6. Brandi, M. L. (1997). Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcified Tissue International*, 61(S1), S5–S8. <https://doi.org/10.1007/s002239900376>
7. Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 655–663. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>
8. Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R., & Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 9064–9068. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9064>
9. Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32(8–9), 762–798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
10. Huang, Z.-M., Zhang, Y. ., Ramakrishna, S., & Lim, C. . (2004). Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*, 45(15), 5361–5368. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.04.005>
11. Siimon, K., Reemann, P., Pöder, A., Pook, M., Kangur, T., Kingo, K., ... Järvekülg, M. (2014). Effect of glucose content on thermally cross-linked fibrous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.075>
12. Leuenberger, B. H. (1991). Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food Hydrocolloids*, 5(4), 353–361. [https://doi.org/10.1016/s0268-005x\(09\)80047-7](https://doi.org/10.1016/s0268-005x(09)80047-7)
13. Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites.

- Composites Science and Technology, 63(15), 2223–2253. [https://doi.org/10.1016/s0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/s0266-3538(03)00178-7)
14. Lutolf, M. P., & Hubbell, J. A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 23(1), 47–55. <https://doi.org/10.1038/nbt1055>
 15. Patrae, K. (2014). Maksa tüvirakkude pinnamarkerite ja neid ümbritseva ekstratsellulaarse maatriksi iseloomustamine normaalses ja kahjustatud koes. DSpace
 16. Griffith, L. G., & Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3), 211–224. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>
 17. Guilak, F., Cohen, D. M., Estes, B. T., Gimble, J. M., Liedtke, W., & Chen, C. S. (2009). Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell*, 5(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
 18. Stevens, M. M. (2005). Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science*, 310(5751), 1135–1138. <https://doi.org/10.1126/science.1106587>
 19. Vogel, V., & Sheetz, M. (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(4), 265–275. <https://doi.org/10.1038/nrm1890>
 20. Meyle, J., Gültig, K., Brich, M., Hämmerle, H., & Nisch, W. (1994). Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(6–7), 463–466. <https://doi.org/10.1007/bf00058984>

Tänuavaldused

Sooviksin tänada kõiki, kes bakalaureusetöö valmimisele kaasa aitasid. Erilised tänud juhendajale Martin Järvekülgile ning rakukultuuri poolse juhendustöö ning katsetuste läbiviimise eest Paula Reemannile.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rasmus Liira, (sünnikuupäev: 06.08.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Rakukultuuriks sobilike fiibriliste želatiinmaatriksite valmistamise meetodika väljaarendamine“, mille juhendaja on Martin Järvekülg,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 06.06.2018

Lisad

