

# Matemaattisen lämpötilaestimointimallin ja epäsuoran mittauksen käyttäminen solu ympäristön lämpötilan ylläpidossa ja säädössä

Antti-Juhana Mäki\*, Tomi Rynnänen, Jarmo Verho, Joose Kreutzer, Jukka Leikkala, ja Pasi Kallio  
Tampereen teknillinen yliopisto, Biolääketieteen tekniikan tiedekunta, BioMediTech Instituutti, Korkeakoulunkatu 3, 33720 Tampere

\* Kontaktihenkilö, yhteystiedot: puh. +358 40 7364613, e-mail antti-juhana.maki@tut.fi

## Tiivistelmä

*Ihmisperäisten solujen optimaalisessa kasvatuksessa solun fysiologisten ympäristötekijöiden, kuten happitoisuuden ja lämpötilan, tarkka kontrollointi on tärkeää. Siitä huolimatta perinteisesti solut kasvatetaan isossa inkubaattorissa monen muun soluviljelmän kanssa, jolloin solutason ympäristötekijöiden kontrollointi ei onnistu. Siksi olemme kehittämässä millimetriluokan solukasvatusjärjestelmää, jossa integroimme kaasusyötön ja lämpötilan tarkan kontrolloinnin solutason optimaalisen kasvatusympäristön luomiseksi. Ongelmana suorassa lämpötilanmittauksessa solualueelta on se, että mittaus voi häiritä soluja ja estää tärkeän solutarkastelun optisella mikroskoopilla sekä anturin hankalamman asentamisen solualueelle verrattuna ulkopuoliseen kohtaan järjestelmässä. Tästä syystä olemme kehittäneet järjestelmän, jossa lämpötilan säätö pohjautuu epäsuoralla mittauksella estimoituun solualueen lämpötilaan. Järjestelmässämme lämpötilan estimaatti saadaan yhdistämällä solualueen ulkopuolinen lämpömittaus ja työssä kehitelty matemaattinen malli. Osoitamme, että järjestelmä pystyy ylläpitämään solualueen lämpötilan 37°C noin 0.4°C tarkkuudella yli 15 tuntia.*

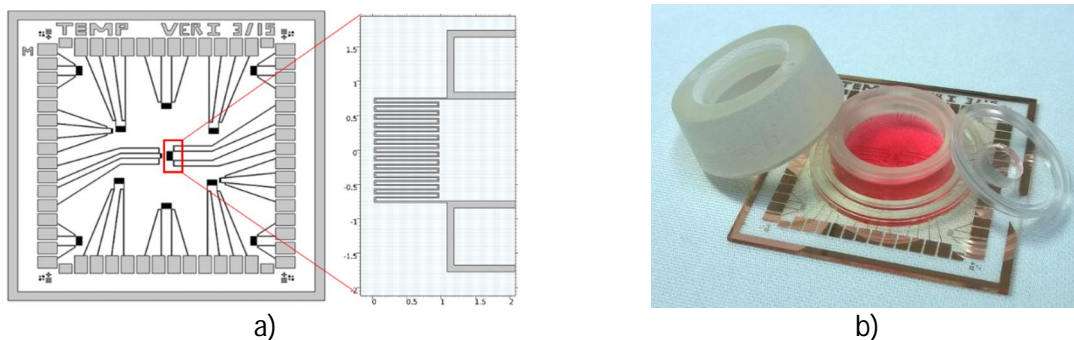
Ihmisperäisten solujen avulla voidaan muun muassa tehdä lääkeainekehitystä ja sitä kautta vähentää ongelmallisia eläinkokeita. Solujen menestyksellinen kasvattaminen vaatii solun fysiologisten ympäristötekijöiden, muun muassa lämpötilan, happipitoisuuden, ja pH:n, tarkan kontrolloinnin. Perinteisessä soluviljelyssä solut kasvatetaan isossa inkubaattorissa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>) monen muun soluviljelmän kanssa. Tämä kasvatustapa vaatii paljon manuaalista työtä, eikä ympäristötekijöiden tarkka kontrollointi solutasolla ole mahdollista, jolloin myös niiden optimaalinen kasvatustapa ei onnistu. Esimerkiksi fysiologisesti relevantti ihmisperäisten solujen kasvuympäristö sisältää normaaliin huoneilmaan verrattuna huomattavasti vähemmän happea. Matkittaessa ihmiskehon olosuhteita maljalla tapahtuvassa tutkimuksessa solujen happipitoisuus pitäisi useimmiten olla välillä 1% - 10%. Myös hiilidioksidin määrällä on väliä. Solukasvatuksessa yleensä käytettävien elatusnesteiden pH on riippuvainen hiilidioksidin määrästä nesteessä (tyypillisesti luokkaa 5% - 10%). Toisaalta solut ovat melko herkkiä elatusnesteiden pH:n muutoksille, joten hiilidioksidi kaasun säätö on tärkeää solujen hyvinvoinnin kannalta. Kaasujen lisäksi lämpötila on oleellinen kasvatusympäristön parametri. Yleensä maksimissaan yhden asteen lämpötilapoikkeama on sallittu solukasvatuksessa. Tutkimuksissa on havaittu esimerkiksi sydänsolujen sykkinnän merkittävää muutosta eri lämpötilassa [Laurila, 2016].

Näiden syiden takia kehittelemme millimetriluokan automatisoitua solukasvatusympäristöä käytettäväksi jatkuva-aikaisesti inkubaattorin ulkopuolella. Järjestelmämme mahdollistaa solun ympäristötekijöiden tarkemman ja nopeamman mittaamisen ja kontrolloimisen verrattuna perinteisiin kasvatusmenetelmiin. Automatisoidummalla solukasvatuksella pystymme myös vähentämään manuaalista työtä sekä siitä aiheutuvia häiriöitä, esimerkiksi eliminoimalla ei-toivotut lämpötilan ja pH:n muutokset solujen tarkastamisen tai pidempikestoisempien mittausten aikana. Kun tavoitteena on täysin automatisoitu solukasvatustapa, on ehdottoman tarpeellista pystyä kontrolloimaan solujen ympäristötekijöitä tarkasti. Tästä syystä olemme integroineet järjestelmäämme lämpötilan tarkan säädön ja sekä kaasujensyötön, jolla pystytään luomaan vähähappisia olosuhteita sekä ylläpitämään elatusnesteiden pH optimaalisella tasolla. Valmistetut solukasvatuskammio ja lämpöanturilevy on esitelty Kuvassa 1.

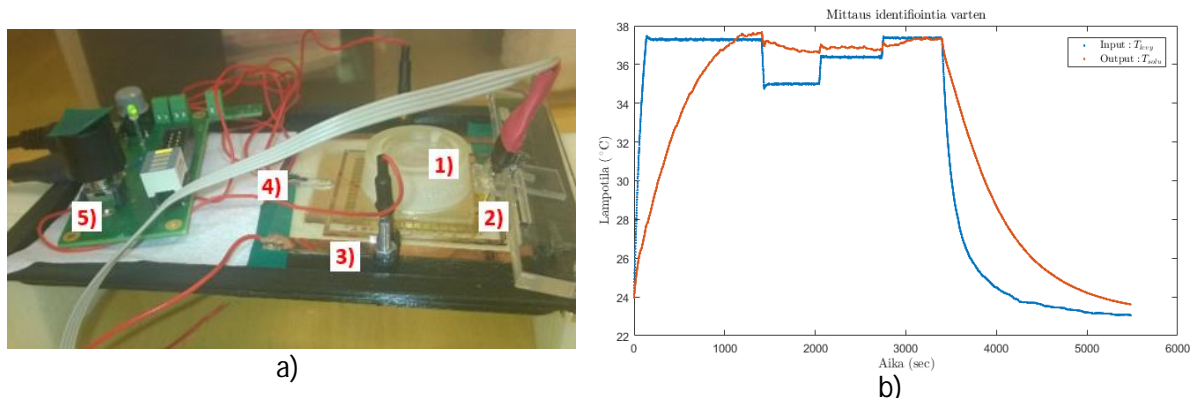
Optimaalisessa solukasvatuksessa on erittäin tarpeellista pystyä mittaamaan ja ylläpitämään haluttu lämpötila solualueella. Siksi lämpötila olisi tarpeen mitata suoraan nimenomaan solualueelta, ei kauempaa muualta solukasvatuslaitteesta ja olettaa mittauksen pätevän myös solualueelle.

Ongelma suorassa mittauksessa on se, että se voi haitata soluja, ja toisaalta anturin asettaminen solualueelle voi olla hankalaa ja se myös vaikeuttaa solukasvatusympäristön sulkemista, samalla kasvattaen kontaminaatoriskiä. Anturi myös yleensä estää solukasvatuksessa tärkeän mikroskopoinnin käytön solujen tarkastelemiseen.

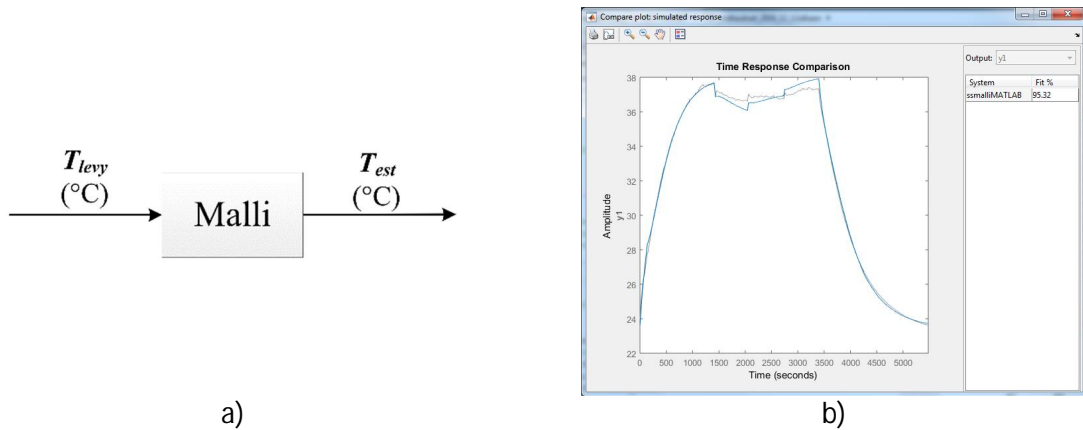
Edellä mainittujen syiden johdosta olemme kehittäneet lämpötilasäätöjärjestelmän perustuen lämpötilan approksimointiin epäsuoran mittauksen perusteella. Järjestelmässämme ei tarvitse asentaa anturia solualueelle, koska halutun alueen lämpötilan estimaatti on saatu alueen ulkopuolisen lämpöanturin mittauksen ja työssä kehitellyn matemaattisen mallin avulla. Ensimmäisessä kokeessa mittasimme samanaikaisesti sekä solualueen ( $T_{solu}$ ) että lämpölevyn ( $T_{levy}$ ) lämpötilaa, kuten on esitetty Kuvassa 2. Sitten, käyttäen mittausdataa ja identifiointia kehitimme lämpötilan estimoinnin matemaattisen mallin. Saadulla sisäänmeno-ulostulo datalla ja MATLAB:n avulla loimme 3.kertaluvun tilaesityksen, joka kuvaa solualueen dynaamista lämpötilaa tarpeeksi tarkasti, kuten voi havaita Kuvasta 3. Kuvassa 4a esitetystä lohkoakaaviosta nähdään koko lämpötilan säätöjärjestelmä, jossa takaisinkytkentähaarassa mitatulla ulkopuolisen anturin lämpötilalla ( $T_{levy}$ ) sekä luodulla mallilla estimoidaan halutun alueen lämpötilaa ( $T_{est}$ ), jota sitten verrataan asetusarvoon. Demonstroimme, kuinka järjestelmä pystyy ylläpitämään solu ympäristön lämpötilan epäsuoralla mittauksessa. Tässä kokeessa mittasimme myös solualueen lämpötilan ( $T_{solu}$ ) ja vertailimme miten mitattu ja estimoitu solualueen lämpötila erosivat toisistaan. Tulosten perusteella järjestelmä pystyy ylläpitämään solualueen lämpötilan asetusarvossa 37°C noin 0.4°C tarkkuudella yli 15 tuntia, kuten on esitetty Kuvassa 4b.



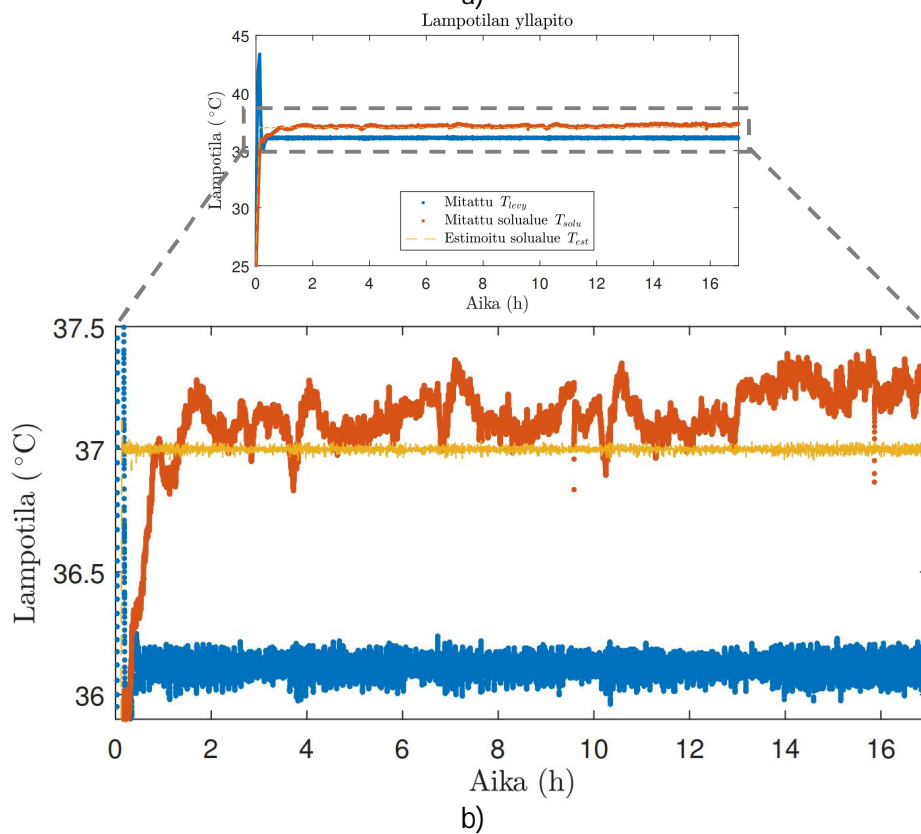
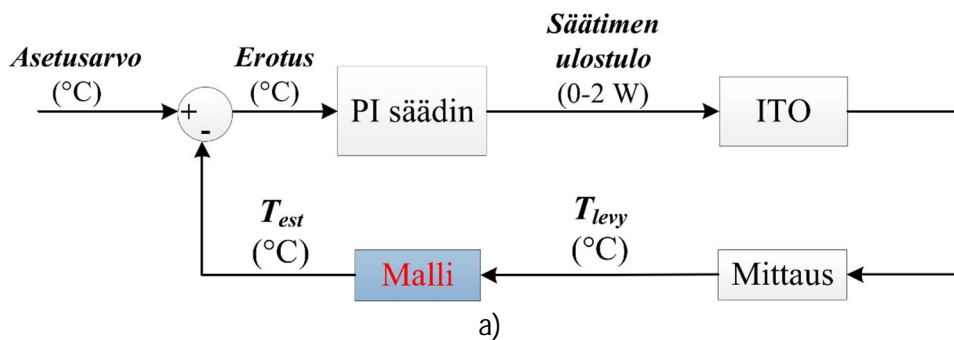
Kuva 1: a) Lämpöanturilevyn skeema ja käytetty anturi suurennettuna, sekä b) solukasvatuskammio valmistetun lämpöanturilevyn päällä.



Kuva 2: a) Mittausjärjestely: 1) solukasvatuskammio sisältäen 1 ml nestettä, 2) lämpöanturilevy, 3) lämmityslevy (ITO-levy), 4) pt100 anturi jonka data antaa lämpötilan  $T_{levy}$ , ja 5) kontrolleri ja b) identifiointimallin luomiseen käytetty mittaus.



Kuva 3: a) Lohkokaavio esittää, kuinka solualan lämpötila ( $T_{solu}$ ) estimoidaan ( $T_{est}$ ) perustuen levyn lämpötilan mittaukseen pt100-anturilla ( $T_{levy}$ ), ja b) MATLAB:n ja identifiointin avulla saadun mallin vertailu mittaustietoon.



Kuva 4: a) Säätiöjärjestelmän lohkokkaavio, b) mittausdata, jossa tavoitteena on ylläpitää  $37^{\circ}\text{C}$  solualan lämpötilan perusteella.

## Lähteet

E. Laurila, A. Ahola, J. Hyttinen, and K. Aalto-Setälä, "Methods for in vitro functional analysis of iPSC derived cardiomyocytes - Special focus on analyzing the mechanical beating behavior," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, no. 7, pp. 1864–1872, 2016.