

Mesenkymaalisten kantasolujen induktio luuta muodostaviksi osteoblasteiksi biomateriaalilla

Pro Gradu – tutkielma
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Tampereen yliopisto
Katriina Joensuu
Lokakuu 2006

Alkusanat

Tämä pro gradu – tutkielma on tehty Tampereen yliopistossa Lääketieteellisessä tiedekunnassa Lääketieteellisen teknologian instituutissa. Tarkastajina ovat toimineet dosentti Teuvo Hentunen ja professori Markku Kulomaa. Tutkielman on ohjannut dosentti Teuvo Hentunen.

Varsinainen tutkimusosa on suoritettu Turun yliopistossa Biolääketieteen laitoksella Anatomian yksikössä. Tutkielma on tehty osana Tekesin rahoittamaa Teknoluu-projektia.

Haluan kiittää ohjaajaani Teuvo Hentusta mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta ja hyvästä ohjauksesta. Haluan kiittää myös professori Markku Kulomaata tutkielman tarkastamisesta. Kiitän myös kaikkia muita henkilöitä, jotka ovat auttaneet tutkielman teossa.

Turku, Lokakuu 2006

Katriina Joensuu

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka: Tampereen yliopisto, Lääketieteellinen tiedekunta, Lääketieteellisen teknologian instituutti
Tekijä: Joensuu, Katriina Vilhelmiina
Otsikko: Mesenkymaalisten kantasolujen induktio luuta muodostaviksi osteoblasteiksi biomateriaalilla
Sivumäärä: 66
Ohjaaja: Yliassistentti, dosentti Teuvo Hentunen
Tarkastajat: Yliassistentti, dosentti Teuvo Hentunen ja professori Markku Kulomaa
Aika: Lokakuu 2006

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Luu on hyvin uusiutumiskykyinen kudos. Luusolut erilaistuvat kantasoluistaan erilaisten signaalien ohjaamina. Tiedetään kuitenkin useita patologisia tiloja, joissa luun kudosteknologia on tarpeen. Luun kudosteknologiassa on lähiaikoina tutkittu paljon synteettisiä biohajoavia polymeerejä polylaktidia (PLA), polyglykolidia (PGA) ja näiden kopolymeeria poly(laktidi-ko-glykolidia) (PLGA). Tässä tutkimuksessa käytimme PLGA:a sekä komposiittimateriaalia PLGA-bioaktiivinen lasi. Seurasimme kuinka mesenkymaaliset kantasolut tarttuivat, proliferoituivat ja erilaistuivat näillä biomateriaaleilla ja tutkimme oliko polymeerien NaOH-pintakäsittelyllä vaikutusta solujen tarttumiseen. Teimme lisäksi mesenkymaalisille kantasoluille esikäsittelyjä fibroblastikasvutekijä 2:lla ja 8:lla (FGF-2 ja FGF-8), luun morfogeneettinen proteiini 4:llä (BMP-4) ja lisäkilpirauhashormonilla ja tutkimme onko niillä luun muodostusta lisäävää vaikutusta in vitro. Tutkimme myös vaikuttaako BMP-4 solujen erilaistumiseen annosteltuna biomateriaalin päälle solujen istuttamisvaiheessa.

Menetelmät: Solujen kasvatus tapahtui perinteisin soluviljelymetodein staattisessa ympäristössä. Mesenkymaalisia kantasoluja kasvatettiin seerumirikkaassa α -MEM-elatusnesteessä ilman kasvutekijöitä ennen kokeiden aloitusta. Hiiren solut olivat peräisin NMRI-hiirten luuytimeistä ja ihmisen solut olivat rikastettu luuydinnäytteestä. Osteoblastien erilaistumista ja luunmuodostusta karakterisoitiin eri värjäysmenetelmin tiettyjen viljelyjaksojen (3-4 viikon) jälkeen. Käytettyjä värjäysmenetelmiä olivat värjäys alkaalisen fosfataasin (ALP) suhteen, sekä von Kossa-värjäys.

Tutkimustulokset: Molemmat biomateriaalityypit osoittautuivat soluyhteensopiviksi. FGF-2- ja FGF-8 -esikäsittelyt lisäsivät mesenkymaalisten kantasolujen proliferaatiota ja osteogeenisyyttä voimakkaasti, kun taas BMP-4:llä ja lisäkilpirauhashormonilla ei ollut vaikutusta kontrolliin verrattuna. NaOH-käsittelyllä ei näyttänyt olevan merkittävää vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen tarttumiseen ja osteogeenisyyteen. BMP-4 lisättynä biomateriaaliin solujen istutusvaiheessa ei stimuloinut solujen erilaistumista osteoblasteiksi tässä tutkimuksessa.

Johtopäätökset: FGF-2 ja FGF-8 lisäävät mesenkymaalisen kantasolun proliferaatio- ja erilaistumiskykyä. Ne ovat optimaalisia kasvutekijöitä lisättynä viljelmään hieman ennen osteoblasti-induktiota. BMP-4 ja lisäkilpirauhashormoni eivät ole optimaalisia tekijöitä annettuna viljelmän alkuvaiheessa, vaan mahdollisesti vaikuttavat osteoblastien erilaistumiseen ja luun muodostukseen myöhemmässä vaiheessa kuin FGF:t.

MASTER`S THESIS

Place: University of Tampere, Medical Faculty, Institute of Medical Technology
Author: Joensuu, Katriina Vilhelmiina
Title: Induction of mesenchymal stem cells in to bone forming osteoblasts in biomaterial
Pages: 66
Supervisor: Adjunct Professor, Docent Teuvo Hentunen
Reviewers: Adjunct Professor, Docent Teuvo Hentunen and Professor Markku Kulomaa
Date: October 2006

ABSTRACT

Background and aims: Bone has good renewing capacity trough its stem cells. There are still several pathological conditions where bone tissue engineering is needed.

PLGA is a polymer which has been a target biomaterial in many studies of tissue engineering. In this master`s thesis we studied how mesenchymal stem cells (MSCs) adhered, proliferated and differentiated in PLGA and PLGA with bioactive glass granules. We also studied what kind of impact NaOH has on polymer surfaces and on adherence and osteogeneity of mesenchymal stem cells. We also studied whether fibroblast growth factors 2 and 8 (FGF-2 and 8), bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) or parathyroid hormone (PTH) had osteogenic impact on MSC when added before osteoblast induction. Finally, we studied if BMP-4 had effect on cell differentiation when added at the same time with the cells on biomaterials.

Methods: We used standard cell culture methods on static environment. We used human and murine bone marrow mesenchymal stem cells. MSCs were cultured in medium with high serum content without any growth factors before study.

We characterized osteoblast differentiation and bone formation after several time points with different staining methods.

Results: FGF-2 and FGF-8 had strong impact on cell proliferation and differentiation when added before osteoblast induction. BMP-4 and PTH did not have any impact on cell proliferation or differentiation when added before induction. NaOH did not make any difference on cell adherence or differentiation. BMP-4 did not have impact when added with the cells to the biomaterials.

Conclusions: FGF-2 and FGF-8 are optimal growth factors when added just before osteoblast induction. They have strong impact on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation towards osteoblastic cell line. BMP-4 and PTH probably have stronger effect when added to the cultures after osteoblast induction.

SISÄLLYS

1. Johdanto.....	7
2. Kirjallisuuskatsaus	9
2.1 Luun rakenne ja toiminta.....	9
2.1.1 Luun väliaine.....	9
2.1.2 Luun solut	11
2.1.3 Luun kehitys.....	15
2.1.4 Luun uusiutuminen	17
2.2 Mesenkymaaliset kantasolut.....	18
2.2.1 Mesenkymaalisten kantasolujen eristys ja viljely	20
2.2.2 Pintamarkkerit	20
2.2.3 Eriilaistuminen	21
2.3 Luun kudosteknologia.....	21
2.3.1 Mesenkymaaliset kantasolut luun kudosteknologiassa	22
2.3.2 Biomateriaalit luun kudosteknologiassa	23
2.4 Hormonit ja paikalliset kasvutekijät luun muodostuksessa ja uusiutumisessa	28
2.4.1 Lisäkilpirauhashormoni	29
2.4.2 Luun morfogeneettiset proteiinit (BMP:t)	30
2.4.3 Fibroblastikasvutekijät (FGF:t).....	31
3. Tutkimuksen tavoitteet.....	33
4. Menetelmät	34
4.1 Hiiren mesenkymaalisten kantasolujen eristäminen ja viljely	34
4.2 Ihmisen mesenkymaalisten kantasolujen ylläpito ja käsittely	35
4.2.1 Trypsinointi.....	35
4.2.2 Kasvutekijäesikäsittelyt	35
4.3 Biomateriaalien käsittely	36
4.4 Solujen istuttaminen biomateriaalille	36
4.4.1 Hiiren mesenkymaalisten kantasolujen käsittely	36
4.4.2 Ihmisen mesenkymaalisten kantasolujen käsittely	37

4.5 Viljelmien lopetukset ja värjäykset	38
5. Tulokset	40
5.1 Hiiren mesenkymaaliset kantasolut	40
5.2 Ihmisen mesenkymaaliset kantasolut.....	40
5.2.1 NaOH- käsittely ja BMP-4:n lisäys	40
5.2.2 Kasvutekijäesikäsitellyt ihmisen mesenkymaaliset kantasolut.....	41
6. Pohdinta	49
6.1 Hiiren solut	49
6.2 Ihmisen solut.....	49
6.2.1 NaOH-käsittely ja BMP-4:n lisäys	49
6.2.2 Kasvutekijäesikäsitellyt	50
7. Johtopäätökset	52
LÄHDELUETTELO	55

Lyhenteet

BMP	luun morfogeneettinen proteiini (engl. bone morphogenetic protein)
FBS	naudan sikiön seerumi (engl. fetal bovine serum)
FGF	fibroblastikasvutekijä (engl. fibroblast growth factor)
FSD	toiminnallinen kalvoalue (engl. functional secretory domain)
IL	interleukiini
M-CSF	makrofagien tuotantoa stimuloiva tekijä (engl. macrophage colony stimulating factor)
MSC	mesenkymaalinen kantasolu (engl. mesenchymal stem cell)
OPG	osteoprotegeriini
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PTH	lisäkilpirauhashormoni
PGA	polyglykolidi
PLA	polylaktidi
PLGA	poly(laktidi-ko-glykolidi)
RANK	engl. reseptor activator of nuclear factor κ B
RANK-L	RANK-ligandi (engl. reseptor activator of nuclear factor κ B ligand)
RGD	arginiini, glysiini ja asparagiinihappo

1. Johdanto

Luukudos koostuu mineralisoituneesta proteiini-rikkaasta solun ulkoisesta tilasta, sekä luun soluista. Luun matriksi koostuu lähinnä tyypin I kollageenista ja ei-kollageenisista proteiineista, kuten osteokalsiinista, osteopontiinista ja osteonektiinistä. Epäorgaaninen aines on pääasiassa hydroksiapatiittia. Luuta muodostavat solut ovat mesenkymaalista alkuperää olevat osteoblastit, jotka tuottavat soluväliaineen sekä mineraalin ja erilaistuvat varsinaisiksi luusoluiksi eli osteosyyteiksi. Luunsyöjäsolut, eli osteoklastit, ovat hematopoeettista alkuperää, ja niiden tehtävänä on luun hajotus. Luu on aineenvaihdunnallisesti aktiivista kudosta ja sen uusiutumiskyky on hyvä, koska uusia osteoblasteja ja osteoklasteja muodostuu jatkuvasti luun kantasoluista erilaisten signaalien ohjaamina. Tiedetään kuitenkin useita patologisia tiloja, jossa luun kudosteknologia on tarpeen.

Kudosteknologiassa käytetään hyväksi elimistön uusiutumiskykyä. Mesenkymaalisten kantasolujen löytämisen myötä kudosteknologia on kehittynyt ja tutkimus vilkastunut. Tavoitteena on esimerkiksi korvata kudoksia ja jopa kokonaisia elimiä kudosteknologisesti, käyttämällä potilaan omia soluja ja biomateriaaleja hyväksi. Eräs tyyppiesimerkki kudosteknologisesta sovelluksesta on, että ensin eristetään potilaalta kantasoluja, joita sitten kasvatetaan in vitro, istutetaan biomateriaalille, erilaistetaan ja lopuksi solut viedään biohajoavassa materiaalissa vaurioituneeseen kudokseen, missä solut muodostavat uutta kudosta nopeuttaen paranemista. Solu-, geeni- ja kasvutekijäterapiat vauriokudoksessa ovat myös kudosteknologisen tutkimuksen kohteena. Tämä tutkimus liittyy juuri yllämainittuun sovellusmalliin, jossa käytetään hyväksi soluterapiaa, eli solujen kasvatusta in vitro kasvutekijöiden vaikutuksen alaisena.

Luun kudosteknologiassa on kokeiltu erilaisia biomateriaaleja. Paljon tutkittuja materiaaleja ovat synteettiset biohajoavat polymeerit polylaktidi (PLA), polyglykolidi (PGA) ja näiden kopolymeerit poly(laktidi-ko-glykolidi) (PLGA). Tässä tutkimuksessa käytettiin PLGA:ta sekä komposiittimateriaalia PLGA-bioaktiivinen lasi. Bioaktiivinen lasi muodostaa mekaanisesti kestävästä kemiallisesta sidoksesta elävän luukudoksen kanssa (Hench 1973). Tutkimme tässä työssä kuinka mesenkymaaliset kantasolut tarttuivat, proliferoituivat ja erilaistuivat näillä biomateriaaleilla ja tutkimme myös onko

polymeerien NaOH-pintakäsittelyllä vaikutusta solujen tarttumiseen. Teimme lisäksi mesenkymaalisille kantasoluille esikäsittelyjä eräillä luun sikiöaikaisessa kehityksessä ja luun uudismuodostuksessa mukana olevilla tekijöillä ja tutkimme oliko niillä luun muodostusta lisäävää vaikutusta in vitro. Tutkimme myös vaikuttiko BMP-4 solujen erilaistumiseen annosteltuna biomateriaalin päälle solujen istuttamisvaiheessa.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1 Luun rakenne ja toiminta

Luusto muodostaa kehon tukirangan. Se toimii lihasten kiinnittymispaikkana ja näin mahdollistaa liikkeen synnyn lihasten supistuessa nivelten yli. Luusto antaa myös suojan tärkeille elimille, kuten aivoille ja luuytimelle, ja toimii elimistön mineraalivarastona. Luukudos muodostuu luun soluista ja solun ulkoisesta mineralisoituneesta proteiinirikkaasta väliaineesta.

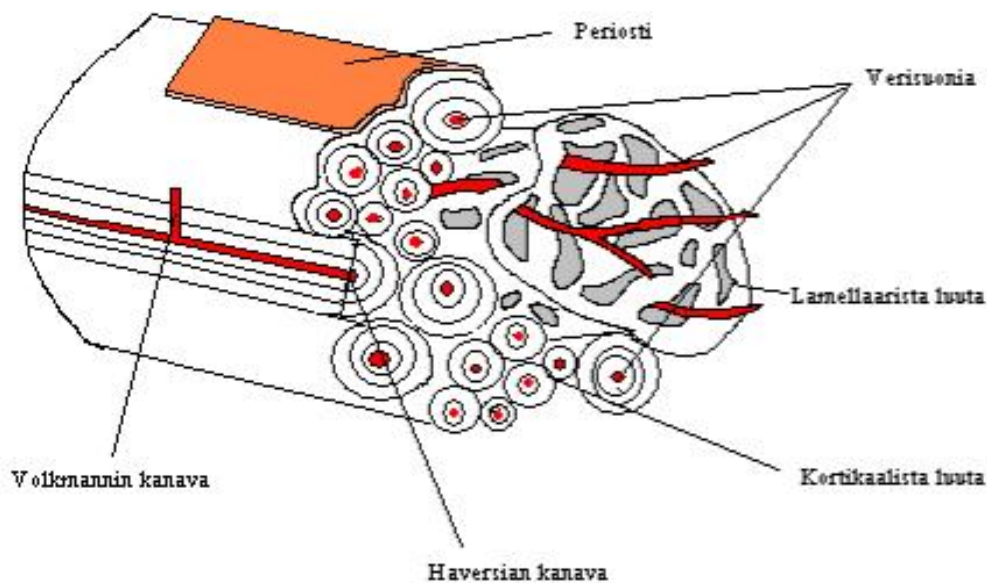
Anatomisesti luutyypit voidaan jakaa pitkiin luihin, kuten reisi- ja sääriluuhun, ja litteisiin luihin, kuten esimerkiksi kallon luut.

Luukudos voidaan jakaa kahteen alatyypiin: kortikaaliseen- eli kuoriluuhun ja trabekulaariseen- eli lamellaariseen- eli hohkaluuhun (Kuva 1). Kortikaalista luuta on luun kuoriosassa ja pitkien luiden diafyysialueella. Se kattaa noin 80 % luuston massasta. Sen rakenne on tiivistä ja kovaa. Kortikaalinen luu antaa luustolle sen mekaaniset ja suojaavat ominaisuudet. Histologisesti se on järjestäytynyt osteonirakenteiksi, joiden keskellä on verisuonen ja hermon täyttämä Haversian kanava. Siellä täällä on myös horisontaalisesti kulkevia Volkmannin kanavia (Kuva 1). Trabekulaarinen luu on metabolisesti aktiivista luukudosta. Se muodostaa sienimäisen verkoston pienten luiden sisäosiin ja pitkien luiden epifyysialueelle. Verkoston täyttää luuydin. Kumpikin luukudostyyppi koostuu samoista soluista ja matriksista, järjestäytyminen on vain erilaista.

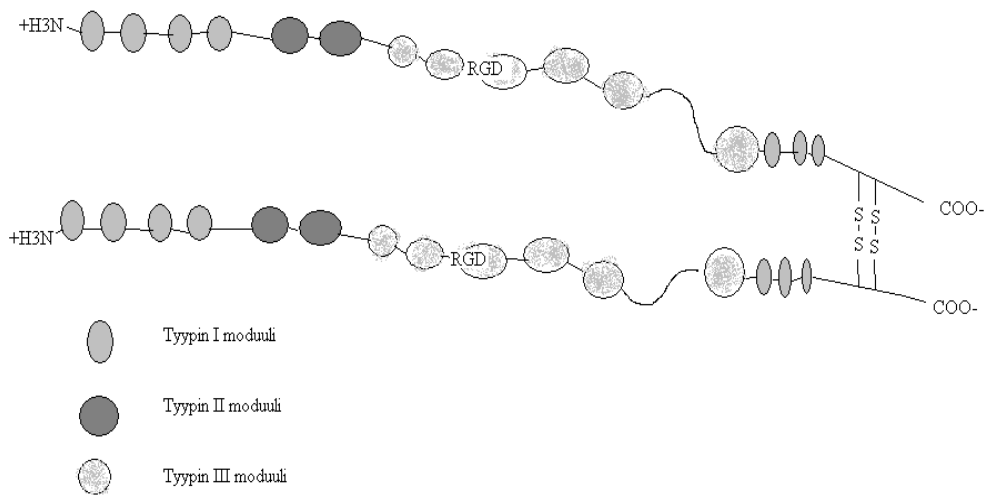
2.1.1 Luun väliaine

Luun orgaanisen väliaineen proteiineista pääasiallinen proteiini on tyypin I kollageeni, jota on jopa 90 % kaikista matriksin proteiineista. Se antaa luulle vetolujuutta ja pinta-alan mineraalitekille. Muita proteiineja ovat mm. osteopontiini, osteonektiini ja osteokalsiini. Osteopontiini välittää solujen tarttumisen väliaineen mineralisoituneisiin

proteiineihin aminohapposekvenssin arginiini-glysiini-asparagiinihappo (RGD) -tunnistusjakson avulla. Monet solun pinnan integriinireseptorit tunnistavat tämän sekvenssin ja sitoutuvat siihen (Heino & Vuoto, 2001). Osteopontiinilla on havaittu olevan osuutta luun mineralisaatiossa (Mark ym., 1988; McKee ym., 1992) sekä luun kantasolujen erilaistumisen säätelyssä (Stier ym., 2005). Osteonektiini ja osteokalsiini luultavasti estävät luun liiallisen mineralisaation (Bianco ym., 1988). Muun solunulkoisen tilan tapaan luussa on myös proteoglygaaneja ja glykoproteiineja. Yksi tärkeä glykoproteiini on fibronektiini (Kuva 2), joka kiinnittää soluja ja matriksin komponentteja toisiinsa RGD-sekvenssin välityksellä, kuten osteopontiini. Fibronektiiniä tuotetaan useassa vaiheessa luun muodostuksen aikana (Weiss & Reddi, 1981). Luun epäorgaaninen materiaali on pääasiassa hydroksiapatiittia $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Mineraali antaa luulle sen puristuslujuuden.



Kuva 1. Luun rakenne. Kortikaalinen luu muodostuu osteoblastien muodostamista osteonirakenteista, joiden sisälle luukudosta tuottavat osteoblastit ovat jääneet ja muuttuneet osteosyyteiksi. Osteonin sisällä kulkee Haversian kanava, jota pitkin verisuoni pääsee tuomaan happea ja ravintoa luukudokselle. Putkiluiden epifyysialueella ja pienten luiden sisällä on lamellaarista luuta, jonka rakenne on huokoista ja sienimäistä. Luuta ympäröi luukalvo, periosti.



Kuva 2. Fibronektiini koostuu kahdesta alayksiköstä, mitkä ovat kahdella rikkisillalla kiinni toisissaan. Alayksiköt koostuvat kolmenlaisista moduuleista, joiden avulla fibronektiini kiinnittyy muihin molekyyliin. (Mukaiillen Heino ja Vuento, Solubiologia 2001).

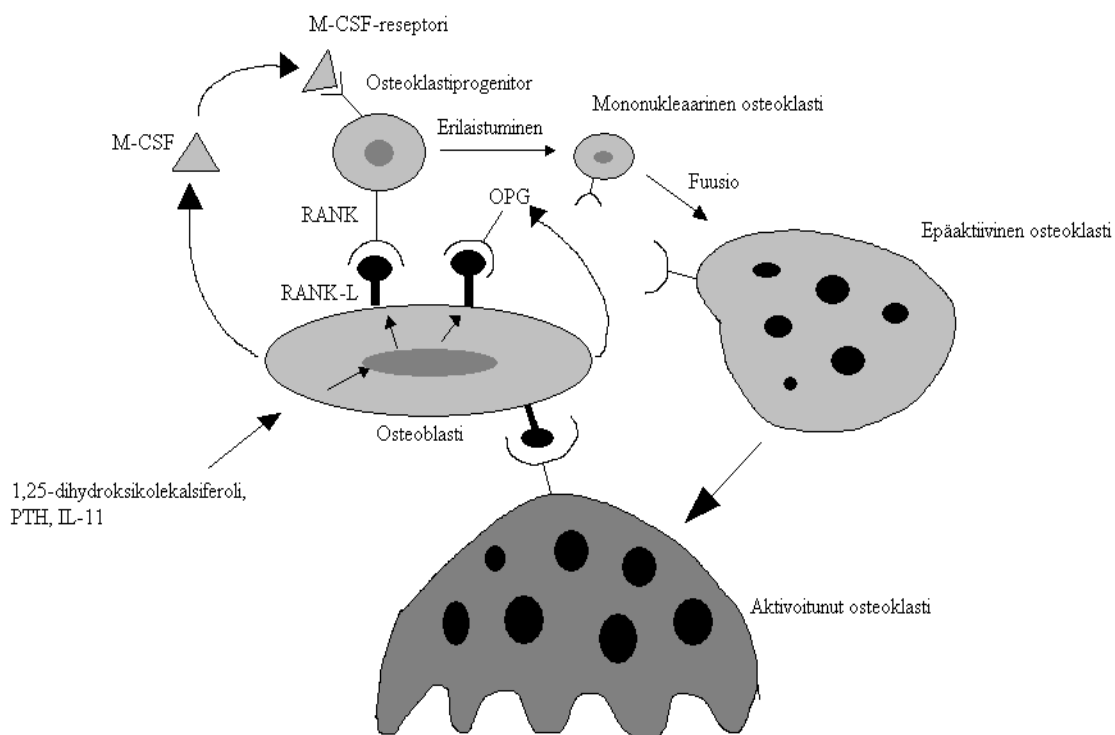
2.1.2 Luun solut

Luun solutyypit ovat mesenkymaalista alkuperää olevat osteoblastit, osteosyytit ja näiden esiasteet sekä hematopoeettista alkuperää olevat monitumaiset luunsyöjäsolut eli osteoklastit.

Osteoblastit

Osteoblastit tuottavat luumatriksin orgaanisen komponentin ja aikaansaavat luun mineralisaation. Metabolisesta aktiivisuudesta kertovat suuri endoplasminen kalvosto ja useat Golgin laitteet. Osteoblasteilla on tärkeä rooli myös luun resorptioon säätelyssä RANK-ligandin (receptor activator of NF kappa B ligand) avulla (Lacey ym., 1998). RANK-ligandi yhdessä M-CSF:n (macrophage-colony stimulating factor) kanssa stimuloivat osteoklastien muodostumista verenkierron ja luuytimen mononukleaarista soluista (Suda ym., 1999; Hofbauer ym., 2000). Osteoklastin kantasolut sekä kypsät osteoklastit ilmentävät RANK:ia (receptor activator of NF kappa B), RANK-ligandin reseptoria (Jimi ym., 1999; Nakagawa ym., 1998). RANKL:n sitouduttua reseptoriinsa

M-CSF:n läsnäollessa osteoklastin kantasolut fuusioituvat ja erilaistuvat kypsiksi osteoklasteiksi (Kuva 3). Osteoblastit tuottavat myös liukoista reseptoria eli osteoprogeniinia (OPG), joka sitoutuessaan RANK-ligandiin toimii RANK:n vastavaikuttajana ja estää näin osteoklastien muodostumisen ja aktivoitumisen. Näiden kahden tekijän avulla osteoblastit toimivat keskeisenä luun metabolian säätely-yksikkönä, johon useat liukoiset parakriiniset tekijät vaikuttavat (Kuva 3).

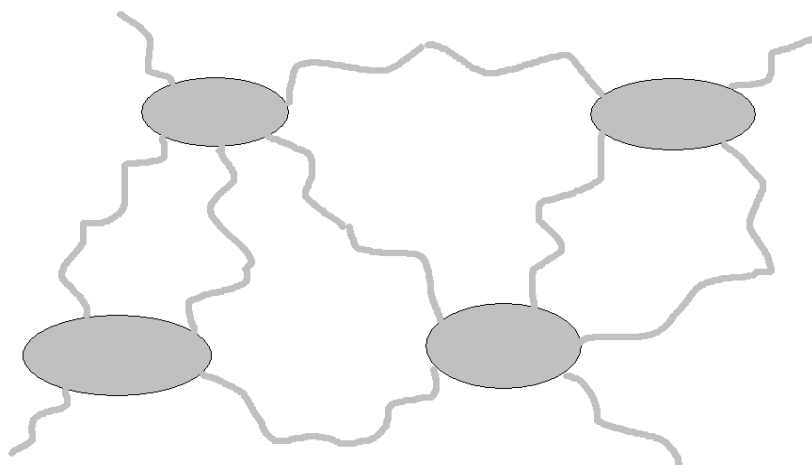


Kuva 3. Osteoblasti säätelee osteoklastien muodostusta RANK-ligandin (RANK-L) ja OPG:n (Liukoinen RANK) avulla. RANK-L:n ilmentymistä lisäävät mm. D-vitamiini, parathormoni ja interleukiini-11. OPG:n synteesiä lisää puolestaan mm. estrogeeni, jolla on täten luun massaa lisäävä vaikutus. (Mukaiillen Udagawa, 2002)

Osteosyytit

Osteosyytit ovat luun monilukuisin solutyyppi. Niitä on jopa 10 kertaa osteoblastien lukumäärä. Osteosyytit ovat erilaistuneet osteoblasteista. Osteoblastien tuottaessa soluväliainetta, ne jäävät tuottamansa matriksin sisälle ja vähitellen muuttuvat

aineenvaihdunnallisesti epäaktiivisemmiksi osteosyyteiksi (Palumbo ym., 1990). Osteosyytit ovat pienempiä kuin osteoblastit, mutta osteoblastien erilaistuessa osteosyyteiksi ne kasvattavat solukontaktipintoja muodostaen verkoston muiden osteosyyttien kesken. Tämä on osoitettu solun aktiinitukiverkoston vaiheittaisella järjestäytymisellä erilaistumisprosessin aikana (Kamioka ym., 2004). Näiden solukontaktipintojen välityksellä osteosyytit viestivät keskenään. Tämän osoittaa solulokkeissa sijaitsevat monimutkaiset aukkoliitosrakenteet, jotka kattavat koko osteosyyttiverkoston (Doty, 1981; Shapiro, 1997). Osteosyyteillä oletetaan olevan tärkeä rooli luun mekaanisen kuormituksen aistijana (Mullender & Huijkes, 1997), ja juuri tämä mikrofilamenteistä koostuva solun tukiranka on ajateltu olevan tärkein tekijä mekaanisen kuormituksen aistijana ja tiedon välittäjänä. Uusimpien tutkimusten perusteella näyttäisi siltä, että osteosyytti on se solutyyppi, joka säätelee sekä osteoblastin, että osteoklastin erilaistumista ja toimintaa (Heino ym., 2004; Gu ym., 2005; Kurata ym., 2006).



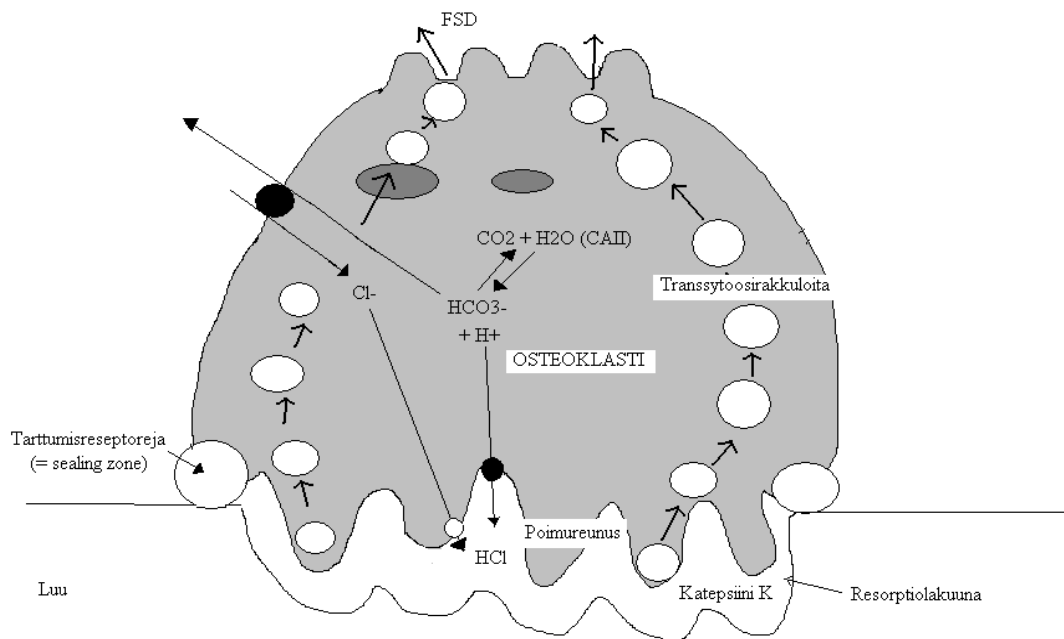
Kuva 4. Osteosyytit muodostavat luussa verkoston pitkien ulokkeiden avulla ja viestivät näin keskenään sekä ohjaavat muiden luun solutyypin toimintaa.

Osteoklastit

Osteoklastit ovat ainoita luun hajotukseen kykeneviä soluja. Kypsät osteoklastit eivät jakaannu ja niiden elämänsaika on jokseenkin lyhyt. Ne ovat monitumaisia jättisoluja jotka muodostuvat yksitumaisista esisoluista fuusioitumalla (ks. kuva 3). Ihmisen

osteoklasteilla on tyypillisesti 5-8 tumaa, mutta joissain patologisissa tiloissa, kuten Paget`n taudissa tumia voi olla jopa sata (Väänänen, 2005).

Luun hajotus tapahtuu osteoklastin kiinnittyessä mineralisoituun matriksiin muodostamalla tiiviin vyöhykkeen (engl. sealing zone) (Lakkakorpi ym., 1989; Lakkakorpi & Väänänen, 1991; 1996). Solukalvo polarisoituu ja muodostuu erityisiä kalvodomeeneja kuten poimureunus (engl. ruffled border) ja toiminnallinen erittävä alue (engl. functional secretory domain, FSD). Apiaalikalvolle muodostuneen poimureunuksen alle muodostuu resorptiolakuuna, johon osteoklasti pumppaa protoneita käyttämällä V-tyypin ATPaasia. Samalla resorptiolakuunaan siirtyy kloridioneja solun sisältä. Näin pH laskee suotuisaksi luun mineraalin hajotukseen. (Väänänen ym., 1990)



Kuva 5. Aktiivisen osteoklastin ja luun väliin muodostuu resorptiolakuuna, johon osteoklasti pumppaa protoneita. Protoneita kuljetetaan resorptiolakuunaan tietynlaisten vesikkeleiden avulla osteoklastin sisällä. Tärkeässä roolissa ovat hiilihappoanhydraasi II, V-tyypin protonipumppu ja bikarbonaatti/kloridivaihtaja. Tarttumisreseptorit muodostavat sealing zone- kalvodomeenin, joka tiivistää resorptiolakuunan ympäristöstä. Katepsiini K hajottaa tyypin I kollageenia happamassa ympäristössä. Hajotettu luuainne otetaan solun sisään, kuljetetaan solun läpi FSD-kalvodomeenille ja eritetään sieltä edelleen ulos solusta. Transsytoosin aikana luuta hajotetaan edelleen tuntemattomilla mekanismeilla.

Pääasiallinen matriksia hajottava entsyymi on katepsiini K, mikä myös vieään resorptiolakuunaan (Inaoka ym., 1995; Drake ym., 1996). Katepsiini K hajottaa erityisesti kollageenia ja vaatii matalan pH:n toimiakseen. Soluväliaineen osittain hajonnut materiaali otetaan solun sisään ja kuljetetaan transsytoosimenetelmällä ulos solusta solun FSD-kalvodomeenin kautta (Nesbitt & Horton, 1997; Salo ym., 1997).

2.1.3 Luun kehitys

Sikiön kehityksen aikana luuta muodostuu kahdella tavalla: rustoisen mallin kautta endokondraalisella luun muodostuksella tai suoraan mesenkymaalista kudoksesta intramembranoottisen luutumisen kautta.

Endokondraalinen luun muodostuminen

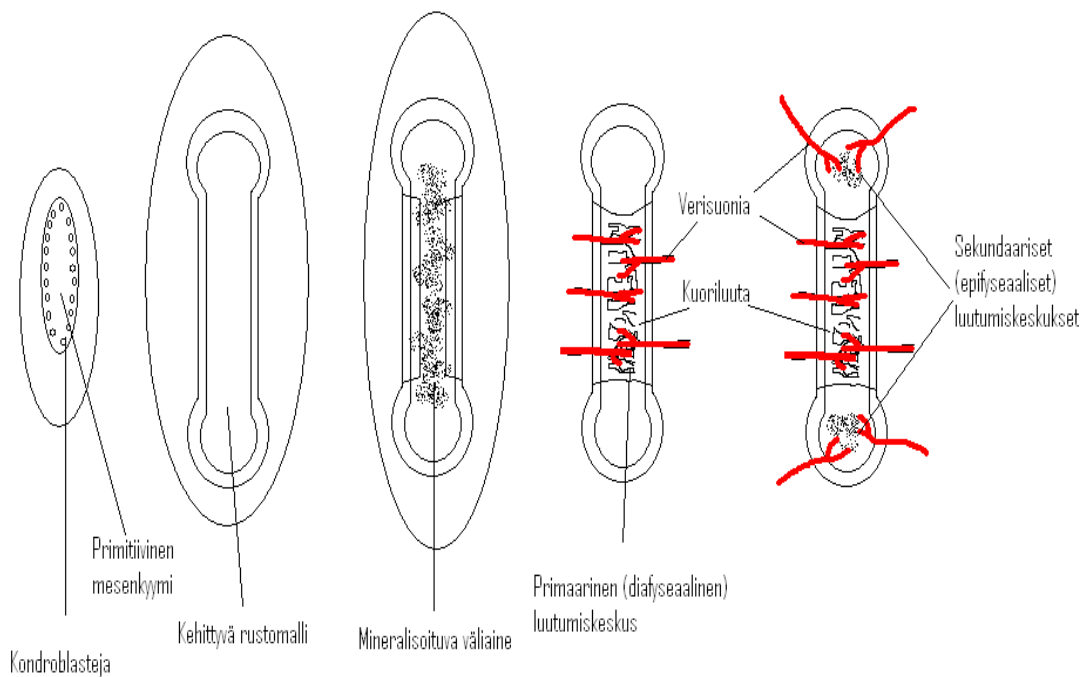
Endrokondraalisen luutumisen kautta muodostuu suurin osa ihmisen luista, erityisesti putkiluut, kuten raajojen luut. Aluksi mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat kondroblasteiksi ja syntetisoivat matriksin proteiineja. Ruston väliaine kalsifioituu ja kondrosyytit hypertrofioituvat ja joko häviävät apoptoottisesti uusien mesenkymaalisten solujen tieltä, jotka vaeltavat paikalle muodostuneiden verisuonien välityksellä, tai erilaistuvat suoraan osteoblasteiksi asymmetrisen solunjakautumisen kautta (Roach ym., 1995). Seuraavaksi kalsifioitunut rusto resorpoidaan ja osteoblastit tuottavat epäkypsää luuta kalkkeutuneen rustomallin pinnalle (Roach, 1990, 1992; Thesing ym., 1991; Gerstenfield & Shapiro, 1996).

Sekundaarista luun muodostusta tapahtuu luiden kasvulevyissä. Kasvulevyt ovat pitkien luiden diafyysialueen ja epifyysialueen rajalle jäävä rustoinen vyöhyke, jossa luun pituuskasvu tapahtuu. Kasvulevyssä voidaan erottaa kolme eri vyöhykettä; reservivyöhyke on kauimpana diafyysistä, seuraavana on proliferatiivinen vyöhyke, jonka jälkeen seuraa hypertrofinen vyöhyke. Reservivyöhyke sisältää kantasoluja proliferatiivista vyöhykettä varten, eikä siellä tapahdu paljoakaan solun jakautumista. Proliferatiivisella vyöhykkeellä tapahtuu nopeaa solun jakautumista ja soluväliaineen

synteesiä. Hypertrofinen alue on tärkeä luun pituuskasvulle ja siinä tapahtuu varsinainen luutumisprosessi. (Downey & Siegel, 2006)

Intramembranoottinen luun muodostuminen

Intramembranoottisen luutumisen kautta muodostuvat useat kallon ja kasvojen luut sekä muut litteät luut. Silloin mesenkymaaliset solut erilaistuvat suoraan osteoblasteiksi ja luu muodostuu ilman rustoista mallia. Tällaisia luita kutsutaan membraanoottisiksi luiksi. (Franz-Ondendaal ym., 2006)

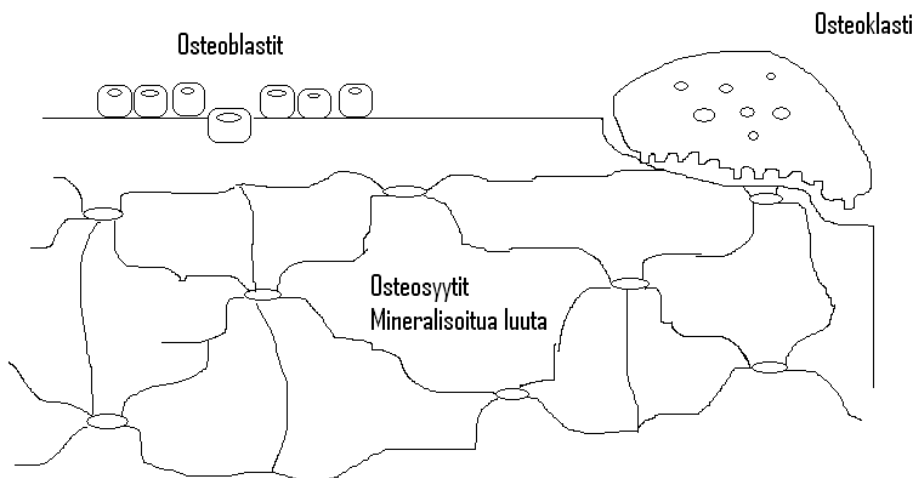


Kuva 6. Endokondraalinen luutuminen. Ensimmäiseksi primitiivisestä mesenkyymistä muodostuu rustoinen malli: kehittyneet kondroblastit tuottavat ruston väliainetta, joka mineralisoituu. Mineralisoituneeseen väliaineeseen tunkeutuu verisuonia ja rustoon muodostuu luutumiskeskus, jossa osteoblastit alkavat tuottaa luun väliainetta. Sekundaarista luutumista tapahtuu kasvuvaiheen aikana epifyysin ja diafyysin välisellä vyöhykkeellä eli kasvulevyn alueella, jossa on erikoistuneet rustosoluvyöhykkeet (ks. teksti).

2.1.4 Luun uusiutuminen

Luusto uusiutuu jatkuvasti elämän aikana. Ihmisellä luuston puoliintumisaika on noin 12-15 vuotta. Luun massa on huipussaan pian kasvukauden päätyttyä, jonka jälkeen se alkaa hieman laskea. Naisilla luumassan väheneminen kiihtyy selvästi vaihdevuosien jälkeen, ja puolet huippumassasta on menetetty 80 vuoden ikään mennessä. Miehillä väheneminen ei ole aivan näin huomattavaa. Arviolta 25-30 % miehen luumassasta häviää 80 vuoden ikään mennessä. (Väänänen, 1996)

Luuta muodostavat osteblastit erittävät luun väliaineen proteiineja luun pinnasta käsin. Vähitellen ne jäävät muodostamansa väliaineen sisälle ja muuttuvat osteosyyteiksi.



Kuva 7. Osteoblastit muodostavat mineralisoitua luun väliainetta luun pinnalla, kunnes jäävät tuottamansa väliaineen ympäröimäksi ja muuttuvat osteosyyteiksi. Osteoklastit hajottavat luuta mm. osteosyyttien signaalien ohjaamana. Osteoklastien aktiivisuuteen vaikuttavat useat systeemiset ja parakriiniset tekijät. (Mukaiillen Downey & Siegel, 2006)

Väliaineen mineralisaatio tapahtuu pian kun osteoblastit ovat erittäneet väliaineen proteiineja ulkopuolelleen. Osteoblastit tuottavat vesikkeleitä, joissa on korkea kalsiumin ja alkaalisen fosfataasin pitoisuus. Mineraalit vapautuvat solunulkoiseen

tilaan ja kiteytyvät mineraalikristalleiksi kollageenisäikeiden lomaan. Useat luun väliaineen ei-kollageeniset proteiinit ovat myös tärkeitä mineralisaatiossa. Esimerkiksi osteonektiinillä on kaksi voimakkaasti kalsiumia sitovaa kohtaa, ja sen on arveltu olevan tärkeä hydroksiapatiitin muodostumisessa (Cowles ym., 1998).

Samalla kun osteoblastit muodostavat uutta luukudosta, osteoklastit hajottavat luuta erilaisten signaalien ohjaamana. Resorptiotapahtumaa kuvaa työhypoteesiteoria, jonka mukaan osteosyytit lähettävät signaaleja osteoklasteille. Kun osteoklasti on kosketuksissa terveeseen osteosyyttiin, viestittää osteosyytti resorptiota estäviä viestejä. Kun taas osteoklasti kohtaa vaurioituneen osteosyytin, saa osteoklasti resorptiota aktivoivan signaalin. (Gu, 2005; Kurata ym., 2006)

Luun elinkaareissa on havaittavissa kolme vaihetta: luun kasvuvaihe, jossa saavutetaan nettopaino, luun tasapainovaihe, jossa luun määrä pysyy samana sekä vanhenemisvaihe, jossa luun määrä vähenee. Kasvuvaiheen aikana luun resorptio on vähäisempää verrattuna luun muodostukseen. Tasapainovaiheessa resorptiota ja luun uudismuodostusta tapahtuu samassa suhteessa. Kun ihminen vanhenee, on luun resorptio suurempaa suhteessa luun muodostukseen.

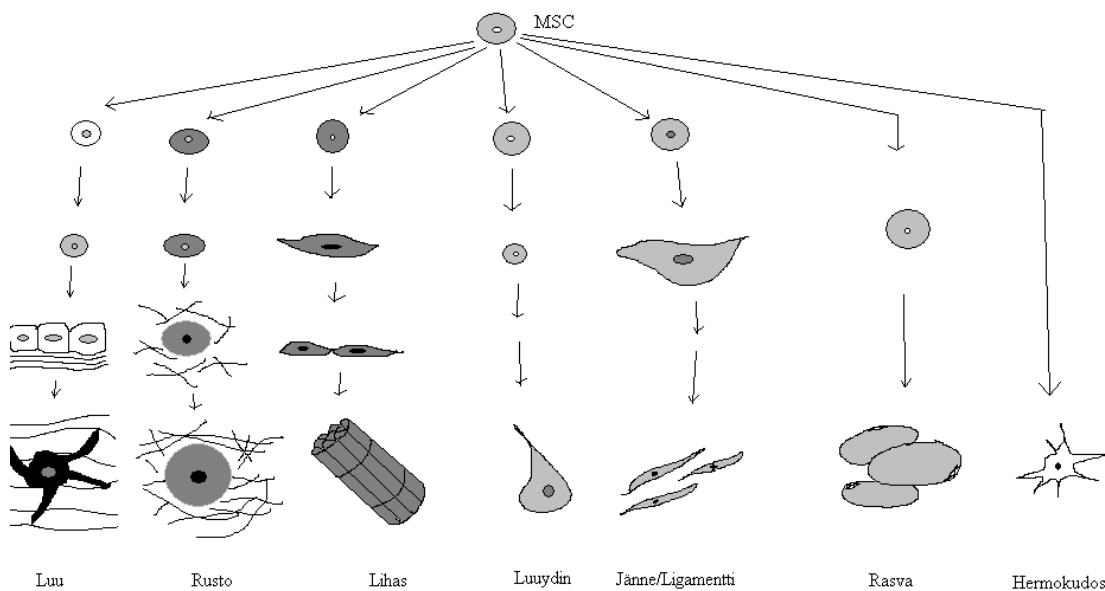
2.2 Mesenkymaaliset kantasolut

Useimmat mesenkymaalista alkuperää olevat kudokset uusiutuvat läpi elämän. Eri kudosten välinen uusiutumiskyky voi olla hyvin erilainen, mutta riippumatta kudoksesta, uusiutumiseen tarvitaan jakautumis- ja erilaistumiskykyisiä soluja. Tällaisia solupopulaatioita on löydetty luuytimeistä, jossa hematopoieettisten kantasolujen lisäksi on löydetty ryhmä soluja, jotka kykenevät tietyissä olosuhteissa erilaistumaan useiksi eri mesenkymaalista alkuperää olevaksi solutyypiksi. Näitä soluja kutsutaan mesenkymaaliseksi kantasoluksi.

Mesenkymaaliset kantasolut kuvattiin ensimmäisen kerran 1960-luvulla, kun Friedenstein ja Petrakova eristivät luuta muodostavia progenitorsoluja rotan luuytimeistä (Friedenstein ym., 1968). Siitä lähtien kyseiset solut ovat kiinnostaneet tutkijoita erityisesti kudosteknologian alalla.

Mesenkymaalaisilla kantasoluilla on kyky erilaistua tiettyjen signaalien vaikutuksesta fenotyypiltään erilaisiksi soluiksi, kuten osteoblasteiksi, kondrosyyteiksi ja adiposyyteiksi (Kuva 8). Kyseiset kantasolut ovat saaneet nimensä siitä, että ne erilaistuvat mesenkymaalista alkuperää oleviksi kudoksiksi. Viime vuosien aikana kuitenkin muutamat laboratoriot ovat raportoineet mesenkymaalisen kantasolun erilaistuneen jopa neuroniksi (Hou ym., 2003; Qiana & Saltzman, 2004; Wislet-Gendebiena ym., 2005), joka on ektodermaalista alkuperää.

Aikuisen mesenkymaalaisia kantasoluja on löydetty mm. luuytimestä, periostista, lamellaarisesta luusta, rasvakudoksesta, synoviasta, luustolihas kudoksesta ja maitohampaista. Näitä soluja löydetään hyvin vanhojenkin henkilöiden luuytimestä, mutta niiden lukumäärän on oletettu vähenevän iän myötä (Caplan, 1991). Vanhojen ihmisten kantasolujen jakautumis- ja erilaistumiskyvystä ei tosin ole vielä varmaa tietoa, mutta on ehdotettu, että ainakin näiden solujen osteogeenisyys sekä jänteenmuodostuskyky säilyisi läpi elämän (Leskelä ym., 2003; Dressler, 2005).



Kuva 8. Mesenkymaalinen kantasolu voi läpikäydä osteogeenesisin, kondrogeneesisin, myogeenesisin, tendogeenesisin/ligamentogeenesisin, adipogeenesisin, erilaistua luuytimen stroomasoluksi tai jopa neuroniksi tai joksikin hermotukisoluksi.

Mesenkymaalisten kantasolujen uusiutumiskyky on herättänyt suurta huomiota regeneratiivisen lääketieteen alalla, ja niiden biologiaa tutkitaan laajasti. Muutamia teorioita on kehitetty mesenkymaalisten kantasolujen stimuloimasta kudosten uusiutumisesta. Erään teorian mukaan mesenkymaalinen kantasolu toimii tyypillisen kantasolun tavoin korvaamalla vaurioituneita kudoksia erilaistamalla ja tuottamalla uutta tukikudosta. Toinen hypoteesi on, että transplantoitu mesenkymaalinen kantasolu voisi tuottaa kudosspesifisiä kantasoluja kiihdyttäviä kasvutekijöitä, jolloin kudosten uusiutuminen lisääntyisi. On ehdotettu myös, että joissain tapauksissa mesenkymaalinen kantasolu muodostaisi heterokaryonin tietyn kudoksen solutyypin kanssa. (Väänänen, 2005)

2.2.1 Mesenkymaalisten kantasolujen eristys ja viljely

Parhaiten mesenkymaalisia kantasoluja voidaan eristää luuytimeä, jolloin fraktio on puhtain ja se on helpoin karakterisoida (Pittenger ym., 1999). Ihmiseltä niitä eristetään useimmiten lantion crista iliaca superiorista (Digirolamo ym., 1999; Pittenger ym., 1999) ja jyrsijöillä tibian ja femurin diafyysistä. Yleensä koko luuydinäyte sentrifugoidaan tiheysgradienttiliuoksen, kuten Percollin, kanssa, jonka jälkeen solut maljataan erilaisin tiheyksin (1×10^4 solua/cm² - 0.4×10^6 solua/cm²) (Pittenger ym., 1999; Lodie ym., 2002; McBride ym., 2003).

Soluja viljellään perinteisin soluviljelymenetelmin esimerkiksi α -MEM-mediumissa (α -minimum essential medium), jossa on 10-15 % FBS (engl. fetal bovine serum, naudan sikiön seerumi). Mediumia vaihdetaan n. neljän päivän välein, jolloin myös nonadherentti hematopoeettinen solufraktio poistuu samalla.

2.2.2 Pintamarkkerit

Erilaisia pintamarkkereita on yritetty löytää mesenkymaalisten kantasolujen havaitsemisen, valikoimisen ja testaamisen helpottamiseksi. Useita monoklonaalisia vasta-aineita on pyritty valmistamaan tähän tarkoitukseen. Yksi esimerkki tällaisesta on Stro-1, minkä osoitettiin reagoivan ei-hematopoeettisen luuytimen kantasolun kanssa

(Simmons & Torok-Storb, 1991). Muita käytettyjä vasta-aineita ovat SH-2 ja SH-3. SH-2 kiinnittyy transformoivan kasvutekijä β :n reseptoriin ja SH-3 tunnistaa CD73-antigeenin mesenkymaalisen kantasolun pinnalta (Haynesworth ym., 1992; Barry ym., 1999). Myöhemmin on kuitenkin selvinnyt, että löydetty markkerit ilmentyvät myös muissa soluissa, joten yksinomaan mesenkymaalisen kantasolun leimaavaa pinta-antigeenia ei ole löydetty. Lisäksi on havaittu, että mesenkymaalinen kantasolu ilmentää useita adheesiomolekyylejä, jotka ovat tarpeen solun sitoutumisessa ja kotiutumisen (engl. homing). Näitä ovat mm. integriinit $\alpha 1$, $\alpha 5$ ja $\beta 1$. Tämä kertoo mesenkymaalisten kantasolujen mahdollisista interaktioista muiden solujen kanssa, sekä kotiutumisilmiöstä kudosisäurekohdassa.

2.2.3 Erilaistuminen

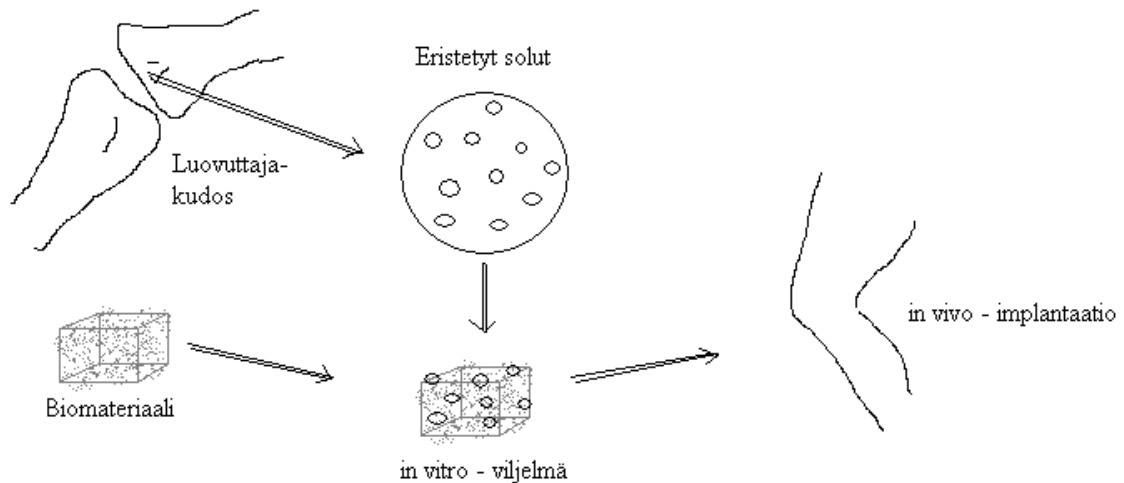
Useat laboratoriot ovat kuvanneet mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista luuksi, rustoksi sekä rasvaksi (Barry & Murphy, 2004). Muutamat tutkimusryhmät ovat raportoineet mesenkymaalisten kantasolujen erilaistuneen myös sydänlihassoluiksi ja neuroneiksi sekä hermotukisoluiksi (Hou ym., 2003; Barry & Murphy, 2004).

Mesenkymaalisen kantasolun erilaistuminen luuta muodostaviksi soluiksi vaatii askorbiinihappoa, natriumbetaglyserofosfaattia, deksametasonia (synteettinen glukokortikoidianalogi) ja naudan sikiön seerumia. Viljelyn aikana solujen morfologia muuttuu ja ne alkavat ilmentää alkaalista fosfataasia (ALP) (Barry & Murphy, 2004). Alkaalinen fosfataasi on osteoblastien tuottama entsyymi, jonka pitoisuus nousee aina ennen luun muodostusta. Sitä tarvitaan luun mineralisaatiossa. Alkaalinen fosfataasiaktiivisuus ilmentyy 2-4 viikon kuluttua induktion aloittamisesta riippuen eläinlajeista.

2.3 Luun kudosteknologia

Kudosteknologia on 80-luvun lopulla syntynyt käsite, joka tarkoittaa potilaan oman kudoksen muokkaamista in vitro biomateriaaleja ja kasvutekijöitä käyttäen, ja sitten tuotteen asentamista vauriokohtaan, jossa kudoksen uusiutuminen nopeutuu (Kuva 9).

Kudosteknologisesti tuotetuilla kudospaloilla pyritään korvaamaan autologiset/allogeeniset siirteet, joihin sisältyy ongelmia, kuten luovuttajien vähyys ja luovuttaja-alueen vauriot.



Kuva 9. Kudosteknologia tarkoittaa potilaan solujen eristämistä, kasvattamista ja istuttamista biohajoavaan materiaaliin, jonka avulla solut viedään vaurioalueelle nopeuttamaan kudoksen kasvua.

2.3.1 Mesenkymaaliset kantasolut luun kudosteknologiassa

Kudosteknologian tavoitteena on kudosten oman uusiutumiskyvyn hyödyntäminen. Luun kudosteknologialla on paljon mahdollisuuksia luun uusiutumiskyvyn johdosta. Myös luun muodostukseen vaikuttavia kasvutekijöitä ja hormoneja tunnetaan useita, joiden hyödyntäminen kudosteknologisissa sovelluksissa on usein tutkimuksen tavoitteena. Erityisesti mesenkymaalisten kantasolujen löytämisen myötä luun kudosteknologia on kehittynyt. Vaikka luukudos uusiutuu hyvin, on silti useita patologisia tiloja, joissa luun kudosteknologia on tarpeellista. Esimerkkeinä mainittakoon infektiot, kasvainten poiston jälkitilat ja luukato (Logeart-Avramoglou ym., 2005). Osteoporoosi eli luukato on sairaus, jossa luun massa pienenee ja johtaa luun haurastumiseen sekä murtumiin. Se on tyypillinen sairaus erityisesti vaihdevuodet ylittäneillä naisilla, jotka eivät käytä estrogeenilisiä. Osteoporoosin syyksi onkin ehdotettu epätasapainotilaa osteoblastien ja osteoklastien määrissä, mikä johtaa

lisääntyneeseen luun hajotukseen luun muodostukseen verrattuna (Jilka ym., 1996). Uusimmissa tutkimuksissa arvellaan myös, että mesenkymaalisten kantasolujen jakaantumisnopeus ja mitogeeninen vaste osteogeenisille kasvutekijöille olisi huonontunut osteoporoosipotilailla (Verma ym., 2002). Väestön ikääntymisen myötä osteoporoosi on merkittävä lääketieteellinen ongelma, eikä sen primaariin eli seniiliin muotoon ole täydellistä hoitokeinoa. Kantasoluhoidoja pidetäänkin potentiaalisena hoitomuotona seniilin osteoporoosin hoidossa.

2.3.2 Biomateriaalit luun kudosteknologiassa

Biomateriaalit ovat myrkyttömiä teollisesti valmistettuja tai luonnonperäisiä materiaaleja, jotka ovat tarkoitettu biologisiin systeemeihin parantamaan, korvaamaan tai vahvistamaan mitä tahansa elimistön kudosta, elintä tai toimintoa (Williams, 1986).

Biomateriaalille on asetettu suuri määrä vaatimuksia. Materiaalin tulee olla bioyhteesopiva, eli ei-immunogeeninen ja myrkytön, materiaalin hajoamisnopeus tulee olla sopiva luun uudismuodostuksen kanssa, sen täytyy olla osteokonduktiivinen, eli luun kasvun salliva ja steriloitavissa oleva. Valmistustavan on oltava toimiva suuriakin sovellusmääriä ajatellen ja materiaalin käsiteltävyys leikkaussalissa on oltava helppoa. Materiaalin mikro- ja makroskooppiset ominaisuudet ovat myös tärkeät solu- ja kudostyyppistä riippuen. Materiaalin huokoskoko on oltava optimaalinen kudoksen sisään kasvua ja verisuonten uudismuodostusta ajatellen, ja materiaalin pinnan karheus vaikuttaa myös solujen tarttumiseen, jakaantumiseen ja erilaistumiseen. (Logeart-Avrangoglou ym., 2005)

Ortopediassa käytetyt biomateriaalit voidaan jakaa viiteen tyyppiin: keraamit, metallit, synteettiset polymeerit, luonnonperäiset polymeerit ja komposiitit. Ennen kuin luun kantasoluja oli löydetty, ja solujen eristämismenetelmiä kehitetty, käytettiin luukudoksen korjaamiseen pelkkiä biomateriaaleja stimuloimaan ja ohjaamaan luun kasvua trauman tai kirurgisen operaation jälkeen (Bianco & Riminucci, 2003).

Keraamit

Keraamit ja lasikeraamit ovat olleet suosittuja biomateriaaleja luun kudosteknologiassa. Aikaisemmin suuri osa käytetyistä biomateriaaleista oli hydroksiapatiittipohjaisia, ja niiden huokoisuudella pyrittiin jäljitellä luun Haversianin kanavia. Hydroksiapatiitti on osteokonduktiivista, koska se adsorboi osteogeenisiä kasvutekijöitä ympäristöstään valmistaen optimaaliset olosuhteet luun kasvulle (Riminucci & Bianco, 2003). Hydroksiapatiitin, kuten muidenkin keraamimateriaalien ongelmana erityisesti painoa kannattavissa sovelluksissa on kuitenkin niiden hauraus. Muita käytettyjä keraamimateriaaleja ovat lasikeraamit ja bioaktiiviset lasit, joita on käytetty mm. luusubstituutteina ja metalli-implantin päällysmateriaalina.

Bioaktiivinen lasi

Lasi koostuu yhteen liitetystä silikaattiryhmistä tai muista verkkorakennetta muodostavista oksideista kuten SiO_2 , B_2O_3 ja P_2O_5 . Lasin verkkorakenteessa on sitovia happisidoksia vierekkäisten piiatomien välillä ja ei-sitovia happisidoksia piiatomin ja muokkaaja-atomien välillä. Muokkaaja-atomi voi olla esimerkiksi Na-, Ca- tai Mg-atomi muodostamissaan oksideissa. Lasin biologiset ominaisuudet riippuvat sitovien ja ei-sitovien happisidosten suhteesta. (Niemelä, 2004)

Bioaktiivisuudella tarkoitetaan materiaalin kykyä muodostaa mekaaninen sidoksensa kudoksen kanssa (Hench & Wilson, 1993). Hench huomasi 60-luvun lopussa, että tietyt lasikoostumukset muodostavat mekaanisesti kestävästi kemiallisen sidoksen luukudoksen kanssa (Hench ym., 1973). Näitä lasityyppejä alettiin kutsua bioaktiivisiksi lasiksi. Bioaktiiviset lasit ohjaavat luun kasvua, eli ovat osteokonduktiivisia.

Kun bioaktiivinen lasi on kosketuksissa fysiologisiin liuoksiin, tapahtuu kemiallinen reaktio lasin pinnalla: ioneja liukenee lasista ja kalsiumfosfaattia saostuu (Hench & Wilson, 1984; Kokubo, 1992; Karlsson, 1999). Lasin pintaan muodostuu piirikas kerros, kun muut ionit liukenevat nopeammin pois. Lasista liukenevat kationit korvautuvat kudostesteistä peräisin olevilla vetyioneilla, joten myös nesteen pH nousee. Piikerrokseen kerääntyy kalsium- ja fosfaatti-ioneja, jotka kiteytyvät

hydroksikarbonaattiapatiitiksi. Sen koostumus on hyvin lähellä luun oman apatiitin koostumusta. Näitä kemiallisia reaktioita seuraa elimistössä biologiset tapahtumat: proteiinit adsorboituvat apatiittipintaan, osteoprogenitorsolut kiinnittyvät materiaaliin ja erilaistuvat, luun solun ulkoinen matriksi muodostuu ja mineralisoituu. Luun integraatio riippuu eniten lasin SiO₂-määrästä. (Hench, 1994, 1998)

Metallit

Metallit ovat olleet pääasiallinen proteesityyppi suurissa nivelissä, kuten lonkassa niiden hyvien mekaanisten ominaisuuksiensa takia. Titaania, koboltti-kromi - seoksia ja ruostumatonta terästä on käytetty eniten. Varsinaisiin kudosteknologisiin sovelluksiin metallit eivät kuitenkaan sovellu, koska ovat biohajoamattomia.

Synteettiset polymeerit

Synteettisiä polymeerejä on lääketieteen käytössä sekä biohajoavia, että biohajoamattomia. Polymeerit valmistetaan monomeeriyksiköistä kemiallisesti. Biohajoavat polymeerit hajoavat elimistössä joko hapettumalla tai hydrolyyttisesti. Entsyymit voivat nopeuttaa reaktiota riippuen polymeeristä.

Poly- α -hydroksihapot

Poly- α -hydroksihapot ovat paljon tutkittuja biohajoavia polymeerejä. Näitä ovat mm. polyglykolidi (PGA) ja polylaktidi (PLA) ja näiden kopolymeerit poly(laktidi-koglykolidi) (PLGA).

PLA, polylaktidi

Laktidi on maitohaposta valmistettava monomeeri. Sen valmistusprosessi on tunnettu jo pitkään. Maitohappo esiintyy kahtena stereoisomeerimuotona, L- ja D-maitohappona, joiden kemialliset ominaisuudet ovat samanlaiset. Laktidi muodostuu kahdesta maitohappomonomeerista. Laktidi voi muodostua joko L-maitohaposta, D-maitohaposta tai molemmista, joten laktidilla voi esiintyä kolmenlaista optista aktiivisuutta. Näitä

kutsutaan L-, D- ja mesolaktideiksi. Puhtaista enantiomeereista valmistetut laktidit ovat kiteisiä polymeereja ja meso- ja D,L-laktideista valmistetut polymeerit taas ovat amorfisia. (Niiranen, 2004)

Polylaktidin rakennekaava on seuraava: $[-O-CH(CH_3)-CO-CH(CH_3)-CO-]_n$

PGA, polyglykolidi

Glykolidimonomeeri valmistetaan glygoliapon dimerisaatiolla. Polyglykolidi on erittäin kiteinen polymeeri. Se on hyvin hydrofiilinen materiaali, ja hajoaakin hydrolyysissä muutamassa viikossa, kun polylaktidin hajoaminen kestää kuukausista jopa vuoteen. Polyglykolidilla on FDA:n hyväksyntä läketieteellisiin sovelluksiin. (Niiranen, 2004)

Polyglykolin rakennekaava on seuraava: $[-O-CH_2-CO-O-CH_2-CO-]_n$

PLGA

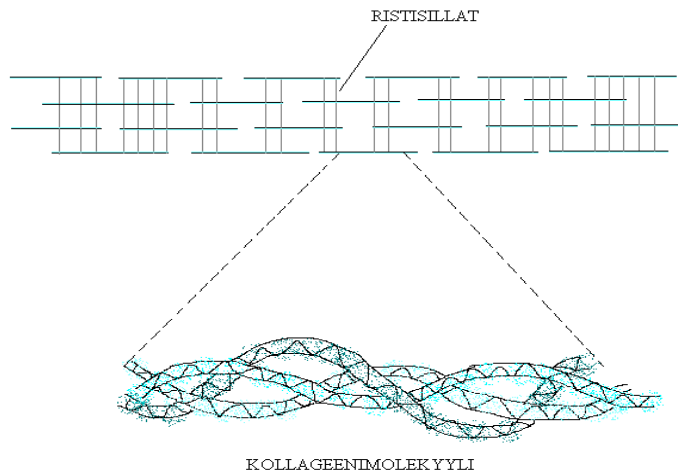
Laktidin ja glykolidin kopolymeeria kutsutaan poly(laktidi-ko-glykolidi):ksi eli PLGA:ksi. Kopolymeroimalla voidaan laajentaa homopolymeerien ominaisuuksia. Kopolymeerin ominaisuudet riippuvatkin homopolymeerien osuuksista, mutta niiden välillä ei ole lineaarista riippuvuutta. Esimerkiksi hajoamisnopeus voi olla hyvin erilainen eri koostumuksilla. (Niiranen, 2004)

Luonnonperäiset polymeerit

Luonnonperäiset polymeerit ovat herättäneet kudosteknologian alalla paljon mielenkiintoa, koska ne ovat bioyhteensopivia, biohajoavia ja solujen tarttumisen ja proliferaation kannalta hyviä (Hubbel, 1995).

Luonnonperäiset biohajoavat polymeerit voidaan jakaa proteiineihin, polysakkarideihin ja polyhydroksialkanoaatteihin. Kudosteknologiassa proteiinien käyttö on lisääntynyt viime aikoina. Niillä pyritään jäljittelemään kudoksen rakennetta. Luun ja koko

elimistön yleisin proteiini on kollageeni, joten sitä käytetään useissa kudosteknologisissa sovelluksissa. Kollageeneja tunnetaan tällä hetkellä yli 20 eri tyyppiä, joista tyypin I kollageeni on luun pääasiallinen kollageeni. Kollageeni koostuu kolmesta aminohaposta, X-Y-glysiini, jossa X on usein proliini ja Y hydroksiproliini. Sekundaarirakenne on vasenkätinen heliksi, α -ketju. Tertiäärirakenne muodostuu kun kolme α -ketjua kiertyy oikeakätisesti yhteen. Vahvat kollageenisäikeet muodostuvat, kun kollageenimolekyylit asettuvat vierekkäin ja ristisilloittuvat (Kuva 10).



Kuva 10. Kollageenimolekyylit koostuu kolmesta α -ketjusta. Kollageenimolekyylit asettuvat vierekkäin ja peräkkäin ja ristisilloittuvat vahvaksi kollageenikuiduksi.

Komposiitit

Komposiittimateriaaleissa yhdistetään kahta tai useampaa biomateriaalia. Ortopediassa näitä on käytetty saavuttamaan luuta lähempänä olevia mekaanisia ominaisuuksia, jolloin vältetään ns. stress shielding – ilmiöltä ja luun osteoporoosilta. Keraami-polymeeri-metalli - ja kollageeni-kalsiumfosfaatti – komposiitteja on kokeiltu luun kudosteknologisissa sovelluksissa. (Zhang & Ma, 1999; Gasser, 2000) Komposiittimateriaalien yleisenä haittapuolena pidetään sitä, että niissä yhdistyy myös usean materiaalin ongelmat, joiden yhteisvaikutuksia voi olla vaikea ennustaa.

2.4 Hormonit ja paikalliset kasvutekijät luun muodostuksessa ja uusiutumisessa

Luun kasvua, kehitystä ja uusiutumista säätelevät useat systeemiset ja paikalliset tekijät. Osa on sikiönkehityksen aikana yleisiä säätelytekijöitä, mutta pääasiassa tekijät ovat luukudokseen kohdistettuja. Näiden tekijöiden vaikutukset ovat monimutkaisia ja niiden biologia on vielä monin osin epäselvää.

Luun uusiutuminen on erittäin tarkkaan säädelty tapahtuma, jossa sekä luun muodostuminen että hajotus ovat tasapainossa keskenään. Tätä toimintaa säädellään useilla systeemisillä ja paikallisilla tekijöillä. Näitä luun kehitystä ja uusiutumista sääteleviä tekijöitä ovat esimerkiksi glukokortikoidit, jotka ovat välttämättömiä luun muodostumisen stimuloijia tietyllä terapeuttisella pitoisuudella, mutta suurilla pitoisuuksilla ne lisäävät RANK-ligandin ilmentymistä, ja näin ollen osteoklastien muodostumista ja luun resorptiota. Glukokortikoidihoidot ovatkin yksi osteoporoosin riskitekijä. Estrogeeni on myös hyvin tärkeä tekijä luun massan ylläpidossa. Tämän todistaa naisen luuntiheyden voimakas lasku vaihdevuosien jälkeen ja vastaavasti esimerkiksi lihavuuden suoja osteoporoosia vastaan, koska rasvakudoksessa tuotetaan estrogeenia. Estrogeeni lisää osteoprotegeriinin tuottoa, mutta sen vaikutukset näyttäisivät olevan sen lisäksi kuitenkin paljon monimutkaisemmat luun biologiassa. D-vitamiinilla on myös kiistaton rooli luun uusiutumisessa. D-vitamiini lisää seerumin kalsiumpitoisuutta lisäämällä kalsiumin imeytymistä suolesta ja munuaisten alkuvirtsasta. D-vitamiini myös stimuloi osteoklasteja lisäämällä RANK-ligandin määrää, jolloin seerumin kalsiumpitoisuus lisääntyy. D-vitamiinilla on kuitenkin tutkittu olevan myös luun mineralisaatiossa tärkeä rooli, minkä todistaa esimerkiksi osteomalasian ilmeneminen nimenomaan potilailla, jotka eivät saa tarpeeksi D-vitamiinia. D-vitamiinilisä on myös lähtökohtainen suositus osteoporoosiriskipotilaille. Lisäkilpirauhashormonilla on myös tutkittu olevan sekä luun massaa lisääviä vaikutuksia, että osteoklastiaktiivisuutta lisäävä vaikutus. Lisäkilpirauhasen liikatoimintaa sairastavien potilaiden seerumin kalsiumpitoisuus kasvaa, mutta he eivät kuitenkaan kärsi osteoporoosista, koska lisäkilpirauhashormonilla on myös anabolisia vaikutuksia.

Luun kehitystä sikiövaiheessa ohjaa pääasiallisesti sekä fibroblastikasvutekijät että luun morfogeneettiset proteiinit, mutta näillä samoilla kasvutekijöillä on myös erittäin tärkeä rooli syntymän jälkeisessä luun kasvussa, kehityksessä ja uusiutumisessa. BMP-perheen jäsenet on osoitettu olevan tärkeitä mm. murtuman paranemisessa.

Seuraavaksi esitellään tämän työn kannalta oleelliset tekijät tarkemmin.

2.4.1 Lisäkilpirauhashormoni

Lisäkilpirauhashormoni eli parathormoni (PTH) on parakriininen peptidihormoni, jota tuotetaan lisäkilpirauhasissa. Se säätelee solun ulkoisen nesteen kalsiumpitoisuutta, toimien siis lähinnä luussa ja munuaisissa. Luussa lisäkilpirauhasen vaikutukset ovat jokseenkin monimutkaiset. PTH vaikuttaa suoraan luun resorptioon lisäämällä RANK-ligandin ekspressiota osteoblasteissa, mutta pidemmällä aikavälillä PTH stimuloi sekä osteoblasteja että osteoklasteja. Lisäkilpirauhashormonin on tutkittu lisäävän luun massaa osteoporoottisilla potilailla (Reeve ym., 1980). Tällä hetkellä lisäkilpirauhashormonivalmisteet ovat ainoita luun massaa lisääviä osteoporoosilääkkeitä.

Lisäkilpirauhashormoni koostuu 84 aminohaposta. Kaksi ensimmäistä aminohappoa ovat välttämättömät biologiseen aktiivisuuteen, mutta luun anaboliseen vaikutukseen riittävät 31 ensimmäistä aminohappoa (hPTH(1-31)). N-terminaaliset tähteet eivät tutkimusten mukaan sitoudu reseptoriin. (Hodsman ym., 2005) On arveltu, että C-terminaalisisessa päässä olisi myös toinen reseptoriin sitoutuva rakenne. Bringhurst työtovereineen (Divieti ym., 2001) huomasi C-terminaalisten fragmenttien lisäävän osteosyyttien apoptoosia, ja aikaisemmat tutkimukset osteoblasteilla osoittivat C-terminaalisten yli 30 aminohappoa pitkien fragmenttien stimuloivan osteoblastien alkaalisen fosfataasin ekspressiota (Sutherland ym., 1994). Kliinisissä sovelluksissa on ollut käytössä hPTH(1-34). Täten on arveltu, että kun käytetään kokonaista PTH:ta osteoporoosin hoidossa, saataisiin hieman erilaisia biologisia vaikutuksia kuin hPTH(1-34):llä (Hodsman ym., 2005). PTH-analogien vaikutusmekanismeja osteoporoosin hoidossa ei vielääkään täysin tunneta (Rosen & Bilezikian, 2001).

2.4.2 Luun morfogeneettiset proteiinit (BMP:t)

Luun morfogeneettiset proteiinit kuuluvat TGF β - superperheeseen. Niiden aktiivisuus luun muodostuksessa huomattiin 60-luvulla (Urist, 1965), mutta proteiinit eristettiin ja sekvensoitiin vasta 80-luvun lopulla (Wozney ym., 1988; Luyten ym., 1989). Tämän jälkeen proteiineja myös ekspressoitiin (Wozney ym., 1988; Wozney, 1992). Nykyään tunnetaan yli 20 BMP-perheen jäsentä.

Luun morfogeneettisillä proteiineilla on useita tärkeitä rooleja. Ne indusoivat luun sekä ruston muodostusta, mutta niillä on myös tärkeitä tehtäviä muidenkin kudosten kehityksessä. Ne ovat mukana säätelemässä alkion kehityksessä neuraali-induktiota, hermostoputken syntymistä. BMP:t ohjaavat epidermaalista induktiota (Muñoz-Sanjuán & Brivanlou, 2002) ja somiittien syntymistä.

Luun morfogeneettiset proteiinit ovat kiinnostavia kasvutekijöitä luun kudosteknologisiin sovelluksiin. Eräs BMP:n funktio on indusoida mesenkymaalisia kantasoluja luu- tai rustosolulinjan soluiksi ja lisätä niiden proliferaatiokykyä (Canalis, 1985). Tämä tulee esille esimerkiksi murtuman paranemisprosessissa, jolloin BMP-2 ja/tai BMP-4 aloittavat mesenkymaalisten kantasolujen rekrytoinnin luukalvosta ja luuytimestä luun uudismuodostusta varten (Saito & Takaoka, 2003). On osoitettu, että rekombinantti hBMP-4 stimuloi myös osteoblastien DNA- ja kollageenisynteesiä, sekä alkaalisen fosfataasin aktiivisuutta.

Kirjallisuudessa on kuvattu kolme tapaa käyttää luun morfogeneettisiä proteiineja kudosteknologiassa: soluterapia, geeniterapia ja kasvutekijäterapia. Soluterapialla tarkoitetaan potilaan mesenkymaalisten kantasolujen kasvatusta ja erilaistamista osteoblasteiksi BMP:n läsnä ollessa. Solut tuottavat kasvatuspullossa luuta, jota voidaan sitten siirtää potilaan vaurioituneeseen kudokseen. Geeniterapia voidaan toteuttaa in vivo tai ex vivo. Ensimmäisessä vaihtoehdossa BMP:n geeni sopivassa vektorissa siirretään suoraan soluihin in vivo. Jälkimmäisessä solut ensin eristetään ja geenin siirto toteutetaan koeputkessa. Kasvutekijäterapialla tarkoitetaan kasvutekijöiden viemistä vaurioalueelle biomateriaalikuljettimessa. (Saito & Takaoka, 2003)

BMP-2:n on raportoitu säätelevän myös osteoklastien erilaistumista ja resorptioaktiivisuutta (Kaneoko ym., 2000; Wildemann ym., 2004). Se lisää myös katepsiini K:n ja hiilihappoanhydraasi II:n mRNA-pitoisuutta osteoklasteissa (Kaneoko ym., 2000).

2.4.3 Fibroblastikasvutekijät (FGF:t)

Fibroblastikasvutekijöillä on tärkeä rooli sekä luun sikiöaikaisessa että syntymän jälkeisessä kehityksessä, kuten BMP:illa. Luun kehitys on riippuvainen FGF-perheen jäsenten paikallisesta ilmentymisestä tiettyinä ajankohtina.

FGF:t säätelevät osteoblastin erilaistumiseen tarvittavia genejä, kuten alkaalista fosfataasia, tyypin I kollageenia, osteopontiinia, osteonektiinia ja luun sialoproteiinia koodaavia genejä (Marie, 2001; 2003). Sääteily tapahtuu mm. transkriptiotekijä Runx2:n välityksellä. Fibroblastikasvutekijät säätelevät useiden solutyypin proliferaatiota ja erilaistumista (Basilico & Moscatelli, 1992; Jaye ym., 1992). Luussa fibroblastikasvutekijöiden transkripteja on löydetty osteoblasteista sekä mesenkymaalisisista kantasoluista (Gonzales ym., 1996; Kim ym., 1998). Syntymän jälkeen FGF-2 tuotetaan kypsissä osteoblasteissa ja säilytetään solun ulkoisessa matriksissa (Globus ym., 1989).

Fibroblastikasvutekijöiden vaikutukset riippuvat sekä kasvutekijän, että sen reseptorien ekspressiosta (Givol & Yayon, 1992). FGF-1:n ja FGF-2:n reseptoreja ekspressoitetaan mesenkymaalisisissa soluissa mesenkymin kondensaation aikana pitkien luiden kehittyessä ja kallon suturoissa (Orr-Urtreger ym., 1991; Delezoide ym., 1998). Myöhemmin sikiönkehityksessä sekä syntymän jälkeen FGF-reseptoreja ilmentetään preosteoblasteissa ja osteoblasteissa (Iseki ym., 1997; Delezoide ym., 1998; Kim ym., 1998).

FGF-2:n yliekspressio hiirillä tuottaa epänormaalin pitkät luut (Coffin ym. 1995), joten on siis selvää, että ainakin FGF-2:lla on tärkeä asema luun kehityksessä. Viimeaikaiset tutkimukset osoittavat myös, että FGF-8:lla (Valta ym., 2006) ja FGF-18:lla (Ohbayashi ym., 2002) olisi vaikutusta luun kehityksessä. FGF-8 on todettu lisäävän

mesenkymaalisen kantasolun erilaistumista osteoblastiksi ja FGF-18 on todettu säätelevän luun muodostusta in vivo.

FGF:t säätelevät myös osteoblastien apoptoosia. FGF-signalointi suojelee soluja ravinnon puuttien apoptoottisilta vaikutuksilta, sekä estää osteoblastien kuolemaa peroksinitriitin vaikutuksessa in vitro (Kelpke ym., 2001). Näyttäisi kuitenkin siltä, että apoptoosin säätely olisi osteoblastin erilaistumisasteesta riippuvaa, koska FGF-käsittely taas puolestaan indusoi kypsempien osteoblastien apoptoosia (Mansukhani ym., 2000). On myös huomattu, että FGFR2:n (FGF-reseptori 2:n) yliekspressio indusoi kypsien osteoblastien apoptoosia (Lemonnier ym., 2001).

Sen lisäksi että FGF:t säätelevät luun muodostukseen tarvittavia genejä, ne säätelevät myös matriksia hajottavien entsyymien tuottamista. FGF:t lisäävät IL-6:n ja prostaglandiini E2:n erittämistä osteoblasteista (Hurley ym., 1996). Nämä yllä mainitut tekijät ovat mukana luun resorption säätelyssä mm. lisäämällä RANK-ligandin ilmentymistä. FGF:t lisäävät myös erilaisten kollageenaasien tuottoa vaikuttamalla kollageenia tuottavien geenien promoottorialueille (Varghese ym., 1995, 2000; Hurley ym., 1996; Tang ym., 1996).

3. Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena on testata uusien biomateriaaliyhdistelmien (PLGA sekä PLGA+bioaktiivinen lasi) soluyhteensopivuutta sekä materiaalin pintakäsittelyn ja kasvutekijäkäsittelyjen vaikutuksia luun muodostukseen biomateriaalilla.

Ensimmäisenä tavoitteena on selvittää kuinka hiiren ja ihmisen mesenkymaaliset kantasolut tarttuvat, proliferoituvat ja erilaistuvat osteoblasteiksi PLGA sekä PLGA+bioaktiivinen lasi – biomateriaaleissa.

Toisena tavoitteena on selvittää vaikuttaako polymeerien NaOH-käsittely ihmisen mesenkymaalisten kantasolujen tarttumiseen ja osteogeenisyyteen.

Kolmantena tavoitteena on tutkia BMP-4:n vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumiseen osteoblasteiksi biomateriaaliin annosteltuna solujen istuttamisvaiheessa.

Lopuksi selvitämme onko PTH-, BMP-4-, FGF-2- tai FGF-8- esikäsittelyillä vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumiseen luuta muodostavaksi osteoblastiksi yllä mainituilla biomateriaaleilla.

Kontrollimateriaalina käytetään Spongostan-kollageenisientä (Johnson & Johnson, UK), jolla on jo pitkä kliinisen käytön historia. Tuloksia arvioidaan käyttämällä kahta eri värjäysmenetelmää, joista toinen osoittaa solujen alkaalisen fosfaatin pitoisuuden, mikä on yksi eniten käytetyistä osteoblastimarkkereista, ja minkä pitoisuus nousee voimakkaasti juuri ennen luun muodostusta. Toinen värjäysmenetelmä on von Kossa – värjäys, joka osoittaa luun mineralisaation määrän.

4. Menetelmät

4.1 Hiiren mesenkymaalisten kantasolujen eristäminen ja viljely

Kahden noin kahden kuukauden ikäisen NMRI-uroshiiren femurit ja tibiaat preparoitiin steriloiduilla työvälineillä (skalpelli, pinsetit ja sakset). Pehmytkudos poistettiin mahdollisimman hyvin ja luut siirrettiin fosfaatilla puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (PBS-liuokseen, engl. phosphate-buffered saline) (Gibco, UK).

Seuraavat työvaiheet tehtiin steriilisti laminaarikaapissa. Luut huuhdeltiin nopeasti 70 %:ssa etanolissa ja sen jälkeen steriilissä PBS-liuoksessa. PBS-liuoksessa poistettiin vielä pehmytkudosriekaleita, ja sitten luut siirrettiin α -MEM-kasvatusmediumiin (Gibco, UK), jossa oli 15 % FBS:a (Gibco, UK) sekä 100 IU/ml penisilliiniä ja 100 μ g/ml streptomysiiniä (Gibco, UK).

Luiden rustoiset päät leikattiin pois ja luuydin ruiskutettiin puhtaalla mediumilla 27G:n neulaa ja 10 ml:n ruiskua käyttäen 50 ml:n sentrifuugiputkeen (Becton-Dickinson, USA). Mediumia käytettiin yhtä hiirtä kohden n. 9 ml. Solususpension annettiin seisoa putkessa noin 5 minuuttia, jolloin luupalat ja luuydinriekaleet painuivat putken pohjalle. Supernatantti siirrettiin sen jälkeen pipetoimalla uuteen sentrifuugiputkeen.

Solususpensiota sentrifugoitiin 8 minuutin ajan 400 x g:n painovoimalla, minkä jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja solupelletti suspendoitiin viiteen millilitraan mediumia. Tästä solususpensiosta suoritettiin solulasku Bürker-Türk - laskukammiossa tekemällä 1:20 – laimennos etikkahappoon.

Soluja saatiin yhteensä 97 miljoonaa, jotka maljattiin T75-soluviljelypulloon (Becton-Dickinson, USA) solutiheydellä 1×10^6 /cm². Mediumia laitettiin 15 ml/pullo. Puolet mediumista vaihdettiin kahdesti viikossa ja solut irrotettiin pullosta trypsiini-EDTA:lla (Gibco, UK) viikon kasvatuksen jälkeen. Solut siirrettiin trypsinoinnin jälkeen kahteen uuteen T75-pulloon.

4.2 Ihmisen mesenkymaalisten kantasolujen ylläpito ja käsittely

Ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja oli saatu luuydinnäytteestä rikastamalla Oulun yliopistosta anatomian laitokselta (Dos. Petri Lehenkari) sekä Turun yliopistosta ortopedian tutkimusyksiköstä (Prof. Hannu Aro). Soluja viljeltiin T75-pulloissa α -MEM-kasvatusmediumissa, jossa oli 10 % FBS:a ja penisilliini-streptomysiiniä. Mediuumeja vaihdettiin puolet tilavuudesta joka 3.-4. päivä. Solut irrotettiin pulloista trypsiini-EDTA:lla n. kahden viikon välein ja siirrettiin kolmeen uuteen T75-pulloon (1:3 – jako).

4.2.1 Trypsinointi

Trypsiini-EDTA sulatettiin lämpöhauteessa (+37 °C) puolen tunnin ajan. Mediuimit imettiin pois T75-pulloista ja soluja pestiin kahdesti lämpimällä PBS:llä, minkä jälkeen solujen päälle pipetoitiin 5 ml trypsiini-EDTA -liuosta.

Trypsiinin annettiin vaikuttaa 10-20 minuuttia hiilidioksidikaapissa. Solujen irtoamista seurattiin mikroskoopilla pienin väliajoin. Pulloja ravisteltiin voimakkaasti solujen irtoamisen edistämiseksi. Kun solut olivat irronneet, lisättiin pulloihin 5 ml kasvatusmediumia ja solususpensio siirrettiin 15 ml:n sentrifuugiputkiin.

Solususpensiota sentrifugoitiin viisi minuuttia 400 x g:n painovoimalla. Supernatantti kaadettiin pois ja solupelletti suspendoitiin 3 ml:aan α -MEM-kasvatusmediumia, jossa oli 10 % FBS:a ja penisilliini-streptomysiiniä. Sitten solut jaettiin tasan kolmeen T75-pulloon ja lisättiin mediumimäärä 15 ml:aan/pullo.

4.2.2 Kasvutekijäesikäsittelyt

Kasvutekijäesikäsittelyt tehtiin 50 - 60 %:esti konfluenteille ihmisen mesenkymaalisille kantasoluille kolme päivää ennen biomateriaalille istuttamista. Kaikkien käytettyjen kasvutekijöiden [PTH (Sigma, USA), FGF-2 (Peprotech, UK), FGF-8 (R&D Systems, UK) ja BMP-4 (R&D Systems, UK)] pitoisuus oli 10 ng/ml.

4.3 Biomateriaalien käsittely

Polymeerit PLGA 9:1 ja PLGA 9:1+BAG 20 % (Ari Rosling, Åbo Academi) leikattiin n. 7mm x 7mm kokoisiksi paloiksi. Biomateriaalit steriloitiin inkuboimalla niitä 70 %:ssa etanolissa 30 min. Viinalla käsitellyt polymeeripalat huuhdeltiin useasti steriilillä PBS:llä ja siirrettiin maljoille, joissa oli 15 % seerumia sisältävää kasvatusmediumia.

Osalle biomateriaaleista tehtiin natriumhydroksidikäsittely ennen steriloimista. Biomateriaalipaloja inkuboitiin 10 minuutin ajan 1 M NaOH:ssa, minkä jälkeen ne huuhdeltiin useita kertoja steriilillä PBS:llä.

Kontrollimateriaalina käytetty Spongostan-kollageenisieni (Johnson & Johnson, UK) oli valmiiksi steriloitu. Siitä leikattiin n. 1cm x 1cm:n kokoisia paloja, jotka painettiin steriilillä ruiskun männällä lyttyyn. Sitten palaset siirrettiin mediumiin, kuten polymeerit.

Kaikkia materiaaleja inkuboitiin seerumipitoisessa mediumissa hiilidioksidikaapissa yön yli ennen solujen istuttamista.

4.4 Solujen istuttaminen biomateriaalille

4.4.1 Hiiren mesenkymaalisten kantasolujen käsittely

Solut irrotettiin trypsiini-EDTA:lla T75-pulloista. Biomateriaalit kuivattiin steriilillä paperilla ja siirrettiin 24:n kaivon kuoppalevyille (Becton-Dickinson, USA). Yhteensä tehtiin neljä samanlaista ryhmää.

Soluja pipetoitiin biomateriaaleille 20 000/35 μ l. Sitten solujen annettiin tarttua materiaaleihin hiilidioksidikaapissa 30 minuuttia ennen mediumin lisäämistä.

Ryhmiiin 1 ja 2 pipetoitiin α -MEM-kasvatusmediumia, jossa oli 15 % FBS:a ja penisilliini-streptomysiiniä 1 ml/kaivo. Solut pidettiin tässä mediumissa viikko ennen

induktion käynnistämistä. Ryhmiin 3 ja 4 laitettiin osteoblasti-induktiomediumi heti alussa.

Viljely tapahtui hiilidioksidikaapissa staattisissa olosuhteissa. Mediuumeja vaihdettiin kahdesti viikossa. Induktiomediumissa oli 15 % FBS:a, 10 mM Na-β-glyserofosfaattia (Fluka, Sveitsi), 70 µg/ml askorbiinihappofosfaattia (Sigma, USA) ja 100 IU/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Deksametasonia (10^{-7} M) pidettiin viljelmässä ensimmäisen viikon ajan.

4.4.2 Ihmisen mesenkymaalisten kantasolujen käsittely

NaOH- käsittely ja BMP-4:n lisäys

Solut irrotettiin pulloista trypsinoimalla kuten aikaisemmin ja niiden lukumäärä laskettiin. Biomateriaalit kuivattiin steriilillä paperilla ja siirrettiin kahdelle 24:n kaivon kuoppalevyille. Soluja pipetoitiin 20 000/materiaali 25 µl:n tilavuudessa. Toiseen levyyn pipetoitiin heti solujen aplikoinnin jälkeen 50 ng/ml BMP-4:ää (R&D Systems) biomateriaalin ja solujen päälle. Soluja tartutettiin 30-40 minuuttia hiilidioksidikaapissa ennen mediumin lisäämistä.

Kasvutekijäesikäsitellyt

Kasvutekijäesikäsitellyt solut irrotettiin pulloista trypsinoimalla, niiden lukumäärä laskettiin ja niitä pipetoitiin steriilillä paperilla kuivattuihin biomateriaaleihin, jotka olivat siirretty kuoppalevyille. Ryhmiä tehtiin yhteensä kaksi, joten solujen erilaistumista voitiin seurata kahdessa eri aikapisteessä.

Soluja pipetoitiin 20 000 /biomateriaali 25 µl:n tilavuudessa. Soluja tartutettiin hiilidioksidikaapissa 30-40 minuuttia. Sen jälkeen kaivoihin pipetoitiin 1 ml kasvatusmediumia. Molempiin ryhmiin laitettiin osteoblasti-induktiomediumi heti tartutuksen jälkeen. Deksametasonia (10^{-7} M) annettiin viikon ajan ja mediuumeja vaihdettiin kahdesti viikossa.

4.5 Viljelmien lopetukset ja värjäykset

Fiksaatio tehtiin paraformaldehydi (PFA)-PBS:lla seuraavasti: Mediumi imettiin pois kaivoista ja viljelmät pestiin kerran PBS:llä. PBS imettiin pois ja tilalle laitettiin 500 µl 3 %:sta PFA-PBS:ää, jonka annettiin vaikuttaa 20 minuuttia huoneen lämmössä. Tämän jälkeen PFA-PBS imettiin pois ja solut pestiin kahdesti PBS:llä. Soluja pidettiin PBS:ssä ja levyjä säilytettiin jääkaapissa värjäykseen saakka.

Värjäykset tehtiin ensin alkaalisen fosfataasin (ALP) suhteen. Värjäys tehtiin käyttämällä sytokemiallista värjäysmenetelmää (Alkaline phosphatase kit no. 86-R, Sigma, USA).

Värjäys suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Aluksi sekoitettiin FRV alkaline-luosta ja Na-nitriittiliuosta suhteessa 100 µl + 100 µl 1,5 ml:n eppendorf-putkessa 30 sekunnin ajan. Sitten liuosta inkuboitii huoneen lämmössä 2 minuuttia. Tämä seos lisättiin 4,5 ml:aan huoneenlämpöistä tislattua vettä. Lopuksi lisättiin 100 µl Naphtol-AS-BI-liuosta. Sitten liuos sekoitettiin ja lisättiin 500 µl/kaivo biomateriaalien päälle kuoppalevyihin, mistä PBS oli imetty pois.

Levyjä inkuboitii 15 minuuttia huoneenlämpötilassa valolta suojattuna, ja lopuksi kaivot pestiin kahdesti tislatulla vedellä. Kaivoihin jätettiin vettä siten, että biomateriaalit peittyivät ja viljelmät säilytettiin jääkaapissa.

Von Kossa – värjäys perustuu siihen, että luunoduleissa oleva kalsium korvataan hopealla. Tämä värjäys tehdään pidemmällä oleville viljelmille, joissa luun muodostuminen on kehittyneempää. Menetelmällä karakterisoidaan luun mineralisaatiota.

Fiksoitujen, ja useasti tislatulla vedellä pestyjen solujen päälle pipetoitiin 500 µl 2 % hopeanitraattiliuosta/kaivo. Kuoppalevyjä inkuboitii 60 minuuttia 60 W lampun alla. Sen jälkeen solut pestiin kolmesti tislatulla vedellä ja lisättiin 2.5 % natriumtiosulfaattiliuosta (Merck, Saksa) 500 µl/kaivo. Levyjä inkuboitii huoneen

lämpötilassa 5 minuuttia. Sitten viljelmä pestiin kahdesti tislattulla vedellä. Kaivoihin jätettiin tislattua vettä, etteivät biomateriaalit kuivuisi. Levyt säilytettiin jääkaapissa.

Hiiren mesenkymaalaisia kantasoluja sisältävät ryhmät 4 ja 5 lopetettiin 25 viljelypäivän jälkeen. Osteoblasti-induktio oli aloitettu näille ryhmille heti. Ryhmät 1 ja 2 lopetettiin 33 viljelypäivän jälkeen, jolloin ne olivat olleet osteoblasti-induktiossa 26 päivää. Ryhmät 1 ja 4 värjättiin alkaalisen fosfataasin suhteen ja ryhmät 2 ja 3 von Kossalla.

Ihmisen mesenkymaalisista kantasoluista koostuvat ryhmät lopetettiin seuraavasti: NaOH- käsittelyn ja BMP-4 -lisäyksen saaneet viljelmät lopetettiin 33 viljelypäivän jälkeen. Nämä levyt värjättiin siten, että puolet kaivoista värjättiin ALP:n suhteen ja puolet von Kossalla.

Kasvutekijäesikäsitellyistä viljelmistä ensimmäinen ryhmä lopetettiin 22 viljelypäivän jälkeen ja toinen ryhmä 26 viljelypäivän jälkeen. Ensimmäinen ryhmä värjättiin ALP:n suhteen osteoblastien erilaistumisen osoittamiseksi ja toinen ryhmä värjättiin von Kossalla luun mineralisaation osoittamiseksi.

5. Tulokset

5.1 Hiiren mesenkymaaliset kantasolut

Hiiren mesenkymaaliset solut proliferoituivat ja erilaistuivat sekä kuoppalevyn pohjassa että biomateriaalilla. Erityisesti von Kossa -värjäyksessä huomattiin voimakasta värjäytymistä (Kuvat 13 ja 14). Kuvassa 11 nähdään, että solut ovat erilaistuneet ALP-positiivisiksi osteoblasteiksi, mutta solujen värjäytyminen polymeereissä on huonompaa kuin kuopan pohjalla.

Viljelyn aikana solujen levittäytymistä ja erilaistumista kuoppalevyn pohjalla pystyi seuraamaan mikroskoopilla. Molemmat polymeerit olivat läpinäkymättömiä, joten solujen kasvua biomateriaaleilla ei voitu tarkkailla ennen värjäyksiä. Solujen kasvusta kuoppalevyn pohjalla pääteltiin kuitenkin verrattaessa ryhmiä 1&2 ja 3&4 keskenään, että osteoblasti-induktio on parempi aloittaa heti. Ryhmät 3&4, joille aloitettiin induktio heti, näyttivät olevan tiheimmin kasvavia ja osteoblastien erilaistuminen oli parempaa. Tällä perusteella aloitimme myöhemmät viljelmät tällä tekniikalla. Tosin katsoessa värjäyksiä, ei luunmuodostuksessa näytä olevan suurtakaan eroa.

Keskellä kuvassa 11 nähdään PLGA:ssa suuri värjäytynyt uloke, joka mitä luultavimmin on muodostunutta luuta. Tämä todistaa biomateriaalin olevan soluyhteensopivaa ja luunmuodostuksen sallivaa. Samanlainen kappale näkyy myös kuvassa 13 PLGA+BAG-materiaalissa.

5.2 Ihmisen mesenkymaaliset kantasolut

5.2.1 NaOH- käsittely ja BMP-4:n lisäys

Ihmisen mesenkymaaliset kantasolut kasvoivat hieman nopeammin ja runsaslukuisemmin kuin hiiren solut. Kuvissa 15 ja 16 on nähtävissä kuoppalevyn pohjassa solujuosteita, jotka kiinnittyvät polymeereihin ja kuoppalevyn pohjaan. Tällaista ilmiötä ei ollut nähtävissä hiiren soluilla. Solujuosteet ovat ALP-positiivisia,

mikä kertoo sen, että ainakin osa soluista on mitä todennäköisimmin osteoblasteja. Biomateriaalien värjäytyminen ALP:n suhteen oli kuitenkin heikompaa kuin hiiren soluilla.

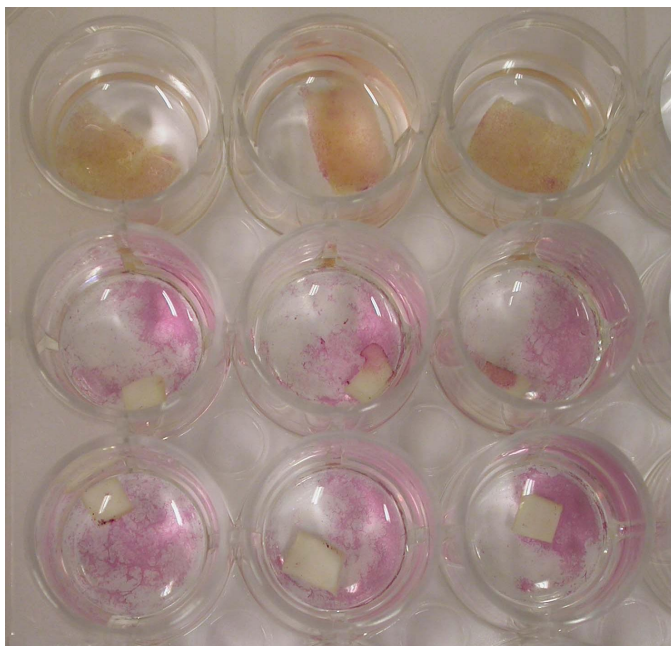
BMP-4-lisäys näytti huonontavan solujen proliferaatiota kuoppalevyn pohjaa tarkasteltaessa viljelyjakson aikana. Värjäyksiä perusteella ei ole huomattavissa eroa BMP-4-lisäyksen saaneen viljelmän ja ilman BMP-4:ä kasvaneen viljelmän välillä. Näistä viljelmistä voi kuitenkin päätellä, että solut erilaistuivat osteoblasteiksi ja muodostivat luuta paremmin bioaktiivista lasia sisältävässä materiaalissa, ja erityisesti NaOH-pintakäsitellyssä PLGA+BAG:ssa. Paras osteoblasti-induktio ja luun muodostus tapahtui kuitenkin kontrollimateriaalissa eli spongostanissa.

5.2.2 Kasvutekijäesikäsitellyt ihmisen mesenkymaaliset kantasolut

FGF-2- ja FGF-8-esikäsitellyt lisäsivät mesenkymaalisten kantasolujen proliferaatiota voimakkaasti. FGF-2- käsitellyt solut olivat jakaantuneet jopa kolminkertaisesti verrattuna kontrolliin, PTH- sekä BMP-4-käsitelyihin soluihin kolmen päivän aikana ennen solujen istuttamista biomateriaalille. FGF-8- esikäsitellyt solut olivat taas proliferoituneet kaksinkertaisesti kontrolliin verrattuna. Kaikkien muiden esikäsitelyjen solujen erilaistuminen oli nopeampaa kuin BMP-4- ja NaOH-käsitellyissä viljelmissä. Värjäys ALP:n suhteen tehtiin 22 viljelypäivän jälkeen. Kuvista 17 ja 18 huomataan FGF-esikäsitelyjen solujen värjäytyneen voimakkaimmin sekä ALP:in suhteen että von Kossa - värjäyksessä.

Solujen ulkonäkö kaivon pohjalla oli hieman erinäköistä kuin muissa ryhmissä. Samanlaisia solujuosteita ei ollut nähtävissä kuten edellisessä viljelmässä, mutta solut kasvoivat paksuna mattona kuoppalevyn pohjassa, mikä on huomattavissa myös kuvista 17 ja 18. Nämä matot värjäytyivät erityisesti alkaalisen fosfataasin suhteen. Paljain silmin nähtävät solurykelmät oli havaittavissa FGF- ja PTH- käsitellyissä soluissa aikaisemmin kuin muissa ryhmissä. BMP-4- ja PTH-käsitellyt solut eivät eroa suuresti kontrollista värjäyksiä suhteen paljaalla silmällä katsottuna.

Spongostan osoittautui parhaaksi kasvualustaksi luuta muodostaville osteoblasteille. Nämä viljelmät ovat värjäytyneet voimakkaimmin sekä ALP:n suhteen että von Kossalla värjättyinä. PLGA+BAG näyttäisi olevan PLGA:ta optimaalisempi kasvualusta – luun mineralisaatio on voimakkaampaa bioaktiivista lasia sisältävässä materiaalissa (Kuva 18). FGF-käsittelyt antoivat parhaan tuloksen. BMP-4-käsitellyt solut näyttäisivät erilaistuneen hieman paremmin osteoblasteiksi kuin PTH-esikäsitellyt solut, jotka erilaistuivat osteoblasteiksi samalla tavalla kuin kontrollisolut.



Spongostan

PLGA

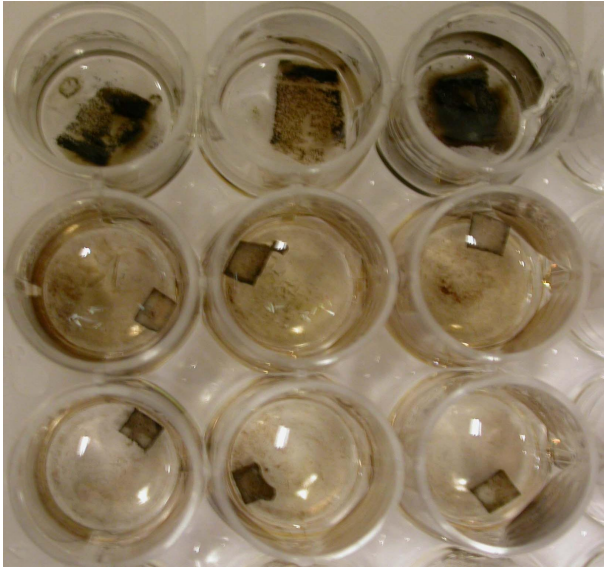
PLGA+BAG

Kuva 11. Hiiren mesenkymaalaisia kantasoluja kasvatettiin kolmiulotteisilla alustoilla osteoblasti-induktiomediumissa 25 vrk (Ryhmä 4). Solut ovat värjätty alkaalisen fosfataasin suhteen. Biomateriaalit ovat seuraavassa järjestyksessä: ylin vaakarivi Spongostan, keskimäinen PLGA ja alin PLGA+BAG.



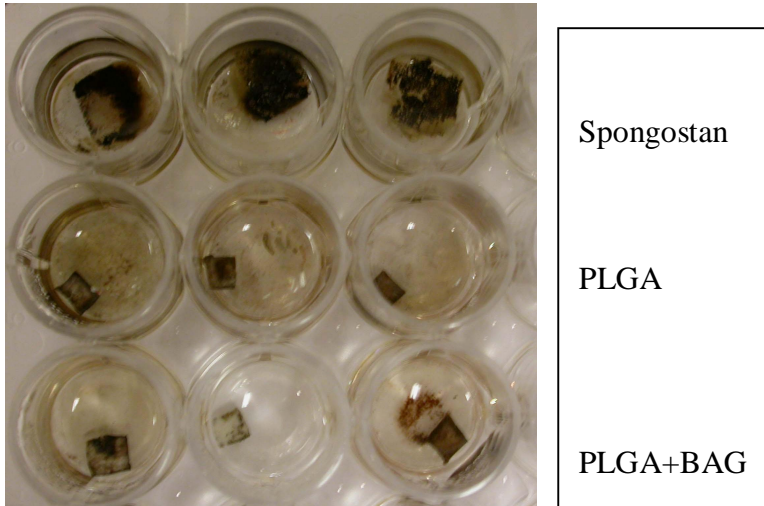
Spongostan
PLGA
PLGA+BAG

Kuva 12. Hiiren mesenkymaalaisia kantasoluja kasvatettiin kolmiulotteisilla alustoilla 33 vrk, joista 26 päivää tapahtui osteoblasti-induktiomediumissa (Ryhmä 1). Solut ovat värjätty alkaalisen fosfataasin suhteen. Biomateriaalit ovat seuraavassa järjestyksessä: ylin vaakarivi Spongostan, keskimmäinen PLGA ja alin PLGA+BAG.



Spongostan
PLGA
PLGA+BAG

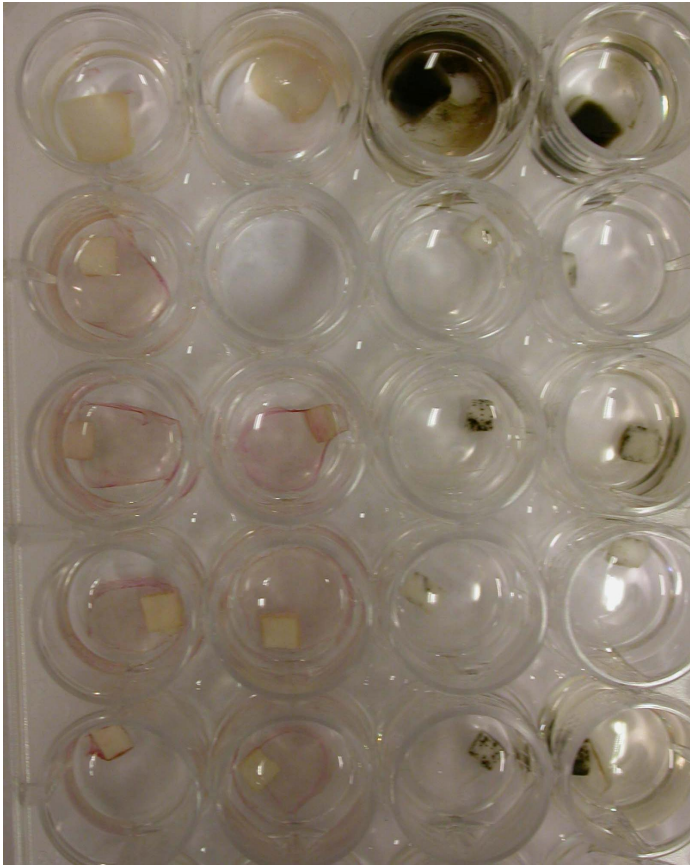
Kuva 13. Hiiren mesenkymaalaisia kantasoluja kasvatettiin kolmiulotteisilla alustoilla 33 vrk, joista 26 päivää tapahtui osteoblasti-induktiomediumissa (Ryhmä 3). Solut värjättiin von Kossalla. Biomateriaalit ovat seuraavassa järjestyksessä: ylin vaakarivi Spongostan, keskimmäinen PLGA ja alin PLGA+BAG.



Kuva 14. Hiiren mesenkymaalaisia kantasoluja kasvatettiin kolmiulotteisilla alustoilla osteoblasti-induktiomediumissa 25 vrk (Ryhmä 2). Solut värjättiin von Kossalla. Biomateriaalit ovat seuraavassa järjestyksessä: ylin vaakarivi Spongostan, keskimäinen PLGA ja alin PLGA+BAG.

ALP

| von Kossa



Spongostan

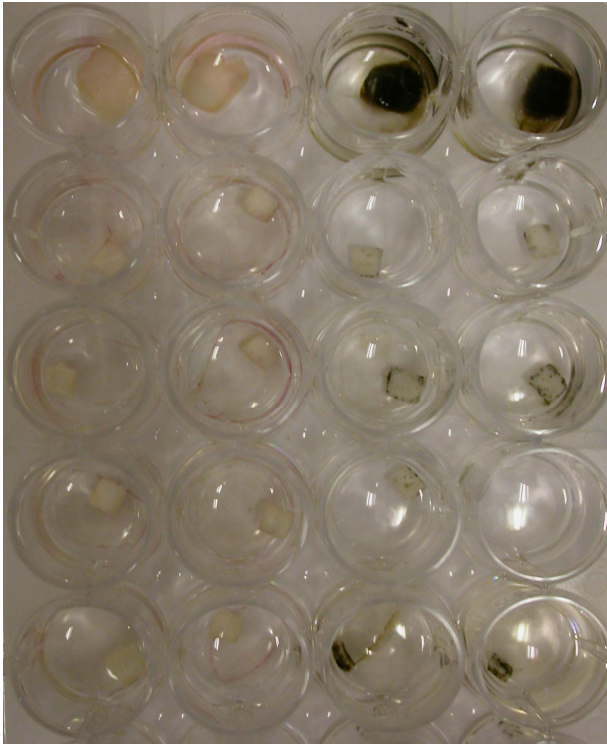
PLGA

PLGA+BAG

PLGA (NaOH-
käsittely)PLGA+BAG (NaOH-
käsittely)

Kuva 15. Ihmisen mesenkymaalaisia kantasoluja viljeltiin kolmiulotteisilla biomateriaaleilla 33 vrk osteoblasti-induktiomediumissa. Osa biomateriaaleista käsiteltiin natriumhydroksidilla. Solut värjättiin joko alkaalisen fosfataasin suhteen tai von Kossalla. Tässä levyssä biomateriaaleihin ei lisätty BMP-4:ää. NaOH-käsitellyt polymeerit ovat kahdessa alimmassa vaakarivissä. Ylimmässä vaakarivissä Spongostan, toisessa PLGA, kolmannessa PLGA+BAG, neljännessä PLGA ja alimmassa PLGA+BAG. Vasemmat kaksi pystyriviä värjäys ALP:n suhteen, oikeat von Kossalla.

ALP | von Kossa



Spongostan

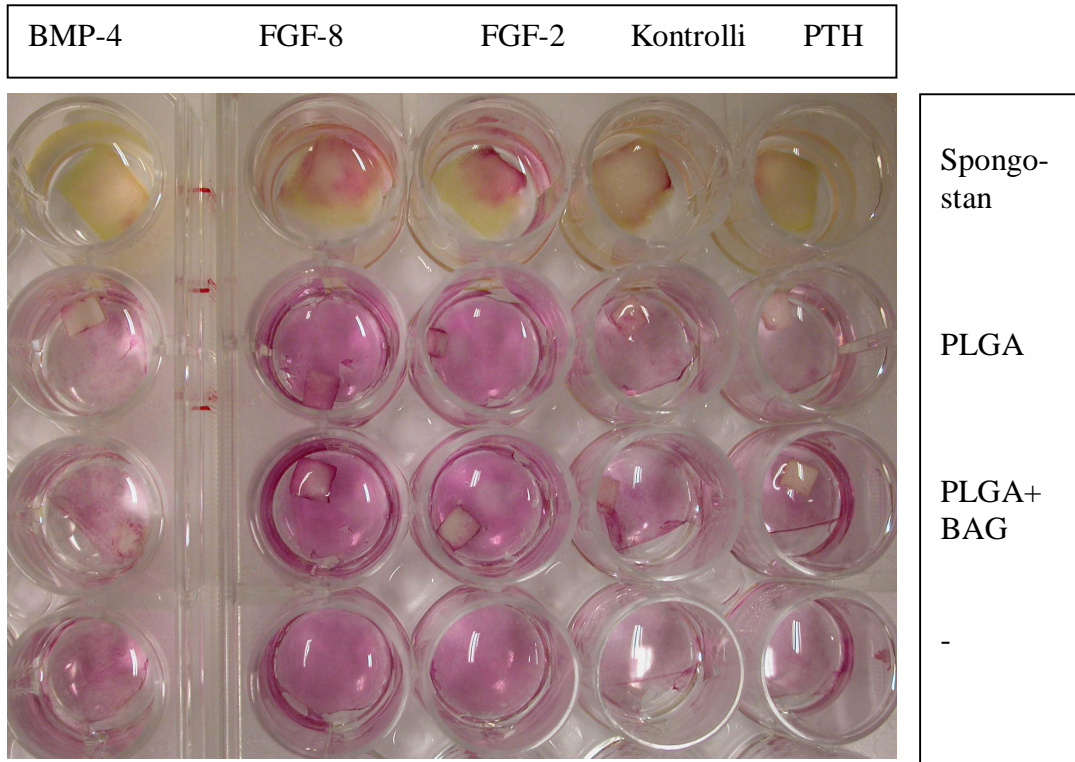
PLGA

PLGA+BAG

PLGA (NaOH-käsittely)

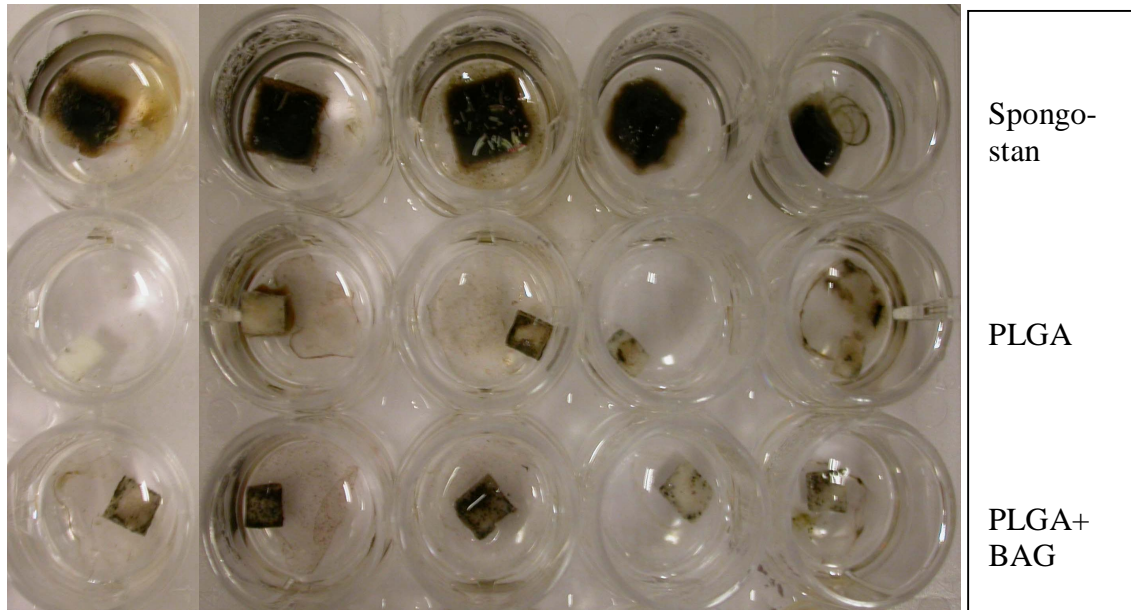
PLGA+BAG (NaOH-käsittely)

Kuva 16. Ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja viljeltiin kolmiulotteisilla biomateriaaleilla 33 vrk osteoblasti-induktiomediumissa. Osa biomateriaaleista käsiteltiin natriumhydroksidilla. Solut värjättiin joko alkaalisen fosfataasin suhteen tai von Kossalla. Biomateriaaleihin lisättiin BMP-4 solujen istuttamisen yhteydessä. NaOH-käsitellyt polymeerit ovat kahdessa alimmassa vaakarivissä. Ylimmässä vaakarivissä Spongostan, toisessa PLGA, kolmannessa PLGA+BAG, neljännessä PLGA ja alimmassa PLGA+BAG. Vasemmat kaksi pystyriviä: värjäys ALP:n suhteen, oikeat kaksi pystyriviä: von Kossa - värjäys.



Kuva 17. Ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja viljeltiin 22 päivää osteoblasti-induktiomediumissa. Soluja esikäsiteltiin kasvutekijöillä kolme päivää ennen biomateriaalille istuttamista. Vasemmalta lähtien ensimmäinen pystyryvi BMP-4-käsitellyt solut, toinen FGF-8-, kolmas FGF-2-käsitellyt solut, neljäs kontrolli (solut ilman kasvutekijäesikäsittelyä) ja viides PTH-esikäsitellyt solut. Ylin vaakarivi spongostan, toinen PLGA, kolmas PLGA+BAG ja neljäs ilman biomateriaalia. Biomateriaalit värjättiin alkaalisen fosfataasin suhteen.

BMP-4	FGF-8	FGF-2	Kontrolli	PTH
-------	-------	-------	-----------	-----



Kuva 18. Ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja viljeltiin 26 päivää osteoblasti-induktiomediumissa. Soluja esikäsiteltiin kasvutekijöillä kolme päivää ennen biomateriaalille istuttamista. Vasemmalta lähtien ensimmäinen pystyrivi BMP-4-käsitellyt solut, toinen FGF-8-, kolmas FGF-2-käsitellyt solut, neljäs kontrolli (solut ilman kasvutekijäesikäsitelyä) ja viides PTH-esikäsitellyt solut. Ylin vaakarivi spongostan, toinen PLGA, kolmas PLGA+BAG ja neljäs ilman biomateriaalia. Biomateriaalit ovat värjätty von Kossalla.

6. Pohdinta

Kumpikin tutkittava biomateriaalityyppi osoittautui soluyhteensopivaksi ja luun muodostuksen sallivaksi sekä hiiren, että ihmisen soluilla. Mesenkymaaliset kantasolut erilaistuiivat osteoblasteiksi, ja muodostivat luuta (von Kossa – värjäys).

6.1 Hiiren solut

Von Kossalla värjätyt biomateriaalit värjäytyivät voimakkaammin kuin biomateriaalit, jotka värjättiin alkaalisen fosfaatin suhteen. Kaikki ryhmät olivat olleet induktiossa suurin piirtein yhtä kauan, joten ehkä olisi mahdollista, että ALP-positiivisuus olisi näkynyt voimakkaammin aikaisemmin. Kuitenkin kaivon pohja oli värjäytynyt paikoin voimakkaasti, joten värjäys oli kuitenkin toiminut. Von Kossalla värjäytyistä biomateriaaleista nähdään kuitenkin selvästi, että luun muodostusta oli tapahtunut jokaisessa biomateriaalissa. ALP-positiivisuus oli voimakkaampaa PLGA-materiaaleissa kuin bioaktiivista lasia sisältävässä materiaalissa.

6.2 Ihmisen solut

6.2.1 NaOH-käsittely ja BMP-4:n lisäys

Kirjallisuudessa on paljon raportoitu BMP-perheen vaikutuksesta luun muodostukseen. On tehty useita töitä, joissa BMP-4 tai BMP-2 on stimuloinut luun muodostusta, erityisesti in vivo (Yuan ym., 2001; Huang ym., 2004; Ono ym., 2004). Tässä työssä BMP-4 ei stimuloinut mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista tai luun muodostusta millään tavalla. Ehkä kasvutekijä olisi pitänyt antaa toisella tavalla, esimerkiksi imeyttämällä biomateriaaliin ennen solujen istuttamista tai sitä olisi pitänyt lisätä mediumin vaihdon yhteydessä koko viljelyn ajan.

Natriumhydroksidikäsittely ei näyttänyt vaikuttavan solujen tarttumiseen tai osteogeenisyyteen. Huang työtovereineen (2004) on osoittanut, että

natriumhydroksidikäsittely muuttaa PLGA:n pintavarausta hydrofiilisemmäksi, sen huokoskokoa ja mikrokarheutta luuytimen stroomasoluille suotuisammaksi ja pinta-alaa suuremmaksi. Käsittely oli lisännyt osteoblastien alkaalista fosfataasia ja mineralisaatiota. Kumpaakaan ilmiötä ei nähty tässä työssä (Kuvat 15 ja 16). Huang oli tehnyt työnsä kanin luuytimen stroomasoluilla ja hiiren preosteoblastisilla MC3T3-E1-soluilla, joten solutyypillä saattaisi olla vaikutusta edellä kuvattuihin ominaisuuksiin.

6.2.2 Kasvutekijäesikäsittelyt

FGF-2 ja FGF-8

FGF-8 ja FGF-2 antoivat parhaan tuloksen kantasolujen erilaistumisessa ja luun muodostuksessa. Sekä värjäys ALP:n suhteen ja von Kossa -menetelmällä olivat voimakkaimmat näillä kasvutekijöillä esikäsitellyissä soluissa. Kirjallisuudessa on mainittu fibroblastikasvutekijöiden inhiboivan alkaalisen fosfataasin ekspressiota (Rodan ym., 1989; Hurley ym., 1993; Kalajzic ym., 2003), mutta tässä työssä ei ainakaan nähty tällaista vaikutusta, vaan päinvastoin ALP:n ekspressio oli huomattavasti voimakkaampaa FGF-esikäsitellyissä soluissa kuin kontrollissa (Kuva 17). Tulevaisuudessa kannattaisi käsitellä mesenkymaalisia kantasoluja fibroblastikasvutekijöillä 2 tai 8 ennen osteoblasti-induktiota. Näiden tulosten perusteella kyseisten kasvutekijöiden käyttöä voisi tutkia myös muita kudosteknologisia sovelluksia varten, kuten kasvutekijäterapioihin biomateriaaliin imeytettynä tai geeniterapiana.

Lisäkilpirauhashormoni

Lisäkilpirauhashormoni (1-34) ei vaikuttanut yhtä stimuloivasti kantasolujen erilaistumiseen kuin FGF:t. Von Kossa – värjäyksessä oli hienoinen ero kontrolliin, mutta ei yhtä voimakas kuin fibroblastikasvutekijöillä esikäsitellyissä soluissa. Kirjallisuuden perusteella lisäkilpirauhashormoni on kuitenkin tärkeä luun kehitystä ja uusiutumista säätelevä tekijä. Näiden tulosten perusteella voisi olettaa, että fysiologisesti lisäkilpirauhashormoni vaikuttaisi myöhemmässä vaiheessa luun kehitystä, ja ehkäpä sen vaikutus on voimakkainta luun uusiutumisprosessissa ja

osteoblastien aktiivisuuden säätelyssä, eikä mesenkymaalisen kantasolun rekrytoimisessa osteoblastilinjan soluksi kuten FGF:t, jotka ovat tärkeitä tekijöitä jo sikiönkehityksen alkuvaiheessa.

BMP-4

BMP-4 – käsittely ei lisännyt osteoblastien/luun muodostusta verrattaessa kontrolliin. BMP:illa on osoitettu olevan kyky indusoida mesenkymaalisia kantasoluja luu- tai rustosolulinjan soluiksi ja lisätä niiden proliferaatiokykyä (Canalis, 1985). Tätä ilmiötä ei huomattu tässä tutkimuksessa. Vaikutukset voivat tosin olla hyvinkin erilaisia in vivo ja in vitro. Rekombinantin hBMP-4:n on raportoitu stimuloivan myös osteoblastien DNA- ja kollageenisynteesiä, sekä alkaalisen fosfataasin aktiivisuutta (Chen ym., 1991). Värjäys alkaalisen fosfataasin suhteen ei kuitenkaan juurikaan eronnut kontrollista. Syyksi vaikutusten vähäisyyteen tässä tutkimuksessa voisi olettaa saman seikan kuin PTH:lla käsitellyissä soluissa: väärän ajoituksen. BMP-4 on voimakas differentiaatiotekijä, joka ei kuitenkaan lisää mesenkymaalisten kantasolujen proliferaatiota. Kun BMP-4 annetaan juuri ennen osteoblasti-induktiota, jää mesenkymaalisten kantasolujen määrä vähäisemmäksi, eikä luun muodostus tapahdu optimaalisella voimakkuudella, koska solujen määrä on vähäisempi. Tällä perusteella BMP-4 kannattaisi lisätä, kun osteoblastien erilaistuminen on juuri käynnistynyt, esimerkiksi kun osteoblasti-induktiomedium on ollut viljelmässä kahden viikon ajan.

7. Johtopäätökset

Molemmat tutkittavat biomateriaalityypit osoittautuivat soveltuviksi alustoiksi mesenkymaalisten kantasolujen kasvulle ja erilaistumiselle in vitro. Polylaktidi-koglykolihapoja on käytetty myös kliinisissä sovelluksissa jonkin aikaa, joten näistä materiaalityypeistä tiedetään, että ne ovat elimistölle myrkyttömiä ja bioyhteensopivia. Myös bioaktiivista lasia on käytetty kirurgiassa. Kudosteknologisten sovellusten kehittäminen käyttökelpoiseksi kliiniseen käyttöön soveltuvaksi tuotteeksi on kuitenkin pitkä prosessi. Nykyään muutamia tuotteita on saatu markkinoille, ja täten myös EU on laatimassa direktiiviä ihmiskudosta sisältävien tuotteiden turvallisuudesta. Tämä toisaalta yhdenmukaistaa kudosteknologisten sovellusten kehittämisprosesseja, sekä pitkittää tuotteen viemistä markkinoille. Toki tuotteiden turvallisuus on ensisijaisen tärkeätä ja direktiivin tärkeys on kiistaton myös EU:n alueella.

Tämän tutkimuksen tulokset antoivat uutta tietoa luun muodostuksen optimoinnista biomateriaalissa. Tällä hetkellä luun muodostus on erityisesti ihmisen mesenkymaalisisilla kantasoluilla aikaa vievä tapahtuma, ja sen nopeuttaminen olisi tärkeä asia vietäessä teknologiaa kohti kliinistä sovellusmuotoa. Mesenkymaalisten kantasolujen esikäsittely fibroblastikasvutekijöillä tehosti ja nopeutti luun muodostusta biomateriaaleilla sekä muovilla. Tätä tietoa voimme käyttää hyväksi jatkotutkimuksissa. Myös tutkittavat biomateriaalit osoittautuivat toimiviksi, joten voimme käyttää niitä tulevaisuuden tutkimusprojekteissa.

Tulosten perusteella voisi olettaa, että fibroblastikasvutekijät ovat optimaalisimmat tekijät mesenkymaalisen kantasolun rekrytoinnissa osteoblastilinjan soluksi. Ne lisäävät solujen proliferaatiota, mikä on tärkeätä luun muodostuksen kannalta. Ne myös lisäävät solujen osteogeenisyyttä, jolloin erilaistuminen ja luun muodostus nopeutuvat. BMP-4 on voimakas erilaistumistekijä, ja se saattaa vaikuttaa voimakkaimmin kun erilaistumisprosessi on jo käynnistynyt, jolloin solujen ei tarvitse enää jakaantua. Lisäkilpirauhashormonin voisi puolestaan olettaa olevan tärkeä säätelijä jo muodostuneen luukudoksen uusiutumisessa, jolloin sitä kannattasi lisätä myös viljelmään vasta parin viikon viljelyjakson jälkeen.

Tutkimustulokset viittaisivat siihen, että kyseiset biomateriaalit eivät sellaisenaan sovellu kasvutekijöiden vapauttamiseen, vaan tähän tarkoitukseen täytyisi käyttää pidemmälle vietyjä sovelluksia, kuten kasvutekijöiden kiinnittämistä biomateriaaliin peptidisidoksin tai kasvutekijöiden vapauttamista mikrokiteistä biomateriaalin sisältä. Nämä menetelmät ovat toki aikaa vieviä ja kalliimpia sovelluksia kuin yksinkertainen kasvutekijän imeyttäminen biomateriaaliin.

Kudosteknologisen sovelluksen tavoite on biomateriaalin ja solujen integraatio kudokseen ja vaurioituneen kohdekudoksen parantuminen. Tällaiset in vitro – tutkimukset luovat pohjaa in vivo – tutkimuksille. Tässä työssä löydettiin ihmisen mesenkymaalisten kantasolujen kasvun ja erilaistumisen salliva biomateriaali. Sovelluksen vieminen koe-eläinmalliin vaatisi kasvuolosuhteiden muuttamista ja optimoimista. Tärkeätä olisi löytää optimaaliset kasvuolosuhteet, mitkä sallisivat kudoksen mahdollisimman nopean kasvun biomateriaalissa, mutta mitkä eivät sisältäisi elimistölle vieraita antigeneja. Optimaalisinta olisikin kasvattaa soluja potilaan omassa seerumissa. Siitä kuitenkin saattaa puuttua joitain kasvutekijöitä tai ravinteita, mitä naudan sikiön seerumissa on tarjolla. Solut ja biomateriaalit täytyisi siis puhdistaa huolellisesti ennen elimistöön viemistä, jotta immuunireaktioilta vältyttäisiin.

Lääkelaitoksen tekemässä selvityksessä ennustetaan, että kolme erilaista teknologian haaraa tulee dominoimaan lääketieteellisiä hoitotapoja seuraavalla vuosisadalla. Nämä teknologiat ovat soluterapia, kudosteknologia ja geeniterapia. Selvityksessä kerrotaan, että raja näiden teknologioiden välillä on keinotekoinen, ja kaikki kolme muotoa kehittyvät käsi kädessä, samojen tutkijoiden soveltaessa niitä yhtäaikaaisesti. Kudosteknologia on tunnustettu olevan tulevaisuuden lääketiedettä ja siihen on varauduttu myös EU:n sisällä säätämällä aikaisemmin mainittu direktiivi.

Mesenkymaaliset kantasolut ovat yksi potentiaalisimmista solulähteistä kudosteknologisiin sovelluksiin. Sillä, että soluterapioissa voitaisiin käyttää potilaan omia soluja, vältyttäisiin useilta sekä eettisiltä, että immunologisilta ongelmilta. Optimaalisen solulähteen ja kasvatusmetodien sekä kasvutekijöiden löytäminen on tärkeätä. Myös mesenkymaalisen kantasolun biologian tutkiminen voi avata uusia mahdollisuuksia solujen erilaistamiseen ja eristämiseen. Esimerkiksi mesenkymaalisten kantasolujen eristäminen verenkierrosta, niiden kasvattaminen ja erilaistaminen

kudosteknologista sovellusta varten olisi tulevaisuudessa ideaalinen vaihtoehto. Myös kantasolujen kotiutumisen selvittäminen antaisi useita mahdollisuuksia regeneratiiviselle lääketieteelle. Tällöin esimerkiksi aivovauriopotilaalle voitaisiin antaa verenkierron mukana kantasoluja, jotka integroituisivat vauriokohtaan ja erilaistuisivat neuroneiksi, tai sydäninfarktipotilaalle annettaisiin sydänekudosta uusivia kantasoluja verenkierron kautta.

Myös luusairauksien hoidossa kudosteknologialla on tulevaisuudessa paljon mahdollisuuksia. Väestön ikääntymisen myötä osteoporoosi sekä esimerkiksi eturauhaskarsinoman luumetastaasit lisääntyvät. Osteoporoosin hoitokeinona kantasoluterapiat näyttävät potentiaalisilta vaihtoehdoilta, ja vastaavasti luutumorien poiston jälkeen vaaditaan allogenista luuta täyttämään tuumorin poistosta aiheutunut vauriokohta. Tampereen sairaanhoitopiirin mukaan heillä on krooninen pula allogenisestä luusta. Kaiken lisäksi käytettävät luusiirteet ovat yleensä osteoporoottista luuta. Kudosteknologia tuo ehkä tulevaisuudessa ratkaisun tällaisiin ongelmiin.

Tämä tutkimus toi muutamia uusia lähtökohtia tulevaisuuden tutkimushankkeisiin, joita pyritään käyttämään hyväksi. Tämä in vitro – malli osoitti mesenkymaalisten kantasolujen soveltuvuuden tutkittuihin biomateriaaleihin ja toi uusia keinoja luun muodostamisen tehostamiseen.

LÄHDELUETTELO

Barry FP, Boynton RE, Hayneshworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 265:134-139.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36:568-84.

Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992; 59:115-165.

Bianco P, Silvestrini G, Termine JD, Bonucci E. Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies. *Calcif Tissue Int.* 1988; 43:155-61.

Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarised vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245:855-887.

Canalis E. Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clinn Orthop* 1985; 193:246-263.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 5:641-650.

Chen TL, Bates RL, Dudley A, Hammonds RG Jr, Amento EP. Bone morphogenetic protein-2b stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cells: comparison with TGF-beta 1. *J Bone Miner Res* 1991; 6:1387-93

Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calsif Tissue Int* 1998;62:74-82.

Delezoide AL, Benoist-Lassel C, Legeai-Mallet L, Le merrel M, Munnich A, Vekemans M, Bonaventure J. Spatiotemporal expression of FGFR 1,2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech Dev* 1998; 77:19-30.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate, *British Journal of haematology* 1999; 107:275-281.

Divieti P, Inomata N, Singh R, Juppner H, Bringhurst FR. Receptors for the carboxyl region of PTH (1-84) are highly expressed in osteocytic cells. *Endocrinology* 2001; 142:916-925.

Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calsif Tissue Int* 1981; 33: 509-512.

Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 2006; 86:77-91.

Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Depouck D, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman T, Barthlow R, Hastings G, Gowen M. Cathepsin K, but not cathepsin B, L or S, is abundantly expressed in human osteoclasts, *J Biol Chem* 1996; 271:12511-12516.

Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. Effects on age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *J Orthop Res* 2005; 23:287-293.

Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006; 235:176-90.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova Ai, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hemopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 2:230-247.

Gasser B. About composite materials and their use in bone surgery. *Injury* 2000; 31:49-53.

Gerstenfeld LC, Shapiro FD. Expression of bone specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem* 1996; 62:1-9.

Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 1992; 6:3362-3369.

Globus RK, Plouet J, Gospodarowicz D. Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology* 1989; 124:1539-1547.

Gonzales AM, Hill DJ, Logan A, Maher PA, Baird A. Distribution of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor-1 messenger RNA expression and protein presence in the mid semester human fetus. *Pediatr Res* 1996; 39:375-385.

Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335:1095-1101 .

Hayneshworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13:69-80.

Heino J ja Vuento M. *Solubiologia*, WSOY 2001, pp. 193-195.

Heino TJ, Hentunen TA, Väänänen HK. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res* 2004; 294:458-468.

Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res* 1973; 7:25-42.

Hench LL. Bioactive ceramics: Theory and clinical applications. Oxford: Butterford-Heinemann Ltd. 1994:3-14.

Hench LL. Biocheramics. J Am Ceram Soc, 1998; 81:1705-1727.

Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, Kendler DL, McClung MR, Miller PD, Olszynski WP, Orwoll E, Yuen G. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. Endocr Rev 2005; 5:688-703

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The Roles of osteoprogenin and osteoprogenin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 2000; 15:2-12.

Hou L, Cao H, Wang D, Wei G , Bai C , Peia X, Zhang Y. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. Int J Hematol 2003; 78:256-261.

Huang W, Carlsen B, Wulur I, Rudkin G, Ishida K, Wu B, Yamaguchi DT, Miller TA. BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and is required for in vitro bone formation in a PLGA scaffold. Exp Cell Res 2004; 299:325-34.

Hubbel JA. Biomaterials in tissue engineering. Biotechnology 1995; 13:565-576.

Hurley MM, Abreu C, Harrison JR, Lichtler AC, Raisz LG, Kream BE. Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression on osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Biol Chem 1993; 268:5588-5593.

Inaoka T, Bilbe G., Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone, Biochem. Biophys. Res. Commun 1995; 206:89-96.

Iseki S, Wilkie AOM, Heath JK, Ishimura T, Eto K, Morris-Kay GM. FGFR-2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF-2. *Development* 1997; 124:3375-3384.

Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor kinases: molecular and signal transduction. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1135:185-199.

Jilka RL, Weinstein RS, Takahashi K, Parfitt AM, Manolagas SC. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest* 1996 ; 97(7):1732-40.

Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okashaki N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takashaki N, Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 1999; 163:434-442.

Kalajzic I, Kalajzic Z, Hurley MM, Lichtler AC, Rowe DW. Stage specific inhibition of osteoblast lineage differentiation by FGF2 and noggin. *J Cell Biochem* 2003; 88:1168-1176.

Kaneoko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, nakagawa M, Toyama Y, Yabe Y, Kumegawa M, Hakeda Y. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000; 4:479-486.

Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takanoko-yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res* 1995, 19:471-478.

Karlsson KH. Bone implants – a challenge to materials science. *Ann Chir Gyn* 1999; 88:237-245.

Kelpke SS, Reiff D, Prince CW, Thompson JA. Acidic fibroblast growth factor signalling inhibits peroxynitrite induced death of osteoblasts and osteoblast precursors. *J Bone Miner Res* 2001; 16:1917-1925.

Kim HJ, Rice DPC, Kettunen PJ, Thesleff I. FGF-, BMP. and Shh-mediated signaling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development* 1998; 125:1241-1251.

Kokubo T. Bioactivity of glasses and glass-ceramics. *Bone-Bonding Leidersdorf: Reed Healthcare Communications*, 1992: 31-46.

Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Väänänen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 616-625.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliot R, Colombero R, Elliot G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprogenitor ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-176.

Lakkakorpi P, Tuukkanen J, Hentunen T, Järvelin K, Väänänen HK. Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro. *J Bone Miner Res* 1989; 4:817-825.

Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Kinetics of the cytoskeleton in osteoclast during the resorption cycle in vitro. *J Bone Miner Res* 1991; 6:817-826.

Lawson AC, Czernuszka JT. Collagen-calcium phosphate composites. *Proc Instn Mech Engrs* 1998; 212:413-425.

Leskelä HV, Risteli J, Niskanen S, Koivunen J, Ivaska KK, Lehenkari P. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:1008-10013.

Lemonnier J, Hay E, Delannoy P, Fromigue O, Lomri A, Modrowski D, Marie PJ. Increased osteoblast apoptosis in apert craniosynostosis: role of protein kinase C and interleukin-1. *Am J Pathol* 2001; 158:1833-1842.

Lodie TA, Blickarz CE, Devakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabudin L, Tubo R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction, *Tissue engineering* 2002; 8:739-751.

Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005; 9:72-84.

Luyten FP. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 1989; 264:13377–13380.

Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* 2000; 149:1297-1308.

Marie PJ. The molecular genetics of bone formation: implications for therapeutic interventions in bone disorders. *Am J Pharmacogenomics* 2001; 1:175-187.

Marie PJ. Fibroblast growth factor signalling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 2003; 316:23-32.

Mark MP, Butler WT, Prince CW, Finkelman RD, Ruch JV. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation*. 1988;37(2):123-36.

McBride C, Gaupp D, Phinney DG. Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real time PCR. *Cytotherapy* 2003; 5:7-18.

Mullender MG, Huiskes R. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? *Bone*. 1997; 20(6):527-32.

Muñoz-Sanjuán I, Brivanlou AH. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosc* 2002; 3:271–280

Nagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RNK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:395-400.

Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 1997; 276:219-220.

Niiranen Henna. Biohajoavat synteettiset polymeerit ja hajoamisprosessit. *Luentomoniste* 2004, Tampereen teknillinen yliopisto.

Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, Takada S. FGF18 is a required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 2002, 16:870-879.

Ono I, Yamashita T, Jin HY, Ito Y, Hamada H, Akasaka Y, Nakasu M, Ogawa T, Jimbow K. Combination of porous hydroxyapatite and cationic liposomes as a vector for BMP-2 gene therapy. *Biomaterials* 2004; 25:4709-18

Orr-Urtreger a, Givol D, Yayon A, Yarden Y, Lonai P. Developmental expression of murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* 1991; 113:1419-1434.

Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* 1990; 11:401-406.

Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multiple potential of human mesenchymal stem cells, *Science* 1999; 284:143-147.

Qiana L, Saltzman WM. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification. *Biomaterials* 2004; 25:1331-1337.

Riminucci M, Bianco P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36:1027-36.

Roach HI. Long term organ culture of embryonic chick femora: a system for investigating bone and cartilage formation at an intermediate level of organization. *J Bone Miner Res* 1990; 5:85-100.

Roach HI. Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone Miner* 1992; 19:1-20.

Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol* 1995; 131(2):483-94.

Rodan SB, Wesolowski G, Yoon K, Rodan GA. opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem* 1989; 264:19934-19941.

Reeve J, Meunier PJ, Parson JA, Bernat M, Bijvoet OL, Courpron P, Edouard C, Klenerman L, Neer RM, Renier JC, Slovik D, Vismans FJ, Potts Jr TJ. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Br Med J* 1980; 280:1340-1344.

Rosen CJ, Bilezikian JP. Anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:957-964.

Saito N, Takaoka K. New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24:2287-2293.

Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikkö K, Väänänen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 1997; 276:270-273

Shapiro F. Variable conformation of GAP junctions linking bone cells: a transmission electron microscopic study of linear, stacked linear, curvilinear, oval and annular junctions. *Calcif Tissue Int* 1997; 61:285-293.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78:55-62

Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grunewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR, Scadden DT. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 2005; 201:1781-91

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Giellespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by new members of tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrinol Rev* 1999; 20:345-357.

Sutherland MK, Rao LG, Wylie JN, Gupta A, Ly H, Sodek J, Murray TM. Carboxyl terminal parathyroid hormone peptide (53-84) elevates alkaline phosphatase and osteocalcin mRNA levels in SaOS-2 cells. *J Bone Miner Res* 1994; 9:453-458.

Tang KT, Capparelli C, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Huber AC, Braverman LE, DeVito WJ. Acidic fibroblast growth factor inhibits osteoblast differentiation in vitro: altered expression of collagenase, cell growth-related, and mineralization associated genes. *J Cell Biochem* 1996; 61:152-166.

Thesing CW, Groot CG, Wassenaar AM. Transdifferentiation of hypertrophic chondrocytes into osteoblasts in murine fetal metatarsal bones, induced by co-cultured cerebrum. *J Bone Miner Res* 1991; 12:24-40.

Urist MR: Bone formation by autoinduction, *Science* 1965; 150:893–899.

Valta MP, Hentunen T, Qu Q, Valve EM, Harjula A, Seppänen JA, Väänänen HK, Härkönen PL. Regulation of osteoblast differentiation: a novel function for fibroblast growth factor 8. *Endocrinology* 2006; 147(5):2171-82.

Varghese S, Ramsby ML, Jeffrey JJ, Canalis E. Basic fibroblast growth factor stimulates expression of interstitial collagenase and inhibitors of metalloproteinases in rat bone cells. *Endocrinology* 1995; 136:2156-2162.

Varghese S, Rydziel S, Canalis E. Basic fibroblast growth factor stimulates collagenase-3 promoter activity in osteoblasts through an activator protein-1-binding site. *Endocrinology* 2000, 141:2185-2191.

Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *J Clin Pathol* 2002; 55(9):693-8.

Väänänen HK, Karhukorpi EK., Sundqvist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lakkakorpi P. Evidence for the presence of a proton pump of a vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 1990; 111:1205-1311.

Väänänen HK. Luun elämänkaari. *Duodecim* 1996; 112(22):2087

Väänänen HK. Mesenchymal stem cells. *Annals of Medicine* 2005, 37:469-479.

Weiss RE, Reddi AH. Role of fibronectin in collagenous matrix-induced mesenchymal cell proliferation and differentiation in vivo. *Exp Cell Res* 1981; 133:247-54.

Wildemann B, Kadow-Romacker A, Lubberstedt, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Differences in the fusion and resorption activity of human osteoclasts after stimulation with different growth factors released from a polylactide carrier. *Calcif Tissue Int* 2005; 76:50-55.

Williams DF. Definitions in biomaterials: Proceedings of a consensus conference of the European Society for biomaterials. March 3-5, 1986. Elsevier, Amsterdam 1987.

Wislet-Gendebiena S, Hansa G,b, Leprincea P, Rigoa J-M, Moonena G, Rogistera B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 2005; 23:392-402.

Wozney JM. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242:1528–1534.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis, *Mol Reprod Dev* 1992; 32:160–167

Yuan H, Bruijn JD, Zhang X, Van Blitterswijk CA, De Groot K. Use of an osteoinductive biomaterial as a bone morphogenetic protein carrier. *J Mat Sci: Materials in medicine* 2001; 12:761-766.

Zhang J, Ma PX. Poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res* 1999; 44:446-455.