

Laura Halme

LUUKUDOKSEN JA ELIMISTÖN ENERGIAMETABOLIAN YHTEYS

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevät 2016

Laura Halme

LUUKUDOKSEN JA ELIMISTÖN ENERGIAMETABOLIAN YHTEYS

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Biolääketieteenlaitos /Solubiologia ja anatomia

Kevät 2016

Vastuuhenkilö: Kaisa Ivaska

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. KIRJALLISUUSOSA	2
2.1 YLEISTÄ KUDOKSISTA.....	2
2.1.1 Luukudos	2
2.1.2 Rasvakudos	3
2.2 LIHAVUUS JA TYYPIN 2 DIABETES.....	3
2.3 LUUKUDOKSEN JA RASVAKUDOKSEN YHTEYS	4
2.3.1 Leptiinin keskushermostovälitteinen inhibitorinen vaikutus luukudokseen in vivo.....	5
2.3.2 Leptiinin perifeerinen anabolinen vaikutus in vivo.....	8
2.4 LUU- JA RASVAKUDOKSEN YHTEYS HAIMAN INSULIININ ERITYKSEEN.....	9
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	11
4. AINEISTO JA MENETELMÄT	12
4.1 ROTTIEN KANTASOLUJEN ERISTÄMINEN JA VILJELYN ALOITTAMINEN	12
4.2 KANTASOLUJEN YLLÄPITO	12
4.3 IHMISEN KANTASOLUJEN (MSC) VILJELEMINEN	13
4.4 KOKEET	13
4.5 VILJELMIEN LOPETUS, FIKSOINTI JA VÄRJÄYS.....	15
4.5.1 Von Kossa -värjäys	16
4.5.2 ALP(alkalinen fosfataasi) -värjäys.....	16
4.6 IMMUNOMÄÄRITYKSET	17
4.6.1 Aikaerotteinen fluoresenssi (TRF, time-resolved fluorometry)	17
4.6.2 Aikaerotteisen fluoresenssin käyttö osteokalsiinipitoisuuden mittaamisessa	18
4.6.3 Menetelmän suorittaminen.....	18
4.7 ALP –AKTIIVISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN	19
4.7.1 Alkalisen fosfataasin määrittäminen solulyysaateista	19
4.7.2 Bradfordin proteiininmäärittäminen	19
5. TULOKSET.....	21
5.1 D-vitamiinin merkitys osteoblastien osteokalsiinin erityksessä	21
5.2 Glukoosin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja proliferaatioon sekä osteokalsiinin eritykseen (koe 1 ja koe 3).....	22

5.3 Insuliinin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja proliferaatioon sekä osteokalsiinin eritykseen (koe 2 ja koe 4).....	24
5.4 Leptiinin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja proliferaatioon sekä osteokalsiinin eritykseen (koe 5 ja koe 6).....	25
6. POHDINTA JA PÄÄTELMÄT	27
8. LÄHTEET	29
LIITE 1.....	33

1. JOHDANTO

Luukudoksen ja elimistön energia-aineenvaihdunnan välinen yhteys on tunnettu pitkään. Pienipainoisuus ja anoreksia lisäävät riskiä sairastua osteoporoosiin, kun taas lihavilla ihmisillä luukudoksen mineraalitiheys on suurentunut (Zaidi et al 2012). Lisääntyneen estrogeenipitoisuuden ja mekaanisen kuormituksen on ajateltu olevan osasyynä ylipainoisten parempaan luun kestävyYTEEN, mutta luu- ja energia-aineenvaihdunnan väliset säätelymekanismit solu- ja molekyyllitasolla ovat olleet vielä epäselviä.

Leptiini on rasvasolujen erittämä hormoni, joka säätelee ruokahalua ja elimistön energiametaboliaa. Leptiinin suhteen poistogeeniset hiiret ovat lihavia ja niillä on havaittu myös muutoksia luuaineenvaihdunnassa. Vuonna 2000 leptiinipuutteisilla hiirillä todettiin olevan suurempi luumassa verrokkeihin verrattuna, minkä jälkeen kiinnostus leptiinin vaikutuksesta luukudokseen lisääntyi. Rasvakudos näyttäisi siten säätelevän luukudoksen toimintaa. Luukudos puolestaan saattaa osallistua koko elimistön energiametabolian säätelyyn. Vuonna 2007 julkaistiin poistogeeninen hiirimalli, jolta oli poistettu osteoblastien tuottama osteokalsiini -proteiini. Osteokalsiinipuutteiset hiiret olivat lihavia, hyperglykeemisiä ja haiman beetasolujen massa sekä insuliinin erityis olivat pienentyneet. Lisäksi adiponektiinin erityis rasvakudoksesta oli vähentynyt ja sitä kautta myös insuliiniherkkyys oli vähentynyt. Hiirten luumassa oli suurentunut sekä luun muodostuminen lisääntynyt. Luuston erittämällä osteokalsiinilla voisi olla merkitystä energia-aineenvaihdunnan säätelyssä.

Tässä työssä käsitellään erityisesti rasvakudoksesta erittyvän leptiinin vaikutuksia luukudoksessa, sillä leptiinin merkitys ja mekanismit tunnetaan tällä hetkellä parhaiten. Lisäksi käsitellään jonkin verran muita hormoninkaltaisia välittäjäaineita, joiden on havaittu yhdistävän luu- ja energia-aineenvaihduntaa toisiinsa. Työn kokeellisessa osassa on pyritty solumallien avulla tutkimaan eri leptiini-, glukoosi- ja insuliinipitoisuuksien vaikutuksia luukudoksesta erittyvän osteokalsiinin pitoisuuksiin.

2. KIRJALLISUUSOSA

2.1 YLEISTÄ KUDOKSISTA

Vierekkäin sijaitsevat samanlaiset solut muodostavat yhtenäisiä alueita, kudoksia. Kudokset luokitellaan sen mukaan, minkälaisia soluja ja soluväliainetta niissä on. Ihmiskeho muodostuu neljästä peruskudoksesta: epiteeli-, tuki-, lihas- ja hermokudos.

2.1.1 Luukudos

Luukudos kuuluu tukikudoksiin ja se on alkioikautisen mesodermin johdannainen. Luukudosta syntyy kahdella eri tavalla: suoraan sidekudoksesta sekä rustoisen mallin kautta. Luukudos muodostuu tiiviistä luusta eli kuoriluusta, hohkaluusta sekä luuytimestä. Tiivis luu sijaitsee luun pinnalla. Se muodostuu osteoneista, joiden keskellä sijaitsee ravitseva verisuoni ja ympärillä luusäleiden kerroksia, joissa luusolut, osteosyytit, sijaitsevat. Hohkaluu sijaitsee tiiviin luun rajaaman luun sisäosassa ja se muodostuu ohuista luulamelleista. Hohkaluun välitiloissa on luuydintä, jossa sijaitsee suuri osa elimistön kantasoluista.

Luukudoksessa vallitsee luun muodostumisen ja luun hajoamisen välinen tasapaino, joka säätelee luumassan määrää. Luun hajottamisesta vastaavat monitumaiset jättisolut, osteoklastit, jotka jatkuvasti hajottavat luukudosta. Osteoblastit seuraavat osteoklasteja ja muodostavat uutta luuta hajotetun luun tilalle. Tasapaino osteoklastien ja osteoblastien toiminnan välillä on tärkeää, jottei luusto haurastuisi liikaa tai muodostuisi liian jykeväksi.

Osteoblastit ja osteosyytit tuottavat luun rakenneproteiinia, osteokalsiinia. Seerumin osteokalsiinipitoisuutta on pidetty luun muodostumisen merkkiaineena esimerkiksi osteoporoosipotilaiden lääkehoidon seurannassa. Silti osteokalsiinin tehtävä luussa on edelleen epäselvä. Suurin osa osteokalsiinista sijaitsee luussa, mutta pieni osa erittyy verenkiertoon. Osteokalsiini esiintyy elimistössä kahtena muotona: γ -karboksyloitumuoto ja ei-karboksyloitumuoto. Karboksyloitua muotoa löytyy enemmän luusta, sillä se pystyy sitoutumaan luun mineraaliin, kun taas ei-karboksyloitua muotoa löydetään enemmän seerumista (Motyl ym. 2010).

2.1.2 Rasvakudos

Rasvakudos on yksi tukikudoksen tyyppi ja se on myös mesodermin johdannainen. Rasvakudos muodostuu suurista rasvasoluista eli adiposyyteistä, soluväliaineesta sekä hiussuonista. Adiposyyteissä tuma sijaitsee sirppimäisenä solun reunalla ja pääosin rasva täyttää lähes koko solun. Rasvakudos toimii elimistön suurimpana energiavarastona. Lisäksi rasvakudos toimii lämmöneristeenä sekä suojaa sisäelimiä.

Adiposyyteistä erittyy hormonia, leptiiniä. Leptiinin on jo pitkään tiedetty säätelevän ruokahalua. Leptiinin määrän lisääntyessä ruokahalu vähenee ja leptiinin pitoisuuden laskiessa näläntunne kasvaa. Normaalit leptiinin pitoisuudet seerumissa aikuisella ihmisellä ovat noin 7.5 ng/ml ja ylipainoisilla noin 31.3 ng/ml. Rotilla ja hiirillä pitoisuudet vastaavat normaalipainoisen ihmisen pitoisuuksia (Motyl et al. 2012).

2.2 LIHAVUUS JA TYYPIN 2 DIABETES

Suomalaisen Käypä hoito -suosituksen mukaan: ”Lihavuudella tarkoitetaan rasvakudoksen ylimäärää elimistössä”. Määritelmässä käytetään usein mittarina painoindeksiä(kg/m²), jolla on vahva yhteys rasvakudoksen määrään. Painoindeksi saadaan, kun jaetaan henkilön massa(paino, kg) pituuden neliöllä(m). Taulukossa 1 on esitetty lihavuuden luokitus painoindeksin perusteella (Lihavuus. www.kaypahoito.fi).

Taulukko 1. Lihavuuden luokitus. (Lähde: Suomalainen käypä hoito, lihavuus)

	Normaalipaino	Ylipaino	Lihavuus	Vaikea lihavuus	Sairaalloinen lihavuus
BMI (kg/m ²)	18.5-24.9	25.0-29.9	30.0-34.9	35.0-39.9	40.0 tai yli

Lihavuuden lisääntyminen on suuri kansanterveyden ongelma ja joka viides suomalainen aikuinen on lihava. Työikäisten miesten keskimääräinen painoindeksi on 27,1 kg/m² ja miehistä vähintään 66 % on ylipainoisia. Työikäisten naisten keskimääräinen painoindeksi on 26,0 kg/m² ja vähintään 46% on ylipainoisia. Paino nousee iän lisääntyessä ja yleisintä lihavuus on keski-ikäisillä miehillä ja yli 65-vuotiailla naisilla (Männistö ym. 2012).

Lihavuus lisää riskiä sairastua moniin sairauksiin ja oireyhtymiin. Etenkin, kun painoindeksi ylittää rajan 25 kg/m². Useimmat niistä johtuvat aineenvaihdunnan häiriöistä, joita sisäelimiin ja vatsaonteloon kertyvä rasvakudos aiheuttaa. Sairauksia ovat mm. erilaiset sydän- ja verenkiertoelimestön sairaudet, syöpäsairaudet, nivelrikko, hedelmättömyysongelmat sekä mielenterveysongelmat (Lihavuus. www.kaypahoito.fi).

Merkittävin lihavuuteen liittyvä sairaus on tyypin 2 diabetes. Tyypin 2 diabeteksella tarkoitetaan yleensä 35. ikävuoden jälkeen ilmaantuvaa diabetesta, joka johtuu insuliinin vaikutuksen heikentymisestä eli insuliiniresistenssistä kohdekudoksissa sekä erityksen vähenemisestä. Diagnoosi tehdään kohonneen veren glukoosipitoisuuden perusteella. Mikäli paastoverensokeri-arvo on yli 7 mmol/l tai 2 tunnin sokerirasituskokeen jälkeen yli 11.1 mmol/l, voidaan puhua diabeteksestä (Diabetes. www.kaypahoito.fi).

Ylipaino on tyypin 2 diabeteksen tärkein riskitekijä. Ylipainon lisääntyttyä, myös tyypin 2 diabetesta sairastavien määrä on vuosi vuodelta kasvanut. Kaiken kaikkiaan arvioidaan, että 500 000 suomalaista sairastaa tyypin 2 diabetesta ja näistä suuri osa tietämättään (Diabetes. www.kaypahoito.fi). Tyypin 2 diabetesta sairastavilla todetaan yleensä sairauden alkuvaiheessa normaalia suurempi luumassa ja heidän murtumariski on alentunut. Kuitenkin pitkäaikaisseurannassa tyypin 2 diabeetikoilla murtumariski on suurentunut verrokkeihin verrattuna (Strotmeyer ym. 2007). Lihavuuden ja tyypin 2 diabeteksen lisääntyessä, kiinnostus niiden vaikutuksista elimistön energia-aineenvaihduntaan on kasvanut.

2.3 LUUKUDOKSEN JA RASVAKUDOKSEN YHTEYS

Osteoporoosi on systeeminen luusairaus, jossa luun lujuus ja mineraalitiheys on alentunut niin, että murtumariski on lisääntynyt. Diagnoosi tehdään luun mineraalitiheysmittauksella eli BMD-mittauksella. WHO:n määritelmässä osteoporoosissa luuntiheys on vähintään 2.5 keskihajontaa 20-40 -vuotiaiden naisten keskimääräisen luuntiheyden alapuolella (T-score<-2.5) (WHO 1994). Alipainolla ja anoreksialla on jo pitkään tiedetty olevan yhteys osteoporoosiin. Pienipainoisuus on riskitekijä reisiluun ja nikamien murtumille sekä osteoporoosiin sairastumiselle. Luuytimen rasvakudoksen lisääntyneen määrän on todettu olevan yhteydessä pieneen luumassaan (Bredella MA ym. 2009).

Aikaisemmin lihavuutta on pidetty suojaavana tekijänä osteoporoottisille murtumille. Ylipainoisilla on todettu olevan suurentunut luun mineraalitiheys, jonka on ajateltu johtuvan muun muassa rasvakudoksesta erittyvän estrogeenin anabolisesta vaikutuksesta sekä suuremmasta ylipainon tuomasta kuormituksesta luukudokselle, jolla on anabolinen vaikutus. Kuitenkin useammat tutkimukset lähiaikoina ovat osoittaneet lihavuuden olevan riskitekijä tietyille murtumatyypeille (Gonnelli ym. 2014, Compston ym. 2011). Nämä seikat ovat lisänneet tutkijoiden kiinnostusta rasvakudoksen ja luukudoksen välisiin yhteyksiin.

Leptiinin tiedetään kontrolloivan elimistön painoa ja sen vaikutuksia on pitkään tutkittu lihavuuteen liittyvissä tutkimuksissa. Leptiinin rooli myös luukudoksessa on parhaiten tunnettu. Kun leptiinipuutteisilla hiirillä todettiin olevan suurempi luumassa verrokkeihin verrattuna (Ducy ym. 2000), kiinnostus leptiinin vaikutuksesta luukudokseen lisääntyi. Vaikutuksesta ja mekanismeista on esitetty erilaisia hypoteeseja, joista kaksi on saanut tutkimuksista eniten tukea. Toisen hypoteesin mukaan leptiini vähentää luun muodostumista sentraalisesti hypotalamuksen kautta (Ducy ym. 2000), kun taas toisen mukaan leptiini toimisi perifeerisesti anabolisena hormonina ja lisääisi luun muodostumista (Stephan ym. 2000).

Myös *in vitro* -tutkimusten tulokset ovat olleet ristiriitaisia leptiinin vaikutuksen suhteen. Osassa tutkimuksista leptiinin on osoitettu lisäävän osteoblastien proliferaatiota ja erilaistumista fysiologisissa pitoisuuksissa sekä samalla inhiboivan luun resorptiota (Thomas ym. 1999, Cornish ym. 2002 ja Holloway ym. 2002). Osassa tutkimuksista leptiinillä on todettu olevan joko apoptoosia eli solukuolemia lisäävä vaikutus tai ei ole todettu olevan minkälaisia vaikutuksia osteoblasteihin *in vitro*. Näissä tutkimuksissa viljelmissä käytettiin matalia, ei fysiologisia, pitoisuuksia (Ducy ym. 2000, Kim ym. 2003).

2.3.1 Leptiinin keskushermostovälitteinen inhibitorinen vaikutus luukudokseen *in vivo*

Vuonna 2000 yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa osoitettiin, että leptiinin vaikutusmekanismi välittyy sentraalisesti hypotalamuksen kautta ja, että vaikutus olisi luunmuodostumista estävä. Tutkimuksessa, kuten lähes kaikissa leptiiniä käsittelevissä tutkimuksissa, käytettiin kahta erilaista poistogeenistä hiirtä: ob/ob -hiirtä, jolta poistettiin leptiiniä koodaava geeni sekä db/db -hiirtä, jolta poistettiin leptiinireseptoria

koodaava geeni (Ducy ym. 2000). Leptiinipuutteisten hiirten on jo aikaisemmissakin tutkimuksissa todettu olevan fenotyypeiltään lihavia ja hypogonadisia (Zhang et al 1994).

Ob/ob -hiirillä sekä db/db -hiirillä nikamien ja pitkien luiden röntgenkuvissa hohkaluun tiheys oli suurempaa ja mineralisoidun luun määrä oli suurempi verrattuna verrokkeihin. Tiiviissä luussa ei nähty eroavaisuuksia verrokkeihin verrattuna. Laskennallisesti hohkaluun massa oli selvästi suurempaa leptiinipuutteisilla hiirillä kuin verrokeilla.

Sekä ob/ob- että db/db -hiiret olivat fenotyypiltään lihavia, joten tutkimuksessa haluttiin selvittää, olisiko suurentunut luuntiheys vain sekundaarinen vaikutus lihavuudelle. Kun hiirille annettiin vähäenergistä ruokaa, lihavuuden kehittyminen viivästyi. Näillä hiirillä, kuitenkin vielä normaalipainoisina, oli selvästi suurempi luuntiheys. Tutkimuksessa analysoitiin myös heterotsygoottisia hiiriä (ob/+). Hiiret olivat fenotyypiltään normaalipainoisia, mutta silti hiirillä oli suurempi luuntiheys. Lisäksi vertailtiin hiiriä, jotka olivat lihavia, mutta joiden lihavuus ei primaaristi johtunut leptiinipuutteesta. Näillä hiirillä luuntiheys oli samaa luokkaa kuin verrokkihiirillä.

Ob/ob -hiiristä määritettiin parathormoni (PTH)-, kilpirauhashormoni (T4)- sekä kasvutekijäpitoisuudet (IGF1), jotka olivat samaa luokkaa kuin verrokeilla. Sen sijaan kortisolipitoisuus oli ob/ob -hiirillä selvästi kohonnut. Aikaisempien tutkimusten perusteella hyperkortisolismi ja hypogonadismi molemmat inhiboivat luun muodostumista. Kuitenkin tässä tutkimuksessa hiirillä oli selvästi suurempi luuntiheys verrattuna verrokkeihin.

Tutkimuksessa selvitettiin ob/ob ja db/db -hiirten osteoblastiaktiivisuutta ja todettiin, että luumuodostuminen oli selvästi aktiivisempaa, huolimatta siitä, että osteoblastien määrä oli sama kuin verrokkihiirillä. Osteoblastit muodostivat siis aktiivisemmin uutta luuta. Osteoklastien määrä oli suurempi, jota selitettiin hypogonadismilla. Hiirille, joille annettiin estrogeenia, luuntiheys kasvoi entisestään, samalla osteoklastien määrä väheni.

Lopuksi ob/ob -hiirien tai verrokkihiirien aivojen 3. aivokammioon asennettiin pumpppu(intracerebroventricular infusion), josta lisättiin leptiiniä tasaisesti suoraan hypotalamukseen yhteensä 28 vuorokautta. Verrokeilla infuusiassa käytettiin fosfaattipuskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS). Hiirillä, joille leptiiniä infusoitiin hypotalamukseen, luuntiheys oli matalampaa kuin PBS:ää saaneilla hiirillä. Leptiiniä saaneiden hiirten luumassan määrä oli pienempi kuin PBS:ää saaneilla hiirillä (Ducy ym. 2000).

Vuonna 2002, saman tutkimusryhmän toimesta osoitettiin, että leptiinin sentraalisesti välittävät vaikutukset välittyvät sympaattisen hermoston kautta (Ducy et al. 2002). Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että leptiinipuutteisilla hiirillä on alentunut sympaattisen hermoston aktiivisuus(Bray and York, 1998).

Tutkimuksessa käytettiin dopamiini- β -hydroksylaasi puutteisia hiiriä(DBH). DBH:ta tarvitaan sympaattisen hermoston välittäjäaineiden, noradrenaliinin ja adrenaliinin tuotantoon ja tätä kautta koko sympaattisen hermoston toimintaan. Se hydroksyloi dopamiinin noradrenaliiniksi ja sitä on löydetty vain noradrenergisistä ja adrenergisistä hermosoluista ja lisämunuaisytimestä (Koulu et al 2007). dbh $^{-/-}$ -hiirillä luumassan määrä oli verrokkeja suurempaa. Tutkijat ruiskuttivat leptiiniä dbh $^{-/-}$ -hiirten 3. aivokammioon. Tällä kertaa leptiinillä ei ollut vaikutusta luukudokseen. Sen sijaan rasvakudoksen määrä selvästi vähentyi. Samassa tutkimuksessa osoitettiin mRNA-tasolla (PCR:n ja Northern blot -tekniikalla) osteoblasteissa sijaitsevan β 2-adenergisiä reseptoreita. Muita adrenergisiä reseptoreita ei havaittu.

Samassa tutkimuksessa leptiinipuutteisille ob/ob -hiirille annettiin intraperitoneaalisesti kuuden viikon ajan päivittäin sympatomimeettii (β -adrenergista agonistia), isoproterenolia. Tämä vähensi luumassaa sekä osteoblastien määrää, mutta ei vaikuttanut painoon. Koe toistettiin verrokeilla, joilla myös luumassa ja osteoblastien määrä vähentyi, mutta paino pysyi muuttumattomana.

Kun ob/ob -hiirille annettiin oraalisesti β -adrenergistä antagonistia, β -salpaajaa, propranololia, luun muodostuminen, osteoblastien määrä ja luumassa lisääntyivät. Tutkijat halusivat tutkia leptiinin ja sympaattisen hermoston yhteyttä ja antoivat propranololilla hoidetuille hiirille leptiiniä infuusiona aivoihin. Tällöin leptiinillä ei ollut

vaikutusta luumassaan. Tämä tukisi ajatusta, että leptiinin vaikutusmekanismi vaatii sympaattisen hermoston aktiivisuuden toimiakseen (Takeda ym. 2002).

Myöhemmin osoitettiin, että lisääntynyt sympaattinen aktiivisuus inhiboi solujen proliferaatiota sekä lisää RankL:n ekspressiota osteoblasteista. RankL lisää luukudoksessa osteoklastien muodostumista ja tätä kautta luun hajoamista. Lisäksi osoitettiin signaalintireitti, jossa leptiini vaikuttaa sympaattisen hermoston lisäksi CART (cocaine amphetamine regulated transcript) -proteiinin välityksellä vähentämällä RankL:n ekspressiota ja sitä kautta vähentämällä luun resorptiota (Elefteriou ym. 2005).

On huomattava, että kaikki tutkimukset, jotka tukevat leptiinin keskushermoston kautta välittyvää inhiboivaa vaikutusta, tulevat samalta tutkimusryhmältä. Muut tutkimusryhmät eivät ole pystyneet osoittamaan täysin samankaltaisia vaikutuksia luukudokseen.

2.3.2 Leptiinin perifeerinen anabolinen vaikutus in vivo

Useimmat tutkimusryhmät ovat todenneet leptiinillä olevan myös anabolisia vaikutuksia luukudokseen. Burguera ym. vuonna 2001 osoittivat ihonalaisten leptiini-injektoiden hidastavan luun hajoamista rotilla, joilta oli poistettu munasarjat. Steppan ym. vuonna 2002 osoittivat, että kun ob/ob -hiirille annetaan leptiiniä intraperitoneaalisesti, luun tiheys kasvaa. Lisäksi Williams ym. myöhemmin vuonna 2011 osoittivat tietokonetomografia -kuvauksella, että db/db -hiirillä nikamissa ja sääriluissa luuntiheys on matalampaa verrokkeihin verrattuna. Matalampi luuntiheys todettiin sekä hohkaluussa että tiiviissä luussa. Tulokset olivat siis päinvastaisia kuin aikaisemmissa tutkimuksissa.

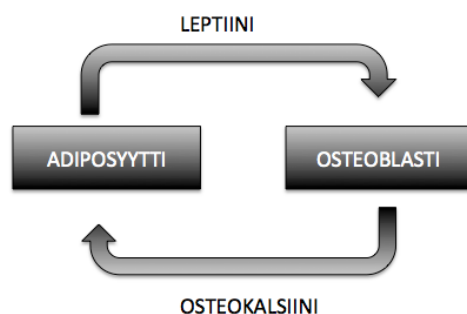
Vuonna 2012 Turner ym. käyttivät sekä ob/ob -hiiriä että db/db -hiiriä ja osoittivat leptiinin vaikuttavan anabolisesti luukudokseen. Ihonalaisesti eli subkutaanisesti injisoitu leptiini lisäsi luunmuodostusta ja hypotalaaminen leptiinigeniterapia vaikutti anabolisesti osteoblasteihin ja luun muodostumiseen. Perifeerisesti annetun leptiinin on todettu läpäisevän veri-aivoeste, joten keskushermostovälitteistä vaikutusmekanismia ei voida poissulkea. Tässä tutkimuksessa ob/ob -hiirillä hohkaluun muodostuminen lannenikamissa ja reisiluissa oli selvästi heikompaan verrokkeihin verrattuna, joka tukee Williams ym. vuoden 2011 tutkimuksia. Myös osteoblastien määrä suhteessa oli pienempi. Kun ob/ob -hiirille annettiin päivittäin subkutaanisesti 40 ug leptiiniä

yhteensä kolme viikkoa, luun muodostuminen, mineralisoituminen ja kasvu oli jopa korkeampaa kuin verrokeilla.

Toisessa kokeessa ob/ob -hiirille lisättiin geeniterapian avulla leptiinigeeni, jolla pyrittiin saamaan suuret pitoisuudet leptiiniä hypotalamukseen. Hypotalaamisella geeniterapialla ei ollut vaikutusta luun muodostumiseen.

2.4 LUU- JA RASVAKUDOKSEN YHTEYS HAIMAN INSULIININ ERITYKSEEN

Rasvakudoksesta erittyvän leptiinin uskotaan siis säätelevän elimistön luuaineenvaihduntaa ja se on parhaiten tunnettu. Myös muiden hormonien ja proteiinien yhteyksiä luuaineenvaihduntaan on tutkittu, mutta tutkimuksia on vielä vähän ja ne ovat osittain ristiriitaisia. Kuten elimistön muissa hormonivälitteisissä säätelyjärjestelmissä, myös tässä, ajatellaan olevan ns. feed back -järjestelmä eli palautejärjestelmä, jossa hormonin vaikutuksen alaisena oleva solu lähettää palautesignaaleja hormonia tuottaville soluille ja näin ollen säätelee omaa erittymistään. Luukudoksesta on pyritty tunnistamaan hormoninkaltaisia proteiineja, jotka voisivat olla palautejärjestelmän välittäjänä (kuva 1). Yhtenä vaihtoehtona on esitetty osteoblastien tuottamaa osteokalsiinia, jonka tehtävä luussa on yhä epäselvä. Kalra ym. vuonna 2009 sekä Williams ym. vuonna 2010 osoittivat, että db/db- ja ob/ob-hiirillä osteokalsiinipitoisuudet ovat matalammat kuin verrokeilla. Lisäksi, kun ob/ob -hiirille annettiin geeniterapian avulla hypotalaamisesti leptiiniä, osteokalsiinipitoisuudet nousivat.



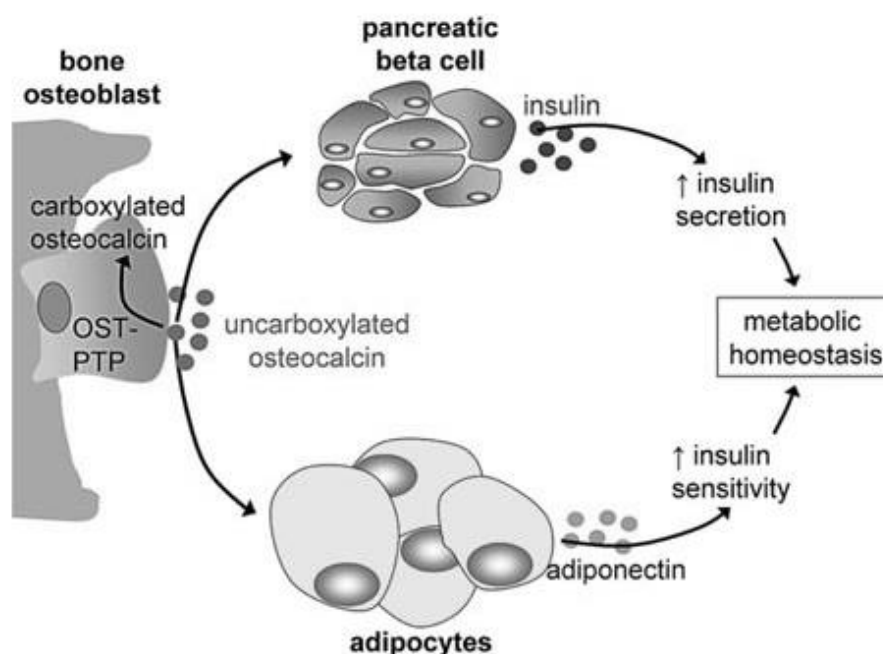
Kuva 1. Hypoteesi luu- ja rasvakudoksen välisestä palautejärjestelmästä. Rasvakudoksen adipodyytistä erittyy leptiiniä, joka vaikuttaa luukudoksen osteoblastien osteokalsiinieritykseen, joka puolestaan säätelee leptiinin eritystä rasvakudoksesta.

Osteokalsiinin on itsessäänkin todettu vaikuttavan energiametaboliaan säätelemällä haiman insuliinin tuotantoa. Vuonna 2007 yhdysvaltalainen tutkimusryhmä julkaisi poistogeenisen -hiiren, jolta osteoblastien tuottama osteokalsiini -proteiini oli poistettu. Hiiret olivat lihavia, hyperglykeemisiä ja haiman beetasolujen massa sekä insuliinin erityks olivat pienentyneet. Lisäksi adiponektiinin erityks rasvakudoksesta oli vähentynyt

ja sitä kautta vähentynyt insuliiniherkkyys. Hiirten luumassa oli suurentunut sekä luun muodostuminen lisääntynyt (Lee ym. 2007).

Kun osteokalsiinin suhteen poistogeenisille hiirille injisoitiin subkutaanisesti osteokalsiinia, veren insuliinipitoisuudet nousivat sekä glukoositoleranssi ja insuliiniherkkyys paranivat. Kun osteokalsiinia injisoitiin hiiriin, jotka söivät runsasenergistä ruokavaliota, hiirten paino ei noussut yhtä paljon kuin ilman osteokalsiinia (Ferron ym. 2008). Osteokalsiinin ajatellaan säätelevän haiman insuliinin tuotantoa lisäämällä haiman beetasolujen proliferaatiota (kuva 2).

Myöhemmin verenkierron osteokalsiinipitoisuuden on todettu olevan yhteydessä painoindeksiin ja rasvakudoksen määrään myös ihmisillä. Matalien osteokalsiinipitoisuuksien on todettu olevan suoraan yhteyksissä huonoihin HbA1c -arvoihin sekä lisääntyneeseen insuliiniresistenssiin. Lisäksi on todettu, että tyypin 1 diabeetikoilla on matalammat osteokalsiinipitoisuudet kuin terveillä verrokeilla (Pittas ym. 2009, Lee ym. 2010). Osteokalsiinin on myös osoitettu stimuloivan insuliinin eritystä ja beetasolujen proliferaatiota ihmisten beetasolusaarakkeissa (Sabek ym. 2015).



Kuva 2. Luukudos energiametabolian säätelijänä. Aktiivinen ei-karboksyloitu osteokalsiini lisää haiman insuliinin eritystä sekä adiponektiinin välityksellä insuliiniherkkyyttä kudoksissa (kuva artikkelista Lieben ym. 2009).

3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Syventävien opintojeni tutkimusprojektissa tutkittiin luun ja energiametabolian yhteyksiä solumallien avulla. Tutkimuksessa käytettiin rotasta ja ihmisestä eristettyjä mesenkymaalaisia kantasoluja, jotka erilaistutettiin osteoblasteiksi. Viljelmiä käsiteltiin eri glukoosi-, insuliini- ja leptiinipitoisuuksilla ja tutkittiin käsittelyjen vaikutuksia osteoblastien erilaistumiseen ja osteokalsiinieritykseen. Tavoitteena oli selvittää osteokalsiinin ja leptiinin merkitystä energiametaboliassa ihmis- ja rottasolumallien avulla.

4. AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 ROTTIEN KANTASOLUJEN ERISTÄMINEN JA VIILJELYN ALOITTAMINEN

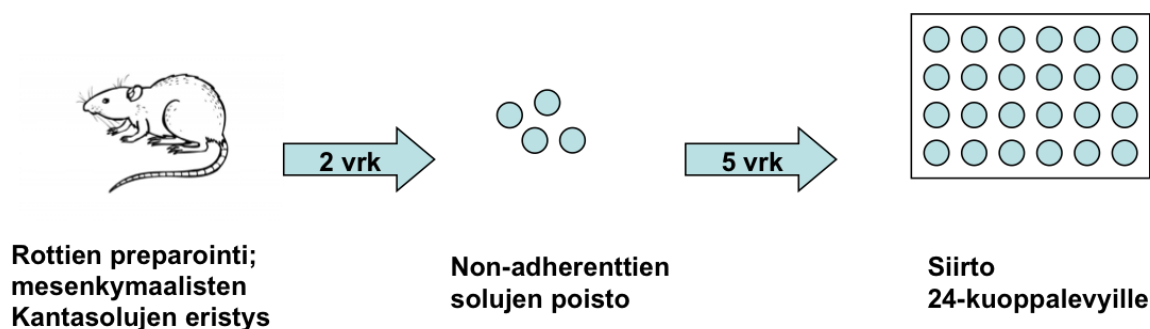
Mesenkymaaliset kantasolut (MSC) huuhdeltiin luuytimen mukana rottien pitkien luiden sisältä. Käytimme n. 3 viikon(17vrk-24 vrk) ikäisiä Sprague-Dawley naarasrottia. Eri viljelmissä käytettyjen rottien tarkemmat iät näkyvät taulukosta 2. Rotat preparoitiin ja niistä otettiin talteen reisiluut ja sääriluut. Luiden päät leikattiin epifyysien kohdalta poikki ja niiden sisällä oleva luuydin huuhdeltiin neulan avulla falcon-putkeen. Luuydin sentrifugoitiin (1000rpm, 8 min), jolloin solut saatiin pelletiksi putken pohjalle. Pääle muodostunut supernatantti imettiin pois ja solupelletti suspensoitiin 2 ml:aan MSC-kasvatusliuosta (Liite1). Solut laskettiin Bürkerin laskukammion avulla ja viljelmät aloitettiin T75-pulloissa (75 miljoonaa solua/pullo). Yhteen T75-pulloon lisättiin 13 ml MSC-mediumia. Solut laitettiin kasvamaan inkubaattoriin, +37°C:een ja 5 %:een CO₂:iin.

4.2 KANTASOLUJEN YLLÄPITO

Kantasolujen määrää lisättiin kasvattamalla niitä inkubaattorissa. Kahden päivän kuluttua kasvatusliuos poistettiin non-adherenttien, hematopoieettisten kantasolujen poistamiseksi. Pohjalle tarttuneet adherentit mesenkymaaliset kantasolut huuhdeltiin kaksi kertaa steriilillä PBS:llä (phosphate buffered saline) ja lisättiin niille uusi kasvatusliuos. Ylläpitokasvatuksessa soluille lisättiin 1x10⁻⁸M deksametasonia. Solut laitettiin takaisin inkubaattoriin ja annettiin kasvaa viisi vuorokautta.

Viiden vuorokauden kuluttua solut siirrettiin 24-kuoppalevyille, jossa niitä alettiin erilaistaa osteoblasteiksi osteogeenisen kasvatusliuoksen avulla (Liite 1). Vanha kasvatusliuos imettiin pois ja T75-pullot pestiin 10 ml:lla steriiliä PBS:ää. Kantasolut irrotettiin pullojen pohjasta entsyymaattisesti käyttäen apuna 0,05 %:sta trypsin-EDTA-liuosta. Trypsiiniä lisättiin 2,5 ml/pullo ja inkuboitiin pulloja 10 minuuttia inkubaattorissa. Trypsiini inaktivoitiin lisäämällä 2,5 ml MSC-kasvatusliuosta ja irrotetut solut siirrettiin falcon-putkeen. Solut sentrifugoitiin (800rpm, 10min) pelletiksi ja supernatantti poistettiin. Muodostunut solupelletti suspensoitiin 1 ml:aan MSC-kasvatusliuosta. Solut laskettiin ja siirrettiin kasvamaan 24-kuoppalevyille (4000solua/kuoppa). Kuoppiin lisättiin 1 ml osteogeenistä kasvatusliuosta (Liite1) sekä

osaan kuopista laitettiin MSC-kasvatusliuosta kontroleiksi. Soluviljelmien kasvatuksen aloittaminen on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Kantasolujen eristys ja viljelyn aloittaminen

4.3 IHMISEN KANTASOLUJEN (MSC) VILJELEMINEN

Humaanisoluviiljelmässä käytettiin soluja kahdelta eri potilaalta, joista tehtiin kolme eri koetta. Viiljelmistä käytetään nimiä 1 ja 2. Tarkemmat tiedot soluista ovat taulukossa 3. Solut otettiin tyypijäädytyksestä ja sulatettiin falcon-putkessa, jonne oli lisätty 5 ml 10 % MSC-kasvatusliuosta. Solut sentrifugoitiiin(400rpm, 8min.) ja muodostunut solupelletti suspentoiittiin 3 ml:aan MSC-kasvatusliuosta. Solususpensio siirrettiin T75-pulloihin, joihin lisättiin vielä 10 ml MSC-kasvatusliuosta. Viiljelmän 1 soluja kasvatettiin MSC-mediumissa 10 vuorokautta, jonka jälkeen ne siirrettiin kahdelle 24-kuoppalevyille ja aloitettiin solujen erilaistaminen osteoblasteiksi lisäämällä soluille OBL-mediumia (osteogeeninen kasvatusliuos). Viiljelmän 2 solut kasvoivat vähän huonommin, joten niiden annettiin kasvaa MSC-mediumissa pidempään, 17 vuorokautta, jonka jälkeen ne siirrettiin 24-kuoppalevyille OBL-mediumiin erilaistumaan.

4.4 KOKEET

Kaikki kokeet tehtiin neljällä rinnakkaisella luotettavuuden lisäämiseksi. Kasvatusliuoksista kerättiin näytteitä tietyn väliajoin. Näytteet säilytettiin -80°C:ssa mittauksiin asti.

Rotista eristetyistä soluista tehtiin kuusi erilaista koetta. Tarkemmat tiedot näistä löytyvät taulukosta 1. Testasimme eri pitoisuuksilla glukoosin, insuliinin ja leptiinin vaikutuksia solujen erilaistumiseen osteoblasteiksi sekä niiden erittämän osteokalsiinin pitoisuuteen. Kokeissa käytetyt glukoosipitoisuudet olivat 5mM, 30mM, 55mM, insuliinipitoisuudet 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM ja leptiinipitoisuudet 1ng/ml, 5ng/ml,

10ng/ml, 50ng/ml ja 100ng/ml. Pitoisuudet oli valittu kirjallisuuden perusteella. Kokeissa 3 ja 5 käsittelyt aloitettiin mesenkymaalisille kantasoluille samaan aikaan, kun niiden erilaistaminen osteoblasteiksi aloitettiin. Kokeissa 1, 2, 4 ja 6 käsittelyt aloitettiin kypsille osteoblasteille erilaistumisen päivänä 8.

Taulukko 2. Rottasolukokeiden yhteenveto

Rotan MSC	Rottien tiedot	Käsittelyt aloitettu	Kasvu aika (d)
Koe.1 Glukoosin vaikutus	3 naarasta, 17 vrk ikäisiä	Päivä 8	17
Koe.2 Insuliinin vaikutus	3 naarasta, 17 vrk ikäisiä	Päivä 8	17
Koe.3 Glukoosin ja glukoosin+insuliinin vaikutus	3 naarasta, 22 vrk ikäisiä	Päivä 1	16
Koe.4 Insuliinin vaikutus	3 naarasta, 22 vrk ikäisiä	Päivä 8	16
Koe.5 Leptiinin vaikutus	3 naarasta, 24 vrk ikäisiä	Päivä 0	15
Koe.6 Leptiinin vaikutus	3 naarasta, 24 vrk ikäisiä	Päivä 8	15

Humaanisoluista tehtiin kolme erilaista koetta (taulukko3). Viljelmän 1 soluille aloitettiin käsittelyt kahden viikon erilaistumisen jälkeen. Ensimmäisessä kokeessa soluille lisättiin leptiiniä eri pitoisuuksilla(1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 50 ng/ml ja 100ng/ml) ja toisessa insuliinia eri pitoisuuksilla(1nM, 10nM, 100nM ja 1000nM) sekä yksi käsittely korkealla glukoosilla (55nM). Viljelmistä kerättiin mediumnäytteitä päivinä 17, 21, 24 ja 26.

Viljelmän 2 soluille käsittelyt tehtiin eri glukoosipitoisuuksilla (5mM, 30mM ja 55mM) sekä samanaikaisella glukoosi- ja insuliinikäsittelyllä, jossa glukoosikäsittelyyn lisättiin 10nM:n insuliini. Käsittelyt aloitettiin jo viikon erilaistumisen jälkeen, sillä halusimme nähdä vaikuttaako glukoosi osteoblastien erilaistumiseen.

Taulukko 3. Ihmissolukokeiden yhteenveto

Ihmisen MSC	Solujen tiedot	Käsittelyt aloitettu	Kasvuaika (d)
Koe.1 Leptiinin vaikutus	Oulu hMSC potilas # 82	Päivä 14	26
Koe.2 Insuliinin vaikutus	Oulu hMSC potilas # 82	Päivä 14	26
Koe.3 Glukoosin ja glukoosin+insuliinin vaikutus	Turun hMSC potilas # 005	Päivä 7	20

4.5 VILJELMIEN LOPETUS, FIKSOINTI JA VÄRJÄYS

Viljelmien lopetuksessa aluksi medium imettiin pois ja solut fiksattiin 3 %:lla paraformaldehydillä (PFA:lla). PFA-liuosta lisättiin 400 µl/kaivo ja inkuboitiiin 20 minuuttia huoneenlämmössä. Solut pestiin kolmesti PBS:llä. Steriili PBS lisättiin soluille ja niitä säilytettiin jääkaapissa värjäykseen asti.

Taulukoista 4 ja 5 nähdään, mitä värjäyksiä ja menetelmiä on käytetty kunkin kokeen kohdalla.

Taulukko 4. Rottasoluviljelmien värjäykset ja menetelmät

Rottasoluviljelmät	ALP-värjäys	Von Kossa värjäys	ALP lyaatit	Osteokalsiini-pitoisuuden määrittäminen
Koe.1 Glukoosin vaikutus	X	X		X
Koe.2 Insuliinin vaikutus	X	X		X
Koe.3 Glukoosin ja glukoosin+insuliinin vaikutus		X	X	X
Koe.4 Insuliinin vaikutus		X	X	X
Koe.5 Leptiinin vaikutus		X	X	X
Koe.6 Leptiinin vaikutus		X	X	X

Taulukko 5. Humaanisoluviljelmien värjäykset ja menetelmät

Humaanisolu- viljelmät	ALP- värjäys	Von Kossa värjäys	ALP lysaatit	Osteokalsiini- pitoisuuden määrittäminen
Koe.1 Leptiinin vaikutus	X		X	X
Koe.2 Insuliinin vaikutus	X		X	X
Koe.3 Glukoosin ja glukoosin+insuliinin vaikutus	X		X	X

4.5.1 Von Kossa -värjäys

Von Kossa -värjäyksen avulla saadaan tietoa osteoblastien tuottaman luunaineksen mineralisoitumisesta. Menetelmässä luunoduleiden kalsium korvataan hopealla, joka nähdään voimakkaana ruskeanmustana värjäytymisenä. Natriumtiosulfaatin avulla värjäytynyt matriksi kiinnitetään kuopan pohjalle.

Aluksi fiksoidut solut pestiin kahdesti tislattulla vedellä PBS:n poistamiseksi. Solujen päälle lisättiin 400 µl/kaivo 2%:sta AgNO₃ -liuosta ja inkuboitiin 60 minuuttia 60 W:n lampun alla. Inkuboinnin jälkeen solut pestiin kolmesti tislattulla vedellä ja lisättiin 400 µl/kaivo Na₂S₂O₃ -liuosta. Inkuboitiin jälleen 5 minuuttia huoneenlämmössä ja lopuksi pestiin solut kahdesti tislattulla vedellä sekä ilmakeivattiin.

4.5.2 ALP(alkalinen fosfataasi) -värjäys

ALP-värjäys perustuu luussa esiintyvään alkalisen fosfataasi-entsyymien todentamiseen. Alkalinen fosfataasi on entsyymi, joka katalysoi fosfaattiryhmien poistoa molekyyleistä. Ihmisellä alkalista fosfataasia esiintyy etenkin luussa, maksassa, sappiteissä, munuaisissa ja istukassa. Luukudoksessa osteoblastit tuottavat alkalista fosfataasia ja sen avulla ne irrottavat fosfaattia molekyyleistä. Fosfaattia tarvitaan luukudoksen kalsifikaatioon (Millán 2006). Menetelmässä alkalinen fosfataasi katalysoi reaktiota, jossa väritön substraatti muuttuu värilliseksi tuotteeksi, tuote saostuu entsyymien kohdalle. Värjäykseen käytettiin Sigman Alkaline Phosphatase Leukocyte Kit 86-R:ää.

Värjäys suoritettiin valmistajan ohjeen mukaisesti. Aluksi sekoitettiin 100µl FRV-alkaline-liuosta ja 100µl Na-nitrate-liuosta. Vorteksoitiin 30 sekuntia ja inkuboitiin huoneenlämmössä 2 minuuttia. Lisättiin seos 4,5 ml:aan lämmintä (+37°C) tislattua vettä. Lisättiin seokseen vielä 100µl Naphtol AS-BI Alkaline liuosta ja sekoitettiin huolellisesti. Imettiin soluilta PBS pois ja lisättiin valmistettu seos soluille 200µl/24-kaivo tai 600µl/6-kaivo. Inkuboitiin 15 minuuttia huoneenlämmössä pimeässä ja pestiin lopuksi kahdesti tislattulla vedellä sekä ilmakeivattiin.

4.6 IMMUNOMÄÄRITYKSET

4.6.1 Aikaerotteinen fluoresenssi (TRF, time-resolved fluorometry)

Fluoresenssi on ilmiö, jossa atomit ja molekyylit imevät itseensä fotonin eli valokvantin ja hetken päästä emittoivat pidemmällä aallonpituudella matalaenergisemmän fotonin. Molekyylit menettävät osan absorboituneesta energiastaan sisäisiin värähtelyihin ja törmäyksiin, mistä johtuen ne eivät emittoi yhtä korkeaenergisiä aallonpituuksilla. Energiaeroa absorboituneen ja emittoituneen fotonin välillä kutsutaan Stokesin siirtymäksi.

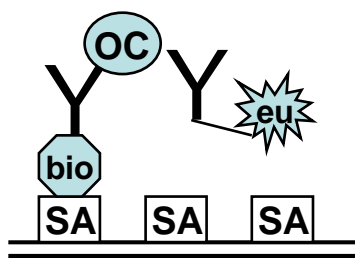
Aikaerotteisella fluoresenssilla pyritään pääsemään eroon taustafluoresenssista, jota monet biologiset yhdisteet ja proteiinit aiheuttavat. Aikaerotteisessa fluoresenssissa käytetään fluoroforeja (fluoresoivat leimat), joilla on pitkäikäinen emissio. Näin mittaus voidaan suorittaa taustafluoresenssin sammumisen jälkeen.

Aikaerotteiseen fluorometriaan perustuvissa mittausmenetelmissä vasta-aineet leimataan lantanidikelaateilla. Lantanidikelaatti on lantanidimetallin ja kelaatin muodostama orgaaninen kompleksi. Käytetyimpiä lantanideja ovat mm. europium(Eu), terbium(Tb), samarium(Sm) ja dysprosium(Dy). Lantanidikelaattien suuri Stokesin siirtymä ja niiden kapea emissioipiikki lisäävät herkkyyttä erottamalla selvästi niiden signaalin taustasta. Tässä työssä käytettiin europiumilla leimattuja vasta-aineita. Europiumin fluoresenssin elinikä on noin yksi millisekunti, kun taas tavallisilla fluoresenssiyhdisteillä se on muutama nanosekunti. Sillä voidaan odottaa taustafluoresenssin sammumista ennen varsinaisen mittauksen tekemistä (Dickson E.F ym. 1995).

4.6.2 Aikaerotteisen fluoresenssin käyttö osteokalsiinipitoisuuden mittaamisessa

Osteokalsiinipitoisuus määritettiin viljelmien mediumnäytteistä. Määrittämisessä käytettiin streptavidiinillä päällystettyjä 96-kuoppalevyjä. Osteokalsiinille kehitetty vasta-aine on leimattu biotiinilla, johon streptavidiini sitoutuu tiukasti. Kun näytteet pipetoidaan 96-kuoppalevyihin, kiinnittyy osteokalsiini sitä sitovaan vasta-aineeseen ja samalla biotiini-streptavidiini-kompleksin avulla kuoppien pohjaan. Toiseen, osteokalsiinin eri epitooppiin sitoutuvaan, vasta-aineeseen kiinnitetään europiumkelaatti, jonka avulla sitoutuneen osteokalsiinin pitoisuus voidaan määrittää aikaerotteiseen fluoresenssiin perustuen (kuva 4).

Rottasoluviljelmien osteokalsiinipitoisuuden määrittämisessä käytettiin bio-8H12 ja eu-2H9 vasta-aineita. Humaanisoluviljelmien määrittämisessä bio-2H9 ja eu-6F9 vasta-aineita (Käkönen et al. 2000).



Kuva 4. Osteokalsiini-vasta-ainekompleksin kiinnittyminen streptavidiinilevyyn

4.6.3 Menetelmän suorittaminen

Mediumnäytteistä mitattiin kokonaisosteokalsiinipitoisuus, jossa on mukana sekä karboksyloidun että ei-karboksyloidun osteokalsiinin pitoisuus. Mittauksiin käytettiin streptavidiinillä päällystettyjä 96-kuoppalevyjä (Kaivogen Oy, Turku), joihin lisättiin 10 µl/kuoppa mediumnäytettä. Useimmat näytteistä mitattiin kahdella rinnakkaisella ja osa näytteistä laimennettiin mittauksissa käytettyyn puskuriin (Delfia Assay Buffer, Perkin Elmer Life Sciences/ Wallac Oy, Turku). Näytteiden päälle pipetoitiin 50 µl/kuoppa vasta-aineliuosta, joka sisälsi 200 ng biotinyloitua vasta-ainetta (bio-8H12 tai bio-2H9), 100 ng europiumilla leimattua vasta-ainetta (Eu-2H9 tai Eu-6F9) sekä 5 mM EDTA:n sekoitettuna Delfian analyysipuskuriin. Rottasolujen ja humaanisolujen näytteille käytettiin eri vasta-aineita. Levyjä inkuboitiin kaksi tuntia PlateShake-ravistelijassa huoneenlämmössä, jonka jälkeen levyt pestiin kuusi kertaa pesuliuoksella (Delfia Wash Solution, Perkin Elmer Life Sciences/Wallac Oy, Turku). Pesujen jälkeen levyille lisättiin 200 µl/kuoppa kehitysluosta (Delfia Enhancement, Perkin Elmer Life Sciences/Wallac Oy, Turku) ja inkuboitiin niitä 30 minuuttia ravistelijassa. Inkuboinnin jälkeen

osteokalsiinipitoisuus määritettiin aikaerotteisen fluoresenssin avulla, käyttäen Victor2 mittauslaitetta (Perkin Elmer Life Sciences/Wallac Oy, Turku).

4.7 ALP –AKTIIVISUUDEN MÄÄRITTÄMINEN

Alkalinen fosfataasi -entsyymiä voidaan määrittää viljelmistä myös spektrofotometrisesti. ALP-aktiivisuus voidaan suhteuttaa viljelmässä esiintyvään proteiinipitoisuuteen, jolloin voidaan arvioida, miten suuri osa viljelmän soluista on erilaistunut osteoblasteiksi.

4.7.1 Alkalisen fosfataasin määrittäminen solulyysaateista

Viljelmien solut hajotettiin lyysoiteiksi solujen sisällön vapauttamiseksi. Soluilta poistettiin medium ja niille lisättiin lyysoipuskuria (50 mM Tris-HCL, 0,1% Triton X-100 ja 0,9 % NaCl, pH 7,6) 200 µl/24-kuoppa. Solut pakastettiin -70 °C:een. Solut sulatettiin ja pakastettiin kolme kertaa solukalvojen rikkomiseksi sekä homogenisoitiin solulyysaattipipetillä.

Alkalisen fosfataasin aktiivisuus määritettiin spektrofotometrisesti. Aluksi valmistettiin analyysipuskurin (0,1 M Tris ja 1mM MgCl₂, pH 10) ja substraatin (0,1 M PNPP(p-nitrofenyylifosfaatti)) seos. PNPP:tä tuli 15µl/kaivo ja analyysipuskuria 85 µl/kaivo. Solulyysaattinäytettä pipetoitiin 10 µl/96-kuoppa ja sen päälle lisättiin valmistettu analyysipuskurin ja substraatin seos. Seosta pipetoitiin 100µl/kaivo. Levyjä inkuboitiin 30 minuuttia pimeässä ja huoneenlämmössä. Entsyymaattinen reaktio pysäytettiin lisäämällä 100 µl/kaivo 1M:sta NaOH:a ja näytteen absorbanssit mitattiin Victor –mittalaitteella (Perkin Elmer Life Sciences/Wallac Oy, Turku) 405 nm:ssä.

4.7.2 Bradfordin proteiinimääritys

Bradfordin proteiinimäärityksellä voidaan määrittää näytteen kokonaisproteiinipitoisuus, jonka avulla voidaan arvioida viljelmien solumäärää. Standardiproteiinina käytettiin naudan seerumista eristettyä albumiinia eli BSA:ta. Standardien proteiinipitoisuudet olivat 2,0 mg/ml, 1,0mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ja 0,0625 mg/ml. Näytteitä ja standardeja pipetoitiin 10 µl/96-kuoppa. Kaivoihin lisättiin 200 µl Bradfordin reagenssia (Bio-rad Oy) ja inkuboitiin levyjä 5 minuuttia huoneenlämmössä. Mitattiin absorbanssi Victor –mittalaitteella (Perkin Elmer Life Sciences/Wallac Oy, Turku) 595 nm:ssä. BSA-liuosten tuloksista tehtiin standardisuora, johon määritettävän näytteen tuloksia verrattiin ja määritettiin sen proteiinipitoisuus.

Näytteistä määritettiin sekä ALP-aktiivisuus että proteiinipitoisuus, jonka jälkeen ALP-aktiivisuus voitiin ilmoittaa proteiinimäärää (mg) kohden.

5. TULOKSET

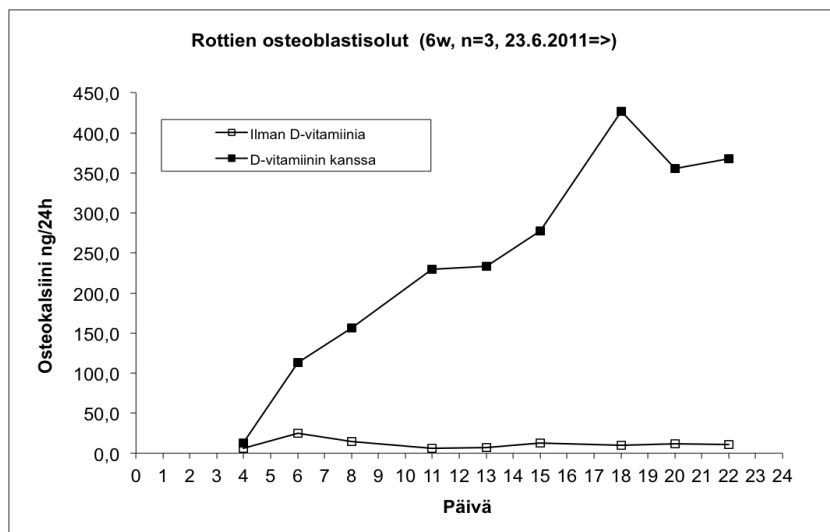
Tulososiossa keskitytään rotan osteoblasteilla tehtyjen kokeiden tulosten esittämiseen.

5.1 D-vitamiinin merkitys osteoblastien osteokalsiinin erityksessä

D-vitamiini on tärkeä tekijä osteoblastien osteokalsiinin erityksessä. Aluksi tehtiin koe, jossa osoitettiin D-vitamiinin osuus osteoblastien osteokalsiinin erityksessä. Kokeessa käytettiin rotan osteoblastisoluja. Koe tehtiin 6-kuoppalevyllä, ja kolmella rinnakkaisella kuopalla. Puolille kuoppalevyn soluille OBL-mediumiin lisättiin $1 \times 10^{-9} \text{M}$ D-vitamiinia ja puolet kasvatettiin ilman D-vitamiinia. Viljelmää kasvatettiin yhteensä 22 vuorokautta ja näytteitä otettiin aina kahden vuorokauden välein. Näytteistä mitattiin osteokalsiinipitoisuudet, jotka suhteutettiin keräysaikaan siten, että saatiin osteoblastien vuorokaudessa (24h) tuottama osteokalsiinipitoisuus.

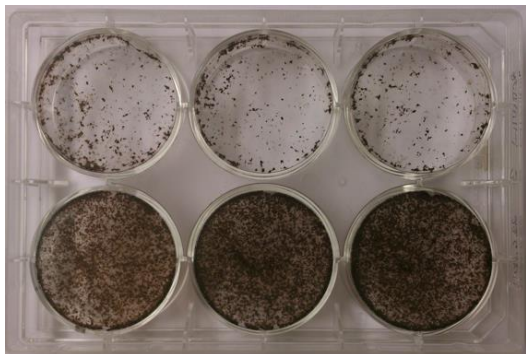
D-vitamiinia saaneet solut tuottivat huomattavasti enemmän osteokalsiinia verrattuna ilman D-vitamiinia eläviin soluihin (kuvaaja 1). Korkeimmillaan osteokalsiinin tuotto oli päivän 18 kohdalla, jonka jälkeen tuotto alkoi tasaisesti laskea. Ero ilman D-vitamiinia olleisiin soluihin näkyy koko mittausaikavälillä. Ilman D-vitamiinia olleet solut eivät tuottaneet juuri ollenkaan osteokalsiinia.

Kuvaaja 1. D-vitamiinin vaikutus osteoblastien osteokalsiinituotantoon



Viljelmän lopetuksen jälkeen solut värjättiin Von Kossa -värjäyksellä, jonka avulla voitiin havainnollistaa osteoblastien mineraalinmuodostuskykyä. Von Kossa -värjäyksessä solut, jotka eivät saaneet D-vitamiinia, värjäytyivät huomattavasti

paremmin D-vitamiinia saaneisiin soluihin verrattuna (kuva 5). Ilman D-vitamiinia osteoblastit tuottivat siis enemmän mineraalia, mutta vähemmän osteokalsiinia. D-vitamiinin kanssa taas osteokalsiinin tuotanto oli tehokkaampaa, mutta solujen mineraalituotanto jäi heikoksi.

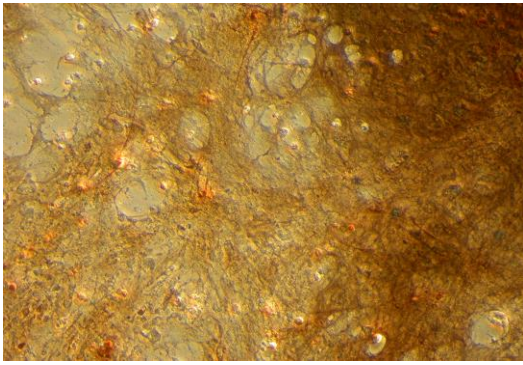


Kuva 5. Von Kossa värjäys. Ylempissä kuopissa D-vitamiinia saaneet solut ja alemmissä kuopissa ilman D-vitamiinia olleet solut.

Tulosten perusteella voidaan todeta, että D-vitamiinin lisääminen osteoblastiviljelmiin, joista halutaan mitata osteokalsiinipitoisuutta, on aiheellista. Käytimme kaikissa kokeissa $1 \times 10^{-9} \text{M}$ D-vitamiinia.

5.2 Glukoosin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja proliferaatioon sekä osteokalsiinin eritykseen (koe 1 ja koe 3)

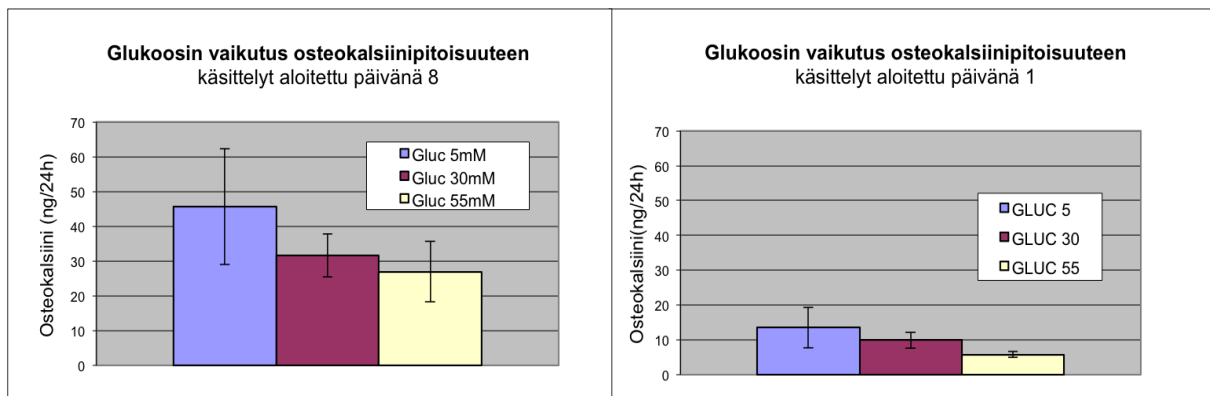
Ensimmäisessä kokeessa testattiin eri glukoosipitoisuuksien vaikutusta osteoblastien osteokalsiinin eritykseen. Koe suoritettiin neljällä rinnakkaisella. Glukoosi lisättiin OBL-mediumiin ja glukoosipitoisuudet olivat 5,5mM, 30mM ja 55mM. Käsittelyt aloitettiin kypsille osteoblastisoluille, jotka olivat erilaistuneet OBL-mediumissa 8 vuorokautta. Mediumnäytteet kerättiin kolmen vuorokauden välein päivinä 11, 14 ja 17. Kontrollina käytettiin sekä ainoastaan MSC-mediumissa että OBL-mediumissa kasvaneita soluja. Viljelmien lopetuksen jälkeen kuoppalevyistä puolet värjättiin ALP-värjäyksellä ja puolet Von Kossa-värjäyksellä. Värjäysten perusteella solut olivat erilaistuneet osteoblasteiksi ja olivat muodostaneet mineraalia. Alhaalla kuva Von Kossa -menetelmällä värjätystä rottasoluista (kuva 6).



Kuva 6. Osteoblastit värjättyinä Von Kossa –menetelmällä. Luunoduleiden kalsium on korvattu hopealla, joka näkyy ruskeana värjäytymisenä kuoppalevyllä.

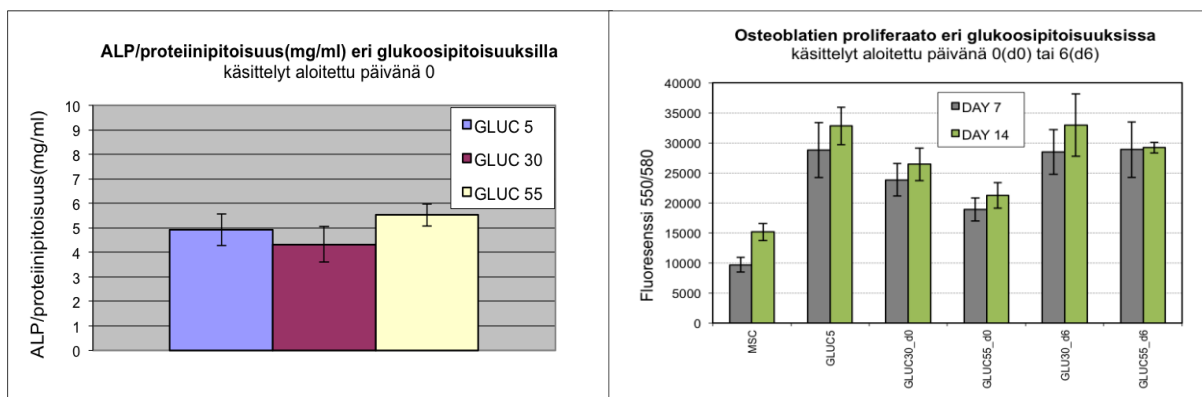
Näytteistä mitattiin osteokalsiinipitoisuus aikaerotteisen fluoresenssin avulla. Mittaukset tehtiin kahdella rinnakkaisella mittauksella ja tulokset suhteutettiin keräysaikaan niin, että saatiin määritettyä osteoblastien vuorokaudessa tuottama osteokalsiinipitoisuus. Tuloksien välinen variaatio oli suurta, mutta erilaistumisen päivästä 17 tehdyt mittaukset viittaisivat siihen, että suuremmassa glukoosipitoisuudessa kasvaneet osteoblastit tuottaisivat vähemmän osteokalsiinia (kuva 7).

Muuten koeasetelma toistettiin samanlaisena kokeessa 3, mutta glukoosi lisättiin jo heti erilaistumisen 1. päivänä. Tarkoituksena oli siis katsoa, miten solut erilaistuvat korkeammassa glukoosipitoisuudessa ja miten niiden osteokalsiinin tuotanto muuttuu. Näytteet keräsimme päivänä 12 ja 16. Osteokalsiinipitoisuudet määritettiin aikaerotteisen fluoresenssin avulla. Suuri glukoosipitoisuus näytti jälleen kerran vaikuttavan määritysten osteokalsiinipitoisuuteen, pienentäen niitä (kuva 7), kuten kokeessa 1. Osteokalsiinipitoisuudet olivat kokonaisuudessaan paljon pienempiä kuin kokeessa 1.



Kuva 7. Eri glukoosipitoisuuksien vaikutuksia osteoblastien osteokalsiinieritykseen, kun glukoosi on lisätty erilaistumisen päivänä 8 tai 1.

Viljelmän lopetuksen jälkeen soluista tehtiin Von kossa -värjäys sekä kokeessa 3 tehdyistä soluista määritettiin alkalinen fosfataasi- ja kokonaisproteiinipitoisuus. Von Kossa -värjäys osoittautui positiiviseksi, mutta kun suhteutimme alkalisen fosfataasin pitoisuudet kokonaisproteiinipitoisuuteen, emme huomanneet eroja eri glukoosipitoisuuksien välillä (kuva 8). Tämä viittaisi siihen, ettei glukoosipitoisuus olisi vaikuttanut osteoblastien erilaistumiseen.



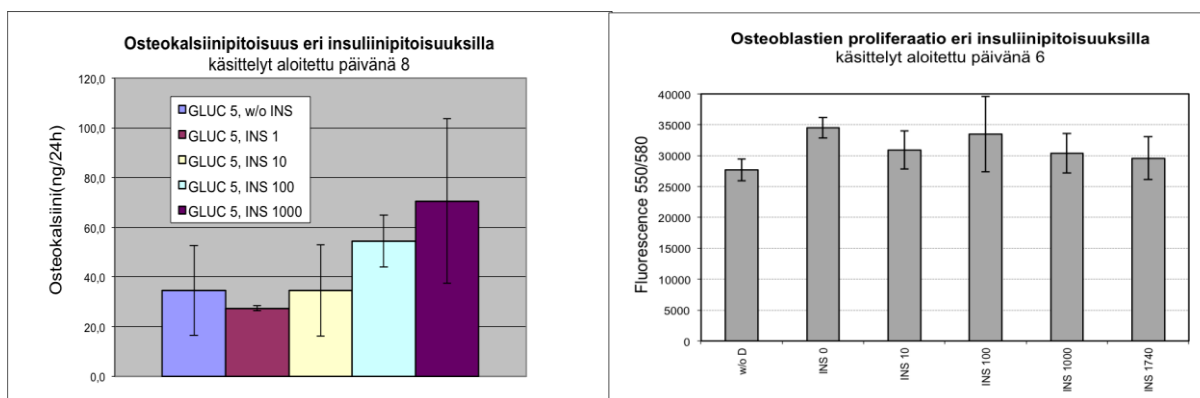
Kuva 8. Glukoosipitoisuuden vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja osteoblastien proliferaatio eri glukoosipitoisuuksissa.

Myöhemmin tehdyissä solujen proliferaatiokokeissa määritettiin elävien osteoblastien määrää viljelmissä. Korkea glukoosipitoisuus näytti vähentävän osteoblastien proliferaatiota (kuva 8).

5.3 Insuliinin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja proliferaatioon sekä osteokalsiinin eritykseen (koe 2 ja koe 4)

Kokeessa 2 testattiin eri insuliinipitoisuuksien vaikutusta osteoblastien osteokalsiinieritykseen. Käsittelet aloitettiin erilaistumisen päivänä 8, kypsille osteoblasteille. Insuliinipitoisuudet olivat 1nM, 10nM, 100nM ja 1000nM. Koe suoritettiin neljällä rinnakkaisella ja mediumnäytteet kerättiin kolmen vuorokauden välein, päivinä 11, 14 ja 17. Viljelmien lopetuksen jälkeen kuoppalevyistä puolet värjättiin ALP-värjäyksellä ja puolet Von Kossa-värjäyksellä. Molemmat värjäykset osoittivat, että solut olivat erilaistuneet osteoblasteiksi (tuloksia ei esitetä).

Mediumnäytteistä mitattiin osteokalsiinipitoisuus aikaerotteisen fluoresenssin avulla ja tulokset suhteutettiin keräysaikaan. Tuloksissa oli suurta vaihtelua rinnakkaisten välillä, mutta osteoblastien osteokalsiinipitoisuus näytti suurenevan insuliinipitoisuuden suurentuessa. Myöhemmin tehdyissä osteoblastien proliferaatiokokeissa insuliini ei näyttänyt vaikuttavan osteoblastien proliferaatioon (kuva 9). Sama koasettelu toistettiin kokeessa 4 eri rottasoluilla, mutta osteoblastien osteokalsiinieritys oli niin huonoa, ettei tuloksia voitu käyttää.



Kuva 9. Eri insuliinipitoisuuksien vaikutus osteoblastien proliferaatioon sekä osteoblastien osteokalsiinieritykseen.

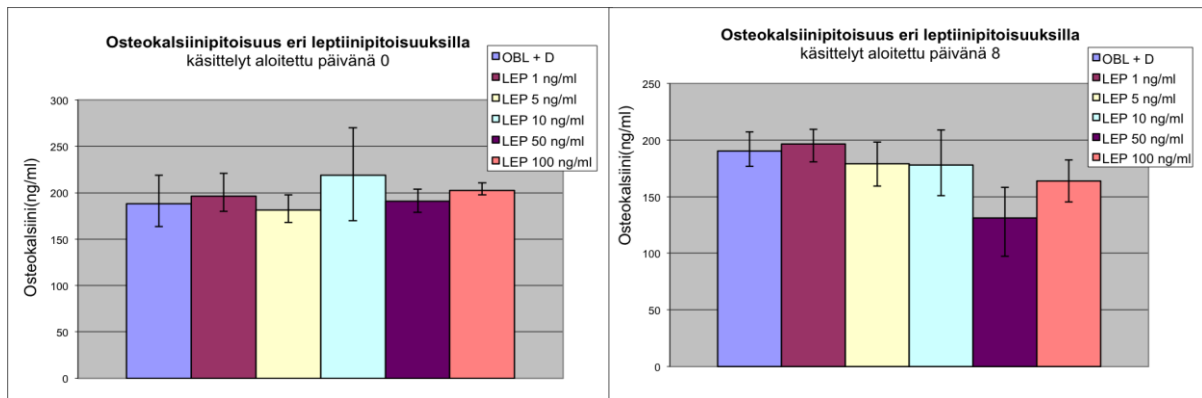
5.4 Leptiinin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja proliferaatioon sekä osteokalsiinin eritykseen (koe 5 ja koe 6)

Kokeissa 5 ja 6 testattiin leptiinin vaikutuksia osteoblastien erilaistumiseen ja niiden osteokalsiinin eritykseen. Leptiinipitoisuudet olivat 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml ja 100 ng/ml ja se oli liuotettu PBS:ään. Kokeessa 5 leptiini lisättiin heti erilaistumisen päivänä 0, jolloin pystyttiin arvioimaan leptiinin vaikutusta osteoblastien erilaistumiseen. Kokeessa 6 leptiini lisättiin kypsille osteoblasteille erilaistumisen päivänä 7. Mediumnäytteet kerättiin kahden vuorokauden välein, päivinä 11, 13 ja 15.

Molemmista viljelmälevyistä tehtiin Von kossa -värjäykset sekä alkalisen fosfataasin ja osteokalsiinin pitoisuusmääritykset. Von Kossa -värjäys osoitti solujen erilaistuneen osteoblasteiksi.

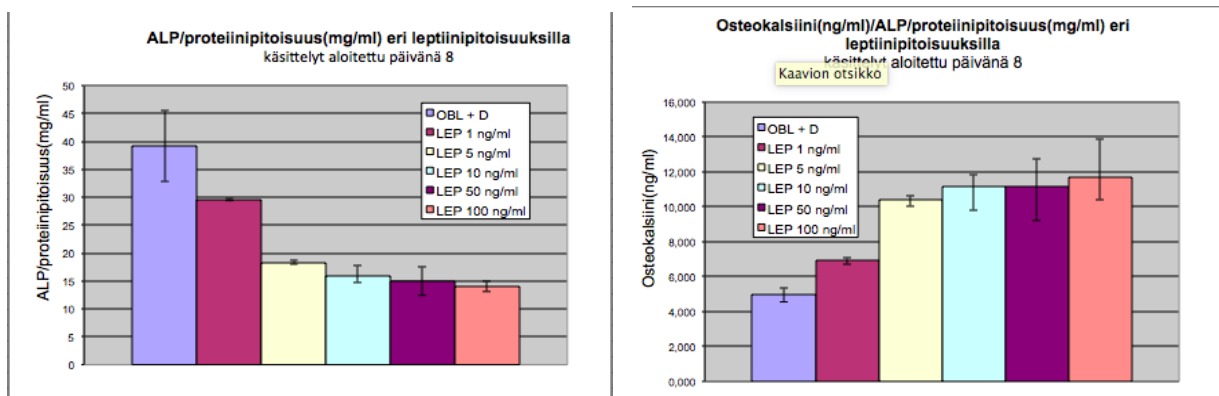
Mediumnäytteistä tehtiin osteokalsiinipitoisuusmääritykset aikaerotteisen fluoresenssin avulla. Osteokalsiinipitoisuudet olivat todella suuria, mutta eroavaisuuksia

eri leptiinipitoisuuksien välillä ei ollut kummassakaan kokeessa (kuva 10). Leptiini ei vaikuttanut osteoblastien erilaistumiseen, kun se lisättiin erilaistumisen päivänä 0.



Kuva 10. Eri leptiinipitoisuuksien vaikutus osteoblastien osteokalsiineritykseen, käsittelety aloitettu sekä mesenkymaalisille kantasoluille, että kypsille osteoblasteille

Kokeessa 6 kuitenkin nähtiin, että kun leptiini lisättiin erilaistumisen päivänä 8, ALP-aktiivisuus suhteutettuna kokonaisproteiinipitoisuuteen pieneni, mitä enemmän leptiiniä soluille annettiin (kuva 11). Kun tämä tulos suhteutettiin vielä kyseisten solujen osteokalsiineritykseen huomattiin, että vaikka osteoblastien määrä oli pienempi, ne tuottivat suhteessa enemmän osteokalsiinia (kuva 11). Kun leptiini lisättiin erilaistumisen päivänä 0 samankaltaista vaikutusta ei nähty.



Kuva 11. Osteoblastien erilaistuminen eri leptiinipitoisuuksissa sekä osteokalsiinin tuotannon suhteuttaminen osteoblastien määrään

6. POHDINTA JA PÄÄTELMÄT

Tämän tutkimuksen perusteella soluviljelmien mediumin korkeampi glukoosipitoisuus vaikuttaisi osteoblastien osteokalsiinieritykseen vähentämällä sitä. Samalla toisaalta todettiin, että korkeammassa glukoosipitoisuudessa eläneiden osteoblastien proliferaatio väheni, joten korkealla glukoosipitoisuudella käsiteltyjen soluviljelmien pienemmät osteokalsiinipitoisuudet voisivat selittyä ainakin osittain osteoblastien proliferaation vähenemisellä. Tämä tulee selvimmin esiin, kun käsittelyt aloitetaan ennen erilaistumista, suoraan mesenkymaalaisille kantasoluille, mutta myös silloin, kun käsittelyt aloitetaan jo erilaistuneille soluille. Mahdollisesti korkea glukoosipitoisuus häiritsee solujen elinolosuhteista niin, että solujen proliferaatio häiriintyy (Shanbhogue et al 2015).

Aikaisemmissa tutkimuksissa (Lee ym. 2007) *in vivo* todettiin, että kun osteokalsiiniproteiini poistetaan hiiriltä kokonaan, haiman insuliinin erityis huononee ja hiiret ovat hyperglykeemisiä. Kun osteokalsiinia lisätään subkutaanisesti, insuliinineritys lisääntyy. Jos osteokalsiini toimii insuliinin erityksen lisääjänä, voitaisiin olettaa että korkeammassa glukoosipitoisuudessa osteoblastit tuottaisivat enemmän osteokalsiinia, jonka seurauksena insuliinin erityis lisääntyisi ja tätä kautta myös glukoosipitoisuus pienenesi. Myös tyyppin 1 diabeetikoilla, joilla veressä todetaan korkeammat glukoosipitoisuudet, todetaan veressä matalammat osteokalsiinipitoisuudet (Pittas ym. 2009, Lee ym. 2010).

Tyyppin 2 diabetesta sairastavilla todetaan sairauden alkuvaiheessa suurempi luumassa ja vähentynyt murtumariski. Kuitenkin pitkäaikaisseurannassa tyyppin 2 diabeetikoilla todetaan suurentunut murtumariski verrokkeihin verrattuna. Kohonnut murtumariski saattaisi osittain selittyä pitkäaikaisella korkealla veren glukoosipitoisuudella, joka voi heikentää osteoblastien proliferaatiota ja sitä kautta luun mineralisaatiota ja luun kestävyyttä.

Tutkimuksemme toisissa käsittelyissä katsottiin eri leptiinipitoisuuksien vaikutuksia osteokalsiinipitoisuuteen. Suurimmilla pitoisuuksilla leptiinin todettiin joko vähentävän osteoblastien proliferaatiota tai aiheuttavan apoptoosia. Samalla kuitenkin suhteellinen osteokalsiinin erityis suureni eli pienempi määrä osteoblasteja tuotti suuremman

määrän osteokalsiinia. Tämä todettiin vain kypsillä osteoblasteilla. Aikaisemmissa tutkimuksissa, *in vivo*, leptiinipuutteisilla hiirillä on todettu olevan matalammat osteokalsiinipitoisuudet kuin verrokeilla. Lisäksi, kun leptiiniä annetaan hiirille subkutaanisesti, osteokalsiinipitoisuus nousee (Kalra ym. 2009 ja Williams ym. 2010). *In vitro* tutkimuksemme tulokset siis tukisivat aikaisempia *in vivo* tutkimuksia.

Tutkimuksessamme selvitettiin solujen vastetta erilaisille käsittelyille vain muutamilla menetelmillä, jonka vuoksi tutkimusasetelma jättää paljon avoimeksi. Soluviljelmät ovat hyvä menetelmiä tutkittaessa erilaisia mekanismeja fysiologisten prosessien takana, mutta soluviljelmien heikkoutena on eri elinjärjestelmien keskinäisten vaikutusten poisjääminen. *In vitro* tutkimuksilla pystytään tutkimaan tietyn mekanismin suoraa vaikutusta, mutta esimerkiksi leptiinin tapauksessa, keskushermoston kautta välittyvä vaikutusmekanismi jää kokonaan pois. Lisäksi tutkimuksissamme käytettiin lehmästä eristettyä seerumia, joka sisältää erilaisia proteiineja, kuten insuliinia ja leptiiniä. Näiden vaikutuksia kokeiden tuloksiin ei voida poissulkea.

Tutkimuksessamme teimme soluviljelmät ja käsittelyt myös humaanisoluille, mutta kasvattaminen oli selvästi rottasoluja haastavampaa. Ongelmaksi muodostui humaanisolujen liian pienet proteiinipitoisuudet, joita käytettävissä olevilla menetelmillämme on vaikea mitata. Tulosten analysointi on vielä kesken ja tämän takia tuloksia ei ole esitetty tässä tutkielmassa.

Elimistön energia-aineenvaihdunta on monimutkainen kokonaisuus, jota ymmärrämme vuosi vuodelta enemmän. Luukudoksen ja etenkin osteoblasteista erittyvän osteokalsiinin merkitys energia-aineenvaihdunnan säätelijänä tuo uuden mielenkiintoisen ulottuvuuden elimistön toiminnan selvittämiseen. Erilaisten metabolisten sairauksien, kuten diabeteksen, lisääntyessä sekä *in vitro* että *in vivo* tutkimuksia tarvitaan lisää, jotta ymmärtäisimme paremmin tätä monimutkaista kokonaisuutta.

8. LÄHTEET

Bredella MA, Fazeli PK, Miller KK, Misra M, Torriani M, Thomas BJ, Ghomi RH, Rosen CJ, Klibanski A. Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009 94(6): 2129-36.

Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL, Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001 142(8): 3546-53.

Compston JE, Watts NB, Chapurlat R, Cooper C, Boonen S, Greenspan S, Pfeilschifter J, Silverman S, Diez-Perez A, Lindsay R, Saag KG, Netelenbos JC, Gehlbach S, Hooven FH, Flahive J, Adachi JD, Rossini M, Lacroix AZ, Roux C, Sambrook PN, Siris ES. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *AM J Med*, 2011 124(11):1043-50.

Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, Grey AB, Broom N, Myers DE, Nicholson GC, Reid IR. Leptin directly regulates bone cell function *in vitro* and reduces bone fragility *in vivo*. *Journal of Endocrinology*, 2002, 175: 405-415.

Dickson E.F, Pollak A, Diamandis E.P. Ultrasensitive bioanalytical assays using time-resolved fluorescence detection. *Pharmac.Ther* 1995. Vol. 66, pp.207-235.

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling A.F, Beil F.T, Shen J, Vinson C, Rueger J.M, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 2000, 100: 197-207.

Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005, 434.

Ferron M, Hinoi E, Karsenty G ja Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl acad Sci*, 2008, 105(13): 5266-70.

Kirjoittaja Markku Koulu. Farmakologia ja toksikologia: Johdanto neurofarmakologiaan, neurotransmissio. toim. Koulu ja Tuomisto, Medicina, Kuopio, 2007.

Gonnelli S, Caffarelli C, Nuti R. Obesity and fracture risk. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2014 11(1): 9-14.

Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ. Leptin inhibits osteoclast generation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17:200-209.

Kalra SP, Dube MG, Iwaniec UT. Leptin increases osteoblast-specific osteocalcin release through a hypothalamic relay. *Peptides*, Elsevier, 2009, 30: 967-973.

Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, Cheng SL. Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, 2003, 13;278(24):21920-9.

Käkönen S, Hellman J, Karp M, Laaksonen P, Obrant KJ, Väänänen HK, Lövgren T, Pettersson K. Development and Evaluation of Three Immunofluorometric Assays That Measure Different Forms of Osteocalcin in Serum. *Clinical Chemistry* 2000; v. 46, p.332-337.

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, MCKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 2007, 130(3): 456-69.

Lee YJ, Lee H, Jee SH, Lee SS, Kim SR, Kim SM, Lee MW, Lee CB, Oh S. Serum osteocalcin is inversely associated with adipocyte-specific fatty acid. *American diabetes association*, 2010.

Lieben L, Callewaert F, Bouillon R. Bone and metabolism: A complex crosstalk. *Hormone research* 2009;71:134-138.

Millán J. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling*, 2006, 2: 335-341.

Motyl KJ, McCabe LR, Schwartz AV. Bone and glucose metabolism: two-way street. *Arch Biochem Biophys*, 2010 1;503(1): 2-10.

Motyl KJ, Rosen CJ. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie*, 2012 94: 2089-2096.

Männistö S, Laatikainen T, Vartiainen E, Suomalaisten lihavuus ennen ja nyt, Tutkimuksesta tiiviisti, THL, 2012.

Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(3): 827-32.

Sabek et al. 2015 Osteocalcin effect on human beta cell mass and function. *Endocrinology*

Stanbhogue VV, Mitchell DM, Rosen CJ, Bouxsein ML. Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015 2213-8587(15)00283-1.

Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory Peptides*, 2000 92(1-3):73-78.

Strotmeyer ES, Cauley JA. Diabetes mellitus, bone mineral density, and fracture risk. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2007, 14: 429-435.

Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen lihavuustutkijat ry:n asettama työryhmä, Lihavuus (aikuiset), Käypä hoito –suositus, 2013.

Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Sisätautilääkäreiden yhdistyksen ja Diabetesliiton Lääkärineuvoston asettama työryhmä, Diabetes, Käypä hoito –suositus, 2013.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker K.L, Amstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 2002, 111: 305-317.

Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999, 140;1630-1638.

Turner RT, Kalra SP, Wong CP, Philbrick KA, Lindenmaier LB, Boghossian S, Iwaniec UT. Pheripheral leptin regulates bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2013, 28(1): 22-34.

Williams GA, Callon KE, Watson M, Costa JL, Ding Y, Dickinson M, Wang Y, Naot D, Reid IR, Cornish J. Skeletal phenotype of the Leptin Receptor-deficient db/db mouse. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010, 26(8):1698-1709.

World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Technical report series 843. Geneva: WHO, 1994

Zaidi M, Buettner C, Sun L, Iqbal J. Minireview: The Link Between Fat and Bone: does mass beget mass. *Endocrinology* 2012, 153:2070–2075.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372: 425-432.

LIITE 1.

MSC-medium (solujen eristys luuytimeistä)

alphaMEM (Minimum Essential Medium (MEM) α Medium) (Gibco)

15 % naudan seerumi (fetal bovine serum, FBS) (Gibco)

100 U/ml penisilliini (Gibco)

100 μ g/ml

10 mM HEPES (Gibco)

2 mM Glutamax (Gibco)

OBL-medium (solujen erilaistaminen osteoblasteiksi)

alphaMEM (Minimum Essential Medium (MEM) α Medium) (Gibco)

10 % naudan seerumi (fetal bovine serum, FBS) (Gibco)

100 U/ml penisilliini (Gibco)

100 μ g/ml

10 mM HEPES (Gibco)

2 mM Glutamax (Gibco)

70 μ g/ml L-askorbiinihappo-2-fosfaatti (Sigma-Aldrich)

10mM Na- β -glyserofosfaatti (Fluka)