

Heikki Halkosaari

IN VIVO TSOLEDRONAATIN JA MURTUMAN VAIKUTUS ROTAN MESENKYMAALISTEN KANTA-
SOLUJEN *EX VIVO* JAKAUTUMISEEN JA ERILAISTUMISEEN OSTEOLASTEIKSI

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2015

Heikki Halkosaari

IN VIVO TSOLEDRONAATIN JA MURTUMAN VAIKUTUS ROTAN MESENKYMAALISTEN KANTA-
SOLUJEN *EX VIVO* JAKAUTUMISEEN JA ERILAISTUMISEEN OSTEOLASTEIKSI

Biolääketieteen laitos

Kevätlukukausi 2015

Vastuhenkilö: professori Juha Peltonen

Käytännön työn ohjaajat: Terhi Heino ja Ville-Valtteri Välimäki

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HALKOSAARI, HEIKKI: *In vivo* tsoledronaatin ja murtuman vaikutus rotan mesenkymaalisten kantasolujen *ex vivo* jakautumiseen ja erilaistumiseen osteoblasteiksi

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 42 s.

Solubiologia ja anatomia

Maaliskuu 2015

Bisfosfonaatit, kuten tsoledronaatti, estävät osteoklastien toimintaa, minkä takia niitä käytetään osteoporoosin hoidossa. Bisfosfonaattien on havaittu vaikuttavan myös osteoblasteihin, mutta tämän vaikutuksen merkitys on epäselvä. *In vitro* pienet pitoisuudet lisäävät mesenkymaalisten kantasolujen (MSC) erilaistumista osteoblasteiksi, kun taas suuret pitoisuudet ovat osteoblasteille haitallisia; *in vivo* on aihetta tutkittu vähemmän. Turun yliopistossa luututkimusryhmä tutki vuonna 2006 rotilla *in vivo* annetun tsoledronaattihoidon ja bioaktiivisen lasin vaikutusta luupuutoksen luutumiseen. Luuydinnäytteistä eristettiin myös MSC:ia, joita erilaistettiin osteoblasteiksi. Alustavien tulosten mukaan tsoledronaatti lisäsi erilaistumista, mutta näytteiden määrä oli liian pieni kattaviin tilastollisiin analyyseihin.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli vahvistaa tai kumota tuo alustava havainto, tutkimalla tsoledronaattihoidon vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen jakautumiseen ja erilaistumiseen luunmurtuman yhteydessä. Lisäksi selvitettiin erilaisten annostelumuotojen merkitystä. 31 rotalle tehtiin reisiluun keskidiapfyysiin suljettu murtuma, ja 19 jäi intaktiksi. Tsoledronaatti annosteltiin ihonalaisesti joko kerta-annoksena tai viikoittain seitsemän viikon ajan osteoporoosin kliinistä hoitoannosta vastaavin annoksin. Kontrollina toimi keittosuolapistos. Kahdeksan viikon kuluttua murtumasta rotat lopetettiin. Murretun reisiluun paranemista arvioitiin röntgenkuvin sekä μ CT-mittauksella. Sääriluiden ja murtamattoman puolen reisiluun luuytimeistä eristettiin MSC:ja, joita kasvatettiin soluviljelmässä ja erilaistettiin osteoblasteiksi. Erilaistumista arvioitiin mittaamalla ALP-aktiivisuus sekä värjäämällä ALP ja mineralisoituminen. Seeruminäytteistä määritettiin luunmuodostuksesta kertova PINP ja resorptiomerkkiaine CTx.

Hypoteesimme mukaisesti viikoittain annosteltu tsoledronaatti lisäsi mesenkymaalisten kantasolujen jakaantumista soluviljelmässä; myös kerta-annoksen vaikutuksessa havaittiin vastaava trendi, joskaan ei tilastollisesti merkitsevä. Tsoledronaatti ei kuitenkaan lisännyt MSC:ien erilaistumista. Luunmurtumalla ei ollut vaikutusta solujen erilaistumiseen tai jakaantumiseen. MSC:jen erilaistuminen korreloi positiivisesti PINP-tasoihin ja negatiivisesti CTx-tasoihin, mikä on havaintona uusi. Tulostemme mukaan siis *in vivo* annettu tsoledronaatti vaikuttaa murtumasta riippumatta mesenkymaalisiin kantasoluihin *ex vivo* lisäten niiden jakaantumista, mutta ei erilaistumista osteoblasteiksi.

Avainsanat: *tsoledronaatti, bisfosfonaatti, osteoblasti, mesenkymaalinen kantasolu*

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
1.1	Mesenkymaaliset kantasolut	1
1.2	Mesenkymaaliset kantasolut ja luun metabolia	3
1.3	Bisfosfonaatit	5
1.4	Bisfosfonaattien vaikutus luunmurtumaan	7
1.5	Bisfosfonaatit ja osteoblastiset solut	8
1.6	Tutkimusasetelma	10
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	11
2.1	Koe-eläimet ja koeasetelma	11
2.2	Murtuman aikaansaaminen	11
2.3	Tsoledronaatin annostelu	12
2.4	Luuydinsolujen eristys ja viljely	13
2.5	Osteoblastien erilaistuminen	14
2.6	Adiposyyttien erilaistuminen	16
2.7	Solujen jakaantumiskyvyn mittaaminen	16
2.8	Murtuman radiologinen kuvantaminen	17
2.9	Murtuman histologia	18
2.10	Seerumin biokemialliset pintamerkkiaineet	18
2.11	Tilastolliset analyysit	19
3	TULOKSET	20
3.1	Tsoledronaatin vaikutus murtuman paranemiseen	20
3.2	Tsoledronaatin vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen jakaantumiseen	22
3.3	Tsoledronaatin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja niiden luuntuottokykyyn	22
3.4	Tsoledronaatin vaikutus luumetabolian seerumimerkkiaineisiin	25
3.5	Tsoledronaatin vaikutus adiposyyttien erilaistumiseen	27
4	POHDINTA	28
	LÄHTEET	35

1 JOHDANTO

1.1 Mesenkymaaliset kantasolut

Mesenkymaaliset kantasolut (MSC, engl. *mesenchymal stromal cell* tai *mesenchymal stem cell*, myös *marrow stromal cell* tai *multipotent stromal cell*) ovat multipotentteja kantasoluja eli soluja, jotka voivat erilaistua useiksi joskaan eivät kaikiksi eri kudostyypeiksi elimistössä. Nimistö on ollut vaihteleva, ja nykyisin englanninkielisessä kirjallisuudessa suositellaan käytettävän yleisterminä nimeä *mesenchymal stromal cell* ja nimeä *mesenchymal stem cell* taa-sen, kun kyseisellä solupopulaatiolla on dokumentoitu olevan kantasoluille tyypillinen kyky erilaistua muiksi soluiksi (Keating 2012).

MSC:t löydettiin 1960-luvulla, jolloin ne kuvattiin multipotentteina ei-hematopoeettisina luuytimen soluina (Friedenstein ym. 1968). Kantasoluina ne toimivat niin alkionkehityksen ja yksilön kasvukauden aikana elinten kehittyessä ja kasvaessa kuin aikuisiälläkin kudosten uusiutumisen ja korjautumisen yhteydessä. Mesenkymaalisia kantasoluja on monessa elimistön kudoksessa: luuytimessä, josta ne ensi kerran havaittiin, luukudoksen sisällä, luukalvolla eli periostissa, sekä lisäksi myös istukassa, lihaskudoksessa ja rasvakudoksessa (Zuk ym. 2002). Ne ovat kuitenkin melko harvinaisia soluja: luuytimessä, joka on solulähteistä parhaimpia, niitä on aikuisella yksi per 34 000 tumallista solua (Wexler ym. 2003). Normaalin homeostaa-sin ja kudoksen uusiutumisen yhteydessä aktivoituvat mesenkymaaliset kantasolut ovat mitä todennäköisimmin lähikudoksissa sijaitsevia kantasoluja, mutta ne voivat myös liikkua elimis-tössä systeemiverenkierron välityksellä. Verenkierrosta luuytimen mesenkymaalisten kanta-solujen kaltaisia soluja on eristetty lonkka- ja nilkkamurtumien jälkeen, mikä viittaa siihen, että mesenkymaaliset kantasolut mobilisoituisivat trauman seurauksena (Alm ym. 2010). Mesenkymaalisia kantasoluja on kuitenkin tutkittu lähinnä *in vitro* -kokeilla, ja niiden tarkkaa *in vivo* -jakaumaa ja sijaintia kudoksissa ei vielä tunneta (da Silva Meirelles ym. 2008).

Jo 1960-luvulla mesenkymaalisten kantasolujen huomattiin voivan erilaistua kolmeksi eri tukikudokseksi: rasvakudokseksi erilaistumalla adiposyyteiksi, luuksi erilaistumalla osteoblas-teiksi ja rustoksi erilaistumalla kondrosyyteiksi. Sittemmin on käynyt ilmi, että MSC:t kykene-vät erilaistumaan myös muiksi solutyypeiksi, kuten fibrosyyteiksi, myosyyteiksi, hepatosyy-

teiksi ja jopa neuroneiksi (Dezawa 2008, Horwitz 2003), minkä takia niitä tutkitaan etenkin regeneraatiolääketieteen saralla.

Toisaalta kaikki mesenkymaaliset kantasolut eivät pysty erilaistumaan sekä osteoblasteiksi, kondrosyyteiksi että adiposyyteiksi (Pittinger ym. 1999), minkä takia jotkut uskovat niiden olevan hyvinkin heterogeeninen, erilaisin erilastumisvalmiuksin varustettu joukko soluja (Kuroda 2011). Yleisimmin käytetty menetelmä solujen eristämiseksi on adherenttiselektio, jossa luuytimeistä aspiroituja soluja kasvatetaan soluviljelmässä ja solumaljalle kiinnittymättömät solut huuhdotaan pois. Tällä menetelmällä saadut solut saattavat kuitenkin edustaa useita enemmän tai vähemmän erilaistuneita mesenkymaalisia osapopulaatioita. Lisäksi myös esimerkiksi makrofagilinjan solut ja epitelialiset solut ovat adherentteja eli alustaansa kiinnittyviä, joten adherenttiselektiolla viljelmään muodostunee myös näiden solujen osapopulaatiota. Eristetyt solut altistuvat viljelmän alussa, ennen ei-adherenttien solujen pois huuhtomista, myös luuytimeistä mukana tulleille hematopoieettisille soluille ja näiden erittämien välittäjäaineiden ja muiden molekyylien vaikutukselle. Eristämisprosessissa mesenkymaalisiin kantasoluihin vaikuttavatkin siis useat tekijät, joiden tarkkaa vaikutusta tai merkitystä ei tunneta lainkaan. Nykyään solutyypin määrittelyyn kuuluu oleellisesti niiden pinnallaan ilmentämät merkkiainemolekyylit (etupäässä CD-molekyylit (engl. *Cluster of differentiation*), joilla lymfosyytit eritellään eri toiminnallisiin luokkiin), mutta mesenkymaalisille kantasoluille ei ole löydetty täysin yhteneviä pintamarkkereita, joita voitaisiin käyttää luokittelussa: eri kudoksista, kuten luuytimeistä ja istukasta eristetyt MSC:t poikkeavat toisistaan pintamerkkiaineiltaan. (Sivasubramaniyan ym. 2012.)

Vaikka nykyinen MSC-määritelmä ei ole täysin definitiivinen ja eristetyt solut saattavat sisältää useita heterogeenisiä osapopulaatioita, tutkimustyössä mesenkymaalisten kantasolujen määritelmän kaltaisena standardina pysyy kuitenkin käytännössä edelleen niiden kyky muodostaa rustoa, luuta ja rasvaa *in vitro*. Vuonna 2006 ISCT (*International Society of Cellular Therapy*) julkaisi tarkempaa karakterisointia varten vähimmäiskriteerit mesenkymaalisten kantasolujen *in vitro* -määritelmälle:

1. Soluilla on taipumus tarttua soluviljelymaljan pohjaan.
2. Solut ilmentävät pinnallaan CD73-, CD90- ja CD105-molekyyleja, mutta eivät hematopoieettisia pintamerkkiaineita, kuten CD45, CD34, CD14 tai CD11b, CD79 α tai CD19, sekä HLA-DR.

3. Solut kykenevät erilaistumaan *in vitro* osteoblasteiksi, adiposyyteiksi ja kondroblasteiksi. (Dominici ym. 2006.)

Näiden lisäksi myös muita kriteerejä on olemassa, kuten solujen taipumus muodostaa viljemässä fibroblastisia rykelmiä eli kolonioita (CFU-f, engl. *Colony forming unit – fibroblast*). Myös muita MSC:ille ominaisia pintamerkkiaineita (kuten CD106, STRO1 sekä ICAM-1) on kuvattu kirjallisuudessa. (Shi 2012.)

1.2 Mesenkymaaliset kantasolut ja luun metabolia

Luu muodostuu kovasta luuaineksestä ja luusoluista, joita on kolme erilaista pääryhmää: osteoblastit, osteosyytit ja osteoklastit. Suurin osa luun massasta on kovaa matriksia eli soluväliainetta, joka koostuu kalsiumhydroksiapatiitista ja erilaisista proteiineista, pääosin kollageeni I -sidekudosproteiinista. Mesenkymaaliset kantasolut liittyvät oleellisesti luukudoksen toimintaan osteoblastogeenisyytensä eli kykynsä erilaistua osteoblasteiksi vuoksi. Sopivan stimuluksen saatuaan – esimerkiksi lapsen kasvukautena tai murtuman jälkeen – ne kulkeutuvat vanhan luun pinnalle ja erilaistuvat esimuodon, preosteoblastin kautta osteoblasteiksi.

Osteoblastit tuottavat uutta luuainesta erittämällä luumatriksin proteiineja, kuten kollageenia ja ns. ei-kollageenisia proteiineja, esimerkiksi osteokalsiinia, joista muodostuu osteoidi eli mineralisoitumaton luuaines. Osteoblastit myös säätelevät osteoidin mineralisoitumista tuottamalla soluvälitilaan solulimastaan kalsiumia ja fosfaattia sisältäviä vesikkeleitä, jotka toimivat kalsiumhydroksiapatiitin saostumisen laukaisijoina. Tuottaessaan luuainesta ympärilleen osa osteoblasteista jää loukkuun sen sisään, jolloin ne erilaistuvat osteosyyteiksi; loput kuolevat apoptoottisesti tai muuttuvat luuta reunustaviksi soluiksi. Osteosyytit menettävät luuproteiinien syntetointikykynsä ja kasvattavat useita solu-ulokkeita eli dendriittejä, joilla ne ovat yhteydessä toisiinsa. Osteosyyttien tunnetuin tehtävä on toimia mekanosensorina eli aistia luun rasitus ja venytys sekä välittää tämä tieto muille luusoluille. (Stevens ja Lowe 2005.) Osteosyytit erittävät myös tekijöitä, jotka edelleen stimuloivat mesenkymaalisia kantasoluja erilaistumaan osteoblasteiksi (Heino ym. 2004).

Mesenkymaalisten kantasolujen erilaistuessa osteoblasteiksi ne alkavat tuottaa lukuisia erilaisia molekyyliä, kuten alkalista fosfataasia (ALP) ja osteokalsiinia, joiden pitoisuuksia voidaan käyttää erilaistumisen kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen arviointiin (Sørensen ym.

2007). Alkalinen fosfataasi on yksi *in vitro* -analyyseissä käytetyimmistä merkkiaineista; se on mineralisaatiolle välttämätön molekyyli, joka tuottaa pyrofosfaatteja hajottamalla inorgaanista fosfaattia, josta voidaan tämän jälkeen muodostaa hydroksiapatiittia osteoblastien vesikkeleissä (Orimo 2010). Luuytimeistä eristetyt MSC:t alkavat noin viikon viljelemisen jälkeen tuottaa ALP:ta, mutta erityis kasvaa ajan myötä lisääntyen moninkertaiseksi mesenkymaalisten kantasolujen erilaistuessa osteoblasteiksi ja alkaessa muodostaa mineraalia (Hoemann ym. 2009).

Osteoklastit, jotka huolehtivat luuaineksen hajottamisesta, ovat puolestaan alkuperältään aivan toista solulinjaa: ne ovat peräisin luuytimen verikudosta muodostavista eli hematopoeettisista kantasoluista, jotka kuuluvat monosyytti-makrofagi-linjaan. Hematopoeettisista kantasoluista muodostuu mononukleaarisia eli yksitumaisia preosteoklasteja, jotka fuusioituvat yhteen muodostaen jättimäisiä, jopa 50 tumaa sisältäviä osteoklasteja. Mesenkymaalista kantasoluista erilaistuneet preosteoblastit ja osteoblastit säätelevät tätä fuusiota ja osteoklastien aktivoitumista. Aktivoiduttuaan osteoklastit hajottavat tehokkaasti luuainesta proteolyyttisten entsyymien sekä suolahapon avulla.

Mesenkymaaliset kantasolut ovat välttämättömiä luun syklisessä uudistumisessa eli remodelaatiossa, jossa osteoklastit tuhoavat vanhaa luuainesta ja mesenkymaalista kantasoluista erilaistuvat osteoblastit muodostavat uutta erilaistuen edelleen osteosyyteiksi. Remodelaation tarkoituksena on huolehtia luun laadusta ja kunnosta. Ajan ja rasituksen myötä luuhun syntyy mikromurtumia ja suurempia murtumia, jotka remodelaatio korjaa vahvistaen luun rakenteen osteosyyttien aistiman rasituksen suuntaa vastaavaksi. Remodelaation resorptio-luunmuodostus-syklin toimimiseksi osteoklastien ja osteoblastien täytyykin olla tiiviissä ja monimutkaisessa vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Remodelaation käynnistyessä osteoblastit aktivoivat osteoklastien esimuotoja erittämällä monia eri välittäjäaineita, joista tärkein, RANKL eli RANK-ligandi, sitoutuu preosteoklastien RANK-reseptoriin aktivoiden solut. Osteoklastit vastavuoroisesti erittävät monia parakriinisiä ja jukstakriinisiä tekijöitä, jotka aktivoivat osteoblastien erilaistumista mesenkymaalista kantasoluista ja luuaineksen tuottoa. (Matsuo ja Irie 2008.)

Luun remodelaatio on luun kunnolle välttämätöntä, mutta se voi häiriintyä useissa sairauksissa. Merkitykseltään kansanterveydellisesti suurin on osteoporoosi, jossa luun tiheyden ja

laadun huonontuminen johtaa suurentuneeseen murtumarisktiin. Syy voi olla postmenopausaalinen estrogeeni vaikutuksen väheneminen, korkea ikä (ns. seniili osteoporoosi), endokriinologinen häiriö, ravitsemushäiriö tai lääkeaine. Periaate on useimmissa muodoissa sama: osteoblastien luunmuodostuskyky ei pysty kompensoimaan kiihtynyttä osteoklastien hajoitustoimintaa. Osteoklastien toiminta kiihtyy välittäjäaineiden aktivoimana myös syövässä, klassisimmin rintasyövässä, eturauhassyövässä ja myeloomassa, joihin liittyy usein luuston lyyttisiä metastaaseja. (Del Fattore ym. 2012.)

1.3 Bisfosfonaatit

Bisfosfonaatit ovat lääkkeitä, jotka estävät melko spesifisti osteoklastien toimintaa ja joita tästä syystä käytetään luun resorption ehkäisemisessä. Bisfosfonaatit luokitellaan toimintaperiaatteensa mukaan kahteen luokkaan: varhaisiin tyyppiä sisältämättömiin bisfosfonaatteihin (etidronaatti, klodronaatti, tiludronaatti) ja uudempiin, tehokkaampiin tyyppiä sisältäviin bisfosfonaatteihin eli aminobisfosfonaatteihin (pamidronaatti, neridronaatti, olpadronaatti, alendronaatti, ibandronaatti, risedronaatti ja tsoledronaatti). Yhteisenä perusrakenteena bisfosfonaateille on pyrofosfaattia muistuttava difosfaattiryhmä, johon on liittynyt kaksi sivuketjua. Difosfaattiryhmä kykenee sitoutumaan kalsiumhydroksiapatiittikiteisiin, minkä takia bisfosfonaatit hakeutuvat erittäin nopeasti luustoon, elimistön kalsiumvarastoon, ja kiinnittyvät sen mineraaliin. Osteoklastit hajottavat luuainesta vapauttaen luusta bisfosfonaatteja ja ottaen nämä endosytoosilla sisäänsä, minkä takia ensisijassa juuri ne altistuvat bisfosfonaattien vaikutukselle. (Drake ym. 2008.) Bisfosfonaattien on kuitenkin osoitettu keräytyvän luuhun osteosyyttien viereen (Roelofs ym. 2010) sekä luun pintaan, jossa osteoblastiset solutkin ovat (Cornish ym. 2011), joten myös nämä solut altistuvat lääkeaineen vaikutuksille.

Samankaltaisesta rakenteestaan huolimatta bisfosfonaattiluokat toimivat hyvin erilaisella tavalla. Vanhojen tyyppiä sisältämättömien bisfosfonaattien toiminta perustuu pyrofosfaattia muistuttavaan bisfosfonaattiosaan: Solujen energialähteen ATP:n synteesissä AMP-molekyylisiin lisätään pyrofosfaattiryhmä, jonka tilalle voidaan liittää myös bisfosfonaatti, jolloin tuloksena syntyy ATP:ta muistuttava toimimaton molekyyli, joka kilpailee sitoutumispaikoista ATP:n kanssa. Solun ATP:hen perustuva energiametabolia häiriintyy, ja solu käynnistää apoptoosin. (Drake ym. 2008.)

Toisen ja kolmannen polven tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit puolestaan johtavat apoptoosiin toista vaikutusreittiä. Niiden toimintamekanismina on farnesyylidifosfaattisyntaasi-entsyymin (FPPS) inhibitio. FPPS on tärkeässä osassa solujen aineenvaihdunnan mevalonaatti-reitissä, jossa asetyyli-CoA:sta tehdään kolesterolisynteesissä ja prenylaatioissa (hydrofobisten ryhmien kiinnittäminen molekyyliin) tarvittavaa farnesyylipyrofosfaattia. Proteiinien prenylaatio on välttämätön useassa solun toiminnossa, kuten solun sisäisen tukirangan eli sytoskeletonin rakentumisessa, solunsisäisessä vesikkeliliikenteessä sekä proliferaatioissa, joten sen häiritseminen FPPS:n toimintaa estämällä vaikuttaa moniin osteoklastin keskeisiin toimintoihin ja tämän ajatellaan johtavan epäsuorasti solun apoptoosin käynnistymiseen. (Drake ym. 2008.) Toisena mekanismina on myös havaittu, että FPPS:n inhibitio kerryttää soluihin isopentenyylipyrofosfaattia (IPP), joka konjugoituu Apppl-nimiseksi ATP-analogiksi. Apppl:n konjugoiva entsyymi on sama joka muuttaa tyyppiä sisältämättömät bisfosfonaatit ATP-analogeiksi. Apppl inhiboi mitokondriaalista adeniinukleotiditranslokaasia (ANT), mikä johtaa mitokondrioiden kalvopotentialin häiriöön ja tätä kautta apoptoosiin. (Mönkkönen ym. 2006.) Tehokkuutensa vuoksi tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit ovat nykyään käytännössä korvanneet ensimmäisen sukupolven bisfosfonaatit. (Drake ym. 2008.)

Tyyppiä sisältävien bisfosfonaattien on lisäksi esitetty vaikuttavan osteoklasteihin myös epäsuorasti osteoblastien kautta. Niiden *in vitro* -vaikutus on ollut suurempi viljeltäessä osteoklasteja yhdessä osteoblastien kanssa (Sahni ym. 1993, Nishikawa ym. 1996). Niiden osoitettiin saavan osteoblastit erittämään jotain osteoklastien aktivaatiota estävää proteiinia (Vitté ym. 1996), jonka myöhemmin osoitettiin olevan osteoprotegeriini, joka sitoo RANKL-molekyylejä ja näin estää niiden pääsyn aktivoimaan osteoklasteja (Pan ym. 2004b, Ohe ym. 2012). Bisfosfonaattien on myös osoitettu vähentävän osteoblastisten solujen pinnalla olevien, osteoklasteja aktivoivien RANKL-molekyylien ilmentymistä (Pan ym. 2004b).

Bisfosfonaatteja voidaan käyttää lääkehoitona kaikissa sairauksissa, joihin liittyy liiallinen luun resorptio, yleisimmin osteoporoosissa sekä maligniteettien aiheuttamissa luustoleesioissa, mutta myös Pagetin taudissa ja myeloomassa hillitsemään hyperkalsemiaa (Landesberg ym. 2009). Kaikissa osteoporoosin muodoissa bisfosfonaatit kuuluvat Suomessa ensilinjan lääkehoitoon murtumien välttämiseksi (Osteoporoosi: Käypä hoito -suositus, 2014).

Tsoledronaatti (ZA, engl. *zoledronate, zoledronic acid*) on yksi uusimmista tyyppiä sisältävistä bisfosfonaateista, ja sitä käytetään osteoporoosin hoidossa, osteoporoottisten murtumien ehkäisyssä sekä maligniteettien luustoleesioiden hoidossa. Osteoporoosin hoidossa se annostellaan infuusiona kerran vuodessa. Infuusioannostelun ja tehokkuutensa takia tsoledronaatin on kirjallisuudessa katsottu olevan hyödyllisempi kuin jatkuvasti suun kautta otettavien bisfosfonaattivalmisteiden (Recknor 2011), mutta suomalaisessa hoitokäytännössä ne ovat toisen linjan lääkevaihtoehto suun kautta otettavien bisfosfonaattien jälkeen (Osteoporoosi: Käypä hoito -suositus, 2014).

1.4 Bisfosfonaattien vaikutus luunmurtumaan

Bisfosfonaatteja on käytössä lääkehoitona usealla osteoporoosipotilaalla. Näillä potilailla on suurentunut murtumariski, ja he saavat usein traumaattisia murtumia myös bisfosfonaattihoidon aikana. Tästä syystä bisfosfonaattien vaikutusta murtumaan ja sen parantumiseen on tutkittu sekä koe-eläinmalleissa että potilasaineistoissa.

Rottakokeissa on osoitettu, että kun bisfosfonaatti oli ollut käytössä ennen murtumaa, ei murtuman histologinen paraneminen eroa kontrollista 16 viikon kohdalla, kun lääke lopetettiin murtumahetkellä. Jos bisfosfonaattia kuitenkin jatkettiin, remodelaatio ja luisen kalluksen resorptio hidastuivat merkittävästi. (Li ym. 1999 ja 2000.) Tsoledronaatti ei rotilla hidastanut rustoisen kalluksen muodostumista, mutta lisäsi luisen kalluksen kokoa, mineraalin määrää ja kestävyyttä sekä hidasti sen remodelaatiota (McDonald ym. 2008). Käytettäessä erittäin korkeita, syövän hoitoa vastaavia annoksia, tsoledronaatti kuitenkin hidasti myös rustoisen kalluksen muodostumista (Yu ym. 2012).

Potilasaineistoissa kerta-annoksen tsoledronaattia ei havaittu vaikuttavan tibian osteotomian luutumiseen (Harding ym. 2011), eikä vuosittainen tsoledronaattiannos vaikuttanut lonkkamurtuman paranemiseen edes heti murtuman jälkeen annosteltuna (Colón-Emeric ym. 2011). Eräässä tutkimuksessa laskettiin tsoledronaatti-infusion tehon olevan optimaalisimmillaan 2–12 viikon välillä lonkkamurtuman hoidon jälkeen; tällöin hoidon murtumia ja mortaliteettia vähentävä vaikutus oli suurimmillaan (Eriksen ym. 2009). Tuoreessa meta-analyysissä tsoledronaatin todettiin vähentävän nikamamurtumien – joskaan ei muiden murtumien – ilmaantumista (Freemantle ym. 2013).

Bisfosfonaatit kuitenkin estävät fysiologista remodelaatiota, mikä ajan myötä johtaa luun mikrotraumojen lisääntymiseen, mutta koska niiden on todettu estävän kliinisesti merkittävien murtumien syntyä, on mikrotraumojen lisääntymisen ja remodelaationeston arveltu olevan kliinisesti merkityksetöntä (Allen ym. 2011). Toisaalta pitkäaikaisen bisfosfonaattihoidon on väitetty aiheuttavan epätyypillisiä reisiluun kaulan murtumia, mutta tämä aihe on vielä varsin kiistanalainen (Abrahamsen ja Einhorn 2012).

1.5 Bisfosfonaattien vaikutus osteoblastisiin soluihin

Bisfosfonaattien vaikutusta luuhun on tutkittu pääasiallisesti vain osteoklastien kannalta, mutta niiden on havaittu vaikuttavan myös muihin luusoluihin, etenkin osteoblasteihin ja osteosyytteihin, mutta vaikutusten merkittävyys on kiistanalainen ja tutkimuksen alla. Kaiken kaikkiaan aminobisfosfonaateilla vaikutusten on havaittu olevan suurempia kuin ensimmäisen polven bisfosfonaateilla (Koch ym. 2011, Koch ym. 2012).

Bisfosfonaateilla on havaittu annoksesta riippuen olevan erilaisia *in vitro* -vaikutuksia solujen jakaantumiseen, osteoblastogeneesiin ja luun muodostukseen. Vertailua vaikeuttaa käytettyjen bisfosfonaattien, kohdesolujen sekä analysoitujen vasteiden erilaisuus, mutta bisfosfonaatit näyttäisivät lisäävän osteoblastien erilaistumista ja jakaantumista alle 10^{-5} M annoksilla. (Bellido ja Plotkin 2011.) Tätä suuremmilla annoksilla ne ovat käynnistäneet osteoblasteissa apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa, tai vaivuttaneet ne sytostaasiin, jolloin niiden jakautumissykli keskeytyy. (Fromigué ym. 2002, Koch ym. 2011, Pan ym. Bone 2004, Walter ym. 2011.) Joissakin tutkimuksissa tsoledronaatilla ei tosin ole osoitettu minkäänlaista vaikutusta osteoblastien määrään (Greiner ym. 2009), kun taas toisissa sen on havaittu vähentävän osteoblastien erilaistumista ja luunmuodostusta sekä pienillä että suuremmilla pitoisuuksilla. (Kellinsalmi ym. 2009, Orriss ym. 2009.)

Myös *in vivo* bisfosfonaateilla on osoitettu vaikutuksia mesenkymaalisiin kantasoluihin ja osteoblasteihin sekä luun metabolian merkkiaineisiin. Vasteet vaihtelevat eri tutkimuksissa ja osin annoksesta riippuen. Alendronaatti ja etidronaatti lisäsivät pienenä annoksena mesenkymaalisten kantasolujen proliferaatiota *ex vivo* ja lisäksi ALP-positiivisten solukertymien ja osteogeenisten proteiinien määrää, minkä katsotaan kertovan osteoblastogeenisestä eri-

laistumisesta. (D'Aoust ym. 2000, Giuliani ym. 1998.). Lisäksi alendronaatin on osoitettu parantavan luun laatua (Gourion-Arsiquaud ym. 2010). Sen sijaan suurena annoksena alendronaatti vähensi proliferaatiota ja pienentää koe-eläinten seerumin ALP:n pitoisuutta (Shoji ym. 2010). Tsoledronaatin on havaittu vähentäneen osteoblastien aktiivisuudesta kertovan osteokalsiinin määrää (Pozzi ym. 2009). Kliinisessä potilasaineistossa kolmen vuoden hoito suonensisäisellä tsoledronaatilla kuitenkin lisäsi mineraalin kertymistä luuhun, mikä kertoo lisääntyneestä osteoblastien toiminnasta (Recker ym. 2008).

Sitä, millä tavalla bisfosfonaatit tarkalleen ottaen luun muodostukseen vaikuttavat, on tutkittu varsin runsaasti, ja useita mahdollisia vaikutusreittejä on havaittu. Kuten edellä on esitetty, bisfosfonaatit saavat osteoblastit erittämään osteoprotegeriinia ja vähentävät niiden RANKL-eritystä, mutta nämä vaikuttavat lähinnä välillisesti osteoklasteihin. Bisfosfonaattijohdannainen, jolla ei ollut osteoklasteja inhiboivaa vaikutusta, pystyi silti estämään osteoblastien ja osteosyyttien solukuolemaa sekä luun massan ja kestävyuden vähenemää samalla tavoin kuin alendronaatti, joten mekanismi on osteoklasteihin vaikuttavasta erillinen (Plotkin ym. 2011). Bisfosfonaatit saavat osteoblastit myös erittämään osteogeenisiä proteiineja, kuten BMP-2:a, tyypin I kollageenia sekä osteokalsiinia (Im ym. 2004). On myös esitetty, että bisfosfonaatit voisivat vaikuttaa osaksi COX-2-entsyymien kautta: *in vivo* rotille annettu risendronaatti lisäsi COX-2-entsyymien ekspressiota, kun taas COX-2-entsyymiä estävällä aineella voitiin vähentää osteoblastien erilaistumisesta kertovan ALP:n geeniekspressiota (Valenti ym. 2010). Molekyylitasolla on esitetty hypoteesi, että bisfosfonaatit varjelevat osteoblasteja apoptoosilta avaamalla konneksiini 43 -solukalvokanavan ja tätä kautta aktivoimalla apoptoosia estävän kinaasi-signaalointireitin (Plotkin ym. 2011).

Bisfosfonaattien on havaittu myös muuttavan välillisesti muiden tekijöiden vaikutusta osteoblasteihin. Neridronaatin on havaittu paitsi vaikuttavan annosriippuvaisesti osteoblastien erilaistumiseen, myös muokkaavan vitamiinien vaikutusta: suuret annokset vähensivät D3-vitamiinin osteoblasteja erilaistavaa vaikutusta, kun taas pienet pitoisuudet päinvastoin kohensivat sitä (Corrado ym. 2005). D3-vitamiini tehosti myös tsoledronaatin anabolista vaikutusta osteoblasteihin (Corrado ym. 2010). Makrofagit estävät osteoblastien toimintaa, mutta pamindronaatti vähensi tätä vaikutusta *in vitro* (Evans 2002).

1.6 Tutkimusasetelma

Vuonna 2006 luututkimusryhmä teki Turun yliopistossa biomateriaalitutkimusta rottamallilla, jossa rottien reisiluun ydinontelo laajennettiin ja täytettiin bioaktiivisella lasilla, biokeeraamisella aineella jota käytetään luupuutosten täyteaineena. Tutkimuksessa arvioitiin kliinissä käytössä olevia annoksia vastaavan tsoledronaattihoidon vaikutusta luun paranemiseen ja bioaktiivisen lasin sulautumiseen luukudokseen. Tutkimuksessa havaittiin, että 9 viikon seurannassa viikoittain annettu ihonalainen tsoledronaattihoito sai aikaan trabekulaarisen luun lisääntymisen paranemisen aikana. (Välimäki ym. 2006.)

Tutkimuksen yhteydessä rottien luuydinäytteistä eristettiin myös mesenkymaalisia kantasoluja, joita erilaistettiin edelleen viljelmissä osteoblasteiksi. Julkaisemattomien, alustavien tulosten mukaan *in vivo* -tsoledronaattihoito lisäsi merkittävästi mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista osteoblasteiksi *ex vivo*. Kantasolunäytteiden määrä oli kuitenkin liian pieni kattavien tilastollisten analyysien suorittamiseksi.

Tämä tutkimus on suoraa jatkoa Välimäen ym. tutkimukselle, ja sen tarkoituksena oli vahvistaa tai kumota tuo alustava havainto tsoledronaatin positiivisesta vaikutuksesta osteoblastien erilaistumiseen. Lähtökohtana oli hypoteesi siitä, että bisfosfonaattihoito lisäisi luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen jakautumista ja erilaistumista luuta muodostaviksi osteoblasteiksi. Koska mesenkymaaliset kantasolut ovat tärkeä toimija luun paranemisessa, tutkittiin myös tsoledronaatin vaikutusta luunmurtuman yhteydessä. Lisäksi selvitettiin, onko bisfosfonaatin annosteluvälillä mahdollisesti merkitystä vasteeseen.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Koe-eläimet ja ryhmäjako

Tutkimuksessa käytettiin malliorganismina rottia. 50 naaraspuolista Harlan Sprague-Dawley -rottaa, iältään 16–23 vk ja massaltaan 224–352 g, jaettiin ensin kahteen osajoukkoon sen mukaan, murrettiinko niiden reisiluu vai ei. Nämä kaksi osajoukkoa jaettiin edelleen kolmeen ryhmään: tsoledronaattilääkityksen joko kerta-annoksena tai viikoittaisena annoksena saavaan ja plasebokontrolliryhmään. Näin muodostui kuusi eri tutkimusryhmää:

- murtuma ja viikoittainen tsoledronaatti (n=10)
- murtuma ja kerta-annos-tsoledronaatti (n=8)
- murtuma ja viikoittainen plasebo (n=13)
- intakti ja viikoittainen tsoledronaatti (n=6)
- intakti ja kerta-annos-tsoledronaatti (n=7)
- intakti ja viikoittainen plasebo (n=6)

Eläinten suuren määrän takia tutkimus suoritettiin neljässä erässä. Tutkimussuunnitelma oli eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen hyväksymä, ja tutkimus suoritettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksessa. Rottien tilaa seurattiin päivittäin, ja ne saivat tavallista ravintoa ja elivät normaalin 24 tunnin valo-pimeärytmin mukaan.

2.2 Murtuman aikaansaaminen

Keskidiafyysinen murtuma tehtiin kirurgisesti murtumaryhmien rottien oikeaan femuriin kirurgisesti. Ennen toimepidettä rotat nukutettiin antamalla ihonalaisesti sekoite ketamiinia (Ketalar®, Parke-Davies, Barcelona, Espanja), buprenorfiinia (Temgesic®, Reckitt Benckiser Healthcare, UK) ja medetomidiniä (Domitor®, Orion Pharma, Espoo, Suomi) suhteessa 1:1:1 ja niiden oikea reisi ajeltiin karvoista sekä puhdistettiin kauttaaltaan. Myös kontrolliryhmien rotat, joiden femurit jäivät intakteiksi, nukutettiin. Anestesia-annos ei ollut vakio, vaan ensi-annoksena rotat saivat massan mukaan karkeasti arvioiden 0,1–0,25 ml seosta ja tarvittaessa enemmän anestesian saavuttamiseen saakka. Yksikään rotta ei menehtynyt anestesiaan.

Ennen femurin murtamista luun sisään ydinkanavaan laitettiin ydinnaulaksi 1,0 mm Kirschner-piikki. Tätä varten tehtiin sagittaalinen viilto oikean patellan kohdalle ja vedettiin patellaa lateraalisuuntaan, jolloin kondyylien väli paljastui. Kirschner-piikki työnnettiin kondyylien välistä ydinkanavan halki, kunnes se työntyi ulos trochanter majorin kohdalla proksimaalisessa femurissa. Tämä ulostyöntynyt piikinosa väännettiin koukkuun, millä varmistettiin piikin ydinkanavassa pysyminen. Femurin murtamisessa käytettiin standardoidun ja siistin murtuman aikaansaamiseksi erityistä Einhornin kolmen pisteen murtuma-aparaattia, jossa murtuma luodaan pudotettavien painojen voimalla (Bonnarens ja Einhorn 1984).

Murtuman onnistuminen, paikka ja laatu varmistettiin kuvaamalla rotat käyttäen digitaalista Faxitron®-röntgenkuvauslaitetta (malli MX-20, Faxitron X-ray corporation, Wheeling, IL, USA) ja Faxitron Imaging Software -ohjelmistoa (Quadros Ltd., Berkshire, UK). Tämä kuvaus toimi myös tutkimuksen lähtökohdassa (aikapiste 0 päivää) seuranta-röntgenkuvana, ja myös intaktien ryhmien rotat kuvattiin. Kaksi rottaa jouduttiin tässä vaiheessa sulkemaan pois tutkimuksesta sirpaleisen murtuman vuoksi, ja kaksi rottaa myöhemmin seurannassa ilmi tulleen femurin kappaleiden epäonnistuneen kiinnittymisen takia. Kaikki rotat kykenivät vauraamaan jalalleen heti operaation jälkeen, ja leikkauksenjälkeisen kivun hoitamiseksi rotille annettiin seuraavina kolmena päivänä 0,01 mg/kg buprenorfiinia ihonalaisesti.

2.3 Tsoledronaatin annostelu

Murtumaoperaation jälkeen rotat jaoteltiin ortopedin arvioiman murtuman morfologian mukaisesti ja satunnaistettiin kolmeen eri lääkeannosryhmään siten, että ryhmien välillä ei olisi suuria eroja murtuman laadussa. Kaksi ryhmää sai tsoledronaattia (ZA) (Aclasta®, Novartis Pharma, Basel, Sveitsi) joko viikoittain tai kertaboluksena, ja kolmas ryhmä toimi plasebokontrollina. Lääkkeen ja plasebovalmisteen annostelu aloitettiin viikon kuluttua murtumasta.

Tsoledronaatin kerta-annos oli ihonalaisesti 0,1 mg/kg. Viikoittainen tsoledronaattiannos oli 0,014 mg/kg ihonalaisesti 7 viikon ajan, eli yhteensä sama 0,1 mg/kg. Käytetyt annokset vastaavat kutakuinkin tsoledronaatin kliinistä käyttöä osteoporoosin hoidossa: tsoledronaattia annostellaan laskimonsisäisenä infuusiona 5 mg kerran vuodessa, eli normaalipainoiselle ihmiselle vajaa 0,1 mg/kg. Kontrolliryhmänä toimiva plaseboryhmä sai ihonalaisesti 7 viikon ajan 0,9 % NaCl-liuosta 2 ml/kg.

2.4 Luuydinsolujen eristys ja viljely

Kahdeksan viikon kuluttua murtumaleikkauksesta eläimet lopetettiin nukuttamalla ne samalla anesteettisekoitteella kuin leikkauksessa ja laittamalla hiilidioksidikammioon. Heti lopetuksen jälkeen otettiin verinäyte sydänpunktiolla. Verinäytteen annettiin hyytyä 30 minuutin ajan, minkä jälkeen seerumi kerättiin talteen sentrifugoimalla näytettä 10 min nopeudella 3000 rpm. Osasta rottia ei saatu seeruminäytettä liian pienen näytemäärän tai näytteen liiallisen hyytymisen takia. Seeruminäytteitä käytettiin myöhemmin luun aineenvaihdunnan bio-kemiallisten merkkiaineiden analyysiin.

Sydänpunktin jälkeen rottien raajat preparoitiin irti ja molemmat femurit sekä tibia otettiin talteen. Oikeanpuoleiset eli murretut femurit röntgenkuvattiin kaikilta rotilta samalla tavoin kuin leikkauksessakin ja säilytettiin +4 °C lämpötilassa histologiaa ja tarkempaa kuvantamista varten. Luuytimen solujen keräämistä varten vasemmanpuoleiset intaktit femurit ja molemmat tibiaat kastettiin nopeasti 70 % etanoliin desinfektoimiseksi ja kuljetettiin soluviljelytiloihin. Kuljetusliuos koostui fosfaattipuskuroidusta suolaliuoksesta (PBS), jossa oli antimykoottina 2,5 µg/ml amfoterisiini B:tä ja antibioottina 100 U/ml penisilliiniä sekä 100 µg/ml streptomysiiniä (PS, *penicillin-streptomycin*).

Soluviljelytiloissa steriilissä vetokaapissa vasen femur ja tibiaat kastettiin jälleen 70 % etanoliin ja siirrettiin PBS:ään, jossa oli 0,25 µg/ml amfoterisiini B -antimykoottia ja PS-antibiootteja. Kunkin rotan solut eristettiin kerrallaan yhdessä vetokaapissa eläintenvälisen solukontaminaation estämiseksi. Luista poistettiin skalpelleilla jäljellä oleva pehmytkudos mahdollisimman tarkasti, ja epifyysit leikattiin irti pyörösahalla. Tämän jälkeen luuydin huuhdeltiin erilliseen astiaan ns. perusmediumilla käyttäen ruiskua ja 23G-neulaa. Käytetty perusmedium koostui α-MEM:sta (fenolipunaton α-minimikasvatusneste, engl. *phenol red free α-minimum essential medium*, Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), jossa oli 10 % naudan sikiön seerumia (*Fetal Bovine Serum*, USA-origin, Gibco®) ja 1 % PS-antibiootteja (*penicillin-streptomycin*, Gibco®). Huuhdeltua solususpensiota sentrifugoitiin 8 min nopeudella 1000 kierrosta minuutissa, minkä jälkeen pohjalle kasaantunut solupelletti sekoitettiin 2 ml:aan perusmediumia ja ruiskutettiin 22G-neulan läpi solurykelmien hajottamiseksi.

Saadun homogeenisen solususpension solutiheys ja solujen totaalimäärä laskettiin Bürker-Türk- laskukammiota käyttäen ja laimentamalla näyte ensin 2 % etikkahappoon punasolujen hajottamiseksi. Solut asetettiin kasvamaan viljelypulloihin tiheyteen 10^6 solua/cm² ja niiden annettiin kasvaa perusmediumissa 37 °C:n lämpötilassa CO₂-kaapissa. 48 tunnin kuluttua pullot huuhdeltiin kahdesti PBS:lla, jotta ei-adherentit solut poistuisivat ja jäljelle jäisivät halutut mesenkymaaliset luuydinsolut. Mediumiksi vaihdettiin ns. MSC-medium eli perusmedium, johon oli lisätty 10^{-8} M deksametasonia (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Tämä oli primaariviljelmän ns. nollas eli 0. jako (engl. *passage 0*). Solujen annettiin jakaantua, ja kuudentena päivänä eristämisen jälkeen puolet MSC-mediumista vaihdettiin. 8–9 päivän jakaantumisen jälkeen 0. jaon solut irrotettiin kasvatuspullon pinnasta käyttäen trypsiini-EDTA:a (trypsiini-etyleenidiamiinitetraetikkahappo), jonka trypsiini katkoo solun adheesio-proteiinit ja EDTA kelatoi adheesiossa tarvittavat ja trypsiinin toimintaa inhiboivat Ca²⁺-ionit. Solujen laskemisen jälkeen solususpensio jaettiin uusiin viljelmiin, erilaistumaan osteoblasteiksi ja adiposyyteiksi. Erilaistamisviljelmät pyrittiin tekemään tässä 1. jaossa, mutta muutamassa tapauksessa solujen vähäisen määrän vuoksi erilaistaminen piti suorittaa 2.–3. jaossa. Lisäksi solujen keräystä ja uudelleenviljelyä MSC-mediumissa jatkettiin aina 10. jakoon saakka solujen jakaantumispotentiaalin tutkimiseksi.

2.5 Osteoblastien erilaistuminen

Ensimmäisen jaon yhteydessä aloitettiin osteoblastogeeniset soluviljemät eli osteoblasti-induktioviljelmät mesenkymaalisten kantasolujen osteoblastogeenisen taipumuksen selvittämiseksi. Soluja laitettiin kasvamaan 24-kaivoisille kuoppalevyille tiheyteen 5000 solua/cm². Kustakin rotasta laitettiin samalle kuoppalevyille 4 toistonäytettä osteoblasti-induktioon ja 2 toistonäytettä kontrolliksi. Kontrollina käytettiin MSC-mediumia. Erilaistumiseen käytettiin erityistä osteoblasti-induktiomediumia eli OB-mediumia: perusmediumia, jossa on 10^{-8} M deksametasonia, 10 mM β -glyserofosfaattia ja 70 μ g/ml askorbiinihappoa. Kutakin analyysimenetelmää varten soluja kasvatettiin kaksi kuoppalevyllistä kahta eri aikapistettä varten. Puolet mediumista vaihdettiin 3-4 päivän välein, ja solujen annettiin kasvaa kuoppalevyillä 1 tai 2 viikon ajan.

Kun erilaistettavat solut olivat kasvaneet kuoppalevyillä aikapisteensä mukaan 1 tai 2 viikkoa, ne kiinnitettiin alustaansa alkalisen fosfataasin (ALP) ja luumineraalin värjäystä varten tai hajotettiin solu-uutteeksi eli lysaatiksi spektrofotometrillä analyysia varten. Kiinnittäminen tapahtui inkuboimalla soluja 3 % paraformaldehydissä (PFA) 15 min ajan huoneenlämmössä, ja kiinnittämisen jälkeen soluja säilytettiin PBS:ssä. Solujen hajottamiseksi solut uutettiin 200 µl:aan/kaivo Triton X-100 -puskuria (50 mM Tris-HCl, 0,1 % Triton X-100 -detergenttiä [$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$], 0,9% NaCl, pH 7,6), minkä jälkeen lysaatti jäädettiin ja suolatettiin kolmasti.

Solujen alkalinen fosfataasi värjättiin kaupallisella histokemiallisella värjäysmenetelmällä (86-R Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Osteoblastien tuottama mineralisoitunut luuaine värjättiin von Kossan menetelmällä, jossa soluja inkuboitiin 2 % hopeanitraattiliuoksessa tunnin ajan 60 W lampun alla. Tällöin hopea reagoi luuaineksen fosfaatin kanssa muodostaen hopeafosfaattia, jonka valo hajottaa muodostaen samalla sen paikalle orgaanisesta aineesta peräisin olevan tumman värin (Meloan 1985). Tumma väri kiinnitettiin inkuboimalla soluja 2,5 % natriumtiosulfaattissa 5 min ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen solut huuhdeltiin huolellisesti hanavedellä ja ilmakeivattiin.

Värjäytyneiden alueiden pinta-ala laskettiin skannaamalla kuoppalevyjen pohjat tietokoneelle. Skannatut kuvat jaettiin kuvankäsittelyohjelmaa käyttäen RGB-värikanaviin, joista värjäytyneiden pikselien prosentuaalinen määrä laskettiin CTan-ohjelmalla (SkyScan, Aartselaar, Belgia). ALP-värjäyksen analyysia varten pikselit määritettiin vihreästä värikanavasta kynnyksarvolla 175, kun taas von Kossaa varten käytettiin sinistä värikanavaa kynnyksarvolla 140. Kynnyksarvot kalibroitiin visuaalisesti kahden henkilön silmin vastaamaan mahdollisimman tarkasti kaivojen pohjien todellista värjäytymistä.

Alkalisen fosfataasin entsyymiaktiivisuutta mitattiin spektrofotometrisellä analyysillä. Osteoblasti-induktion lysaateista otettiin 96-kaivoiselle kuoppalevyille 10 µl näyte, kaksi rinnakkaisnäytettä kustakin soluviljelylevyn kaivosta. Näytteeseen lisättiin 85 µl emäksistä puskuriliuosta (0,1 M Tris, 1 mM MgCl₂, pH 10) sekä 15 µl 0,1 M para-nitrofenyylifosfaattia (pNPP, Sigma-Aldrich) ALP:n substraatiksi. Liuosta inkuboitiin pimeässä 35 min, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin muuttamalla pH lisäämällä 100 µl 1,0 M NaOH. ALP hajottaa pNPP:n kellertäväksi para-nitrofenyyliksi, ja syntyneen väriliuoksen absorbanssi mitattiin spektrofotometri-

laitteella 405 nm aallonpituudella. Näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin Bradfordin proteiinimäärityksellä käyttäen kaupallista Bio-Rad Protein Assay -värireagenssia (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ja pitoisuudeltaan tunnettuja BSA-liuoksia (naudan seerumin albumiini, engl. *Bovine Serum Albumin*) konsentraatiostandardina. Liuoksen absorbanssi mitattiin aallonpituudella 595 nm. BSA-standardien absorbanssien perusteella määritettiin absorbanssi-pitoisuussuora, jonka avulla laskettiin solunäytteiden kokonaisproteiinikonsentraatio (mg/ml). Näytteiden spesifinen ALP-aktiivisuus laskettiin absorbanssina proteiinin kokonaismäärää kohti.

2.6 Adiposyyttien erilaistuminen

1. solujaon yhteydessä aloitettiin myös MSC:jen erilaistaminen adiposyyteiksi. Soluja jaettiin 24-kaivoiselle kuoppalevyille tiheyteen 5000 solua/cm². Adiposyytti-induktiomediumina toimi MSC-medium, jossa oli 10 µg/ml insuliinia (Sigma-Aldrich), 0,5 mM isobutyylimetyyliksantiinia (Sigma-Aldrich), 100 µM indometasiinia (Sigma-Aldrich) sekä 10⁻⁶ M deksametasonia. Puolet mediumista vaihdettiin kaksi kertaa viikossa.

Adiposyytit värjättiin Oil Red O -värjäyksellä. Tätä varten valmistettiin väriliuos sekoittamalla Oil Red O -kantaliuosta (100 ml 99 % isopropanolia, jossa 300 mg Oil Red O -jauhetta (Sigma-Aldrich)) ja deionisoitua vettä suhteessa 3:2 ja suodattamalla liuos suodatinpaperin lävitse. Adiposyytti-induktioviljelmät huuhdeltiin kahdesti PBS:lla ja kiinnitettiin alustaansa inkuboimalla niitä 30 min ajan 10 % PFA:ssa. Sitten solut huuhdeltiin steriilillä vedellä, ja inkuboitiin ensin 5 min 60 % isopropanolissa ja sen jälkeen 5 min Oil Red O -väriliuoksessa. Irtonainen väri huuhdeltiin kuoppalevyiltä juoksevalla vedellä, minkä jälkeen solut peitettiin 1 min ajaksi hematoksyliini-väriliuoksella (Sigma-Aldrich). Levyt huuhdeltiin jälleen vedellä ja pidettiin märkinä mikroskopointiin saakka.

2.7 Solujen jakaantumiskyvyn mittaaminen

Osteoblasti- ja adiposyyttierilaistamisen lisäksi 0. jaon soluja viljeltiin MSC-mediumissa tiheydessä 5000 solua/cm² soluviljelypulloissa solujen jakautumistiheyden arvioimiseksi. Puolet mediumista vaihdettiin kahdesti viikossa, ja viljelmien ollessa 60–80 % konfluentteja solut irrotettiin alustasta trypsiini-EDTA-seoksella, laskettiin ja jaettiin uusiin viljelypulloihin. Soluja

kasvatettiin T25-pulloissa ja jaettiin 9-10 viikon ajan vähintään 10. jakoon saakka. Jakaantumisen analysointiin käytettiin 0. jaosta 7. jakoon asti saatua dataa.

Solujen proliferaatiokykyä kuvaava kahdentumisen määrä ja (engl. *population doubling*, PD) laskettiin aiemmin kirjallisuudessa (Stenderup ym. 2003) käytetyllä kaavalla:

$$\log (\text{jakaantuneiden solujen lkm} / \text{istutettujen solujen lkm}) / \log 2$$

Tuloksena saadaan se, kuinka monta kertaa solupopulaatio on kaksinkertaistunut istuttamisen ja uudelleenlaskemisen välisenä aikana. Proliferaation tutkimiseksi selvitettiin kahdentumisten välinen aika (PDT, *population doubling time*), kahdentumisten kokonaismäärä (PD-tot), kahden jaon välinen keskimääräinen kahdentumismäärä (PD-av) ja suurin havaittu kahdentumismäärä (PD-max). Myös solujen keskimääräinen kahdentumistahti (PD-rate) laskettiin, yksikkönä kahdentumista per päivä.

2.8 Murtuman radiologinen kuvantaminen ja analyysi

Rottien oikeanpuoleiset reisiluut kuvattiin röntgensätein kolmessa aikapisteessä: heti murtumaleikkauksen jälkeen, 4 viikon kuluttua leikkauksesta ja lopettamisen yhteydessä 8 viikkoa leikkauksen jälkeen. Kuvantamismenetelmänä käytettiin joka kerralla samaa, aiemmin mainittua Faxitron® MX-20 -röntgenkuvauslaitetta.

Oikeanpuoleiset femurit kuvannettiin myös mikrotietokonetomografialaitteella (μ CT, engl. *micro-computed tomography*). Femureiden preparoinnin jälkeen ne fiksattiin inkuboimalla kolmen päivän ajan 10 % formaliinissa, minkä jälkeen ne säilöttiin 70 % etanolissa. Tämän jälkeen luut kuvattiin Skyscan 1072 micro-CT -järjestelmällä (SkyScan, Aartselaar, Belgia) kahden tiheydeltään tunnetun fantomin kera. Kuvaus tehtiin 61 kV jännitteellä, 150 μ A sähkövirralla ja 4,9 s valotuksella 0,25 mm alumiinisuodattimen läpi. Kuvauksessa luut pyörähtivät 180° ja joka 0,45° välein laite otti vertikaalisen kuvan 14,65 μ m resoluutiolla. μ CT-kuvaus suoritettiin niiden 41 rotan femurille, joista saatujen solujen viljelmät olivat onnistuneet. Lisäksi yksi kuvattu femur jouduttiin sulkemaan pois tutkimuksesta, kun kuvausdata menetetttiin tietokonevirheessä.

Kuvantamisen jälkeen vertikaaliset röntgenkuvat tallennettiin TIFF-muodossa. Niistä rekonstruoidtiin poikittaissuuntaisia BMP-muotoon tallennettuja leikekuvia käyttäen NRecon-ohjelmaa (SkyScan). Rekonstruktioasetuksina käytettiin siloittamista, väärinkohdistamisen korjausta ja beam-hardening-korjauksena 75 %, ja tulostamisvaiheen dynaaminen alue oli 0,018–0,15. Tämän jälkeen CTan-ohjelman (SkyScan) avulla laskettiin luun tilavuus analysoitujen 15 mm pituinen alue murtuman kallusalueen ympärillä tai keskidiafyysissä intakteissa kontrolliluissa. Kahden tiheysstandardeina toimineen fantomin (250 ja 750 mg/cm³) avulla määritettiin tiheydelle standardisuora, jolla laskettiin luunäytteiden mineraalitiheys (BMD, engl. *bone mineral density*). Mineraalitiheyden ja luun mm³-tilavuuden avulla laskettiin näytteille luumineraalin määrä (BMC, engl. *bone mineral content*).

2.9 Murtuman histologia

μCT-kuvantamisen ja analysoinnin jälkeen etanoliin säilötyistä femureista tehtiin histologisia leikkeitä kvalitatiivista mikroskopointia varten. Luita dekalsifioitiin inkuboimalla niitä 18 päivän ajan 14 % EDTA-liuoksessa, joka kelatoi kalsiumioneja. Tämän jälkeen luista poistettiin vesi ja ne valettiin parafiiniin. Parafiiniblokista leikattiin 5 μm paksuisia kudisleikkeitä, jotka värjättiin Weigertin hematoksyliinillä, Alcian-sinisellä ja van Gieson -värjäyksellä. Hematoksyliini värjää tumat mustiksi, Alcian-sininen värjää ruston siniseksi ja van Gieson värjää kollageenin punaiseksi sekä muut kudokset keltaiseksi.

2.10 Seerumin biokemialliset pintamerkkiaineet

Rottien lopettamisen yhteydessä sydänpunktiolla otetuista seeruminäytteistä analysoitiin kaksi luumetabolian merkkiproteiinia: tyypin I kollageenin C-terminaalinen ristisilloitettu telopeptidi (CTx, engl. C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen) ja tyypin I prokollageenin N-terminaalinen propeptidi (PINP, engl. N-terminal propeptide of type I procollagen). CTx on osteoklastien hajottaman kollageenin fragmentti ja kertoo siten luun resorptiosta, kun taas PINP on kollageenisynteesissä syntyvä jäännöspeptidi, jota syntyy erityisesti osteoidin kollageenin tuotannossa ja joka siten kertoo luun muodostumisesta (Singer ym. 2008). Merkkiainepitoisuudet määritettiin käyttäen kaupallisia entsyymien immunologiseen määrittelyyn (EIA, engl. *enzyme immunoassay*) perustuvia analyysisarjoja RatLaps™ EIA ja Rat/Mouse PINP EIA (IDS Ltd, Boldon, UK).

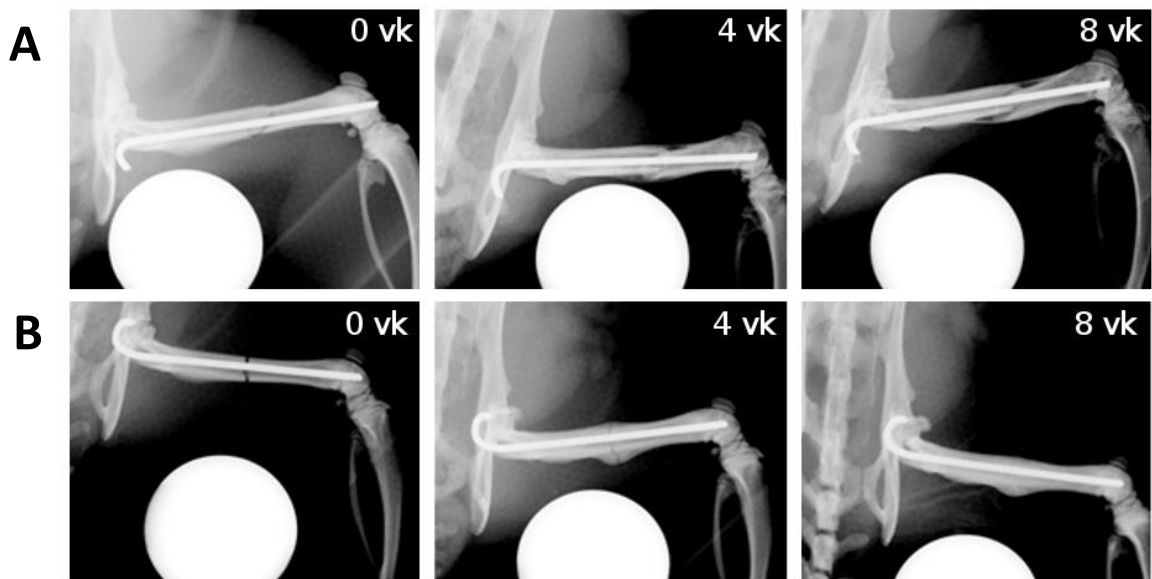
2.11 Tilastolliset analyysit

Tilastollisen analyysin suoritti tutkimusryhmän biostatistikko käyttäen IBM SPSS Statistics -ohjelmaa (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA). Tulokset esitetään muodossa keskiarvo \pm keskihajonta (SD) tai keskiarvo ja 95 % luottamusväli. Tilastollisen merkittävyyden rajana toimi p-arvo $<0,05$.

3 TULOKSET

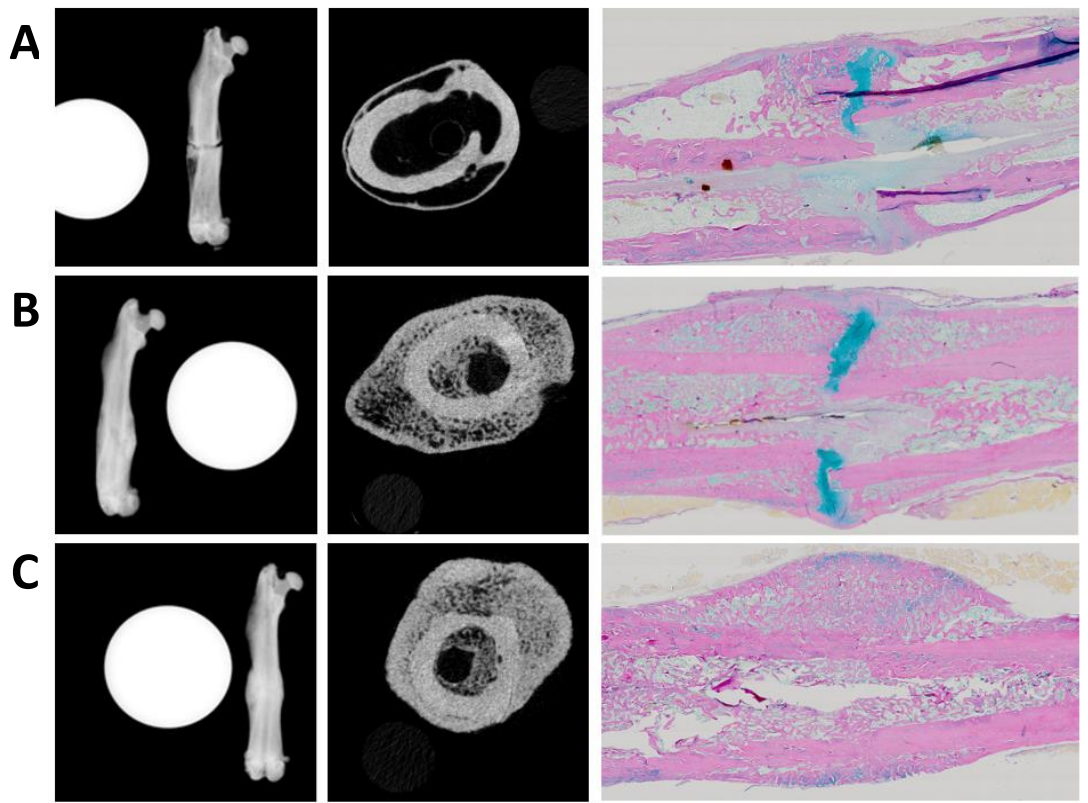
3.1 Tsoledronaatin vaikutus murtuman paranemiseen

Kolmessa aikapisteessä (0, 4 ja 8 viikkoa murtumaoperaatiosta) otettujen röntgenkuvien perusteella murretut femurit alkoivat luutua ja parantua menestyksekkäästi: 8 viikon kohdalla murtumat olivat kaikilla rotilla radiologisesti luutuneita (kuva 1). Murtuman paraneminen näkyy myös histologisissa leikkeissä rustoisena kalluksena ja uudislun muodostumisena (kuva 2).

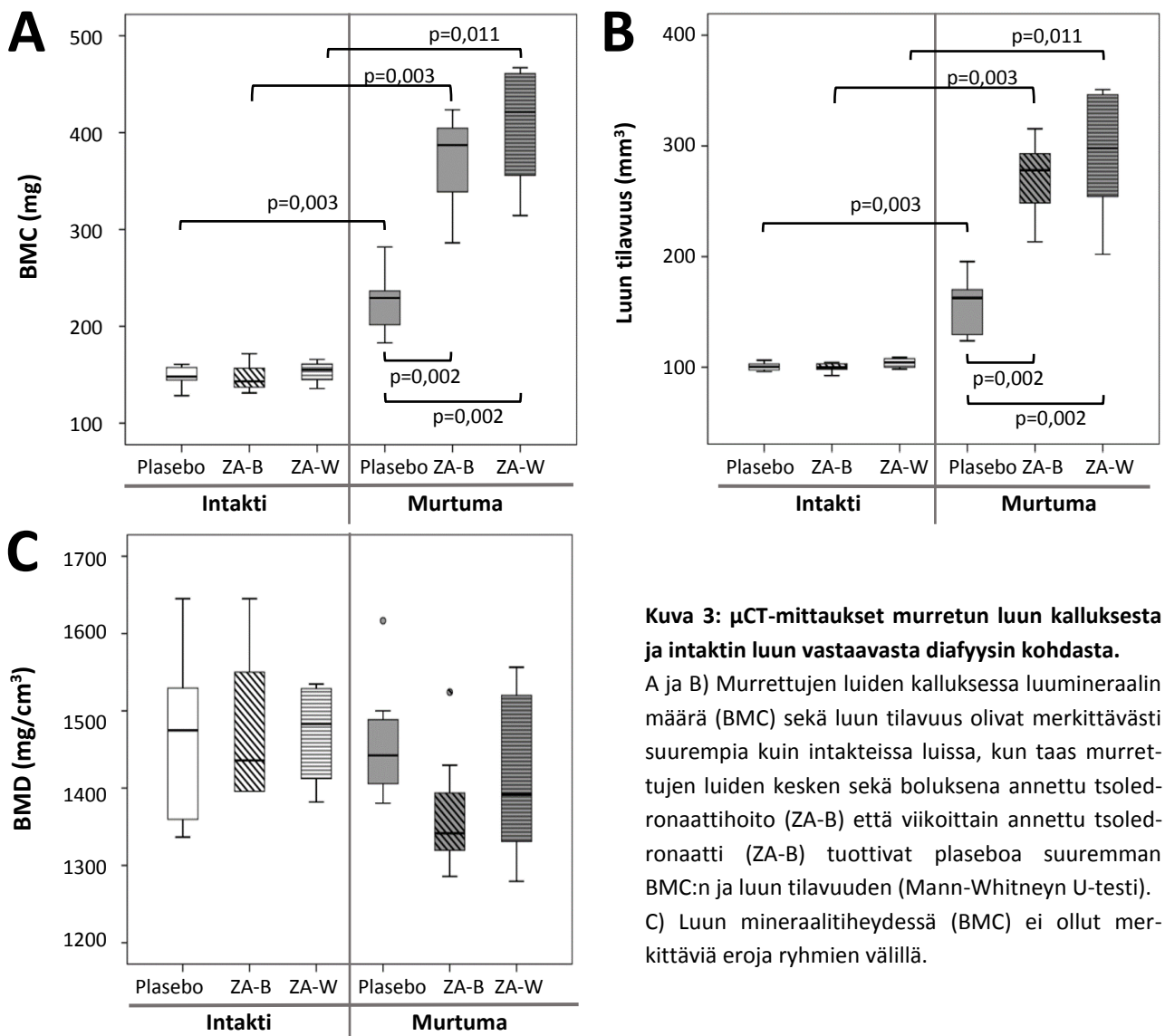


Kuva 1: Digitaaliröntgenkuva A) plaseboa saaneen ja B) viikoittain 7 vk ajan tsoledronaattia saaneen rotan femureista heti murtumaleikkauksen jälkeen sekä 4 ja 8 viikon aikapisteissä.

μ CT-kuvantamisella luista tutkittiin luun tilavuus (BV, *bone volume*), mineraalin määrä (BMC, *bone mineral content*) sekä mineraalin tiheys (BMD, *bone mineral density*). Kuten olettaa sopii, murretuissa luissa luun tilavuus ja mineraalin määrä olivat merkittävästi suurempia kuin intakteilla rotilla. Verrattaessa murtumaosajoukon tsoledronaattia saaneita rottia intakteihin, havaittiin myös, että tsoledronaattilääkitys tuotti murretuissa luissa merkittävästi suuremman luun tilavuuden ja mineraalin määrän kontrolliin verrattuna. Viikoittain annostellulla tsoledronaatilla oli keskimäärin suuremmat BMC- ja BV-arvot, mutta eri annostelumuotojen välinen ero ei ollut tilastollisesti merkitsevää. Intakteissa luissa lääkeaineryhmien ja kontrollien välillä ei tuloksissa ollut eroja. (Kuva 3.)



Kuva 2: Postoperatiivinen röntgenkuva (vas) ja μ CT-kuva (kesk) sekä histologinen leike (oik) 8 viikon aikapis- teessä A) plaseboa sekä B) kerta-annoksen ja C) viikoittaista tsoledronaattihoitoa saaneen rotan femurista.



Kuva 3: μ CT-mittaukset murrettun luun kalluksesta ja intaktin luun vastaavasta diafyysin kohdasta.

A ja B) Murrettujen luiden kalluksessa luumineraalin määrä (BMC) sekä luun tilavuus olivat merkittävästi suurempia kuin intakteissa luissa, kun taas murrettujen luiden kesken sekä boluksena annettu tsoledronaattihoito (ZA-B) että viikoittain annettu tsoledronaatti (ZA-W) tuottivat plaseboa suuremman BMC:n ja luun tilavuuden (Mann-Whitney U-testi). C) Luun mineraalitiheydessä (BMD) ei ollut merkittäviä eroja ryhmien välillä.

3.2 Tsoledronaatin vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen jakaantumiseen

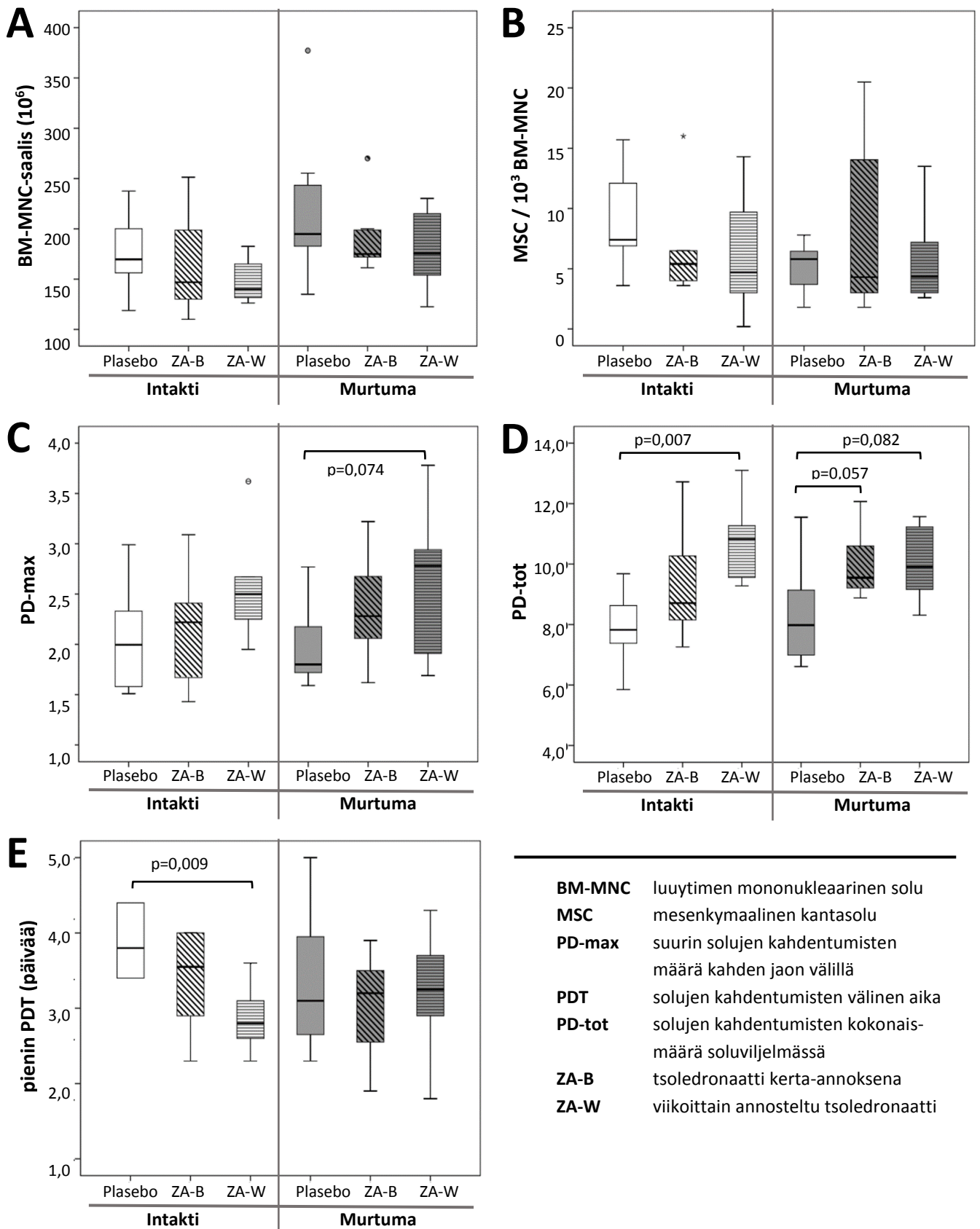
Solujen proliferaatiota tutkittiin kasvattamalla MSC-soluviljelmiä vähintään 10. jakoon saakka ja analysoimalla jakamisten yhteydessä lasketuista solumääristä niiden kahdentumista kuvaavat parametrit. Luuytimistä eristettyjen solujen määrä ei lähtötilanteessa vaihdellut merkittävästi ryhmien välillä, mutta sen sijaan hajonta eri rottayksilöistä eristettyjen solujen jakaantumisessa oli hyvin suurta, mikä heikensi vasteiden tilastollisen merkitsevyyden esille tuloa.

Ensimmäisessä solujaossa ryhmien välillä ei ilmennyt eroja. Jakojen myötä kuitenkin havaittiin, että *in vivo* annettu tsoledronaattilääkitys lisäsi Mesenkymaalisten kantasolujen *ex vivo* jakaantumista. Intakteissa rotissa viikoittain annosteltu tsoledronaatti lisäsi proliferaatiota merkittävästi kontrolleihin verrattuna: PD-tot oli merkittävästi suurempi ($p=0,007$) ja PDT pienempi ($p=0,009$) tsoledronaattiryhmässä. Boluksena annosteltu tsoledronaatti ei analyysissä tuottanut merkitseviä eroja kontrolliin verrattuna. Myös murtumaryhmien jakaantumisessa oli havaittavissa vastaavanlainen trendi. PD-max oli viikoittaisessa tsoledronaattiryhmässä keskiarvoltaan suurempi ja PD-tot suurempi sekä viikoittaisessa että kerta-annoksen saaneessa ryhmässä kontrolliin verrattuna, mutta erot eivät suuren keskihajonnan myötä saavuttaneet tilastollista merkitsevyyttä ($p=0,074$, $p=0,082$ sekä $p=0,057$). (Kuva 4.)

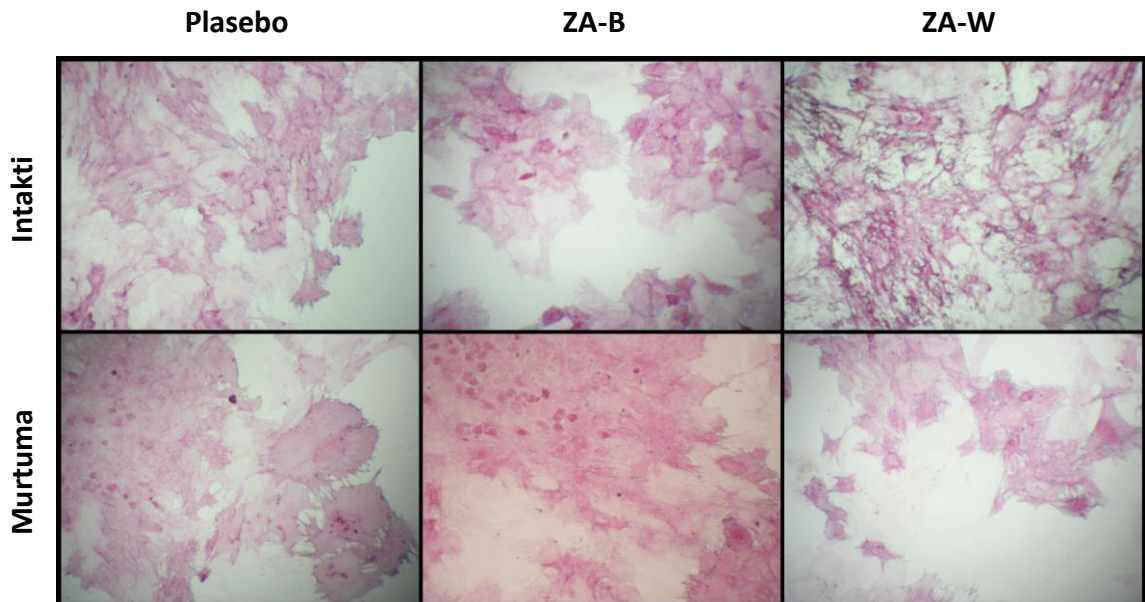
3.3 Tsoledronaatin vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja niiden luuntuottokykyyn

Mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista osteoblasteiksi selvitettiin spektrofotometrillä ALP-aktiivisuusanalyysillä sekä laskemalla soluviljemien ALP-positiivisesti värjäytyvä pinta-ala (kuva 5). Osteoblastien kyky muodostaa mineralisoitunutta osteoidia määritettiin laskemalla osteoblasti-induktioviljelmien von Kossan menetelmällä värjäytynyt pinta-ala (kuva 6).

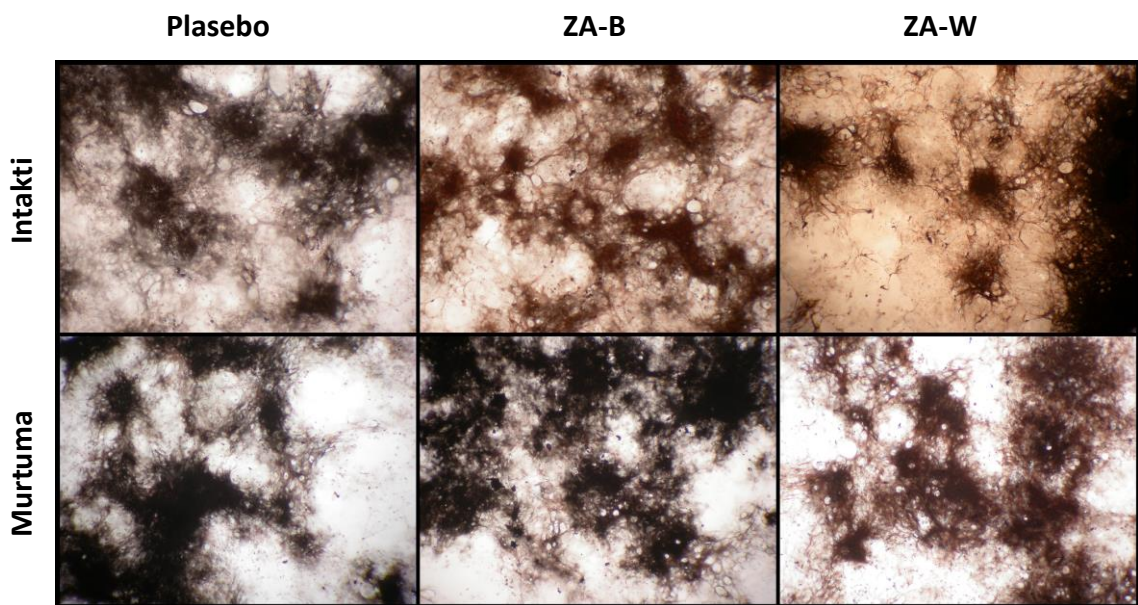
Toisin kuin hypoteesissa oletimme, osteoblasti-induktioviljelmiä analysoitaessa kummankaan tsoledronaattihoidon ja kontrollin välillä ei ollut merkitsevää eroa kummassakaan ALP-parametrissä tai mineraalin tuotossa, oli murtumaa tahi ei. Ryhmien sisäinen hajonta oli



Kuva 4: Eristyksen solusaalis sekä mesenkymaalisten kantasolujen jakaantumispotentiaali soluviljelmässä 1. ja 7. jaon välisenä aikana. A) Luuytimistä saatujen mononukleaaristen solujen määrässä ei ollut merkittäviä eroja ryhmien välillä, kuten ei myöskään B) 0. jaossa eristettyjen mesenkymaalisten kantasolujen määrässä suhteessa mononukleaaristen solujen lukumäärään. C) PD-max ei eronnut tilastollisesti merkitsevästi ryhmien välillä, joskin nouseva trendi oli havaittavissa verrattessa viikoittaista tsoledronaattia kontrolliryhmään. D) PD-tot oli intaktien rottien mesenkymaalisilla kantasoluilla merkitsevästi suurempi viikoittaisella tsoledronaatilla kontrolliin verrattuna, ja samanlainen trendi oli havaittavissa myös murtumaryhmien välillä. E) Pienin solujen kahdentumiseen kulunut aika kahden jaon välillä päivissä laskettuna oli intaktien rottien soluissa merkitsevästi lyhyempi viikoittaisella tsoledronaatilla hoidetussa ryhmässä kuin kontrollissa. Parittaiset vertailut tehtiin käyttäen Studentin t-testiä.



Kuva 5: Osteoblastiviljelmät värjätynä ALP-värjäyksellä (alkalinen fosfataasi) 2 viikon viljelyn jälkeen, 10-kertainen suurennus. ZA-B = kerta-annoksena annosteltu tsoledronaatti, ZA-W = viikoittain annosteltu tsoledronaatti.



Kuva 6: Osteoblastiviljelmät värjätynä von Kossa -värjäyksellä 3 viikon viljelyn jälkeen, 4-kertainen suurennus. ZA-B = kerta-annoksena annosteltu tsoledronaatti, ZA-W = viikoittain annosteltu tsoledronaatti.

huomattavan suurta erityisesti värjäystutkimuksissa, mikä heikensi tilastollista voimaa. MSC-mediumissa inkuboiduissa kontrolliviljelmissä eroja ei odotetusti myöskään havaittu.

Havaittavissa kuitenkin oli se, että osteoblasti-induktiossa boluksena annosteltu tsoledronaatti tuotti suurimman ALP-aktiivisuusarvon ja ALP-värjäytyvyyden, kun taas viikoittain annosteltu tsoledronaatti tuotti parametrien pienimmät arvot. Kontrolliryhmä sijoittui keskiar-

voltaan kahden tsoledronaattiryhmän väliin. Niinpä kontrolliin verrattuna tsoledronaattihoidoilla ei ollut merkitsevää eroa, mutta verrattaessa tsoledronaattiryhmiä toisiinsa havaittiin, että boluksena annosteltu tsoledronaatti tuotti merkitsevästi suuremman ALP-aktiivisuuden kuin viikoittainen tsoledronaatti sekä murretuissa ($p=0,017$) että intakteissa ($p=0,043$) rotissa. (Taulukko 1.)

Lisäksi *ex vivo* soluviljelmätulosten ja *in vivo* μ CT-kuvantamistulosten välinen korrelaatio tutkittiin siltä varalta, että viljelmissä näkyvät erot heijastuisivat myös makrotason morfologiasa. Merkitsevää korrelaatiota ei kuitenkaan havaittu μ CT-parametrien (BMD, BMC, BV) ja soluparametrien (ALP-aktiivisuus, ALP-värjäys ja von Kossa -värjäys) välillä.

3.4 Tsoledronaatin vaikutus luometabolian seerumimerkkiaineisiin

Kahdeksan viikkoa murtumaoperaation jälkeen otetuista seeruminäytteistä ($n=43$) tutkittiin luometabolian merkkiaineena osteogeeninen PINP ja resorptiomarkkeri CTx ja havaittiin, ettei tsoledronaattilääkityksellä ollut vaikutusta merkkiainetasoihin kontrolleihin verrattuna. Tulos oli ei-merkitsevä niin verrattaessa tsoledronaattilääkitystä kaikkiin kontrolleihin kuin tehtäessä vertailut yksittäisten ryhmien välillä. Murtuma sen sijaan odotetusti suurensi merkitsevästi seerumin PINP-markkerin määrää murtamattomiin kontrolleihin verrattuna ($7,7\pm 2,2$ vs. $6,6\pm 1,3$ ng/ml, $p=0,046$). CTx-tasoihin sillä ei kuitenkaan ollut merkitsevää vaikutusta ($29,7\pm 13,4$ ng/ml vs. $29,5\pm 10,0$ ng/ml).

Lisäksi tutkittiin *in vivo* -seerumimerkkiaineiden korrelaatiota soluviljelmien *in vitro* -analyysien (ALP-aktiivisuus, ALP-värjäys ja von Kossa -värjäys) tuloksiin. Analyysiin käytettiin soluviljemien tuloksia vain niistä rotista, joista myös seeruminäytteen otto oli onnistunut. Merkitseviä korrelaatioita havaittiin vain osteoblasti-induktioviljelmissä: kahden viikon viljelyn jälkeinen ALP-aktiivisuus sekä ALP-värjäytyvyys korreloivat molemmat positiivisesti osteogeenisen PINP-markkerin kanssa ($R=0,44$, $p=0,007$ sekä $R=0,32$, $p=0,055$). Samassa aikapisteessä ALP-värjäytyvyys korreloi negatiivisesti CTx-resorptiomarkkerin kanssa ($R=-0,33$, $p=0,045$). Mineralisoituneen osteoidin von Kossa -värjäystuloksen ja seerumimarkkereiden välillä ei sen sijaan ollut havaittavissa merkitsevää eroa. (Taulukko 2.)

	Intakti					
	MSC-viljelmä			osteoblasti-induktio		
	Plasebo	ZA-B	ZA-W	Plasebo	ZA-B	ZA-W
ALP-aktiivisuus (U/mg proteiinia)	0,43 0,38-0,49	0,51 0,46-0,57	0,44 0,38-0,49	1,43 1,29-1,56	1,55 1,41-1,69	1,30 1,16-1,44
Plasebo vs. ZA-B	p>0,05			p>0,05		
Plasebo vs. ZA-W	p>0,05			p>0,05		
ZA-B vs. ZA-W	p>0,05			p=0,043		
ALP-värjäytyvyys (%)	10 6-14	12 8-16	11 6-15	46 41-50	48 43-53	41 36-47
Plasebo vs. ZA-B	p>0,05			p>0,05		
Plasebo vs. ZA-W	p>0,05			p>0,05		
ZA-B vs. ZA-W	p>0,05			p>0,05		
von Kossa - värjäytyvyys (%)				26 21-30	24 19-29	18 13-24
Plasebo vs. ZA-B				p>0,05		
Plasebo vs. ZA-W				p>0,05		
ZA-B vs. ZA-W				p>0,05		

	Murtuma					
	MSC-viljelmä			osteoblasti-induktio		
	Plasebo	ZA-B	ZA-W	Plasebo	ZA-B	ZA-W
ALP-aktiivisuus (U/mg proteiinia)	0,40 0,35-0,45	0,48 0,43-0,53	0,40 0,35-0,45	1,44 1,31-1,57	1,50 1,36-1,64	1,22 1,09-1,36
Plasebo vs. ZA-B	p=0,091			p>0,05		
Plasebo vs. ZA-W	p>0,05			p=0,078		
ZA-B vs. ZA-W	p>0,05			p=0,017		
Intakti vs. murtuma ¹	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
ALP-värjäytyvyys (%)	9 5-13	11 7-15	10 6-15	44 40-48	44 40-49	43 38-48
Plasebo vs. ZA-B	p>0,05			p>0,05		
Plasebo vs. ZA-W	p>0,05			p>0,05		
ZA-B vs. ZA-W	p>0,05			p>0,05		
Intakti vs. murtuma ¹	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
von Kossa - värjäytyvyys (%)				23 19-28	23 18-27	18 13-23
Plasebo vs. ZA-B				p>0,05		
Plasebo vs. ZA-W				p>0,05		
ZA-B vs. ZA-W				p>0,05		
Intakti vs. murtuma ¹				p>0,05	p>0,05	p>0,05

¹ Murtumaryhmä verrattuna vastaavaan intaktiin ryhmään.

Taulukko 1: *In vivo* annostellun tsoledronaatin vaikutus rotan luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumiseen *in vitro*. Soluja viljelty 3 viikon ajan joko perusmediumissa (MSC-viljelmä) tai osteoblasti-induktiomediumissa. Tulokset esitetty muodossa keskiarvo ja 95 % luottamusväli, p-arvot analysoitu Mixed models -analyysillä, vertaillen parinäytteitä kustakin koe-eläimestä. Harmaalla merkittynä von Kossa -värjäys MSC-viljelmässä, joka jää luontaisesti negatiiviseksi (MSC:t eivät tuota värjäyksessä näkyvää mineraalia). ZA-B = kertaannoksena annosteltu tsoledronaatti, ZA-W = viikoittain annosteltu tsoledronaatti.

ALP-aktiivisuus		R	p-arvo	ALP-värjäys		R	p-arvo	von Kossa		R	p-arvo
MSC 2 vk	CTx	0,11	<0,05	MSC 2 vk	CTx	-0,1	<0,05	MSC 2 vk	CTx	-0,09	<0,05
OB 2 vk	CTx	-0,26	<0,05	OB 2 vk	CTx	-0,33	0,045	OB 2 vk	CTx	-0,17	<0,05
MSC 3 vk	CTx	0,18	<0,05	MSC 3 vk	CTx	-0,16	<0,05	MSC 3 vk	CTx	0,13	<0,05
OB 3 vk	CTx	-0,2	<0,05	OB 3 vk	CTx	-0,27	<0,05	OB 3 vk	CTx	-0,12	<0,05
MSC 2 vk	PINP	0,16	<0,05	MSC 2 vk	PINP	0,21	<0,05	MSC 2 vk	PINP	-0,14	<0,05
OB 2 vk	PINP	0,44	0,007	OB 2 vk	PINP	0,32	0,055	OB 2 vk	PINP	-0,14	<0,05
MSC 3 vk	PINP	0,15	<0,05	MSC 3 vk	PINP	0,21	<0,05	MSC 3 vk	PINP	-0,05	<0,05
OB 3 vk	PINP	0,15	<0,05	OB 3 vk	PINP	0,39	0,018	OB 3 vk	PINP	0,25	<0,05

Taulukko 2: Resorptiomerkkiaineen CTx ja osteogeenisen merkkiaineen PINP seerumipitoisuuksien korrelaatiot MSC-soluviljemien ja osteoblasti-induktioviljemien (OB) osteoblastogeenisiin parametreihin (ALP-aktiivisuus ja -värjäys) ja mineraalisaatioon (von Kossa -värjäys) 2 ja 3 viikon aikapisteissä.

3.5 Tsoledronaatin vaikutus adiposyyttien erilaistumiseen

Adiposyytti-induktioviljelmät värjättiin Oil Red O -värjäyksellä adiposyyttien todentamiseksi.

Mikroskopoitaessa värjätyissä viljelmissä havaittiin adiposyyttejä, mutta solujen määrä oli liian vähäinen minkäänlaisten kvantitatiivisten analyysien suorittamiseksi.

4 POHDINTA

Tutkimuksessamme selvitettiin *in vivo* bisfosfonaattilääkityksen vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen proliferaatioon ja osteoblastilinjan erilaistumiskykyyn *ex vivo*, mikä on uudenlainen lähestymistapa siihen kysymykseen, vaikuttavatko bisfosfonaatit myös osteoblastilinjan soluihin. Yleensä osteoblastitutkimukset on tehty *in vitro* -tutkimuksina, joissa bisfosfonaatti annostellaan suoraan soluviljelmään, mikä on tutkimusmallina varsin yksinkertaista. *In vitro* -asetelma on teknisesti helppo, mutta se poistaa lääkeaineen mahdolliset systeemiset vaikutukset sekä eri solutyypin väliset interaktiot bisfosfonaatin läsnäollessa. Bisfosfonaatin antiresorptinen vaikutus saattaa nimittäin ainakin osin välittyä myös epäsuorasti solujen välisten vuorovaikutusten välityksellä, esimerkiksi osteoblastien vähentyneen RANKL:n ja lisääntyneen OPG:n ilmentymisen kautta (Pan ym. 2004a, Viereck ym. 2002). Bisfosfonaatteja on lukuisia erilaisia, joten myös tutkimuksissa käytetty lääkeaine on vaihdellut. Yleisimpiä ovat kuitenkin alendronaatti ja tsoledronaatti, jotka ovat nykyisin kliinisesti käytetyimmät resorptionestolääkkeet. Lisäksi käytetyt solut ja lajit ovat vaihdelleen kudoksista eristetyistä mesenkymaalisisista kantasoluista kaupallisiin osteoblasti-solulinjoihin ja ihmisperäisistä soluista jyrjäsoluihin, joten vaikutusten suora vertailu keskenään on vaikeaa.

In vivo -tutkimuksissa lääkeaine annetaan elävälle organismille soluviljelmän sijasta, ja *ex vivo* -tutkimusasetelmassa lääkeaineen vaste arvioidaan tämän jälkeen primäärisoluviljelmien perusteella. Kirjallisuudesta löytyvissä *in vivo* -bisfosfonaattitutkimuksissa varsinaisen osteoblastivasteen arviointi on tehty seerumin ALP-pitoisuuden ja hampaan kiinnittymislujuden (Shoji ym.2010), biokemiallisten merkkiaineiden (Valenti ym. 2010) tai μ CT-kuvausten ja histologisten arvioiden perusteella (Pozzi ym. 2009), kun taas soluviljelmien analyysia varten viljelmiin on lisätty bisfosfonaattia *in vitro*.

Aiemmin kirjallisuudessa varsinaisia *ex vivo* -tutkimuksia on julkaistu toistaiseksi vain yksi: lyhytaikaisen viikoittain annostellun etidronaatin ja alendronaatin vaikutusta hiiren mesenkymaalisten kantasolujen CFU-F-muodostukseen tutkittaessa havaittiin, että bisfosfonaattien pienemmät pitoisuudet, mutta eivät suuret, lisäsivät solujen proliferaatiota ja differentiaatiota osteoblasteiksi (Giuliani ym. 1998). Oma tutkimuksemme tsoledronaatin vaikutuksesta *ex vivo* on siis ensimmäinen laatuaan tämän bisfosfonaatin osalta.

Tutkimustulostemme mukaan viikoittainen tsoledronaattihoito sai aikaan mesenkymaalisten kantasolujen lisääntyneen jakautumisen *ex vivo*, ja hypoteesimme piti tässä suhteessa paikkansa. Tulos käy yksiin alendronaatilla tehdyn aiemman *ex vivo* -tutkimuksen kanssa (Giuliani ym. 1998). Myös boluksena annostellulla tsoledronaatilla oli havaittavissa jakaantumista lisäävä trendi, mutta ero kontrolliin ei ollut merkitsevä. Keskihajonta oli suuri, joten on hyvinkin mahdollista, että vaikutus on olemassa, mutta niin pieni, että se jää tutkimuksessamme huomaamatta pienen koe-eläinmäärän takia. *In vitro* -tutkimuksissa vaste Mesenkymaalisten kantasolujen proliferaatioon on ollut annosriippuvainen, pienillä annoksilla jakautumista lisäävä ja suuremmilla sytostaattinen tai jopa apoptoosia aiheuttava (Ebert ym. 2009, Giuliani ym. 1998, Patnirapong ym. 2012, Ribeiro ym. 2014).

Vaste jakautumisessa voi kuitenkin olla joko primaarinen tai sekundaarinen. On epäselvää, johtuuko lisääntynyt jakaantuminen suorasta positiivisesta vaikutuksesta mesenkymaalisiin kantasoluihin, vai jakautuvatko nämä vain vilkkaammin vapauduttuaan suppressoivan bisfosfonaatin vaikutuksen alta tai jonkin muun välillisen syyn takia. Suorana mekanismina bisfosfonaattien on esitetty varjelevan osteoblasteja aktivoimalla apoptoosia estävän kinaasi-signaalintireitin avaamalla konneksiini 43 -solukalvokanavan (Plotkin ym. 2011). Soluja suppressoiva vaikutus puolestaan on *in vitro* -tutkimusten valossa annosriippuvainen, mutta *in vivo* -töissä soluihin vaikuttavaa annosta on mahdoton arvioida.

Bisfosfonaattien vaikutus voi myös välittyä välillisesti muiden solutyyppeiden kautta. Makrofagiin on osoitettu estävän osteoblastien toimintaa, mutta pamidronaatti vähensi tätä inhibitorista vaikutusta (Evans 2002). Tutkimuksissa on myös saatu viitteitä tsoledronaatin vaikutuksesta luuytimen osteoblastiseen kantasolupesään eli nicheen. Eräässä tutkimuksessa tsoledronaatti lisäsi hematopoieettisten kantasolujen (HSC) määrää ja luun morfogeneettisten proteiinien (*Bone morphogenetic protein*) BMP-2:n ja BMP-6:n ekspressiota luuytimessä. HSC:t erittävät näitä tekijöitä, ja niiden on havaittu liittyvän luunmuodostukseen ja osteoblastisen nichen ylläpitoon. Tämän esitettiin tukevan sitä, että tsoledronaatilla olisi epäsuorasti osteoblastiseen nicheen positiivinen vaikutus (Soki ym. 2013.) Toisessa tutkimuksessa, jossa tarkasteltiin tsoledronaatin vaikutusta rintasyöpäsolujen luumetastasointiin, tsoledronaatti puolestaan sai osteoblastit kerääntymään putkiluiden kasvulevyihin ja lisäsi tämän alueen soluväliaineen määrää. Tsoledronaatti myös vähensi verenkierrossa kiertäviä rinta-

syöpäsoluja ja sai ne luuytimessä hakeutumaan samoille alueille kuin osteoblastit. Tämän esitettiin viittaavaan siihen, että tsoledronaatilla olisi jonkinlaista vaikutusta osteoblastiseen nicheen, jonka ajatellaan olevan merkittävässä osassa luustometastaasien muodostumisessa ja kasvussa (Haider ym. 2014).

Osittain lähtöhypoteesimme oli kuitenkin väärässä, sillä tsoledronaattihoito ei merkittävästi lisännyt mesenkymaalisten kantasolujen *ex vivo* -osteoblastogeneesiä kontrolliin verrattuna, mutta ei myöskään vähentänyt sitä. Ryhmien sisäinen suuri keskihajonta on kuitenkin voinut piilottaa vasteen. Kirjallisuudessa tulokset ovat olleet vaihtelevia, mutta osaltaan vaihtelun on havaittu riippuvan bisfosfonaattien pitoisuudesta. *In vitro* -soluviljelmissä mesenkymaalisten kantasolujen osteoblastiksi erilaistumista lisäävä vaikutus on tullut matalilla bisfosfonaattikonsentraatioilla 10^{-9} - 10^{-6} M, kun taas 10^{-5} M ja suuremmat konsentraatiot ovat vähentäneet sitä. (Bellido ja Potkin 2011, Patnirapong ym. 2012, Ribeiro ym. 2014.) *In vivo* -tutkimuksissa tulokset ovat niin ikään olleet vaihtelevia. Alendronaatin on havaittu lisäävän mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista tai sitä kuvaavia markkereita (D'Aoust 2000, Giuliani ym. 1998) ja parantavan luun laatua (Gourion-Arsiquaud ym. 2010). Potilasaineistossa kolmen vuoden hoito i.v. tsoledronaatilla lisäsi mineraalin kertymistä luuhun, mikä kertoo lisääntyneestä osteoblastien toiminnasta (Recker ym. 2008). Toisaalta eräässä tutkimuksessa alendronaatti pienensi osteoblastogeesistä kertovaa hiirten seerumin ALP-pitoisuutta (Shoji ym. 2010). Negatiivisia *in vivo* -vaikutuksia on myös raportoitu hiiritutkimuksissa vastaavansuuruisilla tsoledronaattiansiannoilla, kuin omassa tutkimuksessa käyttämämme 0,1 mg/kg. Eräässä tutkimuksessa tsoledronaatti annoksella 0,05 mg/kg kerran viikossa kolmen viikon ajan ei vähentänyt merkittävästi hiirten osteoblastien määrää histologisissa leikkeissä, mutta heikensi luun mekaanista laatua ja vähensi seerumin osteoblastien aktiivisuudesta kertovan osteokalsiinin määrää (Pozzi ym. 2009). Toisessa tutkimuksessa hiirille annettiin 0,1 mg/kg kerta-annos tsoledronaattia, ja yllättävää kyllä jo viiden päivän aikapisteessä osteoblastien lukumäärän trabelukaaleriluussa ja PINP-tason havaittiin pienenevän (Haider ym. 2014).

In vitro -tutkimusten valossa myös *in vivo* -tutkimustulosten vaihtelu johtuneekin ainakin osin erilaisista bisfosfonaattipitoisuuksista, mutta näiden mittaus on – toisin kuin soluviljelymallilla – käytännössä mahdotonta. Pitoisuuksien arviointia vaikeuttaa se, että bisfosfonaatit hakeutuvat luuainekseen, etenkin tsoledronaatti, jolla on kaikista aminobisfosfonaateista

korkein affiniteetti hydroksiapatiittiin (Russell 2007). Murtuman yhteydessä viikoittain annettu inkadronaatti kumuloitui etenkin luiseen kallukseen, ja hoidon jälkeen sen pitoisuus kalluksessa laski ajan myötä (Li ym. 1999 ja 2000), joten bisfosfonaattia vapautuu siis luusta remodelaation myötä, kun osteoklastit sitä luuaineksesta vapauttavat. Se vaikuttaa täten – ainakin paikallisesti, kenties myös systeemisesti – pitkään hoidon jälkeen, mihin perustuu bisfosfonaattien pitkä annosteluväli kliinisessä käytössä.

Mielenkiintoinen havainto tutkimuksessamme oli se, että vaikka kumpikaan tsoledronaattihoito ei tuottanut osteoblastogeneesissä eroa kontrolliin verrattuna, sai kerta-annostelu aikaan merkittävästi suuremman osteoblastogeneesin kuin viikoittainen annostelu. Proliferaatiossahan puolestaan nimenomaan viikoittain annosteltu tsoledronaatti tuotti merkittävän vasteen, joskin trendi oli vastaavanlainen myös kerta-annostelulla. Aiemmissä tutkimuksissa muutaman tunnin pulssihoitona annettu *in vitro* -tsoledronaatti lisäsi ihmisperäisten mesenkymaalisten kantasolujen osteoblastogeneesiä ja luuntuottoa, kun taas pidempi annostelu johti lisääntyneeseen apoptoosiin (Ebert ym. 2009). Pulssimainen annostelu muistuttaa käyttämäämme kerta-annostelua, jossa siinäkin bisfosfonaattipitoisuus nousee hyvin korkeaksi nopeasti ja vähenee sitten merkittävästi. Kerta-annostelussa tosin tsoledronaatti kertyy myös luustoon ja vapautuu sieltä osteoklastien vaikutuksesta pikku hiljaa, kun taas soluviljelmästä se poistuu kokonaan, mutta konsentraatiopiikki on molemmissa samankaltainen.

Tsoledronaatin ja murtuman vaikutus μ CT-parametreihin oli samanlainen kuin aiemmin kirjallisuudessa esitetty: intaktiin luuhun tsoledronaattilla ei ole vaikutusta, mutta murtuman jälkeen tsoledronaatti lisää luumineraalin määrää ja luun tilavuutta hidastamalla luisen kalluksen remodelaatiota osteoklasteja inhiboivan vaikutuksensa kautta. Tsoledronaatti ei kuitenkaan hidasta murtuman paranemisen alkuvaiheen endokondraalista luutumista eikä vaikuta haittaavasti luun paranemiseen. Lisäksi viikottain annostellun tsoledronaatin on osoitettu hidastavan kalluksen remodelaatiota huomattavasti enemmän kuin kerta-annoksen (McDonald ym. 2008.) Solutasolla *ex vivo* murtumalla ei ollut vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen proliferaatioon tai osteoblastogeneesiin. μ CT- ja solutason analyysit tehtiin vain yhdessä aikapisteessä, joten muutosten arvioiminen ajan suhteen on mahdotonta. Solut eristettiin myöhäisen luutumisen vaiheessa, jossa proliferaatiovaihe on ohittunut ja sytokiineja ei juuri enää eritetä. Lisäksi on syytä huomioida, että soluja ei eristetty murretusta

luusta, vaan intakteista kontralateraalista luista. Näin ollen vähäiset löydökset solutasolla ovat odotettavissa. Useamman aikapisteen arvioinnilla yhteys murtuman ja solujen proliferaation välillä olisi voinut tulla paremmin esiin.

Tutkimuksessa mitattiin myös kaksi kliinisesti käytössä olevaa luumetabolian merkkiaineita, luun muodostuksesta kertovaa PINP:ä ja resorptioon liittyvää CTx:ää. Murtumaryhmässä PINP oli 8 viikon aikapisteessä korkeampi kuin intakteissa, kun taas CTx-pitoisuuksissa ei ollut eroa. Ihmisillä molemmat merkkiaineet ovat koholla ensimmäiset 4 kuukautta murtuman jälkeen (Szulc yms. 2008), mutta rotista vastaavaa tietoa ei kirjallisuudesta löydy. Tsoledronaattihoidolla puolestaan ei ollut minkäänlaista vaikutusta PINP- tai CTx-tasoihin. Ihmisillä bisfosfonaatit remodelaatiota hillitessään laskevat merkkiainetasoja (Szulc ym. 2012), mutta rotilla bisfosfonaateilla ei ole vaikutusta PINP-tasoihin (Hale ym. 2007, Vandyke ym. 2010). Sen sijaan CTx:n on aiemmassa tutkimuksessa osoitettu tsoledronaatin vaikutuksesta laskevan niin alhaiseksi, ettei sen mittaaminen onnistunut (Vandyke ym. 2010), kun taas omassa tutkimuksessamme jostain syystä vastaavaa vaikutusta ei nähty. Uusi löydös on sen sijaan se, että mesenkymaalisten kantasolujen osteoblasteiksi erilaistumisesta kertovilla ALP-parametreilla oli havaittavissa selvä positiivinen korrelaatio PINP-tasoihin ja negatiivinen korrelaatio CTx-tasoihin. Näitä merkkiaineita voidaan siis mahdollisesti käyttää myös prekliinissä malleissa osteoblastogeneesin mittareina.

Huomionarvoista on, että tutkimuksessa rotat lopetettiin kahdeksan viikon kuluttua femureiden murtamisesta, mikä edustaa murtuman paranemisen myöhäistä luutumisivaihetta. Kahdeksan viikon kohdalla periosteaalinen uudisluu ja rusto alkavat resorboitua, kun taas luinen kallus on jo muodostunut, ja luuntuotto alkaa kiihtyä ollen pian maksimissaan (Eskelund ja Plum 1949). Rotat olivat lopettamisen hetkellä 24–31 viikon ikäisiä, joten biomekaanisesti normaali luu olisi vasta 12 viikon aikapisteessä (Meyer ym. 2001).

Toinen merkittävä seikka on se, että tutkitut MSC:t eristettiin murtumaan nähden kontralateraalisen puolen femurista ja tibiasta. Ne eivät siis edusta paikallista vastetta murtumalle ja bisfosfonaatille, vaan systeemistä vastetta myöhäisen luutumisen vaiheessa. Luun murtuessa uuden luun ja tukikudosten muodostumiseen tarvitaan kantasoluja, etenkin osteoblasteja ja kondrosyyttejä muodostavia mesenkymaalisia kantasoluja. Näistä suuri osa tulee paikallisesti luuytimestä, periostista ja luukudoksen sisältä, mutta myös verenkierron kautta systeemises-

ti muualta elimistöstä (Knight ym. 2013), joskin joidenkin tutkimusten mukaan verenkierron mukana tulevat mesenkymaaliset kantasolut eivät muodostaisi itse luuta, vaan vaikuttaisivat parakriinisesti, sytokiineja erittäen, ja lisäisivät näin luun tuottoa (Granero-Moltó ym. 2009). Murtuman paranemisen ensimmäisessä vaiheessa, inflammatorisessa vaiheessa, solut erittävät sytokiineja joilla houkutellessaan murtumapaikalle valkosoluja ja kantasoluja. Rotilla tämä vaihe kestää noin neljän päivän ajan (Claes ym. 2012). Osteogeenisia kasvutekijöitä, kuten BMP-proteiineja, eritetään vielä tämän jälkeenkin ja niitä vapautuu resorboitavasta luuaineksesta koko paranemisvaiheen ajan (Lissenberg-Thunnissen ym. 2011). Näistä etenkin BMP-2 houkuttelee mesenkymaalisia kantasoluja murtumapaikalle (Otsuru ym. 2007), ja MSC:t sitä myös itse tuottavat (Granero-Moltó ym. 2009). Mesenkymaaliset kantasolut voivat siirtyä luuytimestä verenkiertoon, jossa ne kuitenkin liikkuvat vain muutaman päivän ajan stimulaation jälkeen (Otsuru ym. 2008, Pitchford ym. 2009). Täten eristämämme solut eivät mitä todennäköisimmin enää edusta murtumaa korjaamaan värvättyä ja lähtenyttä solupopulaatiota, vaan näiden klooneja.

Tutkimuksen hypoteesi ei siis pitänyt täysin paikkaansa, mikä saattaa kuitenkin johtua suuren hajonnan aiheuttamasta epätarkkuudesta. Tutkimusasetelman työläydestä johtuen havaintojen määrä (n) oli verrattain pieni ja solujen eristäminen ja viljelmät tehtiin neljässä erässä. Voima-analyysin mukaan n-määrä oli kuitenkin riittävä, ja tuloksiemme mukaan neljän eri eristämiskerran välillä ei ainakaan saadussa solusaalissa ollut eroja. Soluviljelmien kontaminaatioiden takia n-määrä putosi entisestään: 50 operoidusta rotasta 47 rottaa pysyi mukana tutkimuksessa solujen eristämiseen asti, mutta näistä 10 kontaminoitui, pääosin tutkimuksen alussa ja 1. jaon jälkeen. Kontaminaation aiheuttamat menetykset eri ryhmissä pystyttiin kuitenkin kompensoimaan myöhemmissä tutkimuserissä, joten kontaminaatiot eivät vaikuttaneet tutkimuksen voimaan. Ryhmien koko tosin vaihteli kontaminaatioiden takia, mikä aiheutti haastetta tilastollisiin analyysiin. Analyysit tehtiin lisäksi teknisten vaatimusten takia vain yhdessä aikapisteessä, kahdeksan viikkoa murtuman jälkeen, mikä esti ajallisten trendien tarkemman arvion – ja jolloin sytokiini- ja proliferaatiovaiheen aikaiset systeemiset vaikutukset eivät enää olleet välttämättä havaittavissa.

Tutkimuksessamme käytetyt menetelmät ovat kaikki yleisesti hyväksytyjä ja käytössä olevia, mutta niiden soveltaminen kliiniseen potilasmateriaaliin on epävarmaa. Mineralisoituneen osteoidin määrää mitattiin von Kossan värjäyksellä, jota on kuitenkin kritisoitu, sillä se värjää

viljelmästä fosfaatin, ei kalsiumia. Tästä syystä eräät asiantuntijat katsovat, ettei sitä voi yksinään käyttää mineralisaation mittarina, vaan sen lisäksi tai sijasta tulisi käyttää tarkempia menetelmiä, kuten elektronimikroskopiaa, röntgendiffraktiota tai Fourier-muunnosinfrapunaspektroskopiaa (Bonewald ym. 2003). Von Kossa -värjäys on kuitenkin menetelmänä helppo ja käytännössä solubiologiassa kuitenkin mineralisoitumisen standardimittaus, ja sen takia sitä tässäkin tutkimuksessa käytettiin. Rottien femureiden stabiloimiseen yleisimmin käytettyjä Kirschner-piikkejä on myös kritisoitu, sillä ne eivät tarjoa aksiaalista tai rotaatiostaalista stabilisaatiota, kuten levytykset, ja saattavat vaurioittaa luuydinonteloa (Histing ym. 2011).

Tutkimuksessamme on myös useita vahvuuksia. *Ex vivo* -asetelmiseen tutkimus on ensimmäinen laatuaan tsoledronaattitutkimuksessa, ja käytetty tsoledronaattiannos vastasi kliinisesti osteoporoosin hoidossa käytettävää annosta. Lisäksi tutkimuksessamme rotat jaettiin kuuteen erilaiseen ryhmään tsoledronaattiannostelun ja murtuman suhteen, mikä mahdollistaa monipuolisemmat analyysit eri tekijöiden vaikutuksesta.

Yhteenvetona voidaan todeta, että tutkimuksemme osoittaa sen, että osteoporoosin hoitoannoksia vastaava viikoittain *in vivo* annosteltu tsoledronaatti lisää mesenkymaalisten kantasolujen jakautumistaipumusta, mutta ei niiden erilaistumista osteoblasteiksi *ex vivo*. Vaikutus on systeeminen, ja se on havaittavissa jopa seitsemän viikkoa lääkeaineen antamisen jälkeen. Lisätutkimus suuremmilla aineistolla olisi kuitenkin tarpeen, jotta saataisiin selville, vaikuttavatko bisfosfonaatit mesenkymaalisiin kantasoluihin ja osteoblasteihin suorasti vai epäsuorasti, ja millä mekanismeilla.

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

LÄHTEET

Abrahamsen B, Einhorn TA. Beyond a reasonable doubt? Bisphosphonates and atypical femur fractures. *Bone* 2012;50(5):1196-200.

Allen MR, Burr DB. Bisphosphonate effects on bone turnover, microdamage, and mechanical properties: what we think we know and what we know that we don't know. *Bone* 2011;49(1):56-65.

Alm JJ, Koivu HM, Heino TJ, ym. Circulating plastic adherent mesenchymal stem cells in aged hip fracture patients. *J Orthop Res* 2010;28(12):1634-1642.

Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 2011 Jul;49(1):50-5.

Bonewald LF ym. Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation. *Calcified Tissue International* 2003;72:537-547.

Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal. *Bone J Orthop Res* 1984;2(1):97-101.

Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8(3):133-43.

Colón-Emeric C, Nordsletten L, Olson S ym. Association between timing of zoledronic acid infusion and hip fracture healing. *Osteoporos Int* 2011;22(8): 2329-2336.

Cornish J, Bava U, Callon KE ym. Bone-bound bisphosphonate inhibits growth of adjacent non-bone cells. *Bone* 2011; 49(4): 710-716.

Corrado A, Cantatore FP, Grano M ym. Neridronate and human osteoblasts in normal, osteoporotic and osteoarthritic subjects. *Clin Rheumatol* 2005;24(5):527-34.

Corrado A, Neve A, Maruotti N ym. Dose-dependent metabolic effect of zoledronate on primary human osteoblastic cell cultures. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28(6):873-9.

D'Aoust P, McCulloch CA, Tenenbaum HC ym. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res* 2000;302:353-63.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008;26(9):2287-2299.

Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci* 2012;4:2302-2321.

Dezawa Mari. Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases. *Medical Molecular Morphology* 2008;41:14-19.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I ym. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.

Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clinic Proceedings* 2008;83(9):1032-1045.

Ebert R ym. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone* 2009;44(5):858-864.

Eriksen EF, Lyles KW, Colón-Emeric CS ym. Antifracture efficacy and reduction of mortality in relation to timing of the first dose of zoledronic acid after hip fracture. *J Bone Miner Res* 2009;24:1308–1313.

Eskelund V, Plum CM. Experimental investigations into the healing of fractures. I. Healing of fractures in the femoral diaphysis in rats. *Acta Orthop Scand* 1949;19:433-475

Evans CE. Bisphosphonates modulate the effect of macrophage-like cells on osteoblast. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(5):554-63.

Freemantle N, Cooper C, Diez-Perez A ym. Results of indirect and mixed treatment comparison of fracture efficacy for osteoporosis treatments: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2013;24(1): 209-217.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova A ym. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230–247.

Fromigué O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest* 2002;25(6):539-546.

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G ym. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 1998;22(5):455-461.

- Gourion-Arsiquaud S, Allen MR, Burr DB ym. Bisphosphonate treatment modifies canine bone mineral and matrix properties and their heterogeneity. *Bone* 2010;46:666–72.
- Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI ym. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 2009;27(8):1887-98.
- Greiner S, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G ym. Cocultures of osteoblasts and osteoclasts are influenced by local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating. *J Biomed Mater Res A* 2009;91(1):288-295.
- Haider MT, Holen I, Dear TN ym. Modifying the osteoblastic niche with zoledronic acid in vivo-potential implications for breast cancer bone metastasis. *Bone* 2014;66:240-50.
- Hale LV, Galvin RJ, Risteli J ym. PINP: a serum biomarker of bone formation in the rat. *Bone* 2007;40(4):1103-9.
- Harding AK, W-Dahl A, Geijer M ym. A single bisphosphonate infusion does not accelerate fracture healing in high tibial osteotomies. *Acta Orthop* 2011;82(4):465-470.
- 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(2):458-468.
- Histing T, Garcia P, Holstein JH ym. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011;49(4):591-9.
- Hoemann C, El-Gabalawy H, McKee M. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie* 2009;57(4):318-323.
- Horwitz EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy, *Arch Med Res* 2003;34(6):600-606.
- Im GI, Qureshi SA, Kenney J ym. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25(18):4105-4115.
- Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 2012;10(6):709-16.

Kellinsalmi M, Mönkkönen H, Mönkkönen J ym. In vitro comparison of clodronate, pamidronate and zoledronic acid effects on rat osteoclasts and human stem cell-derived osteoblasts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97(6):382-391.

Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care* 2013;2(6):306-316.

Koch FP, Merkel C, Al-Nawas B ym. Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner--a quantitative in vitro gene expression analysis of *Dlx5*, *Runx2*, *OCN*, *MSX1* and *MSX2*. *J Craniomaxillofac Surg* 2011;39(8):562-569.

Koch FP, Merkel C, Ziebart T ym. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Investig* 2012;16(1):79-86.

Kuroda Y, Kitada M, Wakao S ym. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Arch Immunol Ther Exp* 2011;59(5):369-378.

Landesberg R, Eisig S, Fennoy I ym. Alternative indications for bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(5 Suppl):27-34.

Li J, Mori S, Kaji Y ym. Concentration of bisphosphonate (incadronate) in callus area and its effects on fracture healing in rats. *J Bone Miner Res* 2000;15(10):2042-2051.

Li J, Mori S, Kaji Y ym. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. *J Bone Miner Res* 1999;14(6):969-979.

Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF ym. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 2011;35(9):1271-80.

Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication, *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):201-209.

McDonald MM, Dulai S, Godfrey C ym. Bolus or weekly zoledronic acid administration does not delay endochondral fracture repair but weekly dosing enhances delays in hard callus remodeling. *Bone* 2008;43:653-662.

Meloan SN, Puchtler H. Chemical mechanisms of staining methods: von Kossa's technique. What von Kossa really wrote and a modified reaction for selective demonstration of inorganic phosphate. *J Histotechnol* 1985;8:11-13.

Meyer RA Jr, Tsahakis PJ, Martin DF ym. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 2001;19(3):428-35.

Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, Mönkkönen J. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol* 2006 Feb;147(4):437-45.

Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y ym. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 1996;18(1):9-14.

Ohe JY, Kwon YD, Lee HW. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Investig* 2012;16(4):1153-1159.

Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 2010;77(1):4-12.

Orriss IR, Key ML, Colston KW ym. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem* 2009;106(1):109-118.

Osteoporoosi (online). Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Endokrinologiyhdistyksen ja Suomen Gynekologiyhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2014 (viitattu 19.2.2015). Saatavilla Internetissä: www.kaypahoito.fi.

Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T ym. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(2):453-8.

Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T ym. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 2008;26(1):223-34.

Pan B, To LB, Farrugia AN ym. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. *Bone* 2004a;34(1):112-123.

Pan B, Farrugia AN, To LB ym. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 2004b; 19(1): 147-154.

Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanakul K, Satravaha Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *J Oral Pathol Med* 2012;41(9):713-20.

Pitchford SC, Furze RC, Jones CP, Wengner AM, Rankin SM. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell* 2009;4(1):62-72.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-147.

Plotkin LI, Bivi N, Bellido T. A bisphosphonate that does not affect osteoclasts prevents osteoblast and osteocyte apoptosis and the loss of bone strength induced by glucocorticoids in mice. *Bone* 2011;49(1):122-127.

Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S ym. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res* 2009;15(18):5829-5839.

Recker RR, Delmas PD, Halse J ym. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. *J Bone Miner Res* 2008;23:6–16.

Recknor C. Zoledronic acid for prevention and treatment of osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2011;12(5):807-815.

Ribeiro V, Garcia M, Oliveira R ym. Bisphosphonates induce the osteogenic gene expression in co-cultured human endothelial and mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 2014;18(1):27-37.

Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH ym. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 2010;25(3):606-616.

Russell RG. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 2007;119 Suppl 2:S150-62.

Sahni M, Guenther HL, Fleisch H ym. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993;91(5):2004-2011.

Shi, C. Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology* 2012;136:133–138.

Shoji S ym. Bisphosphonate inhibits bone turnover in OPG(-/-) mice via a depressive effect on both osteoclasts and osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2010; 87(2): 181-192.

Singer FR, Eyre DR. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleve Clin J Med* 2008;75(10):739-750.

Sivasubramaniyan K, Lehnen D, Ghazanfari R ym. Phenotypic and functional heterogeneity of human bone marrow- and amnion-derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1266:94-106.

Soki FN, Li X, Berry J ym. The effects of zoledronic acid in the bone and vasculature support of hematopoietic stem cell niches. *J Cell Biochem* 2013;114(1):67-78.

Stenderup K, Justesen J, Clausen C ym. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;33(6):919-926.

Stevens A, Lowe J. *Musculoskeletal System*. Kirjassa: Stevens A, Lowe J. *Human Histology*, 3rd ed. Elsevier Mosby 2005, s. 251-258.

Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2008;19(12):1683-704.

Szulc P. The role of bone turnover markers in monitoring treatment in postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2012;45(12):907-19.

Sørensen MG, Henriksen K, Schaller S ym. Biochemical markers in preclinical models of osteoporosis. *Biomarkers* 2007;12(3):266-86.

Valenti MT, Giannini S, Donatelli L ym. The effect of risedronate on osteogenic lineage is mediated by cyclooxygenase-2 gene upregulation. *Arthritis Res Ther* 2010;12(4):R163.

Walter C, Pabst A, Ziebart T ym. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 2011;17(2):194-199.

Vandyke K, Dewar AL, Diamond P ym. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib dysregulates bone remodeling through inhibition of osteoclasts in vivo. *J Bone Miner Res* 2010;25(8):1759-70.

Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P ym. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;121(2):368-74.

Viereck V, Emons G, Lauck V ym. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:680–686.

Vitté C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996;137(6):2324-2333.

Välimäki VV, Moritz N, Yrjans JJ ym. Effect of zoledronic acid on incorporation of a bioceramic bone graft substitute. *Bone* 2006;38(3):432-443.

Yu YY, Lieu S, Hu D ym. Site specific effects of zoledronic acid during tibial and mandibular fracture repair. *PLoS One* 2012;7(2):e31771.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P ym. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279-4295.