

Sara Ingalsuo

LUUN RESPORPTIOSYKLIN SIRKADIAANINEN SÄÄTELY

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2022

Sara Ingalsuo

LUUN RESPORPTIOSYKLIN SIRKADIAANINEN SÄÄTELY

Biolääketieteen laitos

Kevätlukukausi 2022

Vastuuhenkilö: yliopistonlehtori, dosentti Jorma Määttä

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

INGALSUO SARA: Luun resorptiosyklin sirkadiaanien säätely

Syventävien opintojen kirjallinen työ s.34

Biolääketieteen laitos

Toukokuu 2022

Kirjallisuuskatsauksessa aiheena on luun resorptiosyklin sirkadiaaninen säätely. Luun uusiutumista sääteleviä tekijöitä on paljon ja se, miten vuorokausirytmii tähän mutkikkaaseen prosessiin vaikuttaa on erityisen kiinnostuksen kohteena tässä kirjallisuuskatsauksessa. Huomiota kiinnitetään niin kutsuttuihin laitakelloihin, jotka ilmentävät sirkadiaanista rytmiä elimistön perifeerisissä kudoksissa. Ne säätelevät kudosten vuorokausirytmii sekä yksin että yhdessä suprakiasmaattisen tumakkeen, koko elimistön vuorokausirytmii vastavaan keskuskellon kanssa.

Vuorokausirytmii liittyy vahvasti myös ongelmiin unen kanssa sekä vuorotyöhön ja edelleen luun terveyteen. Vuorokausirytmii säätely sekä laita- että keskuskellojen osalta vaikuttavat luun uusiutumiseen sekä suoraan että esimerkiksi hormonien välityksellä. Luun uusiutumisen säätely voidaan jakaa sekä systeemiseen että paikalliseen säätelyyn, jotka ovat hyvin herkkiä prosesseja.

Tarkoituksen on koota olemassa olevaa tutkimustietoa aiheesta. Aineisto on kerätty Pubmed-tietokannasta ja hakusanoina on käytetty mm. bone resorption, circadian clock, circadian rhythm ja bone remodeling. Artikkelit on julkaistu vuosien 2003 ja 2020 välillä. Lisäksi lähteinä on käytetty esimerkiksi Käypä hoitosuositusta sekä Duodecimin ja Työterveyslaitoksen kirjoja. Lisää tietoja laitakellojen toiminnasta ja etenkin niiden vaikutuksesta luukudoksen toimintaan tarvitaan edelleen.

Avainsanat: luu, resorptiosykli, uusiutuminen, sirkadiaaninen, vuorokausirytmii

Sisällysluettelo

1. JOHDANTO	5
2. LUU.....	5
2.2 Tärkeimmät luusolupopulaatiot	8
2.2.1 Luuta muodostavat solut	8
2.2.2 Luuta hajottavat solut.....	9
2.3 Osteoporoosi.....	9
3. LUUN HOMEOSTAASI	10
3.1 Uusiutuminen	11
3.2 Systeminen säätely	13
3.3 Paikallinen säätely.....	15
4. ELIMISTÖN SIRKADIAANISEN RYTMIN SÄÄTELY	18
4.1 Suprakiasmaattinen tumake.....	18
4.2 TTO-säätelyketju ja kellogeenien toiminta	19
5. LAITAKELLOT	21
6. LAITAKELLOJEN VAIKUTUS RESORPTIOSYKLIIN.....	22
7. KLIININEN MERKITYS	24
7.1 Vuoro- ja yötyö	25
8. YHTEENVETO JA LOPPUPÄÄTELMÄT	28
LÄHTEET.....	29

1. Johdanto

Tässä syventävässä työssä käsitellään sirkadiaanisen säätelyn vaikutusta luun homeostaasin ylläpitoon ja sitä kautta luun resorptiosyklin säätelyyn. Työ toteutetaan kirjallisuuskatsauksena ja erityinen huomio on niin kutsutuissa laitakelloissa, jotka toimivat resorptiosyklin säätelyssä sekä suprakiasmaattisen tumakkeen keskuskellon kanssa, että itsenäisesti. Laitakelloiksi kutsutaan soluja, jotka ilmentävät sirkadiaanista rytmiä elimistön perifeerisissä kudoksissa kuten esimerkiksi lihaksissa, maksassa ja luussa.

Nukkumisesta, sen tärkeydestä ja terveysvaikutuksista on saatu entistä enemmän tietoa viime vuosina. Sekä oikea-aikainen että sopivan mittainen uni on tärkeää elimistön normaalille toiminnalle. Enenevässä määrin kuitenkin tehdään yö- ja vuorotyötä, valvotaan myöhään eikä noudateta oman elimistön suosimaa unirytmää. Älylaitteiden käyttö ja näytön tuijottelu myöhään yöhön sekä aikaiset aamuherätykset vähentävät saadun unen määrää. Vaikka unen tärkeys ja sen terveysvaikutukset tiedetään, on se silti usein ensimmäinen asia mistä tingitään muun elämän ollessa kiireistä. Luun uusiutumisen sirkadiaaninen rytmisyys on myös tunnettu asia. Tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään siihen, miten valvominen ja oikea-aikaisen yönunen estäminen vaikuttavat luun uusiutumiseen ja metaboliaan, mitä lyhyeksi jäävät unet tekevät nuoren luun terveydelle ja miten laitakellot vaikuttavat tähän kokonaisuuteen. Ennen sitä käydään tiivistetysti läpi luun rakennetta ja toimintaa, sillä sen ymmärtäminen on keskeistä, jotta voidaan tarkastella unen vaikutusta luun prosesseihin.

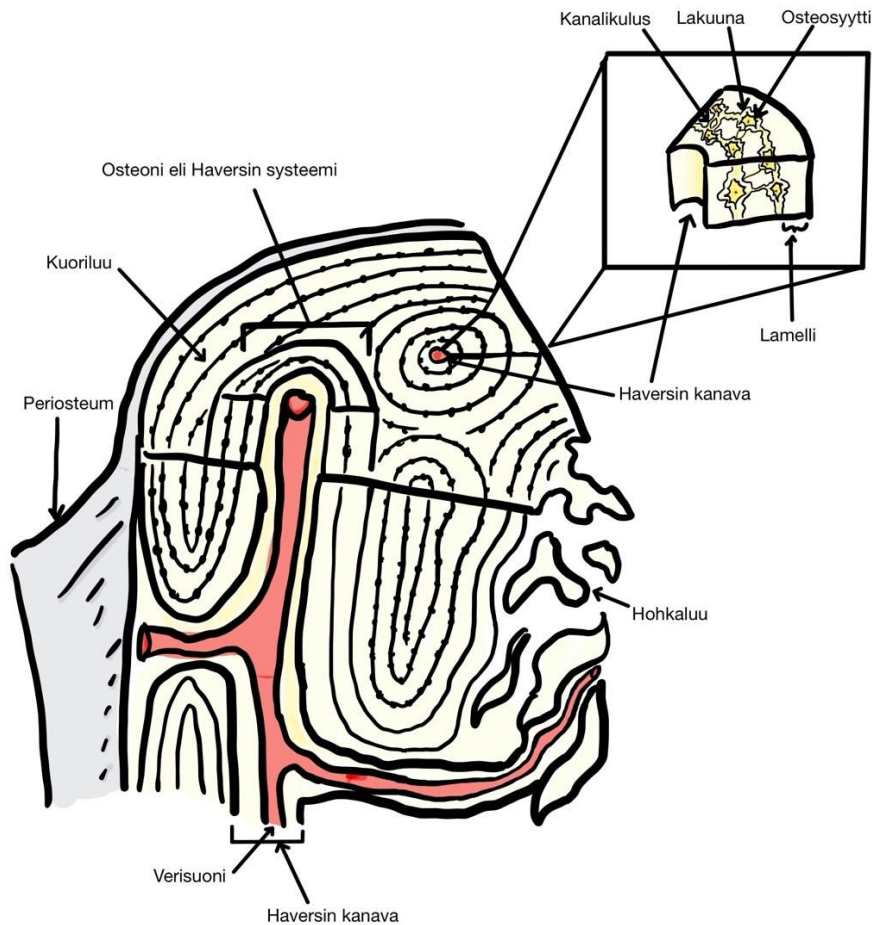
2. Luu

Luukudos on tukikudosta, joka uusiutuu ja elää jatkuvasti. Se on osa ihmisen tuki- ja liikuntaelimistöä ja tärkeässä asemassa elimistön suojaamisessa, liikkeen tuottamisessa, kalsium- ja fosfaattivarastona, endokriinisenä elimenä sekä kantasolujen tuottajana luuytimeästä. Luutyyppejä on kahdenlaisia, kortikaali- eli kuoriluuta sekä trabekulaarista- eli hohkaluuta. (Kröger ja Lamberg-Allardt 2004, Chang ym. 2017, Yu ja Scadden 2016.)

2.1 Luukudoksen yleinen rakenne

Luukudos koostuu matriksista eli soluväliaineesta sekä soluista. Luukudoksesta noin 65 % on epäorgaanista soluväliainetta sisältäen pääosin kalsiumhydroksiapatiittia ja pieniä määriä kalsiumkarbonaattia- ja sitraattia. Orgaaninen soluväliaine koostuu tyypin 1 kollageenista, proteoglykaaneista, osteokalsiinista ja muista proteiineista sekä näihin sidotusta vedestä. Kollageeni yhdessä hydroksiapatiitin kanssa muodostaa lujan mutta joustavan rakenteen, joka kestää voimakastakin räsitusta. (Chang ym. 2017, Gartner 2017.)

Luun solut voidaan jakaa toimijasoluihin, joita ovat osteoklastit ja osteoblastit sekä säätelijäsoluihin, joita ovat osteosyytit ja pintasolut. Yhdessä luuta muodostavat ja hajottavat solut muodostavat väliaikaisen, monisoluisen perusyksikön, jota kutsutaan nimellä basic multicellular unit, BMU. BMU pitää huolta luun rakenteen yhtenäisyydestä. Sen välityksellä luun resorptio ja synteesi ovat kiinteästi yhteydessä toisiinsa. (Jilka 2003.) Monisoluisen perusyksikkö BMU muodostaa edelleen luun toiminnallisen yksikön, osteonin. Osteoni eli Haversin systeemi muodostuu järjestäytyneistä osteosyyteistä. Systeemin keskellä kulkee Haversin kanava, jossa on verisuonia ja hermoja ja edelleen tätä ympäröivät osteosyytit rengasmaisessa muodostelmassa omissa tiloissaan eli lakuunoissa. Lakuunoiden väliin jäävää sipulimaisesti kerrostunutta aluetta kutsutaan lamelliiksi. Osteosyytit ovat edelleen yhteydessä toisiinsa luusolukanavien eli kanalikulusten välityksellä. Haversin kanavien välillä kulkevia kanavia kutsutaan Volkmannin kanava. (Gartner 2014.)



Luun pinnalla on sitä verhoava kalvo, periosteum eli luukalvo, jossa kulkee verisuonia ja hermoja. Luukalvossa on kaksi kerrosta, fibroottinen jossa kollageenisäikeet ja fibroblastit sijaitsevat sekä sisempänä osteogeeninen kerros, jossa on osteoblasteja ja osteoblastien kantasoluja. Luun sisällä on endosteum eli luun sisäkalvo. (Dwek 2010, Gartner 2014.)

Kaikkia luita peittää kuoriluu, joka on tiivistä luuta ja sijaitsee heti periosteumin alapuolella. Siinä on tiivis lamellaarirakenne ja kuoriluu on mekaanisesti hyvin lujaa (Cooper ym. 2016). Trabekulaari- eli hohkaluu taas on syvemmällä koostuen palkkirakenteista ja on metabolisesti hyvin aktiivista (Oftadeh ym. 2015).

Osteogeneesi eli luun muodostuminen tapahtuu joko intramembraanisti eli suoran luutumisen kautta tai endokondriaalisesti eli välillisen luutumisen kautta. Intramembraanisessa luutumisessa mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat suoraan osteoblasteiksi, jolloin niiden angiogeneesiä edistävät tekijät edesauttavat verisuonten muodostumista ja edelleen luun muodostumista. Endokondriaalisessa luun muodostuksessa on rustoinen välivaihe ennen varsinaisen luun muodostumista.

Molemmissa muodostumistavoissa samaan aikaan tapahtuu angiogeneesi eli uusien verisuonten muodostuminen jo olemassa olevista. (Stegen ja Carmeliet, 2018.)

2.2 Tärkeimmät luusolupopulaatiot

Luun soluja on neljää eri tyyppiä, osteoklastit- ja blastit, osteosyytit sekä luun pintasolut. Näiden lisäksi on osteoblastien esisoluja, jotka ovat periosteumissa, endosteumissa ja Haversin kanavien reunoilla (Gartner 2017).

2.2.1 Luuta muodostavat solut

Luuta muodostavia soluja ovat osteoblastit. Ne ovat yksitumaisia, polaaraisia soluja, jotka ovat mesenkymaalista alkuperää ja voivat erilaistua edelleen osteosyyteiksi eli varsinaisiksi luusoluiksi tai luun pintasoluiksi. Pintasolut muodostavat luun pintakerroksen, säätelevät kalsiumin ja fosforin kulkeutumista luuhun sekä aktivoivat osteoklasteja. Kun osteoblastit ovat huolehtineet luun mineralisaatiosta, osa niistä jää soluväliaineen sisään muodostaen osteosyyttejä eli varsinaisia luusoluja.

Osteosyytit kommunikoivat toisensa kanssa kanalikulusten kautta solunulkoisesti ja aukkoliittosten kautta solusisäisesti. Ne ovatkin luukudoksen viestinviejiä, jotka signaloivat osteoklasteille aistiessaan mekaanista rasitusta ja edesauttaakseen mikromurtumien korjaamiseksi. (Gartner 2014.) Kaksi BMP-2 riippuvaista transkriptiotekijää, Cbfa1/Runx2 ja osterix saavat aikaan osteoblastien erilasitumisen osteosyyteiksi. Kun osteoblastit ovat erilaistuneet osteosyyteiksi, ne eivät enää eritä alkalista fosfataasia ja jäävät mineralisoidun soluväliaineen sisälle lakuunaansa. (Gartner 2017.) Osteosyytit muodostavat myös valtaosan reseptorivälitteisesti aktivoivasta tumatekijä kappa-B:stä (engl. receptoractivated nuclear factor kappa- B, RANKL). RANKL:lla on tärkeä rooli sekä osteoklastien toiminnassa, että lymfosyyttien kehityksessä. (Ponzetti ja Rucci 2019.)

Osteoblastit vapauttavat erilaisia kasvutekijöitä ja signaalimolekyylejä, muun muassa insuliininkaltaista kasvutekijä-1:stä (engl. insulin-like growth factor, IGF-1), alkalista fosfataasia, osteokalsiinia, osteonektiiniä, osteoprogenitoria ja RANKL:ia. Näin osteoblastit säätelevät esimerkiksi osteoklastien toimintaa ja luun mineralisaatiota. Osteoblastit myös tuottavat tyyppin I kollageenia, proteoglykaaneja sekä

glykosaminoglykaaneja eli luun soluväliainetta sekä aiheuttavat hydroksiapatiittikiteiden sakkautumisen kollageenisäikeiden joukkoon. (Gartner 2017.)

Osteoblastit erilaistuvat mesenkymaalisista kantasoluista peräisin olevista osteoblastien esisoluista monien eri tekijöiden säatelemänä. Näitä ovat esimerkiksi transformoiva kasvutekijä γ (TGF- γ), joka aktivoi esisolujen erilaistumisen ja on luun muodostuksessa välttämätön sytokiini. Tämän lisäksi erilaistumiseen vaikuttaa luun morfogeeninen proteiini-6 (BMP-6) ja jossain määrin myös BMP-2 ja BMP-4. (Gartner 2017.)

2.2.2 Luuta hajottavat solut

Osteoklastit ovat monitumaisia soluja, jotka syntyvät luuytimessä olevista hematopoieettisten pluripotenttien kantasolujen myeloidista monosyytti-makrofagilinjasta (Ono ja Nakashima 2018). Ne erittävät resorptiolakuunaan suolahappoa, joka aikaansaa luun mineraalien liukenemisen ja tätä kautta luun hajoamisen (Gartner 2017). Suolahapon lisäksi osteoklastit erittävät katepsiini K:ta ja metalloproteinaaseja (MMP) (Ono ja Nakashima 2018). Osteoklastit osallistuvat hematopoieettisten kantasolujen säätelyyn sekä suoraan että välillisesti osteoblastien kautta (Ponzetti ja Rucci 2018).

2.3 Osteoporoosi

Luun sairauksia on paljon, mutta tässä esitellään tämän kirjallisuuskatsauksen kannalta tärkein eli osteoporoosi. Osteoporoosiin kuten muihinkin luun sairauksiin vaikuttaa usein häiriintyminen luukudoksen uusiutumissyklin tasapainossa.

Osteoporoosi on luuston sairaus, joka aiheuttaa sen lujuuden heikkenemistä. National Institutes of Health määrittelee osteoporoosin luun lujuuden heikkenemiseksi, mikä altistaa murtumalle. WHO:n määritelmän mukaan osteoporoosissa luun tiheys lannerangassa tai lonkassa on vähintään 2,5 keskihajontaa pienempi kuin 20–40-vuotiaiden naisten kesimääräinen luun tiheys. Luun tiheyden pienenemiseen vaikuttaa luun vähentynyt mineraalimäärä sekä rakenteen muutos. Sairaus on selvästi yleisempi naisilla kuin miehillä ja sen syntyy

vaikuttavat perimän lisäksi suuri joukko riskitekijöitä kuten esimerkiksi tupakointi, vähäinen liikunta ja riittämätön D-vitamiinin saanti. (Osteoporoosi: Käypä hoito -suositus, 2020.) Postmenopausaalisilla naisilla tärkein syy osteoporoosin synnylle on estrogeenin väheneminen. Osteoporoosiin liittyy myös lisääntynyt sytokiinien määrä, jotka vaikuttavat tulehduksen ylläpitoon. (Pozetti ja Rucci 2019.) Menopausin jälkeen luussa olevien BMU:iden määrä lisääntyy ja niiden toiminta painottuu luun määrää vähentävästi (Eastell ja Szulc 2017).

Osteopeniassa luun tiheys on vähentynyt ja tilaa voidaankin kutsua osteoporoosin esiateeksi. WHO:n määritelmässä osteopeniassa luun tiheys on 1–2,5 keskihajontaa pienempi kuin luun huipputiheys. (Osteoporoosi: Käypä hoito -suositus, 2020.) Osteopetroosissa taas luun mineraalitiheys kasvaa liiaksi. Sairaus on aineenvaihdunnallinen, joko perinnöllinen tai hankittu. Perinnöllisessä muodossa taustalla ovat usein geenivirheet, jotka vaikuttavat osteoklastien kykyyn happamoittaa resorptiolakuunaa. (Mäkitie ja Välimäki 2010.)

3. Luun homeostaasi

Aikuisiällä, luukudoksen kasvun päätyttyä muutokset luun rakenteessa tapahtuvat remodellaation eli uudistumisen kautta (Mäkitie ja Välimäki 2010). Luukudoksen homeostaasia pitää yllä kaksi vastakohtaista prosessia, luun resorptio ja synteesi. Jotta luun uudistuminen olisi normaalia, näiden kahden prosessin tulee olla tarkasti säädeltyjä ja tasapainossa. (Dudek ja Meng, 2014.) Kuten useimmat homeostasiaa säätelevät prosessit, toimii uusiutuminenkin sirkadiaanisessa rytmissä (Fu ym. 2005).

Terveellä aikuisella luukudos on jatkuvan uudistumisen alla, mikä onkin luuston aineenvaihdunnan tärkein ominaisuus. Kuoriluussa uusiutumissykli on hohkaluuta pidempi, sillä hohkaluu on metabolisesti aktiivisempaa. Luun uusiutuminen tapahtuu pienissä erissä ja näissä voidaan erotella neljä eri vaihetta. Aktivaatiovaihe, resorptiovaihe, palautumisvaihe ja synteesivaihe. Uusiutumisella on kolme tarkoitusta, mineraalitasapainon ylläpito, sopeutuminen mekaaniseen rastiukseen ja mikromurtumien korjaaminen. Luun uusiutumiseen vaikuttavat siihen kohdistuva raskaus, mahdolliset infektiot ja metaboliset tekijät. (Gartner 2017, Mäkitie ja Välimäki 2010.) Kokonaisuudessaan uusiutumisprosessiin menee neljästä viiteen kuukautta (Eastell ja Szulc 2017).

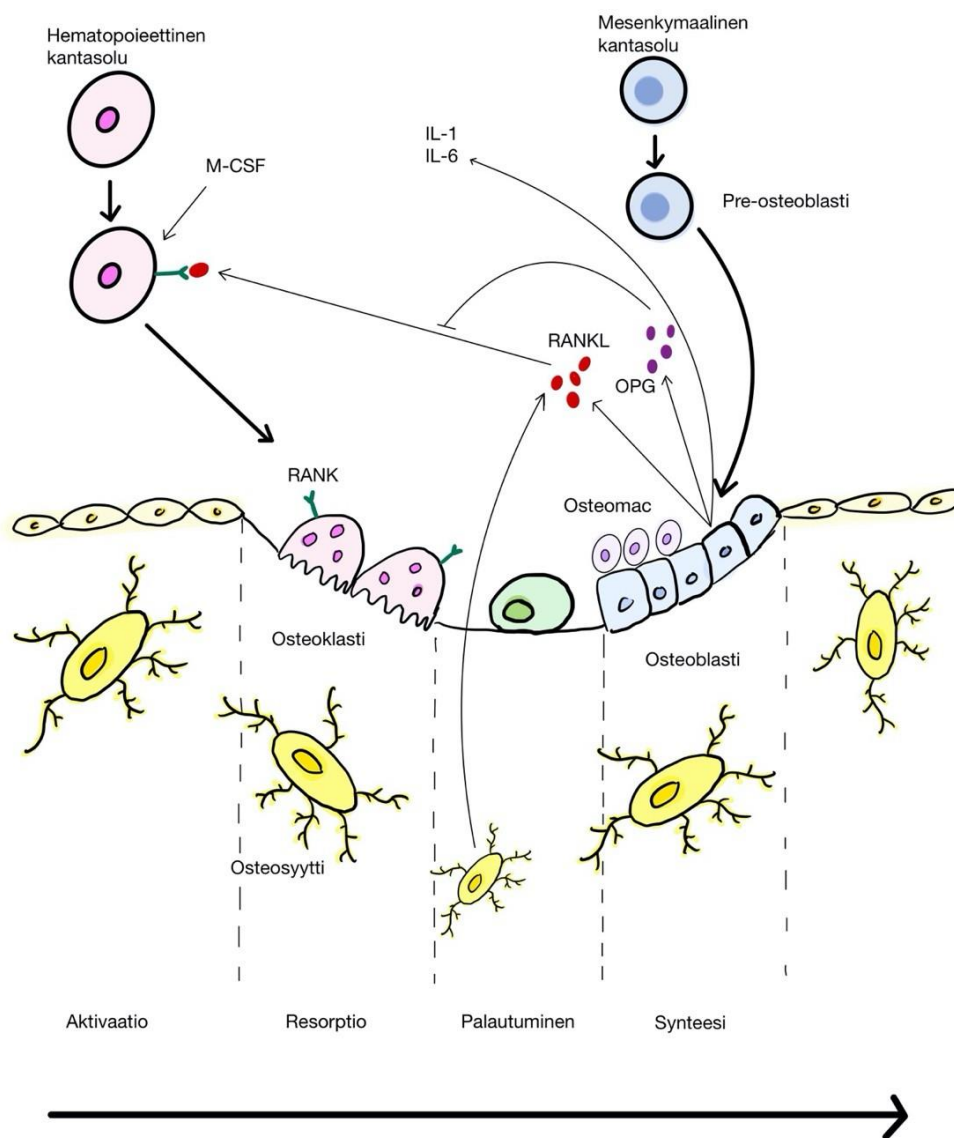
Luun uudistumiseen osallistuvia solutyyppejä ovat osteoblastit, osteoklastit, luun pintasolut, osteosyytit, neutrofiilit, monosyytit ja makrofagit, dendriittisolut ja T- ja B-lymfosyytit (Xiao ym. 2016). Viime aikoina on saatu uutta tietoa siitä mikä kaikki vaikuttaa ja säätelee luumassan ylläpitoa ja luun uudistumista. Keskeinen tekijä on immuunijärjestelmä, jota tutkitaan osteoimmunologiassa. Luun uusiutumisen säätely on selvästi monimutkaisempi prosessi kuin mitä alun perin ajateltiin ja siihen osallistuu runsain määrin erilaisia tekijöitä. (Ponzetti ja Rucci 2019.)

3.1 Uusiutuminen

Luun uusiutumista edeltää latenttivaihe, jonka aikana osteosyytit aktivoivat luun pintasoluja, jotka edelleen stimuloivat osteoklastien erilaistumista ja paljastavat luun pintaa. Aktivaatiovaiheessa, kun luuytimen osteoklastien kantasolut erilaistuvat osteoklasteiksi ja aloittavat luun hajottamisen alueella minkä luun pintasolut ovat paljastaneet. (Ponzetti ja Rucci 2019.) Luun pintasolujen päällä on osteaalisia makrofageja, osteomaceja (Heino ja Määttä 2018, Bozec ja Soulat 2017). Osteaaliset makrofagit esiintyvät osteoblastien välittömässä yhteydessä sekä endostealisesti että periostealisesti (Heino ja Määttä 2018). Osteoklastien erilaistumiseen tarvitaan myös osteoblastien erittämiä aktivaattoreita, interleukiini 6:tä (IL-6), interleukiini 1:tä (IL-1), osteoprotegeriiniä (OPG), RANKL:ia ja kapp-B:n tumatekijän reseptoria (RANK) (Gartner 2017). Preosteoklastien kehittymiselle myös makrofagien erittämä M-CSF (engl. macrophage colony-stimulating factor) on tärkeää (Ponzetti ja Rucci 2019.) Osteoklasti hajottaa luuta suolahappoa erittämällä, jolloin luussa olevat mineraalit liukenevat. Orgaaninen materiaali pilkotaan katepsiini K:n ja metalloproteiinaasien avulla (Mäkitie ja Välimäki 2010). Jäljelle jäänyttä kuoppaa kutsutaan Howshipin lakuunaksi (Gartner 2017). Kun osteoklastit ovat tehneet tehtävänsä, ne irrottautuvat luusta ja käyvät läpi apoptoosin (Ponzetti ja Rucci 2019).

Palautumisvaiheessa yksitumaiset makrofagien kaltaiset solut valmistelevat jäljelle jääneen pinnan sellaiseksi, että osteoblastit voivat aloittaa uuden luun synteisiin. Ne siivoavat osteoklastien jälkeensä jättämän soludebriksen ja houkuttelevat osteoblastit lakuunaan. (Pozetti ja Rucci 2019.)

Synteesivaihe luussa kestää jopa kuusi kuukautta. Sen aikana osteoblastit täyttävät Howshipin lakuunan orgaanisella matriksilla ja mineralisoivat sen. (Ponzetti ja Rucci 2019.) Ne tekevät työtään rakentaen uutta luuta lamelli kerrallaan, kunnes uusi osteoni on valmis (Mäkitie ja Välimäki 2010). Lopulta osteoblastit jäävät luun sisään osteosyyteiksi tai kuolevat apoptoosin kautta (Ponzetti ja Rucci 2019). Koska osteoblastien erilaistuminen osteosyyteiksi on suojattava häiriöiltä, suojaa niitä kerros osteomaceja. Ne myös huolehtivat apoptoosin läpikäyneistä osteoblasteista. (Bozec ja Soulat 2017.)



Yksinkertaistettu esitys luun uusiutumisesta eli remodelaatiosta. Uusiutuminen alkaa aktivaatiovaiheesta jatkuen resorption ja palautumisvaiheen kautta uuden luun synteesiin. Uusiutumisen tarkoituksena on luumassan ylläpito. Kuvassa esitettyjen

säätelytekijöiden lisäksi on useita muita signaalintireittejä ja molekyyliä, jotka vaikuttavat uusiutumiseen.

3.2 Systeeminen säätely

Systeemisellä tasolla luun muodostukseen vaikuttavat hormonit, esimerkiksi sukupuolihormonit, D-vitamiini, kasvuhormoni, kalsitoniini ja parathormoni, verenkierrossa esiintyvät kasvutekijät ja sytokiinit. (Gartner 2017, Mäkitie ja Välimäki 2010.)

Parathormoni, kalsitoniini ja D-vitamiini ovat tärkeitä kalsiumin säätelijöitä, joten kalsiumtason säätelyn välityksellä ne vaikuttavat luun resorptioon. Parathormonin tärkein tehtävä onkin veren kalsiumtason homeostaasin ylläpito. Parathormoni stimuloi osteoblastien erittämän RANKL:in eritystä ja vähentää OPG:n tuotantoa. Se lisää osteoblastien proliferaatiota ja erilaistumista, vähentää niiden apoptoosia sekä aktivoi luun pintasoluja. Nämä tekijät aikaansaavat luun resorption kiihtymiseen, mikä johtaa veren kalsiumtason nousun. Pitkään jatkuessaan veren korkea parathormonitaso johtaa jatkuvaan luun lisääntyneeseen resorptioon ja matala taso voi aiheuttaa luun tiheyden kasvua ja lisätä uuden luun muodostumista. (Siddiqui ja Partridge 2014.)

Kalsitoniinin vaikutus luuhun on parathormoniin verrattuna päinvastainen kalsiumin osalta. Kalsitoniini sitoutuu suoraan osteoklasteihin ja edesauttaa niiden apoptoosia, jolloin myös verenkiertoon pääsevän kalsiumin määrä pienenee luun resorption vähentyessä. (Gartner 2017, Mäkitie ja Välimäki 2010.) Onkin ajateltu, ettei kalsitoniini juuri vaikuta osteoblasteihin. On kuitenkin saatu viitteitä siitä, että kalsitoniini kasvattaisi solunulkoisen IGF-1:n ja IGF-2:n määrää ihmisellä osteoblastien kaltaisissa soluissa sekä kalsitoniinin vuorovaikutuksesta osteoblastien kanssa. (Siddiqui ja Partridge 2014.)

Sukupuolihormoneilla on keskeinen säätelijän rooli luun kasvussa. Erityisesti esterogeeni on yksi tärkeimmistä systeemisistä säätelijöistä luun metaboliassa, sekä miehillä että naisilla. Estrogeenin vaikutuksen on todettu olevan osteoklastien aktiivisuutta hillitsevä, sillä estrogeenin puute saa aikaan osteoporoosia. (Siddiqui ja Partridge 2014.) Estrogeeni vähentää osteoklastien erilaistumista hiljentämällä

RANKL:n tuotantoa sekä osteoblasteissa että T- ja B-soluissa ja lisää osteoklastien apoptoosia. Estrogeeni lisää osteoblastien elinikää ja niiden tyyppin 1 kollageenituotantoa. (Ponzetti ja Rucci 2019). Estrogeenilla on vaikutusta luun resorptioon osallistuvien sytokiinien tuotantoon, joita ovat esimerkiksi IL-1, IL-6, TNF- α , M-CSF ja prostaglandiinit (Siddiqui ja Partridge 2014).

Androgeenit vaikuttavat näin ikään suotuisasti luumassan ylläpitoon ja luun uusiutumiseen sekä miehillä että naisilla. Ne säätelevät sekä suoraan että epäsuorasti osteoblastien ja -klastien aktiivisuutta, mutta androgeenien roolista tarvittaisiin silti lisätutkimuksia molemmilla sukupuolilla. (Siddiqui ja Partridge 2014.) Tutkimuksen, jossa kohdennetulla rekombinaatiolla inaktivoitiin hiirten osteoblastien ja -syyttien estrogeenireseptorigeeni α tulokset viittasivat siihen, että naaraspuolisilla hiirillä kortikaalisen ja trabekulaarisen luun tilavuuteen vaikutti huomattavasti osteoblastien estrogeenireseptorin säätely, kun taas uroshiirissä ei estrogeenireseptoria niinkään tarvittu luun muodostumisen säätelyyn. Urospuolisilla hiirillä estrogeenireseptorin toiminta oli tärkeämpää luukudoksen ylläpidossa. (Määttä ym. 2013a.)

Hiirillä androgeenireseptoreja on sekä osteoblasteissa, osteosyyteissä ja osteoklasteissa. Uroksilla androgeenireseptorin poistaminen vähentää trabekulaarisen luun tilavuutta. Tutkimuksessa, missä myös naarashiiriltä poistettiin androgeenireseptori käytöstä, osoitti samankaltaisia tuloksia. Näin ollen androgeeneillä näyttäisi olevan hyvin keskeinen rooli myös naaraiden trabekulaarisen luun säätelyssä. (Määttä ym. 2013b.)

Luuston muodostuksessa, uudistumisessa ja luumassan lisääntymisessä myös kilpirauhashormoneilla on osansa. Hypotalamus-aivolisäke-kilpirauhasakseli säätelee erityistä, sillä kilpirauhashormoneilla on muitakin elimistön metaboliaan ja kasvuun liittyviä funktioita. Trijodityroniinin (T3) on havaittu vaikuttavan osteoblastien erilaistumista edistävästi mutta myös niiden lisääntymistä vähentävästi in vitro. Osteoklastien aktiivisuutta T3 edistää joko suoraan tai välillisesti sytokiinien kautta. (Siddiqui ja Partridge 2014.)

Glukokortikoidit vaikuttavat luun uusiutumiseen kiihdyttämällä resorpitota ja vähentämällä synteesiä. Ne vaikuttavat osteoklasteja stimuloivasti vähentämällä OPG:n synteesiä ja lisäämällä RANKL:n synteesiä pre-osteoblasteissa.

Glukokortikoidit estävät gonadotropiinien eritystä, mikä vähentää androgeenien ja estrogeenin eritystä ja edistää edelleen luun resorptiota. (Siddiqui ja Partridge 2014.)

Hypotalamuksen säätelyn alaisesti aivolisäkkeestä erittyvä kasvuhormoni säätelee kasvua suoraan omaan reseptoriinsa sitoutuen ja epäsuorasti stimuloimalla maksan ja luuston IGF-1 ekspressiota. (Siddiqui ja Partridge 2014.)

3.3 Paikallinen säätely

Paikallisesti luun homeostaasia säätelevät luusta ja läheisistä hematopoieettisista soluista vapautuvat tekijät. Keskeinen paikallinen tekijä uusiutumiskierron säätelyssä on RANK-RANKL-OPG-järjestelmä. Osteoblastit ja T-lymfosyytit tuottavat RANKL-tekijää, joka lisää osteoklastien toimintaa ja muodostusta. Osteoblastit tuottavat myös OPG:tä, joka sitoo RANKL:ia ja inhiboi näin osteoklastien toimintaa. OPG:n ja RANKL:n keskinäisestä määrästä riippuu pitkälti se, tapahtuuko luussa enemmän resorptiota vai synteesiä. (Mäkitie ja Välimäki 2010.)

Luun hajoamista edistäviä tekijöitä ovat muun muassa sytokiinit IL- α , IL-1 β , IL-6, TNF- α ja TNF- β (Mäkitie ja Välimäki 2010). Useimmat näistä saavat resorption aikaan stimuloimalla RANKL:n tuotantoa (Xiao ym. 2016). Sytokiineista TNF- α säätelee osteoklastogeneesiä suoraan RANK:sta riippumatonta reittiä sekä epäsuorasti. Epäsuora säätely tapahtuu lisäämällä RANK:n ekspressiota preosteoklasteissa sekä RANKL:n ja M-CSF:n tuottoa osteoblasteissa ja aktivoituissa T-soluilla. (Pozetti ja Rucci 2019.) Preosteoblasteihin TNF- α vaikuttaa Runx2:n kautta vähentäen niiden erilaistumista. TNF- α :ta tuottavat enimmäkseen makrofagit, mutta myös esimerkiksi aktivoitunut T-solut, fibroblastit ja endoteelisolut osallistuvat sen tuotantoon. OPG on liukoinen sytokiinireseptori jota erittävät esimerkiksi osteoblastit ja fibroblastit. Se estää RANKL:n sitoutumisen RANK:iin sitoutumalla itse RANKL:iin. RANKL/OPG:n suhde määrittää osaltaan osteoklastien aktiivisuutta. IL- α ja IL-1 β stimuloivat muiden sytokiinien ja prostaglandiinien tuotantoa sekä lisäävät RANKL:n ekspressiota. (Xiao ym. 2016.)

Prostaglandiinit ja leukotrieenit ovat lipidipohjaisia välittäjäaineita, joita tuottavat esimerkiksi makrofagit ja fibroblastit. Prostaglandiini E2, prostasykliini ja prostaglandiini F2 α stimuloivat osteoklastien erilaistumista suoraan sekä RANKL:n

kautta. Tämän lisäksi ne lisäävät uuden luun synteesiä. Prostaglandiini E2 lisää *IGF-1* ekspressiota mikä edelleen lisää kollageenin synteesiä osteoblasteissa. (Xiao ym. 2016.) Prostaglandiinit ovat lisäksi tulehduksen ja kivun välittäjäaineita.

Tulehduskipulääkkeet estävät prostaglandiinisynteesiä ja pitkään käytettynä niiden on sekä *ex vivo* että *in vivo* huomattu vähentävän luun remodellaatiota sekä heikentävän osteoblastien kasvua ja toimintaa. (Aisa ym. 2018.)

Luun morfogeeniset proteiinit (BMP) ja transformoiva kasvutekijä beeta TGF- β lisäävät tehokkaasti luun synteesiä (Mäkitie ja Välimäki 2010). Ne kontrolloivat luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista ja BMP-signaali lisää Runx2:n määrää. BMP ja TGF- β säätelevät luun uudistumista ja luumassan ylläpitoa. Vaikka TGF- β geeniperheen jäsenillä on luun synteesiä lisääviä ominaisuuksia, on niiden vaikutus monisyinen osteoblasteihin- ja klasteihin. TGF- β 1 stimuloi osteoklastien apoptoosia. TGF- β lisää varhaisten osteoblastien erilaistumista ja soluväliaineessa olevien, osteoblastien erittämien proteiinien määrää. (Siddiqui ja Partridge 2014.)

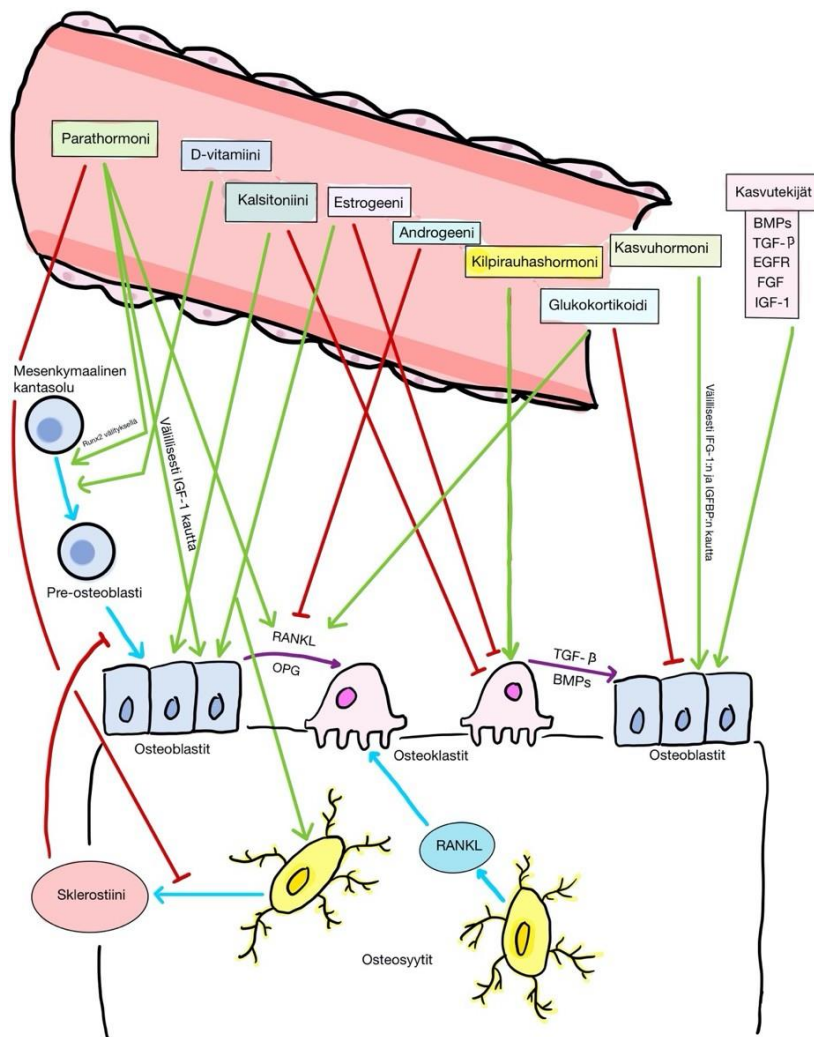
Epidermaalinen kasvutekijän (EGF) huomattiin stimuloivan luun resorptiota rotilla sekä ihmisten luuytimessä, mistä pääteltiin, että epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR) kautta kulkeva signaalireitti säätelee osteoklastogeneesiä ja luun resorptiota (Siddiqui ja Partridge 2014).

Insuliinin kaltaiset kasvutekijät lisäävät (IGF) luun muodostusta lisäämällä orgaanisen soluväliaineen syntymistä ja luusolujen jakautumista. (Mäkitie ja Välimäki 2010.) Niitä tuottaa pääasiassa maksa, joka huolehtii seerumin riittävästä IGF-pitoisuudesta. IGF välittää pääasiassa kasvuhormonin vaikutuksia. IGF-1:n päätehtävä soluväliaineessa on ylläpitää homeostasiaa ja luun massaa luun uusiutumisen yhteydessä RANKL:n ekspression säätelyn kautta. IGF1:n suhteen poistogeenisillä hiirillä (knockout) havaittiin että luun muodostus oli puutteellista ja luumassa oli vähentynyt. (Mäkitie ja Välimäki 2010.)

Luun muodostuksen säätelyssä keskeinen tekijä on Wnt/ β -kateniinisignaali (Mäkitie ja Välimäki 2010). Yhdessä BMP-signaalin ja Runx2:n kanssa reitti säätelee osteoblastien erilaistumista, luun synteesiä ja luuston kehittymistä. Mesenkymaalisisissa kantasoluissa Wnt tehostaa kantasolujen erilaistumista

osteoblastiselle linjalle estäen kantasoluja erilaistumisen kondrogeeniselle tai adipogeeniselle linjalle. Signaalintireitti vaikuttaa lisääntyneiden osteoprogenitorien erityksen välityksellä negatiivisesti luun resorptioon ja osteoklastien erilaistumiseen. (Siddiqui ja Partridge 2014.)

Osteoblastien ja osteoklastien välinen toimiva vuoropuhelu on erittäin tärkeää luun korjaamisen ja remodelaation kannalta sekä elimistön fosfaatti- ja mineraalitasapainon ylläpidossa (Gartner 2014).



Luukudoksen solujen systeeminen ja paikallinen säätely. Systeemiseen säätelyyn osallistuvat useat erilaiset hormonit ja kasvutekijät. Paikallisesti luun uudistumiseen säätelyyn osaa ottavat esimerkiksi tulehdusvälittäjäaineet ja kasvutekijät.

4. Elimistön sirkadiaanisen rytmin säätely

Elimistön sirkadiaanisella rytmillä on tarkoitus sopeuttaa organismin fysiologia sopivaksi ympäristön vuorokaudenajan vaihteluun (Samsa ym. 2016.) Rytmillä on ihmisillä hieman pidempi kuin 24 tuntia, riippumatta siitä saammeko ympäristöstä signaaleja siihen mikä vuorokaudenaika on menossa. Tämä osoittaa sen, että sirkadiaaninen rytmi on sisäsyntyinen ja ei riipu ympäristöstä. (Takashi ym. 2008). Ympäristö toki vaikuttaa rytmiin, sillä tärkein tahdistaja suprakiasmaattiselle tumakkeelle on valo. Suprakiasmaattinen tumake säätelee sirkadiaanista eli vuorokausirytmistä ja vuorokausirytmistä mihin aikaan olemme virkeimmillämme. Se vaikuttaa niin fyysisiin toimintoihin kuin mielenterveyteenkin säädellen kaikkia vuorokausirytmistä riippuvaisia toimintoja kuten esimerkiksi syömistä ja juomista, uni-valverytmistä, kortikosteronien ja kortisolien tasoja. (Claustrat ja Leston, 2015.) Myös immuunivaste ja solujen aineenvaihdunta ovat vuorokausirytmistä riippuvia (Partanen ja Sternberg 2017).

Sirkadiaaninen kello voidaan jakaa kahteen osaan, hypotalamuksen suprakiasmaattisessa tumakkeessa sijaitsevaan keskuskelloon ja laitalkelloihin kehon eri kudoksissa (Richards ja Gumz, 2012). Melatoniini-hormonilla on osansa vuorokausirytmistä säätelyssä. Sitä erittää pääasiassa väliaivojen yläosassa sijaitseva käpylisäke suprakiasmaattisen tumakkeen vaikutuksesta. Eritys seuraa vuorokausirytmistä niin, että melatoniinin pitoisuus on huipussaan pimeällä, yleensä noin kolmen-neljän aikoihin yöllä. Plasman korkeat melatoniinitasot ovat kääntäen verrannollisia elimistön lämpötilaan, jolloin siis öisin elimistön lämpötila on kaikista matalin. Melatoniinin pääasiallinen tarkoitus on välittää elimistölle viestiä vuorokausirytmien vaihtelusta. Verenkierrossa kiertävä melatoniini pääsee kaikkialle elimistöön ja läpäisee myös veri-aivoesteet. (Claustrat ja Leston, 2015.)

4.1 Suprakiasmaattinen tumake

Suprakiasmaattinen tumake (SCN) sijaitsee hypotalamuksen anteriorisessa osassa. Se koostuu useista, toisiinsa yhteydessä olevista neuroneista, jotka ilmentävät vuorokausirytmistä sääteleviä, niin sanottuja kellogeenejä. (Rosenwasser ja Turek, 2015). Suprakiasmaattisen tumakkeen solut jatkavat myös viljeltyinä sirkadiaanisen rytmin tuottamista. Tasan 24 tuntia niiden tuottama rytmi ei ole, vaan valo tahdistaa rytmiä (Partanen ja Stenberg 2017). Valo onkin tärkein säätelijä, joka vaikuttaa

SCN:n säätämään vuorokausirytmiiin (Dudek ja Meng 2014). Neuroneiden väliaineina toimii gamma-aminovoihappo (GABA) ja peptidisignointi (Hastings ym. 2008). Vuorokausirytmiiin valon ja pimeään vaihtelu vaikuttaa sen toimintaan sekä valoreseptorien että silmistä tulevien hermoratojen kautta. Vaikka SCN:ää on pidetty sirkadiaanisen rytmiiin tuottajana, vaatii rytmiiin toteutuminen toimiakseen myös useiden vuorokausirytmiiä säätelviien laitakellojen toimintaa perifeerisissä kudoksissa. (Rosenwasser ja Turek, 2015.)

Suprakiasmaattisesta tumakkeesta viestit lähtevät ensisijaisesti pieneen osaan väliaivoja ja etuaivojen pohjaa. (Rosenwasser ja Turek, 2015.) Uni-valverytmiiin lisäksi tumake säätelviiee muitakin elimistön rytmisiä toimintoja kuten kehon lämpötilaa. Kehon lämpötila laskeekin nukkumaan mennessä asteen verran ja laskee yön aikana lisää. Lämpötilan nousu on yhteydessä heräämiseen sekä vireystilaan. (Hublin ja Järnefelt, 2012.)

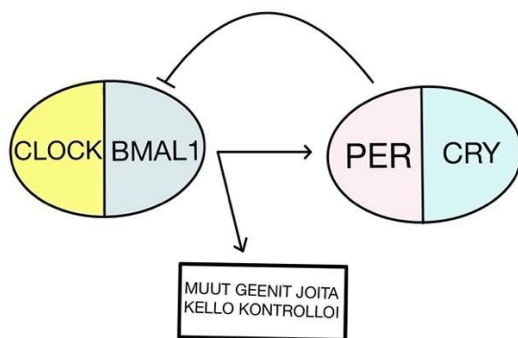
4.2 TTO-säätelyketju ja kellogeenien toiminta

Suprakiasmaattisen tumakkeen toiminta solutasolla perustuu yhteen liittyneisiin, transkriptionaalisiin ja sen jälkeisiin itsesäätelviisiin positiiviseen ja negatiiviseen palauteketjuun. (Hastings ym. 2008, Takashi ym. 2008.) Sirkadiaanisen kellon ydintä kutsutaan TTO-säätelyketjuksi (engl. transcription translation oscillating loop model). Säätelyketju vaikuttaa sekä näiden kyseisten proteiinien transkriptioon että muiden geenien, jotka osallistuvat kellon toimintaan. (Richards and Gumz, 2012.)

Sirkadiaanista rytmiiä päiväsaikaan koodaavat *Clock*- ja *Bmal*- geenit. Ne tuottavat samannimisiä, CLOCK (engl. circadian locomotor output cycles kaput protein) ja BMAL1 (engl. brain and muscle Arnt-like protein-1) -proteiineja. (Hastings ym. 2008, Takashi ym. 2008.) CLOCK ja BMAL1 muodostavat heterodimeerisen yksikön, joka sitoutuu E-boksiin kutsuttuun proteiinirakenteeseen. Nämä kaksi yhteen liittynyttä proteiinia muodostavat TTO-säätelyketjun positiivisen osan. (Richards and Gumz, 2012.)

CLOCK/BMAL1 kompleksi säätelviiee negatiiviseen palauteketjuun kuulviien *Per* (1, 2 ja 3) ja *Cry* (1 ja 2) -geenien ekspressiota. (El Cheik Hussein ym. 2019). PER- (engl. period) ja CRY- (engl. cryptochrome-like protein) proteiinit muodostavat kompleksin, joka vähentää tumassa tapahtuvaa samankaltaisten geenien transkriptiota ja

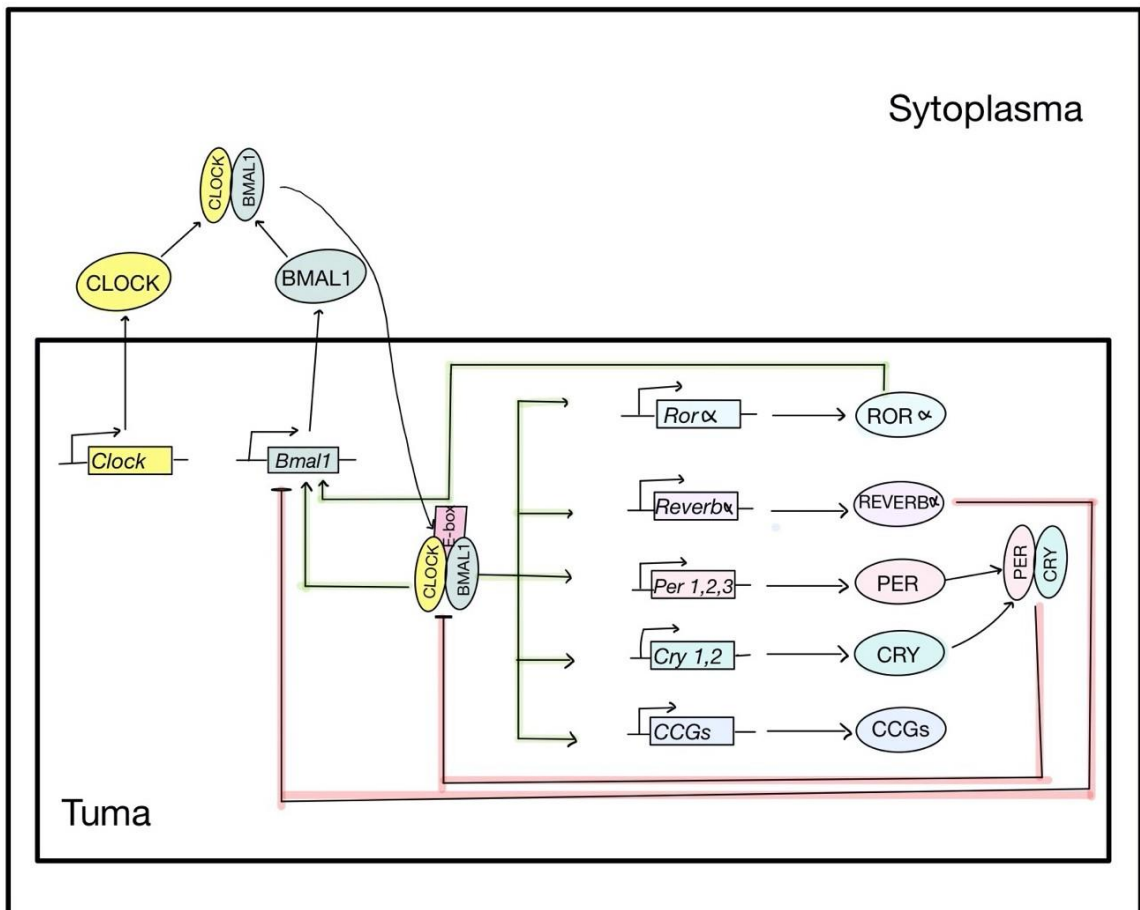
CLOCK-BMAL1-kompleksia sitoutumalla siihen, jolloin muodostuu negatiivinen palauteketju. (Richards and Gumz, 2012.)



Kuvassa esitys sirkadiaanisen kellon ytimen, TTO-säätelyketjun toiminnasta. Ketjussa CLOCK/BMAL1-heterodimeeri on koneiston positiivisesti vaikuttava osa, joka säätelee negatiivisesta säätelyketjusta huolehtivan PER/CRY-kompleksin toimintaa sekä muita sirkadiaanisen kellon geenejä.

Positiivista palauteketjua säätelee puolestaan rytmisesti ilmentyvä $Rev\text{-}erb\alpha$ joka rytmittää *Bmal*:in ekspressiota ja aloittaa sirkadiaanisen yön. (Hastings ym. 2008, Takashi ym. 2008.) $Rev\text{-}erb\alpha$ yhdistää myös näin positiivisen ja negatiivisen palauteketjun (Fu ym. 2005). Näin syntyy biologisen säätelykellon ydintoiminto, ytimen värähtelyrytmi. Valon määrä vaikuttaa sirkadiaaniseen rytmiin neurokemiallisten vihjeiden avulla, jotka taas säätelevät *Per*:in ekspressiota. (Hastings ym. 2008, Takashi ym. 2008.)

Kelloa kontrolloivia geenejä (CCG) säätelevät E-boxiin sitoutuneet proteiinit (Mavroudis ym. 2018). Retinoiinihapporeseptorin kaltainen reseptoriproteiini α ($ROR\alpha$) säätelee positiivisessa palauteketjussa BMAL1:n ekspressiota (Solt ja Burris 2012).



Kuvassa nähdään kellogeenien toimintasykli soluissa.

Transkriptionaalisen ja translationaalisen säätelyn lisäksi mielenkiintoa on herättänyt myös kellon proteiinien säätely transkription jälkeen. Esimerkiksi PER-proteiinin pääsy tumaan ja sieltä pois on olennainen osa vuorokausirytmien säätelyä. CK1 ja CK2 (kaseiinikinaasit) fosforyloivat PER-proteiineja ja CK1-proteiinin inhibitio aiheuttaa vuorokausirytmien viivästymistä. Fosforylaation rooli tässä säätelyssä vaatii silti lisätutkimuksia. (Richards and Gumz, 2012.)

5. Laitakellot

Laitakelloiksi kutsutaan muualla kuin SCN:ssä olevia soluja, jotka ilmentävät sirkadiaanista rytmiä sääteleviä geenejä. Näitä voi olla perifeerisissä kudoksissa esimerkiksi luussa, sydämessä, lihaksissa, neuroneissa, munuaisissa ja muissa elimissä. (Kramer 2009.) Alun perin ajateltiin, että SCN säätelee vuorokausirytmia ja laitakellot toimivat vain sen hormonaalisen ja neuraalisen säätelyn perusteella.

Seuraava ehdotettu malli oli nimeltään ”orkesteri”. Mallissa keskuskello eli SCN toimii ikään kuin kapellimestarina ja laitakellot soittavat kukin omaa instrumenttiaan. Vaikka jokainen laitakello voi toimia omien ulkoisten tai sisäisten stimulusten perusteella, kapellimestari näyttää suuntaa, jotta koko järjestelmä voi toimia yhdessä ja tehokkaasti (Richards ja Gumz, 2012.) Nykyisin ollaan enenevässä määrin sitä mieltä, että vaikka SCN toimii yleisesti elimistön kellojen synkronisoinnissa, voivat laitakellot toimia myös autonomisesti oman geneettisen kellokoneistonsa ansiosta. Ne voivat toimia riippumatta SCN:n säätelystä tai pimeä-valorytmistä jonkin muun ulkoisen ärsykkeen, kuten esimerkiksi fyysisen harjoittelun tai ruokailun perusteella. Tämä antaa kudoksille kyvyn ennakoita vuorokausirytmisiä ja sen muutoksia sekä toimia paikallisten tarpeiden mukaan. (Dudek ja Meng, 2014.) Näissä laitakelloissa on myös *Per*-geeniin perustuvia rytmejä, mutta kudoksesta riippuu, millaiset muut molekulaariset järjestelmät koordinoivat geeniekspressiota ja edelleen kudoksen metaboliaa. (Hastings ym. 2003.)

Laitakellot toimivat yhteistyössä SCN:n kanssa, jotta elimistö toimisi synkronisesti samassa rytmisessä. SCN kommunikoi laitakellojen kanssa hormonaalisen säätelyn (mm. melatoniini ja kortisoli), sympaattisen hermoston ja kehon lämpötilan välityksellä. (Swanson ym. 2018.) Laitakellojen perustoiminta ja TPO-säätelyketju on tämänhetkisen tiedon mukaan samanlainen kuin keskuskellolla, mutta niillä on myös geenejä, jotka vaikuttavat kudosspesifisti (Richards ja Gumz, 2012).

6. Laitakellojen vaikutus resorptiosykliin

Kun vuorokausirytmien tärkein säätelijä SCN:ssä on valo, pystyvät laitakellot säätämään rytmiä kullekin kudokselle sopivammaksi esimerkiksi fyysisen aktiivisuuden tai syömisestä saatavien signaalien perusteella (Dudek, Meng 2014). Kellogeenejä ilmentäviä soluja on luussa ainakin osteoklasteissa, osteoblasteissa ja osteosyyteissä. Luun normaalifysiologian päivittäiset muutokset viittaavat myös siihen, että luun resorptiosykliin on komponentti, joka on riippuvainen sirkadiaanisesta rytmistä. Näyttäisi myös siltä, että murtuman parantuminen luussa riippuu osaksi sirkadiaanisesta rytmistä. (Swanson ym. 2018).

Luun uudistumisen biokemiallisien markkerien (engl. biochemical turnover markers, BTM) määrä kasvaa yöllä ja niiden huippu mitataan aamuyöstä. Aallonpohja BTM:n

tasossa on myöhään iltapäivällä. Niiden erityys on siis rytmistä. (Swanson ym. 2018.) BTM on yhteisnimitys markkereille, joiden määrä kuvastaa osteoblastien ja osteoklastien määrää sekä niiden aktiivisuutta. Niiden pitoisuuksia voidaan mitata sekä verestä että virtsasta. Vuorokausirytmien lisäksi BTM:n määrään vaikuttavat myös esimerkiksi ruokailu sekä viimeaikainen luunmurtuma. BTM:ksi luokiteltavien markkereiden sisällä voidaan erottaa luun synteessin ja resorptioon markkereita. Luun synteesisistä kertovia tekijöitä ovat muun muassa osteokalsiini, P1NP (tyypin 1 prokollageenin N-terminaali preopeptidi) sekä luun alkalinen fosfataasi ja resorptioon markkereita CTX-1 (tyypin 1 kollageenin C-telopeptidi), NTX-1 (tyypin 1 kollageenin telopeptidi) ja deoksiipyridioliini. (Eastell ja Szulc 2017.)

Hiiritutkimuksissa huomattiin, että ne hiiret, joilla *Per1*-geeni puuttui, eli *Per1*-knockout hiiret kasvoivat normaalisti kuuden viikon ikään asti, mutta sen jälkeen niiden luumassa alkoi kasvaa liian suureksi. Kasvu kiihtyi mitä enemmän ikää hiirille tuli. Hiiret, joilla *Per1/Per2* ja *Cry1/Cry2* geenien toiminta oli estetty, esiintyi myös liian suurta luumassaa. Näillä hiirillä havaittiin liian paljon osteoblasteja, mikä korreloi hyvin luun lisääntyneen synteessin ja mineraalien kertymisen kanssa. Samanlaisia tuloksia saatiin myös hiirillä, joilla *Bmal1*-geenin toiminta oli estetty. Näillä geeneillä on siis toimiessaan osteoblastien proliferaatiota estävä vaikutus. (Dudek ja Meng 2014.) Mallit, joissa geenien toimintaa on estetty osoittavat, että sirkadiaanisella rytmillä ja kellogeeneillä on vaikutusta luun uudistumiseen. (Swanson ym. 2018.)

Toisessa tutkimuksessa tarkasteltiin hiiriä, joiden sirkadiaanista rytmia säätelevissä geeneissä oli puutteita ja verrattiin näitä normaalin kellokoneiston omaaviin hiiriin. Hiirillä, joiden sirkadiaaninen kello ei toiminut havaittiin liian alhaista luumassaa ja kiihtynyttä luukudoksen vanhenemista. Hiirillä, joilla *Bmal1*-geeni oli poistettu toiminnasta ja BMAL1-proteiinia oli vähän, nähtiin in vitro häiriintymistä osteoblastien erilaistumisessa. (Samsa ym. 2016.) Toisaalta 2005 tehdyssä tutkimuksessa *Bmal1*-knockout hiirillä havaittiin lisääntyneitä osteoblastien aktiivisuutta, mutta näiden kahden eri havainnon ero saattaa johtua tutkimuksissa käytettyjen hiirien ikäerosta. (Weger ym. 2017.)

Sirkadiaaninen kello voi vaikuttaa luun synteesiin myös vaikuttamalla osteoblastien erilaistumiseen luuytimeistä peräisin olevista kantasoluista. *Noc* (engl. nocturn) säätelee transkription jälkeistä geeniekspressiota. CLOCK-BMAL1-heterodimeeri

vähentää *Noc*:n ekspressiota osteoblastien erilaistumisen aikana *in vitro* ja sen yliekspressio inhiboi osteoblastogeneesiä. Lisäksi kun *Noc* oli pois toiminnasta, *Pparg2* (engl. peroxisome-proliferator-activated receptor γ) ekspressio väheni huomattavasti ruskeissa rasvasoluissa. *Pparg2* vaikuttaa mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumiseen. (Dudek ja Meng 2014.)

Sekä ROR ja Rev-erb α ilmentyvät mesenkymaalisisissa kantasoluissa. ROR α :n määrä suurenee ja Rev-erb α :n määrä vähenee osteogeenisen erilaistumisen yhteydessä. Kun hiirien *Ror* α geeni oli poistettu toiminnasta, huomattiin niiden luiden mineraalipitoisuuden sekä tiheyden pienenneen. Tutkimuksissa *Ror* α vaikuttaa luun uudistumiseen *in vivo*, mikä tukee hiirillä tehtyjä huomioita. Tarkka mekanismi, jolla *Ror* α vaikuttaa on kuitenkin vielä epäselvä ja tarvitsisi lisäselvitystä. (Weger ym. 2017.)

Sirkadiaaninen rytmi vaikuttaa luun uusiutumiseen ja laitakelloihin myös systeemisesti hormonitoiminnan kautta. Sirkadiaaninen rytmi ohjaa muiden tekijöiden kautta hormonien, erityisesti kasvuhormonin ja sukupuolihormonien eritystä ja näin uniongelmat ja ongelmat sirkadiaanisessa rytmissä edelleen vaikuttavat luuhun. (Gamble ym. 2014, Xu ym. 2016.)

On edelleen tutkimuksen alla, liittyykö luunmuodostukseen osallistuvien geenien toiminta niiden rooliin perifeerisissä kelloissa vai onko luun muodostuksen säätely tästä riippumatonta. Tutkimuksissa eri sukupuolien ja lajien käyttö vaikuttavat tuloksiin. Jotta voitaisiin tarkasti tutkia kellogeenien yhteyttä luun muodostukseen, täytyisi vielä tarkemmin tietää geenien vuorovaikutusmekanismeista keskenään eri tilanteissa. (Weger ym. 2017.)

7. Kliininen merkitys

Sirkadiaaninen rytmi on tärkeä osa elimistön toimintaa ja koska se on osa niin useiden eri fysiologisten toimintojen säätelyä, voi se vaikuttaa myös sairauksien syntyyn eri elinjärjestelmissä. Uni-valverytmin säätelyn lisäksi on sirkadiaanisella rytmillä siis monta muutakin tarkoitusta. (Takashi ym. 2008.) Uni-valverytmi muodostuu sekä valvoessa kertyvän unipaineen että sirkadiaanisen rytmin seurauksena (Hublin ja Järnefelt 2012.).

Kehon endogeeninen sirkadiaaninen rytmi vaikuttaa hormonien eritykseen ympäristöstä ja käyttäytymisestä johtuvien tekijöiden lisäksi. Laitakellot kontrolloivat osaltaan hormonien määrää kudoksissa sekä sitä, miten kudokset niiden aiheuttamaan stimulusiin vastaa. (Gamble ym. 2014.) Kun esimerkiksi hormonien rytmien erityshäiriintyy ympäristön tai geneettisten seikkojen vaikutuksesta, edesauttaa se kardiovaskulaaristen ja metabolisten sairauksien sekä syövän syntyä. (Gamble ym. 2014, Xu ym. 2016.) Kun riittävästi unta ei saada tai nukkuminen tapahtuu elimistölle epäedulliseen aikaan, kasvaa riski sairastua myös endokrinologisiin ja neurologisiin sairauksiin. Lisäksi yövuoroja tekevillä on havaittu suurentunut riski luunmurtumille ja pienentynyt luun mineraalitiheys. (Swanson ym. 2018.)

7.1 Vuoro- ja yötyö

Vuorotyö määritellään tilastokeskuksen sivuilla seuraavasti: ” Vuorotyö on työtä, jossa vuorot vaihtuvat säännöllisesti ennakolta sovituin ajanjaksoin. Jos henkilö tekee pysyvästi vain tiettyä vuoroa, esimerkiksi yövuoroa, häntä ei lueta vuorotyötä tekeväksi”. Vuorotyöhön voi siis kuulua normaalien päivävuorojen lisäksi aamuvuoroja, iltavuoroja ja yövuoroja. Vaikka yhä enemmän tehdään vuorotyötä, ei ihmisen tarve nukkua yöllä ja noudattaa säännöllistä vuorokausirytmää ei ole kadonnut minnekään. (Hublin ja Järnefelt, 2012.) Suomen Työaikalain (605/1996) mukaan yötyö on työtä, jota tehdään kello 23 ja 06 välillä. Vuorotyötä tekee Suomessa säännöllisesti 2015 naisista 27 % ja miehistä 19 %. Yötyötä teki taas naisista 12 % ja miehistä 17 %. (Härmä ym. 2019.)

Epäsäännöllisten työaikojen vaihteluun sopeutuminen on vuorokausirytmien kannalta hidasta. Uni-valverytmiä voi muuttaa vain 1–2 tuntia vuorokaudessa ja sekin vaatii sopeutumista tukevan, oikea-aikaisen valosignaalin. Valosignaalin tahdistetaan SCN:n ylläpitämää sirkadiaanista rytmiä ja tehokkain aika tahdistukselle olisi aamulla klo 6–9 välillä. (Hublin ja Järnefelt 2012.) Yötyöläisillä kirkas valo aamuisin kuitenkin vain heikentää yötyöhön sopeutumista, koska se aikaistaa vuorokausirytmää (Härmä ym. 2019). Epäsäännöllisen uni-valverytmien seurauksena sirkadiaaninen rytmi voi häiriintyä ja altistaa uneen ja vireyteen liittyville häiriöille ja oireille. (Hublin ja Järnefelt 2012.)

Yö- ja vuorotyöläisillä on kohonnut riski sairastua syöpään. Erityisesti tutkimusnäyttöä on yötyötä sisältävästä vuorotyöstä, joka altistaa erilaisille terveyshaitoille. Keskeiseksi mekanismeiksi on esitetty melatoniinihormonin erittymisen estymistä valon seurauksena sekä vuorokausirytmien häiriintymistä. (Härmä ym. 2019.)

Epidemiologiset sekä eläimillä tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet korrelaation syövän esiintymisen ja vuorokausirytmien häiriöiden välillä. Tutkimuksissa on todettu myös, että syöpäsoluissa sekä solusykliin osallistuvat että sirkadiaanisen kellon toimintaan osallistuvat geenit ovat väärin säädeltyjä. Solusyklissä tarvittavat proteiinit ja vaiheet kasvuvaiheesta mitosiin voivat vaikuttaa vuorokausirytmien vaiheeseen ja toisinpäin. Sirkadiaanista kelloa sekä solusykliä säädelään myös post-translationalisesti yhteisillä entsyymeillä. (Gaucher ym. 2018.)

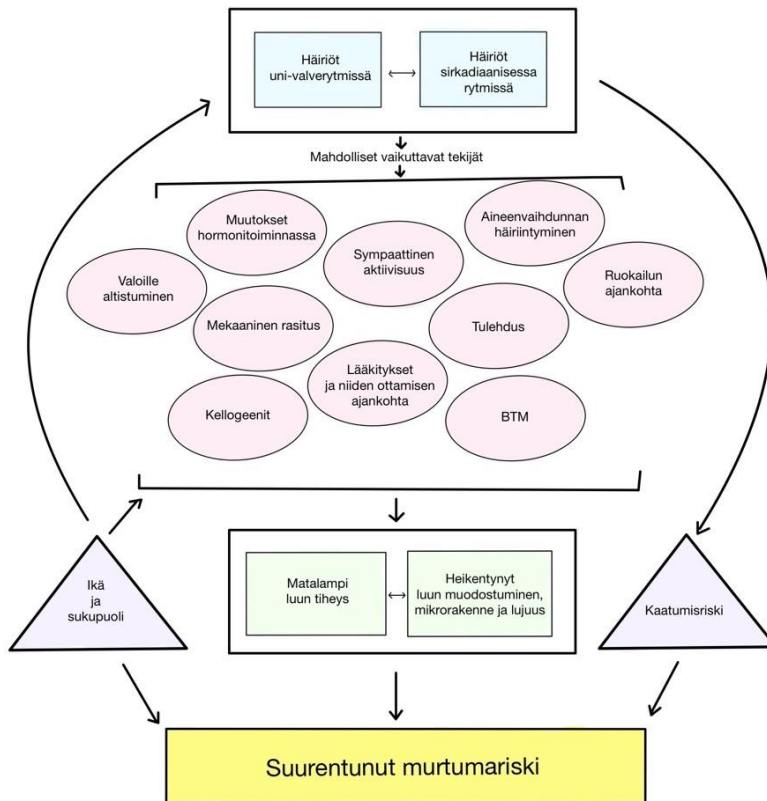
Sirkadiaanisen yön aikana nukkuminen sekä unen riittävä pituus ovat tärkeitä myös luun terveyden kannalta. BTM:n huippu mitataan aamuyöstä. Tällöin häiriöt sirkadiaanisessa rytmissä ja unessa vaikuttavat luun uusiutumiseen. Toisaalta kaikilla luusolujen kommunikaatioon osallistuvilla tekijöillä ei ole selvästi osoitettua vuorokausirytmisiä, kuten RANKL:lla ja osteoprotegeriinilla. Rotilla tehdyn tutkimuksen mukaan jatkuva unen rajoittaminen keskeytti luun remodellaation eli uusiutumisen kokonaan. (Swanson ym. 2018.)

Vuorotyöläisten riski onnettomuuksille ja luunmurtumille on lisääntynyt. Tämä johtuu osaksi siitä, että väsyneenä on hankalampi ylläpitää tasapainoa ja huomioida vaarallisia tilanteita ympäristössä, mikä lisää riskiä kaatumiseen. Rottien valvottaminen tutkimuksessa johti siihen, että luun uudistuminen pysähtyi kokonaan. Yövuoroja tekevillä vuorotyöläisillä on havaittu normaalia matalampaa luun mineraalitiheyttä ja lisääntynyt riski luunmurtumille. Matalampi mineraalitiheys lumbaaliniikamissa ja femoraliksen kaulalla havaittiin chileläisillä, jo menopaussinsa ohittaneilla naishoitajilla, jotka tekivät vuorotyötä verrattuna pelkästään päivällä työskenteleviin. Tutkimuksessa ei tosin otettu huomioon sitä, että kahvin ja tupakan kulutus oli vuorotyöläisillä suurempaa. Korealaisilla miehillä toteutetussa tutkimuksessa huomattiin, että heidän lumbaaliniikamissaan ja koko lonkkaluun alueella alhaisempaa mineraalitiheyttä erityisesti niillä vuorotyöläisillä, jotka työskentelivät myös yöllä. Murtumariskiä kartoittavassa tutkimuksessa 8 vuoden

seurannan jälkeen naisilla, jotka olivat tehneet yli 20 vuotta yövuoroja sisältävää vuorotyötä, oli suurempi lonkan ja ranteen murtumien riski verrattuna niihin naisiin, jotka eivät ikinä olleet tehneet yövuoroja. (Swanson ym. 2018).

Toisaalta päinvastaisen tulokseen päädyttiin tutkimuksessa, jossa keski-ikäisillä vuorotyöläisillä ei havaittu eroa luun mineraalitiheydessä verrattuna päiväsaikaan työskenteleviin. On esitetty, että luun matalampaa mineraalitiheyttä ja murtumariskiä yötyötä tekevillä vuorotyöläisillä selittäisi D-vitamiinin puute, erot fyysisessä aktiivisuudessa ja saadun valon määrässä, kortisolin määrän kasvu ja tulehduksen lisääntyminen. Poikkileikkaus- ja epidemiologisissa tutkimuksissa ei kuitenkaan voida luotettavasti osoittaa syy-seuraussuhteita. (Swanson ym. 2018).

Kymmenelle terveelle miehelle tehdyssä interventiotutkimuksessa selvitettiin miten unen rajoittaminen ja samanaikainen sirkadiaanisen rytmin häiriö vaikuttaa. Tämä vuorotyötä vastaava asetelma ei vaikuttanut luun resorption CTX-markkerin pitoisuuteen. Luun synteesiä kuvaavan P1NP-markkerin pitoisuus sen sijaan oli huomattavasti normaalia pienempi. Ero oli selvempi nuoremmilla miehillä, joilla BTM:n tasot olivat jo alkujaan korkeampia. (Swanson ym. 2018). Nämä tulokset ovat yhteneväisiä rotilla tehdyn tutkimuksen kanssa, jossa rottien unta rajoitettiin 72 päivän ajan. Niiden luun tiheys pieneni ja osteoblastien aktiivisuus väheni, mutta osteoklastien määrä ei muuttunut. Päinvastoin osteoklastien aktiivisuudesta kertovan markkerin (TRACP 5b) määrä plasmassa lisääntyi niillä rotilla, joilla unta rajoitettiin. Myös luun mineraalitiheys pieneni näillä rotilla. IGF-1, joka säätelee osteoblastien erilaistumista ja proliferaatiota pitoisuus veressä väheni myös. (Everson ym. 2012).



Kuvassa tiivistettynä sirkadiaanisen rytmin ja uni-valverytymien yhteys luun terveyteen.

8. Yhteenveto ja loppupäätelmät

Ihmisen normaalin toiminnan, kehityksen ja kasvun kannalta vuorokausirytmien noudattaminen ja oikea-aikainen nukkuminen on selvästi erittäin tärkeää. Toisaalta jokainen meistä on yksilö ja vaikka peruseriaatteet elimistön toiminnassa ovat samanlaisia, on kullakin meistä omanlainen geneettinen perimänsä ja epigeneettiset muutokset. Se, mikä sopii toiselle ei välttämättä toimi toiselle yksilölle. Tämä havaitaan esimerkiksi lääkkeiden soveltuvuudessa ja vaikutuksissa sairauden hoitoon. Toisille yöllä valvominen ja vuorotyö sopivat luultavasti paremmin kuin toisille, mutta onko se haitatonta kellekään, on toinen kysymys.

Laitakellojen vaikutuksesta resorptiosykliin ja niiden itsenäisestä toiminnasta kaivataan vielä lisää tutkimusta. Siitä, miten eri geenit toimivat yhteistyössä toistensa kanssa ja miten ne vaikuttavat toisiinsa eri tilanteissa, tarvitaan myös lisää tietoa. Tämä on edellytyksenä sille, että voidaan tehdä päätelmiä luun uusiutumissykliin vaikuttavien geenien osuudesta sirkadiaaniseen rytmiin perifeerisissä soluissa ja toisinpäin. Sirkadiaanisen rytmin häiritsemisestä aiheutuvista ongelmista tiedetään jo

paljon, mutta sitä kuinka paljon laitakelloilla on osuutta asian kanssa, on syytä tutkia enemmän.

Kaiken kaikkiaan luun terveyteen vaikuttavia asioita on paljon ja niitä pitääkin tarkastella kokonaisuutena. Luussa sijaitsevilla laitakelloilla on luultavasti oma osansa, mutta kuten terveyteen liittyvissä asioissa yleensäkin ei mutkia voida vetää liian suoriksi. Moni seikka osoittaa kuitenkin, että luun resorptiosykliillä on sirkadiaanista säätelyä ja siihen eittämättä laitakellot vaikuttavat SCN:n lisäksi. Ja koska tällainen sirkadiaaninen komponentti on, vaikutetaan luun terveyteen myös ehdottomasti nukkuminen tarpeeksi pitkään ja oikeaan aikaan yöstä.

Lähteet

Aisa MC, Datti A, Orlacchio A, Di Renzo GC. COX inhibitors and bone: A safer impact on osteoblasts by NO-releasing NSAIDs. *Life Sci.* 2018 Sep 1;208:10-19. doi: 10.1016/j.lfs.2018.07.011. Epub 2018 Jul 7. PMID: 29990484.

Bozec A, Soulat D. Latest perspectives on macrophages in bone homeostasis. *Pflugers Arch.* 2017 Apr;469(3-4):517-525. doi: 10.1007/s00424-017-1952-8. Epub 2017 Feb 28. PMID: 28247013.

Chang G, Boone S, Martel D, et al. MRI assessment of bone structure and microarchitecture. *J Magn Reson Imaging.* 2017;46(2):323-337. doi:10.1002/jmri.25647

Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie.* 2015;61(2-3):77-84. doi:10.1016/j.neuchi.2015.03.002

Cooper, D.M.L., Kawalilak, C.E., Harrison, K. *et al.* Cortical Bone Porosity: What Is It, Why Is It Important, and How Can We Detect It?. *Curr Osteoporos Rep* **14**, 187–198 (2016). <https://doi-org.ezproxy.utu.fi/10.1007/s11914-016-0319-y>

Dudek M, Meng QJ. Running on time: the role of circadian clocks in the musculoskeletal system. *Biochem J.* 2014 Oct 1;463(1):1-8. doi: 10.1042/BJ20140700. PMID: 25195734; PMCID: PMC4157581.

Dwek JR. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol.* 2010;39(4):319-323. doi:10.1007/s00256-009-0849-9

Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Nov;5(11):908-923. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30184-5. Epub 2017 Jul 7. PMID: 28689768.

El Cheikh Hussein L, Mollard P, Bonnefont X. Molecular and Cellular Networks in The Suprachiasmatic Nuclei. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 25;20(8):2052. doi: 10.3390/ijms20082052. PMID: 31027315; PMCID: PMC6514755.

Everson CA, Folley AE, Toth JM. Chronically inadequate sleep results in abnormal bone formation and abnormal bone marrow in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012 Sep;237(9):1101-9. doi: 10.1258/ebm.2012.012043. Epub 2012 Sep 3. PMID: 22946089; PMCID: PMC3939802.

Gaucher J, Montellier E, Sassone-Corsi P. Molecular Cogs: Interplay between Circadian Clock and Cell Cycle. *Trends Cell Biol.* 2018 May;28(5):368-379. doi: 10.1016/j.tcb.2018.01.006. Epub 2018 Feb 19. PMID: 29471986.

Gamble KL, Berry R, Frank SJ, Young ME. Circadian clock control of endocrine factors. *Nat Rev Endocrinol.* 2014 Aug;10(8):466-75. doi: 10.1038/nrendo.2014.78. Epub 2014 May 27. PMID: 24863387; PMCID: PMC4304769.

Gartner L. Color atlas and text of histology. 6. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2014.

Gartner, L. Textbook of histology 5th edition. Elsevier, 2017.

Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Aug;4(8):649-61. doi: 10.1038/nrn1177. PMID: 12894240.

Heino, T.J., Määttä, J.A. Bone Marrow Niche: Role of Different Cells in Bone Metastasis. *Curr Mol Bio Rep* **4**, 80–87 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40610-018-0091-0>

Hublin C, Järnefelt H. Työikäisten unettomuuden hoito. Työterveyslaitos, Tammerprint Oy, 2012.

Hublin Christer, Härmä Mikko ja Puutonen Sampsa 2019. Miten yötyö vaikuttaa terveyteen? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 135(1) 27-34.

Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol*. 2003 Sep;41(3):182-5. doi: 10.1002/mpo.10334. PMID: 12868116.

Kramer A. (2009) Peripheral Oscillator. In: Binder M.D., Hirokawa N., Windhorst U. (eds) *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2_4498

Kröger H, Lamberg-Allardt C. Ravitsemustiede. Kustannus Oy Duodecim, 2012.

Lowe JS, Anderson P, Stevens A. *Whether's functional histology*. Neljäs painos. Elsevier/ Mosby, 2015.

Matic I, Matthews BG, Wang X, et al. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells*. 2016;34(12):2930-2942. doi:10.1002/stem.2474

Mavroudis PD, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ. Modeling circadian variability of core-clock and clock-controlled genes in four tissues of the rat. *PLoS One*. 2018 Jun 12;13(6):e0197534. doi: 10.1371/journal.pone.0197534. PMID: 29894471; PMCID: PMC5997360.

Mäkitie O, Välimäki M. *Endokrinologia*. Kustannus Oy Duodecim, 2010.

Määttä JA, Büki KG, Gu G, Alanne MH, Vääräniemi J, Liljenbäck H, Poutanen M, Härkönen P, Väänänen K. Inactivation of estrogen receptor α in bone-forming cells induces bone loss in female mice. *FASEB J.* 2013 Feb;27(2):478-88. doi: 10.1096/fj.12-213587. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23073829. A

Määttä JA, Büki KG, Ivaska KK, Nieminen-Pihala V, Elo TD, Kähkönen T, Poutanen M, Härkönen P, Väänänen K. Inactivation of the androgen receptor in bone-forming cells leads to trabecular bone loss in adult female mice. *Bonekey Rep.* 2013 Nov 6;2:440. doi: 10.1038/bonekey.2013.174. PMID: 24422138; PMCID: PMC3844973. B

Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol.* 2018 Apr;149(4):325-341. doi: 10.1007/s00418-018-1636-2. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29392395.

Osteoporoosi. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Endokrinologiyhdistyksen, Suomen Gynekologiyhdistyksen ja Suomen Geriatri ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2020 (viitattu 21.03.2021). Saatavilla Internetissä: www.käypähoito.fi

Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. *J Biomech Eng.* 2015;137(1):0108021-01080215. doi:10.1115/1.4029176

Partanen Timo, Stenberg Tarja 2017. Sisäisen kellon mekanismin ratkaisu toi lääketieteen Nobel-palkinnon. Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim 133(22) 2179-2181

Ponzetti M, Rucci N. Updates on Osteoimmunology: What's New on the Cross-Talk Between Bone and Immune System. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Apr 18;10:236. doi: 10.3389/fendo.2019.00236. PMID: 31057482; PMCID: PMC6482259.

Richards J, Gumz ML. Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *FASEB J.* 2012;26(9):3602-3613. doi:10.1096/fj.12-203554

Rosenwasser AM, Turek FW. Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation. *Sleep Med Clin*. 2015;10(4):403-412. doi:10.1016/j.jsmc.2015.08.003

Samsa WE, Vasanji A, Midura RJ, Kondratov RV. Deficiency of circadian clock protein BMAL1 in mice results in a low bone mass phenotype. *Bone*. 2016 Mar;84:194-203. doi: 10.1016/j.bone.2016.01.006. Epub 2016 Jan 14. PMID: 26789548; PMCID: PMC4755907.

Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016 May;31(3):233-45. doi: 10.1152/physiol.00061.2014. PMID: 27053737; PMCID: PMC6734079.

Solt LA, Burrell TP. Action of RORs and their ligands in (patho)physiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Dec;23(12):619-27. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.012. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22789990; PMCID: PMC3500583.

Stegen S, Carmeliet G. The skeletal vascular system -Breathing life into bone tissue.*Bone*. 2018;115:50–58. doi:10.1016/j.bone.2017.08.022

Swanson CM, Kohrt WM, Buxton OM, Everson CA, Wright KP Jr, Orwoll ES, Shea SA. The importance of the circadian system & sleep for bone health. *Metabolism*. 2018 Jul;84:28-43. doi: 10.1016/j.metabol.2017.12.002. Epub 2017 Dec 9. PMID: 29229227; PMCID: PMC5994176.

Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*. 2008 Oct;9(10):764-75. doi: 10.1038/nrg2430. PMID: 18802415; PMCID: PMC3758473.

Tilastokeskus: Käsitteet. Osoitteessa <https://tilastokeskus.fi/meta/kas/vuorotyo.html>.
Luettu 22.12.2020

Weger M, Diotel N, Dorsemans AC, Dickmeis T, Weger BD. Stem cells and the circadian clock. *Dev Biol*. 2017 Nov 15;431(2):111-123. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.012. Epub 2017 Sep 9. PMID: 28899666.

Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol.* 2016;18:9-16. doi: 10.1159/000351895. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26599113.

Xu C, Ochi H, Fukuda T, Sato S, Sunamura S, Takarada T, Hinoi E, Okawa A, Takeda S. Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice. *J Bone Miner Res.* 2016 Jul;31(7):1344-55. doi: 10.1002/jbmr.2803. Epub 2016 Mar 4. PMID: 26841172.

Yu VW, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. *Curr Top Dev Biol.* 2016;118:21-44. doi:10.1016/bs.ctdb.2016.01.009

Zhang S, Dai M, Wang X, Jiang SH, Hu LP, Zhang XL, Zhang ZG. Signalling entrains the peripheral circadian clock. *Cell Signal.* 2020 May;69:109433. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109433. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31982551.