

Aino Koski

**BIOAKTIIVISEN LASIN S53P4
VAIKUTUS
VIERASESINEJÄTTISOLUJEN
MUODOSTUMISEEN**

Syventävien opintojen kirjallinen työ

2025

Aino Koski

**BIOAKTIIVISEN LASIN S53P4
VAIKUTUS
VIERASESINEJÄTTISOLUJEN
MUODOSTUMISEEN**

Biolääketieteen laitos

Kevät 2025

Ohjaajat: FT, dosentti Terhi Heino; väitöskirjatutkija, FM, Karoliina Kajander

TURUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

KOSKI AINO: Bioaktiivisen lasin S53P4 vaikutus vierasesinejättisolujen muodostumiseen

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 43 s

Biolääketieteen laitos

Kevät 2025

Vierasesinejättisoluja esiintyy vierasesinereaktion kuten luuston korjauksessa käytettävien biomateriaaliproteesien yhteydessä. Ne muodostuvat vauriopaikkaan siirtyneiden makrofagien fuusioituessa yhteen erilaisten välittäjäaineiden sekä implanttimateriaalin aikaansaamien olosuhteiden vaikutuksesta. Vierasesinejättisoluilla on havaittu olevan kyky hajottaa biomateriaaleja sekä edesauttaa fibroottisen eli sidekudoksisen kapselin muodostumista implantin ympärille, minkä ajatellaan vaikuttavan negatiivisesti biomateriaalien toimintaan elimistössä. Vierasesinejättisolujen erittämien sytokiinien avulla ne voivat myös rekrytoida ja aktivoida luuta hajottavia osteoklasteja mahdollisesti johtaen implantin epäonnistumiseen sen aseptisen löystymisen vuoksi.

Bioaktiivinen lasi S53P4 on biomateriaali, jolla on osoitettu olevan luukudoksen muodostumista edistäviä ja antibakteerisia vaikutuksia. Se kehitettiin Turussa 1980-luvulla aiemmin kehitetyn ns. Hench-lasin (45S5) pohjalta. Nykyään S53P4 bioaktiivista lasia tuottaa Bonalve Biomaterials Ltd ja sitä käytetään luukudosta korvaavana implanttimateriaalina muun muassa erilaisissa kallon ja kasvojen alueen operaatioissa sekä osteomyeliitin hoidossa. Muiden bioaktiivisten lasien 45S5, 52S ja 55S on aiemmin havaittu aiheuttavan makrofagien fuusioitumista vierasesinejättisoluiksi kaneilla tehdyissä *in vivo*-kokeissa. Tämän perusteella voitaisiin olettaa myös bioaktiivisen lasin S53P4 indusoivan makrofagien fuusioitumista, mutta tutkimuksia aiheesta ei ole toistaiseksi julkaistu.

Tämän tutkimuksen tavoitteena olikin selvittää, indusoiko bioaktiivinen lasi S53P4 vierasesinejättisolujen muodostumista *in vitro* hiiren ja ihmisen kaupallisten makrofagisolulinjojen soluista. Opinnäytetyön kirjallisuudessa kuvataan perustietoa biomateriaaleista sekä syvennytään bioaktiivisten lasien 45S5 ja S53P4 koostumukseen ja niiden eroihin. Lisäksi kuvataan bioaktiivisten lasien käyttöä luukudoksen korjauksessa sekä esitellään vierasesinereaktion ominaisuuksia ja vaiheita sekä perehdytään vierasesinejättisoluihin.

Tutkimuksen kokeellisessa osassa tutkittiin vierasesinejättisolujen muodostumista käyttäen hiiren makrofagisolulinjaa RAW264.7 (ATCC, TIB-71) sekä humaanisolulinjaa THP-1 (ATCC, TIB-202). Soluja viljeltiin biomateriaalien Al_2O_3 , 45S5 sekä S53P4 läsnä ollessa vierasesinejättisolujen muodostusta indusoivissa olosuhteissa ja tutkittiin muodostuneiden vierasesinejättisolujen määrää.

Asiasanat: vierasesinejättisolut, vierasesinereaktio, bioaktiivinen lasi S53P4, biomateriaalit, makrofagit

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO	1
1.1 Biomateriaalit	1
1.2 Bioaktiiviset lasit 45S5 ja S53P4	3
1.2.1 Bioaktiivisten lasien hajoaminen elimistössä	5
1.2.2 Bioaktiivisten lasien koostumuksen vaikutus niiden ominaisuuksiin	6
1.3 Luukudos.....	8
1.3.1 Luukudoksen rakenne ja perusfysiologia.....	8
1.3.2 Luukudoksen muodostuminen	11
1.3.3 Luukudoksen uudelleenmuodostuminen ja korjaantuminen	13
1.4 Vierasesinereaktio	15
1.4.1 Makrofagit	15
1.4.2 Vierasesinejättisolut	17
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA HYPOTEESIT	21
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	22
3.1 Proteiinipinnoitteet	22
3.2 Vierasesinejättisolujen muodostamisprotokolla	22
3.3 Biomateriaalit ja niiden vaikutus vierasesinejättisolujen muodostumiseen.....	23
3.4 Tulosten analyysi ja tilastollinen tarkastelu.....	24
3.4.1 Proteiinipinnoitteiden vertaileminen	24
3.4.2 Biomateriaalien vaikutus vierasesinejättisolujen muodostumiseen	25
4 TULOKSET.....	25
4.1 Vitronektiinipinnoite edesauttoi vierasesinejättisolujen muodostumista parhaiten	25
4.2 Bioaktiiviset lasit S53P4 ja 45S5 edesauttoivat vierasesinejättisolujen muodostumista RAW 264.7 solulinjalla	27
4.3 Bioaktiiviset lasit S53P4 ja 45S5 edesauttoivat vierasesinejättisolujen muodostumista THP-1 solulinjalla	28
5 POHDINTA	31
VIITTEET.....	33

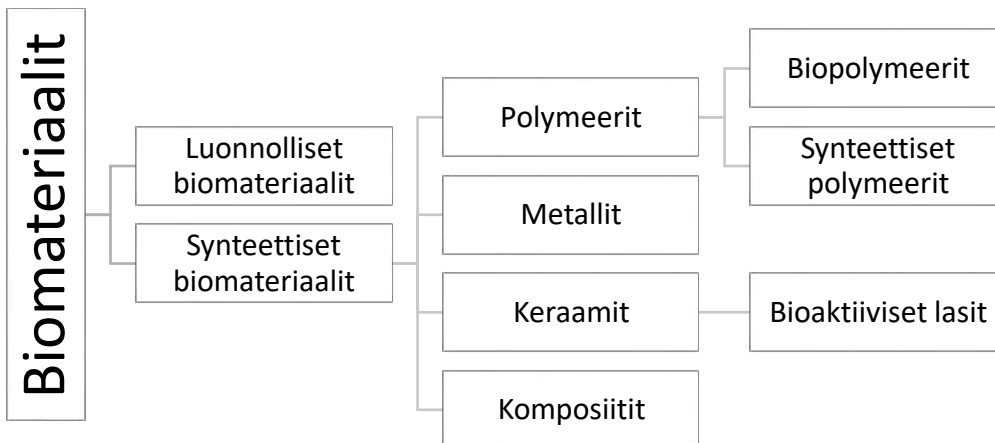
LYHENTEET

Al_2O_3	Alumiinioksidi
CaO	Kalsiumoksidi
CTRL+	Positiivinen kontrolli
CTRL-	Negatiivinen kontrolli
DMEM	Soluviljelymedium
FBGC	Vierasesinejättisol
HA	Hydroksiapatiitti
iFBS	Lämpöinaktivoitu naudan sikiön seerumi
IL-4	Interleukiini 4
Na_2O	Natriumoksidi
P_2O_5	Fosforipentoksidi
RAW 264.7	Hiiren monosyytti/makrofagisolulinja
SG-metodi	Sol-gel-metodi
SiO_2	Piidioksidi
S53P4	Bioaktiivinen lasi S53P4
TGF- β	Transforming growth factor β
THP-1	Ihmisen monosyytti/makrofagisolulinja
45S5	Bioaktiivinen lasi 45S5

1 JOHDANTO

1.1 Biomateriaalit

Biomateriaalit ovat materiaaleja, joita voidaan hyödyntää lisäämään elävän kudoksen muodostumista sekä kudoksen korjaamisessa että korvaamisessa. Ne voivat olla luonnollisia tai synteettisiä. Synteettisiä biomateriaaleja ovat metallit, keraamit ja polymeerit. Yhdistämällä erilaisia synteettisiä biomateriaaleja valmistetaan yhdistelmä materiaaleja eli komposiitteja. Erilaisia biomateriaaleja ja niiden käyttökohteita on esitetty kuvassa 1. Luontoperäisiä eli luonnollisia biomateriaaleja edustavat kudossiirteet, joita puolestaan saadaan puolestaan esimerkiksi ihmisen tai eläimen luusta, rustosta, sidekudoksesta tai ihosta. (1)



Kuva 1. Erilaisten biomateriaalien luokittelu luonnollisiin ja synteettisiin biomateriaaleihin.

Polymeerit koostuvat useasta toisiinsa kemiallisten sidosten välityksellä kiinnittyneestä monomeeristä, jotka muodostavat ketju- tai verkkomaisen rakenteen. Polymeeribiomateriaalit ovat biotekniikan suosituin materiaalityyppi niiden mekaanisen monipuolisuuden ja kudoksen samankaltaisuutensa vuoksi. Polymeerejä on hyödynnetty pääasiassa pehmytkudossovelluksissa. Suosittuja polymeerejä kliinisessä käytössä ovat muun muassa polylaktaattihappo ja polyglykolihiappo (2.) Polymeerejä on myös sovellettu lääkkeiden annostelukäytössä, sillä niiden rakenteen räätälöinti mahdollistaa lääkkeen hallitun vapautumisen (3).

Erilaisia metalleja hyödynnetään kliinisesti kovakudossovelluksissa. Eniten käytettyjä metalleja proteesitarkoituksissa ovat erilaiset titaaniseokset, kromi-kobolttiseokset ja ruostumaton teräs. Metalleja käytetään muun muassa proteesien nivelpinnoilla niiden

kestävyyden takia. Metallien inertin luonteen vuoksi niistä valmistetut proteesit pinnoitetaan monesti esimerkiksi hydroksiapatiitilla $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) paremman osteointegraation eli luuhun kiinnittymisen saavuttamiseksi. (2)

Keraamit ovat epäorgaanisia aineita, jotka sisältävät ionisidoksia tai kovalenttisia sidoksia, eivätkä ole metalleja. Keraameja käytetään kovakudosvaurioiden paikkaamiseen ja kudoksen uusimiseen. Keraamit voidaan jakaa kemiallisten ominaisuuksiensa perusteella inertteihin, bioaktiivisiin ja liukeneviin keraameihin sekä rakenteen perusteella huokoisiin keraameihin (4.) Yleisimmin nykypäivänä käytetyt biomateriaalikeraamit ovat erilaisia HA:sta ja trikalsiumfosfaatista (TCP) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ valmistettuja kalsiumfosfaattijohdannaisia. Luukudosta korvaavana implanttimateriaalina kalsiumfosfaatit ovat osteokonduktiivisia eli ne toimivat alustana luukudosta muodostaville osteoblasteille. Myös alumiinioksidi ja bioaktiivinen lasi luokitellaan biokeraameiksi. (5)

Komposiitit ovat polymeerien, metallien ja keraamien erilaisia yhdistelmiä. Tyypillisesti biomateriaalikäytössä olevat komposiitit ovat jonkin bioaktiivisen keraamin ja biopolymeerin yhdistelmiä. Komposiitit ovat erinomaisia implanttimateriaaleja niiden monipuolisesti muokattavissa olevien ominaisuuksiensa vuoksi. (6)

Taulukko 1. Erilaisten biomateriaalien käyttökohteiden, käytön etujen ja biomateriaaliin liittyvien mahdollisten haittojen vertailu. Koostettu lähteistä (1,5–10).

Materiaali	Käyttökohteet	Edut	Haitat
Polymeerit	Erilaiset pehmytkudossovellukset	Mahdollisuus hyödyntää lääkkeen annostelussa	Voivat adsorboida verestä vettä ja ravinteita. Voivat kulua nopeasti.
Metallit	Lonkkaproteesit, polviendoproteesit, ruuvit sekä levyt	Suuri murtumalujuus, ja mekaaninen lujuus	Korroosio ja mahdollinen allergian kehittyminen.
Keraamit	Silmänpohjan proteesit, välikorvan proteesit, lonkkaproteesien	Bioaktiivisuus, osteokonduktiivisuus	Valmistaminen on haastavaa.

	kiinnittäminen, täyttömateriaali	luun		
Komposiitit	Luudefektien täyttäminen, kasvojen alueen korjausoperaatiot, keinotekoiset jätteet ja rustopinnat		Materiaali on optimoitavissa sen tarkkaa käyttötarkoitusta varten.	Valmistaminen on kallista.

1.2 Bioaktiiviset lasit 45S5 ja S53P4

Bioaktiivisille lasille on ominaista niiden biologinen yhteensopivuus sekä bioaktiivisuus. Bioaktiivisuudella tarkoitetaan materiaalin kykyä kiinnittyä mineralisoituneeseen luukudokseen. Suurin osa bioaktiivisista lasista perustuu samaan Na_2O , CaO , P_2O_5 ja SiO_2 -systeemiin, johon myös pohjautui alkuperäinen Larry Henchin vuonna 1969 kehittämä bioaktiivinen lasi 45S5. Bioaktiivisen lasin hajoamisen kinetiikkaan vaikuttavat lasin koostumus, valmistustapa, huokoisuus sekä dopantti-ionit eli materiaaliin lisätyt ionit, jotka muuttavat sen fysikaalisia ominaisuuksia. (11)

Bioaktiivinen lasi 45S5, jota markkinoidaan nimellä 45S5 Bioglass, on massakoostumukseltaan 45 % piidioksidia (SiO_2), 24,5 % kalsiumoksidia (CaO), 24,5 % natriumoksidia (Na_2O) ja 6 % fosforipentoksidia (P_2O_5) (5). Bioaktiivista lasia 45S5 hyödynnetään nykyään kliinisesti muun muassa peridontaalisen luukadon ja spinaalifuusion hoidossa sekä kallon ja kasvojen alueen luuston korjauksissa. (11)

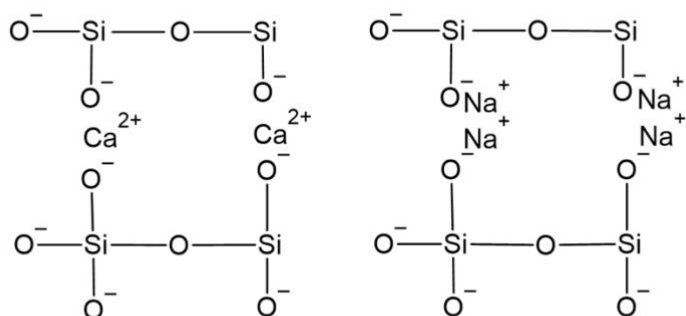
Bioaktiivinen lasi S53P4 on massakoostumukseltaan 53 % piidioksidia (SiO_2), 23 % natriumoksidia (Na_2O), 20 % kalsiumoksidia (CaO) ja 4 % fosforipentoksidia (P_2O_5) (12). Bioaktiivisten lasien 45S5 ja S53P4 tyypilliset oksidiyhdisteiden pitoisuudet on esitetty taulukossa 2. Bioaktiivinen lasi S53P4 on luukudoksen korvaamistarkoituksissa hyödynnetty biomateriaali, joka kehitettiin edellä kuvatun Hench-lasin (45S5) pohjalta Turussa 1980-luvulla (13.) Se sai Euroopan hyväksynnän ortopediseen käyttöön luukudosta korvaavana materiaalina vuonna 2006 (14). Bioaktiivista lasia S53P4 valmistaa nykyään Bonalife materials Ltd ja sitä on saatavilla hienojakoisessa rakeisessa muodossa (Bonalive granules ja Bonalive granules CMF) sekä pakkelimaisessa muodossa (Bonalive putty sekä Bonalive putty MIS). S53P4 tunnetaan erityisesti sen antibakteerisista ominaisuuksista, joita on

tutkittu laajasti (15). Bioaktiivisen lasin S53P4 on todettu kliinisessä kokeessa olevan jopa autologista implanttia parempi vaihtoehto (16). Bioaktiivisten lasien 45S5 ja S53P4 tyypilliset kemialliset koostumukset on esitettyinä taulukossa 2.

Taulukko 2. Bioaktiivisten lasien S53P4 ja 45S5 tyypilliset oksidiyhdisteiden pitoisuudet. Muokattu lähteestä (17).

Bioaktiivinen lasi	SiO_2	Na_2O	CaO	P_2O_5
S53P4	53,0 m-%	23,0 m-%	20,0 m-%	4,0 m-%
45S5	45,0 m-%	24,5 m-%	24,5 m-%	6,0 m-%

Bioaktiiviset lasit koostuvat piin muodostamista Q2-ketjuista, joissa pii muodostaa neljän happiatomin kanssa tetraedrin. Kalsium- ja natriumionit toimivat molekyyliverkkoa muokkaavina kationeina. Nämä ionit mahdollistavat bioaktiivisten lasien liukenemisen vesipitoisissa ympäristöissä. Natrium- ja kalsiumionit sitoutuvat myös bioaktiivisen lasin sisältämiin fosforiatomeihin muodostaen joko mono- tai difosfaattikomplekseja. Nämä molekyylit eivät kuitenkaan ole sitoutuneena bioaktiivisen lasin piitä sisältäviin komponentteihin.(17) Bioaktiivisen lasin piin muodostamista Q2-kejuista on esitettyinä rakennekaava kuvassa 2. Bioaktiivisen lasin piin muodostamista Q2-kejuista on esitettyinä rakennekaava kuvassa 2.



Kuva 2. Kuvassa rakennekaava piin muodostamista Q2-ketjuista, joihin natrium- ja kalsiumionit ovat sitoutuneet. Kuva on muokattu lähteestä (18).

Bioaktiivisten lasien taipumus kristalloitua lämpötilan muutosten indusoimana tekee bioaktiivisesta lasista muodostettujen kolmiulotteisten rakenteiden sekä pinnoitteiden ja komposiittien valmistuksesta haasteellista (11). Bioaktiivisia laseja valmistetaan joko vanhempaa melt-quench-metodia (MQ) hyödyntäen tai sol-gel-metodia (SG) hyödyntäen. MQ-metodissa bioaktiivisen lasin komponenttien oksideja eli tarvittuja oksideja, sulatetaan 1200–1500 °C, minkä jälkeen seos täytyy karkaista eli jäähdyttää nopeasti kristallisoitumisen välttämiseksi. SG-metodissa lähtöaineet muunnetaan kolloidiseksi liuokseksi, jonka jälkeen liuotin haihdutetaan. SG-metodi mahdollistaa eri kompositioista muodostuvien ja erilaisia biologisia ominaisuuksia omaavien bioaktiivisten lasien valmistuksen. SG-metodilla bioaktiivisia laseja voidaan valmistaa myös eri huokoisuuksilla (18.) Bioaktiivisesta lasista 45S5 on vaikea muodostaa huokoisia kolmiulotteisia tukirakenteita sen matalan kristalloitumislämpötilan vuoksi. S53P4 bioaktiivisesta lasista tällaisten rakenteiden valmistaminen puolestaan on mahdollista (20).

1.2.1 Bioaktiivisten lasien hajoaminen elimistössä

Kaikkien Na_2O , CaO , P_2O_5 ja SiO_2 systeemiin pohjautuvien bioaktiivisten lasien hajoamisprosessi *in vivo* ajatellaan olevan vaiheiltaan samanlainen (10,17,21). Bioaktiivisten lasien tarkka kemiallinen koostumus vaikuttaa pääasiassa materiaalin hajoamisen nopeuteen. Hajoamisen nopeuden määrittää materiaalin piidioksidikonsentraatio. (22)

Ensimmäisenä implantin asettamisen jälkeen bioaktiivisen lasin pinnassa muodostuu vetysidoksia piiatomien ja hydroksyyliyhmiä välille ja materiaalin ympäristön pH nousee eli muuttuu emäksiseksi. Korkea paikallinen pH, eli hydroksyyli-ionien korkea konsentraatio, saa aikaan piin ja hapen välisten kovalenttisten sidosten hajoamisen ja piin vapautumisen materiaalista ortopiihapon ($\text{Si}(\text{OH})_4$) muodossa. Piin ja hapen muodostamat silanolit kondensoituvat ja repolymerisoituvat muodostaen hyvin piipitoisen kerroksen lasin pintaan. Kalsiumionit ja ortofosfaattiryhmät muodostavat kalsiumoksidi-difosforipentoksidikerroksen ($\text{CaO-P}_2\text{O}_5$) piipitoisen kerroksen päälle. Hydroksiapatiittikerros (HA) muodostuu hydroksyylien ja karbonaatin sitoutuessa kalsiumoksidi-fosforipentoksidikerrokseen ja kerroksen kristallisoituessa. (10)

Taulukko 3. Muutokset bioaktiivisen lasin pinnalla implantin asentamisen jälkeen. Taulukko muokattu lähteestä (10).

1	Proteiinien adsorbtio bioaktiivisen lasin pinnalle
2	Vetyksidosten muodostuminen piiatomien ja hydroksyyli-ryhmien välille natrium- tai kaliumionien reagoissa liuoksen hydroksyyli- tai oksoniumionien kanssa Ympäristön pH:n nousu eli muuttuminen emäksisemmäksi $Si - O - Na^+ + H^+ + OH^- \rightarrow Si - OH^+ + Na^+ (liuos) + OH^-$
3	Piin ja hapen välisten kovalenttisten sidosten hajoaminen Ortopiihapon vapautuminen materiaalista $Si - O - Si + H_2O \rightarrow Si - OH + OH - Si$
4	Piidioksidi kerroksen muodostuminen materiaalin pintaan
5	Kalsiumoksidi-difosforipentoksidikerroksen muodostuminen piipitoisen kerroksen pinnalle kalsium- ja fosfaatti-ionien adsorboituessa piidioksidikerrokseen
6	Hydroksiapatiittikerroksen muodostuminen Kerroksen kristallisoituminen

1.2.2 Bioaktiivisten lasien koostumuksen vaikutus niiden ominaisuuksiin

Bioaktiivisten lasien bioaktiivisuuden ajatellaan perustuvan Henchin esittämiin bioaktiivisen lasin hajoamisprosessin vaiheisiin, jotka esiteltiin tarkemmin luvussa 1.2.2 (23). Olennaista bioaktiivisten lasien bioaktiivisuuden kannalta on niiden piidioksidikonsentraatio, sillä yli 55 % piidioksidikonsentraatio johtaa bioaktiivisuuden menetykseen. Bioaktiivisten lasien bioaktiivisuus esimerkiksi luukudoksessa on kahden eri mekanismin aikaansaama: i) Bioaktiivisen lasin pinnalle muodostuva HA-kerros mahdollistaa osteogeenisten eli luuta muodostavien solujen tarttumisen materiaalin pintaan ja niiden proliferaation ja ii) ionien liukeneminen materiaalista vahvistaa osteoblastien eli luukudosta muodostavien solujen geeniekspressiota, edesauttaen niiden aineenvaihduntaa, mikä johtaa luukudoksen tehostuneeseen muodostumiseen. Bioaktiivisen lasin optimaalinen piidioksidin (SiO₂) konsentraatio luukudokseen sitoutumisen mahdollistamiseksi on 45–52 %. (11)

S53P4 bioaktiivinen lasi on hydrofiilinen ja pinnan varaukseltaan negatiivinen (zeta potentiaali -47mV) (24). Bioaktiivinen lasi 45S5 on myös hydrofiilinen, mutta pinnan varaukseltaan vähemmän negatiivinen kuin S53P4 (zeta-potentiaali - 14mV ja - 17mV välillä) (26). Bioaktiivisten lasien hajotessa fysiologisissa olosuhteissa niiden pinnan varaus muuttuu negatiivisemmaksi ja sitoo itseensä natrium- sekä kalsiumioneja, jolloin materiaalin pintaan muodostuu niin sanottu sähköinen kaksoiskerros. Plasman proteiinit ovat tyypillisesti varaukseltaan negatiivisia fysiologisessa pH:ssa, mutta tämä sähköinen kaksoiskerros voi edistää proteiinien sitoutumista lasiin. HA-kerroksen muodostuessa materiaalin päälle, muuttuu pinnan varaus lähemmäksi nollaa (27.)

Erlaisia bioaktiivisia laseja erottavat niiden bioaktiivisuuden tasot, jotka ovat riippuvaisia niiden kemiallisesta koostumuksesta (27). Korkeampi piidioksidikonsentraatio tekee bioaktiivisesta lasista hitaammin hajoavaa ja yli 55 % piidioksidikonsentraatio johtaa bioaktiivisuuden menetykseen. Materiaalin oikea hajoamisnopeus on tärkeää esimerkiksi luun uudelleenmuodostumisen onnistumiseksi. Piidioksidin suurempi pitoisuus tekee S53P4 bioaktiivisesta lasista hitaammin hajoavaa kuin 45S5. Bioaktiivisen lasin S53P4 hajoamisnopeus onkin lähempänä luun uudelleenmuodostumisen aikana tapahtuvaa normaalia luun hajoamisnopeutta kuin bioaktiivisen lasin 45S5 (29.)

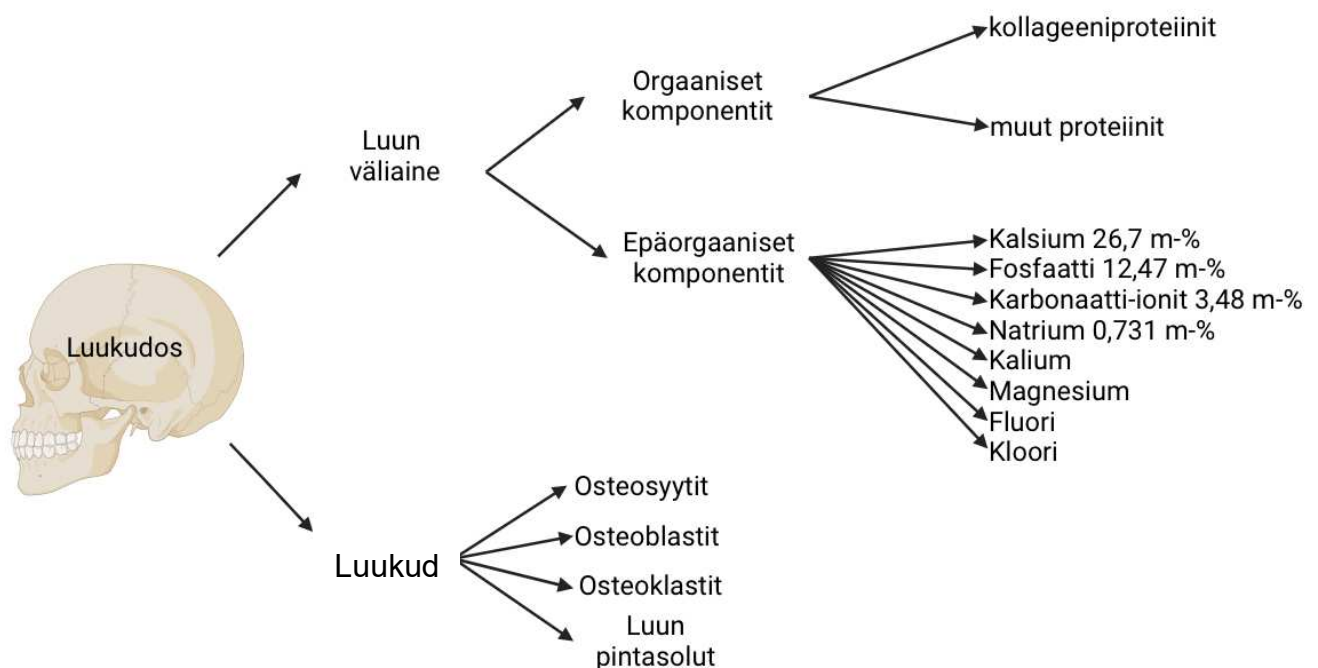
Bioaktiivinen lasi S53P4 on tunnettu sen antibakteerisista ominaisuuksista. Antibakteeristen ominaisuuksien ajatellaan johtuvan siitä, että lasista liuenneiden ionien seurauksena pH nousee eli ympäristö muuttuu emäksiseksi, minkä lisäksi osmoottinen paine nousee (15,22). Vaikka bioaktiivinen lasi 45S5 hajoaa nopeammin kuin S53P4, on *in vitro*-tutkimuksessa havaittu, ettei siitä liukene ioneja enää 24 h jälkeen (17). Tämä pidempään jatkuva ionien liukeneminen voi selittää S53P4:n paremmat antibakteeriset vaikutukset.

Bioaktiivisen lasin pinnalle muodostuva hydroksiapatiittikerros mahdollistaa erilaisten biologisesti aktiivisten molekyylien tarttumisen materiaalin pintaan ja on välttämätön bioaktiivisten lasien osteokonduktiivisuudelle (10). Etenkin pii-ioneilla on havaittu olevan positiivisia vaikutuksia luukudoksen homeostaasiaan, mineraalipitoisuuteen sekä luun muodostukseen (23). Natriumoksidin on puolestaan osoitettu inhiboivan osteoklastien, luukudosta hajottavien solujen, toimintaa ja stimuloivan osteoblastien, luukudosta muodostavien solujen, erilaistumista (22.) Kalsiumionien on todettu aktivoivan SMAD-signalointiketjua, joka edesauttaa osteogeneesiä. Lisäksi lasista vapautuvat kalsiumionit edistävät angiogeneesin, eli verisuonten muodostuksen kannalta tärkeiden proteiinien, kuten VEGF:n (verisuonikasvutekijä) geenien luentaa (30).

1.3 Luukudos

1.3.1 Luukudoksen rakenne ja perusfysiologia

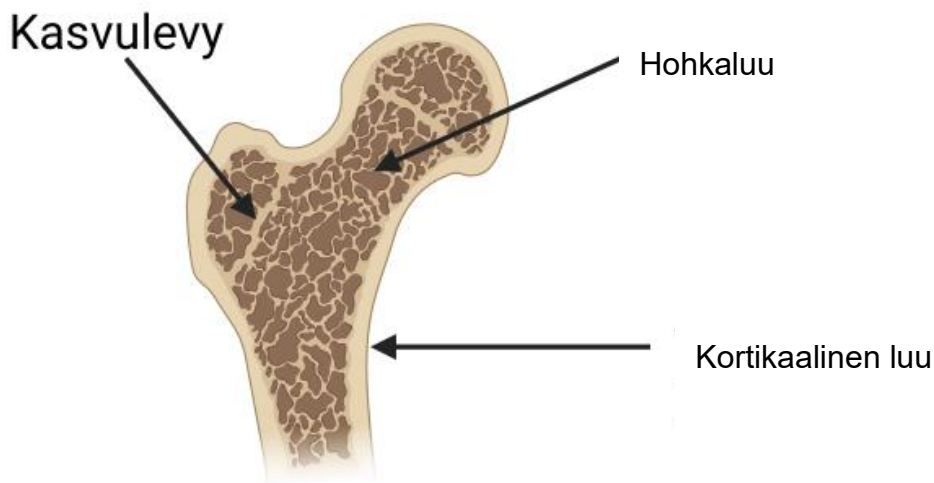
Ihmisen luusto on välttämätön liikkumiselle. Ihmisen luusto myös suojaa elintärkeitä elimiä ja osallistuu elektrolyyttitasapainon ylläpitoon (30). Luukudos muodostuu luukudokselle tyypillisistä soluista sekä niiden tuottamasta soluväliaineesta. Luukudoksessa esiintyy tyypillisesti neljää eri solutyyppiä: osteoblasteja, osteoklasteja, osteosyyttejä sekä luun pintasoluja. Luukudoksen soluväliaineen muodostavat komponentit voidaan jakaa epäorgaanisiin ja orgaanisiin komponentteihin. Orgaanisen komponentin muodostavat suurimmaksi osaksi kollageeniproteiinit, joista tyypin 1 kollageeni on luukudoksessa vallitseva, sekä luukudoksen muut proteiinit kuten osteokalsiini, osteopontiini, fibronectiini sekä niin sanotut BMP-proteiinit (bone morphogenetic proteins). Epäorgaaninen komponentti koostuu pääasiassa kalsium- ja fosfaatti-ioneista, jotka muodostavat kudokseen hydroksiapatiittikristalleja ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$). (31) Luukudoksen koostumus on esiteltyä kuvassa 3.



Kuva 3. Luukudos koostuu sille ominaisista solutyypeistä ja niiden muodostamasta väliaineesta, joka voidaan jakaa orgaanisiin ja epäorgaanisiin komponentteihin. (21)

Luukudos voidaan jakaa kahteen tyyppiin, kortikaaliseen eli kuoriluuhun sekä trabekulaariseen eli hohkaluuhun. Ihmisen luuston kokonaismassasta noin 80 % on kortikaalista luuta. Se ympäröi pitkiä luita ja on rakenteeltaan hyvin tiivistä toisin kuin

palkkimaisesti rakentunut hohkaluu, jota esiintyy muun muassa pitkien luiden pinnalla ja metafysiaalueilta sekä selkänikamissa (32.) Kortikaalinen luu mahdollistaa luun kestävyuden ja painon jakautumisen (33). Kuvassa 4 esitellään ihmisen pitkän luun tyypillinen rakenne. Kuvassa 4 esitellään ihmisen pitkän luun eli reisiluun proksimaalisen pään tyypillinen rakenne.



Kuva 4. Ihmisen pitkät luut rakentuvat sisemmästä, palkkimaisesti rakentuneesta ja kevytrakenteisesta hohkaluusta ja sitä ympäröivästä tiiviistä ja painavarakenteisesta kortikaalisesta luusta. Kuvassa esitetty kasvulevy on kasvuiässä olevilla lapsilla pitkien luiden varren ja pään välissä metafyysialueella oleva rustoinen rakenne, joka mahdollistaa luun pituuskasvun. (33)

Luun solujen ja luukudoksen soluväliaineen välinen vuorovaikutus on välttämätöntä luukudoksen homeostasian ylläpitämiseksi. Vuorovaikutus tapahtuu soluväliaineen orgaanisten komponenttien sisältämien adheesiomolekyylien, tyypillisesti erilaisten integriinien, avulla, kun taas luusolut tuottavat erilaisia kasvutekijöitä, sytokiineja ja prostaglandiineja, joiden avulla ne ylläpitävät luun homeostaasia. (31)

Osteoblastit vastaavat luukudoksen muodostamisesta tuottamalla kollageeniproteiinisäikeitä ja osallistumalla luukudoksen mineralisoimiseen sekä säätelemällä muiden luukudoksen solujen erilaistumista ja toimintaa (34). Osteoblastit ovat peräisin mesenkymaalisista kantasoluista (MSC), jotka ovat mesodermaalista alkuperää ja jotka aikuisella ihmisellä sijaitsevat luuytimen stroomassa (35). Osteoblastit voivat väliaineen muodostuksen jälkeen erilaistua lopullisesti joko luun pintasoluiksi tai varsinaisiksi luusoluiksi eli osteosyyteiksi joutuessaan luun soluväliaineen ympäröimäksi. Luun pintasolujen ja osteosyyttien välinen viestintäverkosto muodostuu solujen välisten aukkoliitosten avulla. Tämä verkosto toimii luukudoksen mekanostatian perustana (36.)

Mekanostatia viittaa luukudoksen kykyyn reagoida mekaanisiin kuormituksiin ja säädellä näin luun uusiutumisosseja ja se perustuu luukudoksen kykyyn havainnoida muutoksia mekaanisessa kuormituksessa. Osteoklastit ovat monitumaisia soluja, jotka hajottavat luukudosta. Ne erilaistuvat hematopoieettisista kantasoluista. Osteoklastien aikaansaama luukudoksen hajottaminen on monivaiheinen prosessi. (37)

Luukudoksen vallitseva solutyyppi ovat osteosyytit, jotka sijaitsevat luukudoksessa soluväliaineen ympäröiminä. Osteosyytit kehittyvät osteoblasteista niiden metabolisen aktiivisuuden laskun myötä niiden joutuessa solun väliaineen ja muiden luusolujen peittämiksi (38). Varhaisten osteosyyttien solu-ulokkeissa on aukkoliitoksia, joiden avulla ne mm. säätelevät mineralisaatiota varten saatavilla olevien ionien määrää (39). Kypsillä osteosyyteillä nämä dendriittien eli solu-ulokkeiden yhteydessä esiintyvät aukkoliitokset mahdollistavat kuljettamalla ravinteita riittävän ravinnon saannin kautta kudoksen. Kypsynyt osteosyytti menettää soluelimiä ja volyyymiä sen metabolian laskiessa, mikä johtaa lakuunoiden muodostumiseen luukudoksen lomaan (40).

Luun pintasolut ovat osteoblasteista erilaistuneita soluja, jotka sijaitsevat inaktiivisten luukudoksauleiden pinnalla (41). Ne ovat morfologialtaan litteitä eivätkä ne omaa osteogeneettistä aktiivisuutta (42). Luun pintasolujen välisten tiiviiden liitosten ajatellaan auttavan ylläpitämään luukudoksen ionikonsentraatioita (40).

1.3.2 Luukudoksen muodostuminen

Luukudoksen muodostumisprosessit voidaan jakaa intramembranoottiseen eli sidekudossyntyiseen välittömään luutumiseen ja endokondraaliseen luutumiseen, jossa luu muodostuu rustoisen välivaiheen kautta. Suurin osa ihmiselimestön luista muodostuu endokontraalisen luutumisen kautta, mutta sikiöaikana ihmisen kallon peitinluut, kasvojen luut ja solisluut muodostuvat intramembranoottisesti. (43)

Intramembranoottisessa luutumisessa mesenkyymikudos muuttuu suoraan luukudokseksi. Intramembranoottisen luutumisen vaiheet on esitettyinä taulukossa 4. Luukudoksen muodostuminen alkaa mesenkymaalisten solujen erilaistuessa osteoblasteiksi ja ryhmittäessä luutumiskeskuksiksi. Osa osteoblasteista erilaistuu osteosyyteiksi hautautuessaan muodostamaansa osteoidiin. Seuraavaksi muodostuu hohkaluuta ja luuta ympäröivä luukalvo eli periosti. Hohkaluun pinnalle muodostuu kerros kortikaalista luuta. Viimeisessä luutumisen vaiheessa verisuonet muodostavat punaisen luuytimen kortikaalisen luun sisäpuolelle. (44)

Taulukko 4. Intramembranoottisen luutumisen vaiheet. Muokattu lähteestä (44).

1.	Mesenkymaalisten solujen erilaistuminen osteoblasteiksi ja ryhmittäminen luutumiskeskuksiksi
2.	Osteoblastien hautautuminen osteoidiin ja erilaistuminen osteosyyteiksi
3.	Trabekulaarisen luun ja periostin eli luuta ympäröivän, luun pintasoluista koostuvan luukalvon muodostuminen
4.	Kortikaalisen luun muodostuminen hohkaluun pinnalle
5.	Verisuonet muodostavat punaisen luuytimen

Endokondraalinen luutuminen tapahtuu välillisesti niin, että hyaliinirustoinen malli korvataan luukudoksella. Sen vaiheet on esitetty yksinkertaistettuna taulukossa 5. Endokondraalinen luutuminen alkaa mesenkymaalisten solujen erilaistuttua kondrosyyteiksi eli rustokudoksen soluiksi. Ne muodostavat rustoisen mallin rakentuvalle luulle. Tämä malli rakentuu lasi- eli hyaliinirustosta, jota ympäröi rustokalvo perikondrium. Rustomuotin keskellä sijaitsevat hypertrofiset kondrosyytit ja alkavat erittää soluväliaineeseen kollageeni X:ä ja fibronectiiniä, mikä myöhemmin mineralisoituu. Mineralisoitumisen estäessä ravinteiden kulkeutumisen rustokudokseen, kondrosyytit kuolevat apotoottisesti. Kuolleiden solujen jälkeensä jättämä tyhjä tila mineralisoituneessa kudoksessa mahdollistaa verisuonien kasvun kudokseen. Verisuonten yhdistyessä muodostuu punainen luuydin. Verisuonten mukana kudokseen kulkeutuu osteogeenisiä soluja, jotka saavat aikaan rustokalvon korvautumisen luukalvolla. Luun paksuuskasvu jatkuu, kun osteoblastit muodostavat hohkaluuta luun diafyysin eli varren alueilla. Rustokudoksen kondrosyytit jatkavat proliferaatiota luutumisprosessin edetessä, mahdollistaen luun pituuden kasvamisen. Alueet, joilla kondrosyyttien proliferaatio jatkuu ovat nimeltään kasvulevyjä. Ne mahdollistavat luun pituuskasvun myös syntymän jälkeen, mutta luutuvat ihmisellä puberteetin päättyessä. Yksi kasvulevyn tyypillisistä sijainneista pitkässä luussa on esitettynä kuvassa 4. (44)

Taulukko 5. Endokondraalisen luutumisen vaiheet. Muokattu lähteestä (44).

1.	Mesenkymaalisten solujen erilaistuminen kondrosyyteiksi eli rustokudoksen soluiksi ja rustoisen mallin muodostuminen rakentuvalle luulle
----	---

2.	Keskellä rustokudosmassaa sijaitsevat kondrosyytit hypertrofioituvat ja niiden erittämä soluväliaine muuttuu kudoksen mineralisaation mahdollistavaksi
3.	Kondrosyytit menevät apoptoosiin ravinteiden puutteen takia
4.	Verisuonet tunkeutuvat rustokudoksen ja mahdollistavat osteogeenisten solujen kulkeutumisen alueelle
5.	Primäärinen luutumiskeskus muodostuu periosteumin diafyysialueelle
6.	Sekundaarinen luutumiskeskus muodostuu epifyysialueelle syntymän jälkeen

1.3.3 Luukudoksen uudelleenmuodostuminen ja korjaantuminen

Ihmisen luukudos uudistuu jatkuvasti. Vuosittain noin 5 % ihmisen luukudoksesta korvautuu uudella. Tämä on osa luukudoksen kestävyuden ylläpitoa (45.). Kuitenkin tilanteet, joissa luukudoksen korostunut uudelleenmuodostuminen ja korjaantuminen on tarpeellista ovat usein traumaperäisten syiden aiheuttamia. Esimerkiksi liiallinen pitkään luuhun kohdistunut luuta taivuttava voima voi saada aikaan niin sanotun pajunoksamurtuman (46).

Luukudoksen korjaantuminen voidaan jakaa kahteen erilaiseen prosessiin. Primäärinen luun korjaantuminen on prosessi, jossa luukappaleet ovat toistensa suhteen oikein asettuneina ja pysyvät kyseisessä asennossa. Kun nämä ehdot eivät toteudu, korjaantuu murtuma sekundaarisella luun korjautumisen prosessilla, joka on primääristä yleisempi. (47)

Primäärinen luun korjautumisen prosessi tapahtuu lamellien ja Haversin kanavien uudelleenmuodostumisen kautta. Lamellit ovat ohuita, kerrosmaisista luukudoksen rakenteita, jotka muodostuvat osteosyyteistä ja kollageenisäikeistä. Haversin kanavat ovat nimensä mukaisesti kanavia, kulkevat luun perusyksikön eli lamellien muodostaman osteonin keskellä. Luukudoksen verisuonet, imusuonet ja hermosyyt kulkevat Haversin kanavissa. Sekundaarinen luun murtuman korjaantumisprosessi voidaan jakaa neljään päävaiheeseen. Ensimmäiseksi murtuma-alueelle muodostuu hematooma eli verenhyytymä, tyypillisesti vauriokohtaa ympäröivien verisuonten vaurioitumisen aiheuttamana. Vaurioituneeseen kudokseen siirtyy valkosoluihin, eli leukosyytteihin kuuluvia soluja, kuten monosyyttejä sekä T- ja B-lymfosyyttejä. Sytokiini VEGF (vascular endothelial growth factor) -kasvutekijä edesauttaa verisuonten uudelleenmuodostusta vauriopaikalle. Seuraavaksi kondrosyyttien esiasteet erilaistuvat kondrosyyteiksi ja aloittavat rustoisen pahkuran eli kalluksen muodostamisen hematooman tilalle. Tätä kutsutaan myös pehmeäksi kallukseksi, ja se

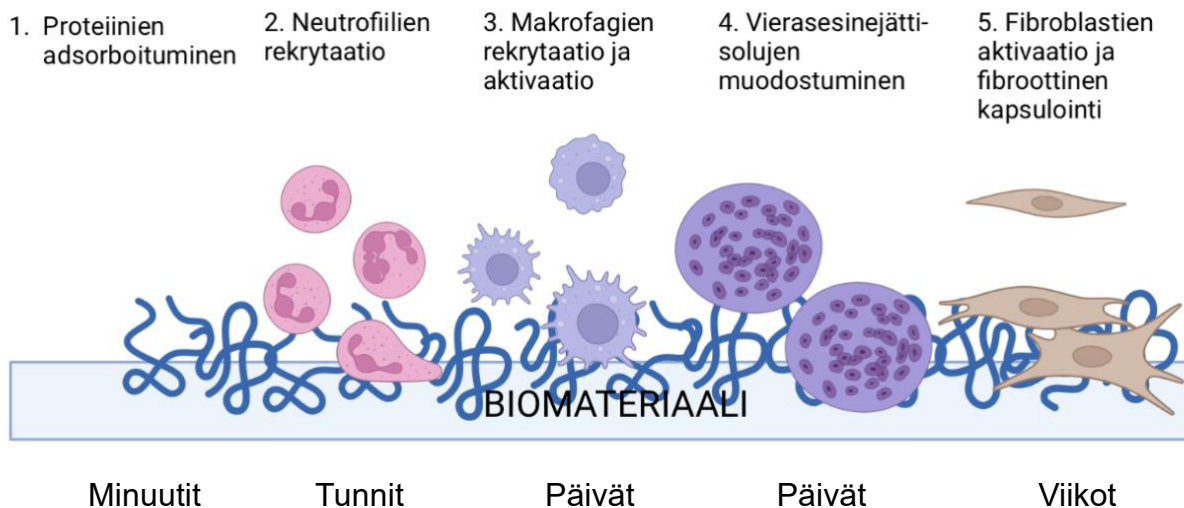
sisältää järjestäytymättömiä kollageenisäikeitä, paljon soluja eikä ole juuri mineralisoitunut. Kalluksen tarkoituksena on stabiloida vaurio ja mahdollistaa endokondraalinen luutuminen, jossa osteoblastit korvaavat rustoisen calluksen kovalla, luisella calluksella. Luukudosta uudelleenmuodostetaan hyvin järjestäytyneesti, kunnes luukudos on täysin regeneroitunut ja sen alkuperäinen arkkitehtuuri on saavutettu. (47) Luumurtuman korjaantumisen päävaiheet on esitelty taulukossa 6. Luumurtuman korjaantumisen päävaiheet on esitelty taulukossa 6.

Taulukko 6. Luumurtuman korjaantumisen päävaiheet. Muokattu lähteestä (47).

	Vaiheen tapahtumat	Aikapiste murtuman jälkeen
1	Hematooman muodostuminen ja akuutti inflammaatio	viikko 1
2	Rustosolujen muodostaman rustokalluksen muodostuminen	viikko 2-3
3	Luisen calluksen muodostuminen	kuukausi 1-4
4	Luun uudelleenmuodostuminen ja järjestäytyminen	kuukausi 4-12

1.4 Vierasesinereaktio

Vierasesine-termillä tarkoitetaan ihon alle tai kehoon joutunutta mitä tahansa esinettä tai roskaa (48). Vierasesinereaktio on elimistön immuunipuolustuksen vaste kehoon joutunutta vierasesinettä kohtaan (49). Sen vaiheet on esitelty kuvassa 5.



Kuva 5. Vierasesinereaktion vaiheet ja siihen osallistuvien solujen vasteet aikajärjestyksessä.

Implantin asentamisen aikana ja sen jälkeen biomateriaalin pinta ja potilaan veri pääsevät kosketuksiin ja veren proteiinit adsorboituvat materiaalin pintaan. Vromanin efektin mukaisesti proteiinit uudelleenjärjestäytyvät biomateriaalin pinnalla niiden biokemiallisen ja sähköisen affiniteetin perusteella (50.) Implantaation jälkeen vallitsee akuutin inflammaation vaihe, jolle on sen varhaisessa vaiheessa ominaista neutrofiilien läsnäolo implanttia ympäröivässä kudoksessa. Myöhemmässä akuutin inflammaation vaiheessa alueelle kerääntyy makrofageja, joita sidekudoksessa sijaitsevat syöttösolut houkuttelevat sinne yhdessä neutrofiilien kanssa (49.) Makrofagit ovatkin vallitseva solupopulaatio vierasesineen sijaintipaikalla ensimmäisen 48 tunnin jälkeen (28).

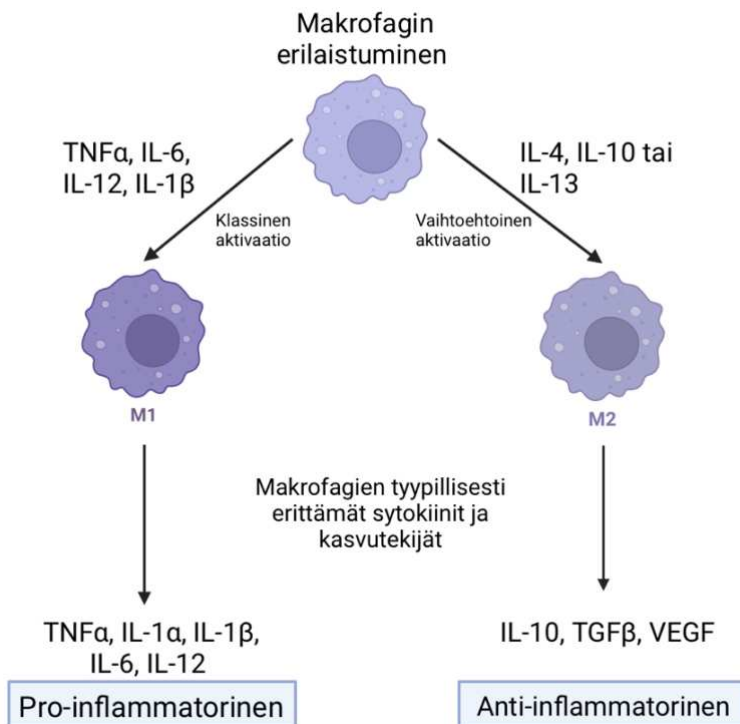
Vierasesinereaktio voi johtaa krooniseen inflammaatioon, jossa fibroottinen sidekuduskapseli muodostuu implantin ympärille. Tämä fibroottinen vaihe alkaa muutama viikko implantin asentamisen jälkeen (51.)

1.4.1 Makrofagit

Makrofagit eli syöjäsolut ovat hematopoieesissa eli verenmuodostuksessa syntyneitä immuunipuolustuksen soluja. Sikiökaudella makrofageja tuotetaan ruskuaispussissa, minkä jälkeen makrofagien tuotanto tapahtuu maksassa. Aikuisen kudoksissa olevat makrofagit

ovatkin pääosin muodostuneet yksilönkehityksen aikana. Syntymän jälkeen tulehdustilanteessa luuytimeistä peräisin olevat monosyytit voivat kulkeutua kudoksiin ja erilaistua makrofageiksi. Tätä tapahtuu pääsääntöisesti tulehdustilanteissa. (52)

Makrofagit ovat plastinen solutyyppe, joka kykenee aktivoitumaan ja polarisoitumaan ympäristön signaalien seurauksena. Klassisella aktivaatiolla tarkoitetaan makrofageja, jotka polarisoituvat yleensä IFN-gamma tai lipopolysakkaridin (LPS) vaikutuksesta tulehdusta edistäviksi soluiksi. Vaihtoehtoisesti aktivoituneista makrofageista puhuttaessa tarkoitetaan yleensä interleukiini (IL) 4:llä stimuloituja soluja, joilla on tulehdusta hillitseviä, anti-inflammatorisia vaikutuksia. Makrofageista käytetään myös M1 (tulehdukselliset) ja M2 (tulehdusta hillitsevät) luokittelua lähteestä riippuen (54.) M1- ja M2-makrofagien erilaistuminen sekä erityisprofiilit ovat esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Klassisesti aktivoituneet eli niin kutsutut M1-makrofagit, erittävät inflammaatiota edistäviä tekijöitä. Vaihtoehtoisesta aktivaatiosta syntyneet M2-makrofagit erittävät anti-inflammatorisia tekijöitä, kuten TGF- β (transforming growth factor β) ja VEGF (verisuonikasvutekijä).

Makrofagit kykenevät kiinnittymään implantin pintaan siihen adsorboituneiden veren proteiinien välityksessä. Nämä materiaaliin kiinnittyneet makrofagit vapauttavat erilaisia yhdisteitä kuten happiradikaaleja materiaalin hajottamiseksi ja tuhoavat sitten materiaalista irronneita pienempiä osia (55.) Materiaaliin kiinnittyneet makrofagit saattavat myös fuusioitua yhteen muodostaen vierasesinejättisoluja (55). On kiisteltyä, muodostuvatko vierasesinejättisolut tulehdusta edistävästä M1- vai tulehdusta hillitsevästä M2-makrofageista (55–57). M2-makrofagit ilmentävät kuitenkin osittain samoja solumarkkereita ja erittävät samoja tekijöitä kuin vierasesinejättisolut. Lisäksi sekä M2-makrofageja että vierasesinejättisoluja saadaan erilaistumaan IL-4-käsittelyllä *in vitro*.

Vierasesinereaktiossa M2-tyyppin makrofagit erittävät TGF- β :aa, joka voi saada aikaan epiteelisolujen transdifferentiaation myofibroblasteiksi, sekä aktivoida kiertäviä fibrosyyttejä ja paikallisia fibroblasteja sekä perisytyttejä. Myofibroblastit muodostavat arpikudosta erittämällä soluväliaineen proteiineja, kuten tyyppin I ja III kollageenia, fibronektiiniä ja laminiinia (52.) Tämä saa aikaan niin sanotun fibroottisen kapselin muodostumisen. Tämä saa aikaan niin sanotun fibroottisen kapselin muodostumisen.

Taulukko 7. M1- ja M2-makrofagien sekä vierasesinejättisolujen tyypillisiä ominaisuuksia. Taulukko on muokattu lähteestä (59)

Solutyyppi	Solun pintamarkerit	Erittyvät tekijät	Indusoivat tekijät
M1-makrofagit	CD80, CD86, CCR7, SOCS3	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23	TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β
M2-makrofagit	IL-10, CD163, SOCS1/2, Stabilis-1, CD201, Dectin-1, CD206	VEGF, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , MMP (3, 8, 9, 12, 13, 14)	IL-4, IL-13, IL-10

1.4.2 Vierasesinejättisolut

Vierasesinejättisolut muodostuvat aktivoituneiden, biomateriaalin pintaan kiinnittyneiden makrofagien fuusioituessa yhteen. Makrofagien kiinnittyminen biomateriaalin pintaan tapahtuu adheesiomolekyyliden kuten α M-, β 1- ja β 2- integriinien sekä CD44 välityksellä, joiden ligandina toimii RGD (arginiini-glysiini-asparagiinihappo) -toistojakso, joka löytyy

useista veren seerumin proteiineista kuten vitronektiinistä ja fibronektiinistä (61.) Makrofagien adheesion jälkeen niiden pinnat fuusioituvat keskenään. Tämän tapahtumiseksi täytyy makrofagien ekspressoida fusogeenejä, jotka fasilitoivat solukalvojen fuusioitumista. Makrofagien fusogeeneihin lukeutuvat DC-STAMP, E-kadheriini, CD44, makrofagi-fusioreseptori (MFR) ja makrofagi-mannoosireseptori (59.) Makrofagien fusogeenien on tutkittu aktivoituvan IL-4:n toimesta. Mahdolliseksi IL-4:n lähteeksi vierasesinereaktiossa on tunnistettu Th2-solut. Th2-solut ovat T-auttajasoluja, jotka tyypillisesti erittävät interleukiineja 4 ja 13 (61.) Vierasesinejättisolujen muodostumisen vaiheet on esitetty taulukossa 8.

Taulukko 8. Vierasesinejättisolujen muodostumisen vaiheet.

1	Veren plasman proteiinien adsorboituminen biomateriaalin pintaan
2	Monosyyttien siirtyminen implantin luo
3	Monosyyttien erilaistuminen makrofageiksi
4	Adsorboituneiden proteiinien sitoutuminen makrofagien pinnan reseptoreihin
5	Makrofagit eivät kykene fagocytoimaan biomateriaalia
6	Th2-solujen erittämä IL-4 aktivoi makrofagien fusogeenit
7	Makrofagit fuusioituvat yhteen

Vierasesinejättisolujen on tutkittu hajottavan biomateriaaleja fagocytoosin ja niiden erittämien happiradikaalien, vetyionien sekä metalloproteaasien avulla. Vierasesinejättisolut kykenevät fagocytoimaan jopa yli kaksi kertaa suurempia partikkeleita verrattuna mononukleaarisiin makrofageihin (62.) Biomateriaalien hajoaminen happiradikaalien, vetyionien ja metalloproteaasien toimesta ajatellaan olevan yksi mahdollisista biomateriaali-implanttien epäonnistumiseen johtavista tekijöistä (49). Vierasesinejättisolut kykenevät fagocytoimaan jopa yli kaksi kertaa suurempia partikkeleita verrattuna mononukleaarisiin makrofageihin (62.) Biomateriaalien hajoamisen happiradikaalien, vetyionien ja metalloproteaasien vaikutuksesta ajatellaan olevan yksi mahdollisista biomateriaali-implanttien epäonnistumiseen johtavista tekijöistä (49). Aseptinen löystyminen eli implantin

ympärillä esiintyvä luukato on usein implantin epäonnistumisen pääasiallinen mekanismi. Vierasesinejättisolujen on havaittu rekrytoivan osteoklasteja ja erittävän osteoklasteja aktivoivia kemokiineja kuten CCL2, CCL3 ja CCL9 (63.) Ne erittävät myös pro-inflammatorisia sytokiineja ja aktivoivat niiden avulla välillisesti T-soluja (64).

Vierasesinejättisolujen eritysfenotyyppi muuttuu vierasesinereaktion edetessä. Ensimmäisten muutaman viikon ajan vierasesinejättisolujen on havaittu erittävän suuria määriä pro-inflammatorisia sytokiineja IL-1 ja tuumorinekroositekijä α (TNF- α). Myöhemmin vierasesinejättisolut erittävät huomattavan suuria määriä transforming growth factor- β :aa (TGF- β) (63), joka edesauttaa kudosisaurioiden paranemista sekä saa aikaan arpikudoksen muodostumista (65,66). Tämän perusteella voisi päätellä vierasesinejättisolujen edesauttavan biomateriaalin bioaktiivisuutta häiritsevän fibroottisen kapselin muodostumista implanttien pinnalle.

Biomateriaalin erilaiset kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet vaikuttavat vierasesinereaktion intensiteettiin ja patogeneesiin. Anderson ja Jones toteuttivat tutkimuksen, jossa verrattiin materiaalipintojen ominaisuuksien vaikutusta vierasesinejättisolujen muodostumiseen (66). Negatiivisesti varautuneilla hydrofiilisilla materiaalipinnoilla havaittiin esiintyvän enemmän makrofagien adheesiota kuin positiivisesti varautuneilla hydrofiilisilla pinnoilla. Huomattavasti vähemmän adheesiota todettiin tapahtuneen neutraalisti varautuneilla pinnoilla. Makrofagien fuusioitumisen määrän havaittiin olevan suoraan verrannollista kiinnittyneiden makrofagien määrään. Hydrofobisten pintojen todettiin myös fasilitoivan makrofagien kiinnittymistä hydrofiilisiä pintoja paremmin. Samassa kokeessa havaittiin kuitenkin makrofagien eritysaktivaation olevan huomattavasti suurempi hydrofiilisilla pinnoilla. Vierasesinejättisolujen erittämien sytokiinien kokonaismäärä ei siis ole välttämättä suoraan verrannollinen vierasesinejättisolujen lukumäärään. Andersonin ja Jonesin tutkimuksen tulosten perusteella voitaisiin todeta hydrofiilisten biomateriaalipintojen fasilitoivan vierasesinejättisolujen välittämiä vaikutuksia hydrofobisia paremmin.

Vierasesinejättisolujen on havaittu kiinnittyvän paremmin huokoisiin kuin tiivispintaisiin materiaaleihin (67). On myös todettu, että nopeammin hajoavien bioaktiivisten lasien pinnoilla esiintyy enemmän vierasesinejättisolujen muodostumista (69). Nämä huokoiset ja nopeammin hajoavat materiaalit tyypillisesti mahdollistavat veren proteiinien kiinnittymisen materiaalin pintaan paremmin kuin tiivispintaisten ja hitaammin hajoavien materiaalien. Vitronektiini on yksi näistä materiaalin pintaan kiinnittyvistä proteiineista, joka myös

mahdollistaa vierasesinejättisolujen muodostumisen (69). Biomateriaalin kyky adsorboida vitronektiiniä pintaansa eli muun muassa materiaalin huokoisuus ja hajoamisnopeus voivat siis olennaisesti vaikuttaa vierasesinereaktion etenemiseen ja vierasesinejättisolujen muodostumiseen.

2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA HYPOTEEESIT

Tutkimuksen tavoitteena oli pystyttää toimiva protokolla vierasesinejättisolujen (FBGC) muodostumiselle soluviljelmäolosuhteissa ja selvittää, indusoiko bioaktiivinen lasi S53P4 vierasesinejättisolujen muodostumista *in vitro*, sekä tutkia muodostuneiden vierasesinejättisolujen tarkempia ominaisuuksia ja piirteitä. Tutkimuksen myötä ymmärryksemme vierasesinereaktioista parhaimmillaan syvenee ja voi tulevaisuudessa edesauttaa uusien biomateriaalien kehitystä ja implanttien parempaa onnistumisastetta.

Tutkimuskysymykset:

1. Vaikuttaako bioaktiivinen lasi S53P4 vierasesinejättisolujen muodostumiseen hiiren makrofagi-solulinjalla RAW 264.7 *in vitro*?
2. Vaikuttaako bioaktiivinen lasi S53P4 vierasesinejättisolujen muodostumiseen ihmisen makrofagisolulla THP-1 *in vitro*?

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Proteiinipinnoitteet

Vierasesinejättisolujen muodostamisprotokollan kehittämistä varten 24-kuoppalevyjen pohjalle lisättiin $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ tai $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ vitronektiini- (Advanced Biomatrix, #5051) tai $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ tai $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronektiinipinnoitetta (Corning, #354008). Pinnoitteet valmistettiin valmistajien ohjeiden mukaisesti. RAW 264.7 (ATCC, TIB-71) solulinjalla tehtyä koetta varten 24-kuoppalevyjen pohjaan lisättiin $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ vitronektiinipinnoite. Vitronektiinipinnoitetta inkuboitiin 2 tunnin ajan soluviljelyinkubaattorissa ($+37^\circ\text{C}$ 5 % CO_2). Tämän jälkeen kaivoista poistettiin ylimääräinen neste ja pinnoitettua levyä säilytettiin ilmatiiviisti jääkaapissa, kunnes se otettiin käyttöön 24 tuntia myöhemmin. THP-1 (ATCC, TIB-202) solulinjalla tehtyä koetta varten valmistettiin $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ vitronektiinipinnoite. Fibronektiinipinnoitetta inkuboitiin 1 tunti huoneenlämmössä, jonka jälkeen kaivot huuhdeltiin steriilillä vedellä. Pinnoitettua levyä säilytettiin ilmatiiviisti jääkaapissa, kunnes se otettiin käyttöön 24 tuntia myöhemmin.

3.2 Vierasesinejättisolujen muodostamisprotokolla

RAW 264.7 soluja lisättiin 24-kuoppalevyn kaivoihin 75×10^3 solua/kaivo. Soluja kasvatettiin 1 ml kasvatusmediumissa, joka koostui DMEM:stä (Gibco, #11965092), 10 % lämpöinaktivoidusta naudan sikiön seerumista (iFBS, Gibco, #10270-06) ja 1 % penisilliinistreptomysiinistä (kokonaistilavuus 1 ml/kaivo) ja solujen annettiin tarttua soluviljelyinkubaattorissa 24 tunnin ajan (37°C ja 5 % CO_2). Inkubaatioajan jälkeen kasvatusmediumin tilalle vaihdettiin 1 ml kasvatusmediumia, jossa oli 15 ng/ml interleukiini-4:ää (IL-4, R&D systems, #204-IL). Kontrollina toimiville soluille vaihdettiin tilalle tuore kasvatusmedium ilman IL-4:ää. Soluja kasvatettiin tämän jälkeen vielä 48 tunnin ajan.

THP-1 soluja lisättiin 24-kuoppalevyn kaivoihin 2×10^5 solua/kaivo. THP-1 solujen erilaistaminen makrofageiksi toteutettiin lisäämällä jokaiseen kaivoon 0,5 ml 25 ng/ml PMA-liuosta (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma Aldrich, P8139), joka oli valmistettu kasvatusmediumiin ilman antibiootteja. Kasvatusmediumina oli RPMI1640 (Gibco, #11835-063), johon lisättiin 10 % lämpöinaktivoitu naudan sikiön seerumi (iFBS, Gibco, #10270-06). Soluja kasvatettiin 72 tuntia (3 päivää) soluviljelyinkubaattorissa, minkä jälkeen soluille

vaihdettiin tuore kasvatusmedium, johon oli lisätty 20 ng/ml IL-4:ää (R&D systems, #204-IL). Kokeeseen sisällytettiin myös kontrolliryhmä ilman IL-4 käsittelyä. 48 tunnin jälkeen kerättiin soluviljelmistä kasvatusmediumnäytteet myöhempää analyysiä varten.

Sekä RAW 264.7 että THP-1 solut fiksattiin 48 tunnin kasvatuksen jälkeen 4 % paraformaldehydillä (PFA) 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen soluille tehtiin Giemsa-värjäys. Väriliuos oli valmistettu laimentamalla Giemsa-väri 1:9 fosfaattipuskuroituun veteen. Soluja inkuboitiin väriliuoksessa 2 minuutin ajan ja tämän jälkeen soluja huuhdeltiin fosfaattipuskuroidulla vedellä, kunnes väriä ei enää irronnut, kunnes väriä ei enää irronnut kaivoista. Tämän jälkeen vierasesinejättisolujen muodostumista eri pinnoitteiden kanssa arvioitiin mikroskopoimalla soluja.

Vierasesinejättisolujen muodostamisprotokolla toistettiin molemmille solulinjoille RAW 264.7 ja THP-1 biomateriaalien kanssa (15 mg/kaivo). RAW 264.7- ja THP-1-solulinjoilla käytettiin molemmilla 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ vitronektiinipinnoitetta. Biomateriaalit lisättiin 24-kuoppalevyjen kaivoihin proteiinipinnoitteiden valmistamisen jälkeen, ennen solujen lisäämistä kaivoihin. Lopuksi solut fiksattiin ja kuvattiin kuten edellä.

3.3 Biomateriaalit ja niiden vaikutus vierasesinejättisolujen muodostumiseen

Vierasesinejättisolujen muodostamisprotokolla toistettiin molemmille solulinjoille RAW 264.7 ja THP-1 biomateriaalien kanssa. Molemmilla solulinjoilla käytettiin 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ vitronektiinipinnoitetta. RAW 264.7 ja THP-1 solulinjoilla tehdyissä kokeissa kuoppalevyn kaivoihin lisättiin pinnoituksen jälkeen 15 mg joko alumiinioksidia (Al_2O_3), bioaktiivista lasia 45S5 tai S53P4 tai ei materiaalia ollenkaan. Taulukossa 10 on esitettyä käytettyjen materiaalien valmistajat, niiden tarkat koostumukset sekä partikkelikoot. Materiaalit oli steriloitu kuumentamalla niitä 180°C neljän tunnin ajan. Biomateriaalit lisättiin 24-kuoppalevyjen kaivoihin proteiinipinnoitteiden valmistamisen jälkeen, ennen solujen lisäämistä kaivoihin. Lopuksi solut fiksattiin ja kuvattiin kuten edellä.

Taulukko 10. Kokeissa käytettyjen biomateriaalien tarkemmat tiedot.

Materiaali	Partikkelikoko (μm)	Koostumus m-%	Valmistaja	LOT numero
Bioaktiivinen lasi 45S5	500-850	24,5 % Na_2O 45 % SiO_2 6 % P_2O_5 24,5 % CaO	MO-SCI Health Care, L.L.C. 4040 HyPoint North, Rolla MO 65401 USA	257-7-1-15093
Bioaktiivinen lasi S53P4	500-800	23 % Na_2O 53 % SiO_2 4 % P_2O_5 20 % CaO	MO-SCI Health Care L.L.C. 4040 HyPoint North, Rolla MO 65401 USA	19041601
Alumiinioksidi	500	99,75 % Al_2O_3 0,25 % Na_2O 0,02 % SiO_2 0,02 % Fe_2O_3	Duralum White (Washington mills)	NA

3.4 Tulosten analyysi ja tilastollinen tarkastelu

3.4.1 Proteiinipinnoitteiden vertaileminen

Kaikissa tehdyissä kokeissa toteutettiin koeryhmät kolmena rinnakkaisena teknisenä toistona eli kaivona. Rinnakkaisten kaivojen vierasesinesolujen määrät laskettiin laskemalla keskiarvo kaivoista otetuista kuvista löytyneiden vierasesinejättisolujen määrän keskiarvoista ja näistä edelleen yksittäisten kokeiden tulosten eli biologisten toistojen keskiarvot. Keskihajonnat määritettiin kokeiden tulosten keskiarvoista. Kokeen tavoitteena oli verrata vierasesinejättisolujen muodostamisprotokollien toimivuutta ja tunnistaa tehokkain menetelmä, jota hyödynnettäisiin jatkotutkimuksissa. Tuloksista ei tehty tilastollista testausta, sillä se ei ollut tarkoituksenmukaista.

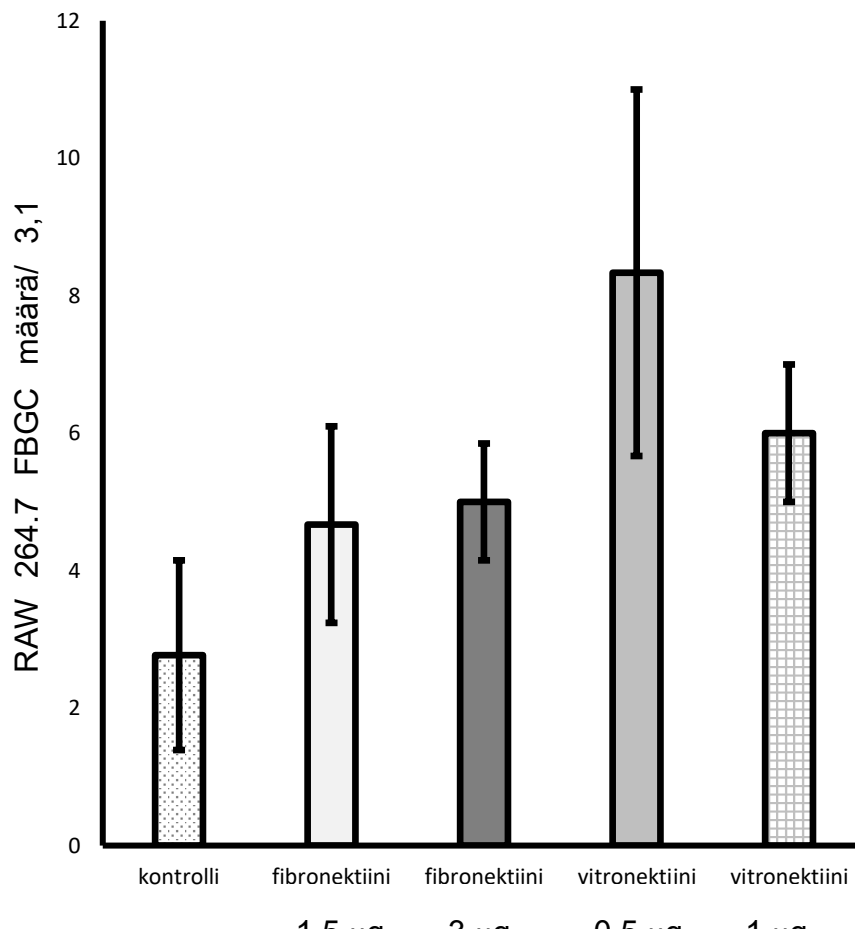
3.4.2 Biomateriaalien vaikutus vierasesinejättisolujen muodostumiseen

Jokainen kaivo jaettiin neljään osaan piirtämällä kaivojen pohjaan rastit. Jokaisesta alueesta otettiin mikroskoopilla (Nikon Eclipse TS100) yksi kuva satunnaisesta sijainnista 20x objektiivilla. Tämä tehtiin datan keräämisen systemoimiseksi. Jokaisen koeryhmän kaikille kolmelle biologiselle toistolle toteutettiin ensin normaalijakauman tarkastus graafisesti Microsoft Office Excelissä. Niille toteutettiin sitten Excelillä F-testi (F-Test Two-Sample for Variances) ja tämän jälkeen t-testi (t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances) koeryhmien välillä olevien mahdollisten tilastollisten erojen määrittämiseksi.

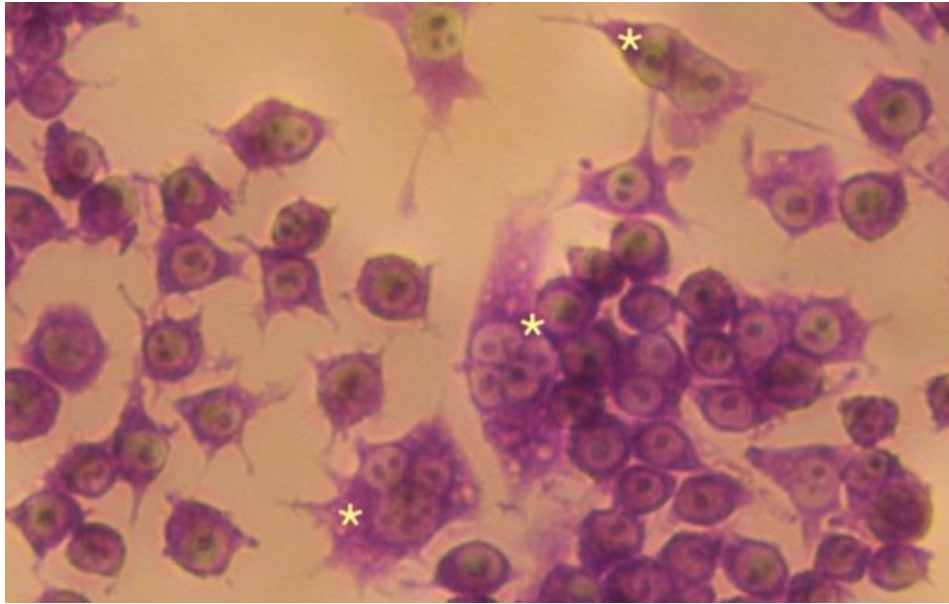
4 TULOKSET

4.1 Vitronektiinipinnoite edesauttoi vierasesinejättisolujen muodostumista parhaiten

Vierasesinejättisolujen indusointia varten RAW 264.7 soluja kasvatettiin joko fibronektiini- tai vitronektiinipinnoitetuilla kuoppalevyillä. Molemmista pinnoitemateriaaleista kokeiltiin kahta eri konsentraatiota. Eniten vierasesinejättisoluja saatiin muodostumaan $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ vitronektiinipinnoitusta käyttämällä. Tämän perusteella valittiin $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ vitronektiinipinnoite RAW 264.7 solulinjalla toteutettaviin jatkotutkimuksiin. Tulokset ovat esitettynä kuvassa 7.



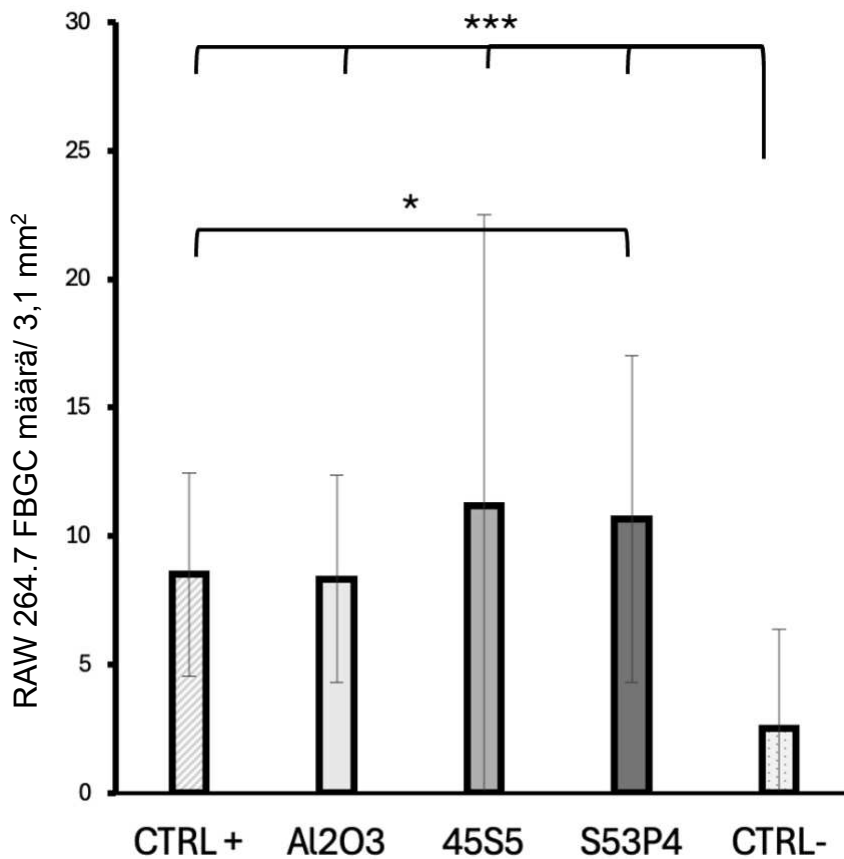
Kuva 7. Vierasesinejättisolujen muodostusprotokollissa kokeiltujen eri proteiinipinnoitteiden tehokkuudet vierasesinejättisolujen muodostumisessa. Kuvassa on esitetty vierasesinesolujen keskimääräinen määrä soluviljelykuoppalevyn pinta-alaa kohden. Eniten vierasesinejättisoluja saatiin muodostumaan RAW 264.7-solulinjan soluista käyttämällä 0,5 µg/cm² vitronectiinipinnoitusta. FBGC vierasesinejättisolu.



Kuva 8. Giemsa-värjättyjä RAW 264.7-solulinjan soluista muodostuneita vierasesinejättisoluja, jotka on merkitty tähdellä (*).

4.2 Bioaktiiviset lasit S53P4 ja 45S5 edesauttoivat vierasesinejättisolujen muodostumista RAW 264.7 solulinjalla

Negatiivisessa kontrolliryhmässä, eli kaivoissa, joissa viljeltiin soluja ilman vitronektiinipinnoitetta tai IL-4 käsittelyä, havaittiin ainoastaan satunnaisia yksittäisiä vierasesinejättisoluja. Positiivisen kontrollin ja alumiinioksidin välillä ei ollut havaittavissa merkittävää eroa vierasesinejättisolujen muodostumisessa ($p = 0,599$; Kuva 8). Bioaktiivisten lasien kanssa viljeltyt makrofagit muodostivat enemmän vierasesinejättisoluja kuin makrofagit, joita viljeltiin alumiinioksidin kanssa tai ilman materiaalia. 45S5-koeryhmässä havaittiin enemmän vierasesinejättisoluja kuin S53P4-koeryhmässä. S53P4-koeryhmässä havaittiin merkittävästi enemmän vierasesinejättisoluja kuin positiivisessa kontrolliryhmässä ($p < 0,05$). Positiivisessa kontrolliryhmässä havaittiin negatiiviseen kontrolliin verrattuna huomattavasti enemmän vierasesinejättisoluja ($p < 0,001$). Myös alumiinioksidi-, 45S5- ja S53P4-koeryhmissäkin havaittiin huomattavasti suurempi määrä vierasesinejättisoluja kuin negatiivisessa kontrollissa ($p < 0,001$). Tarkat muodostuneiden vierasesinejättisolujen määrät on esitetty taulukossa 11.



Kuva 8. Kuvassa on esitettyä RAW 264.7 -solulinjan solujen muodostamien vierasesinejättisolujen keskimääräinen määrä soluviljelykuoppalevyn pinta-alaa kohden. Tilastollisesti merkittävät tulokset positiiviseen kontrolliin verrattuna on merkitty *** $p \leq 0,001$ ja * $p \leq 0,05$. FBGC vierasesinejättisoluu, CTRL+ positiivinen kontrolli, CTRL- negatiivinen kontrolli.

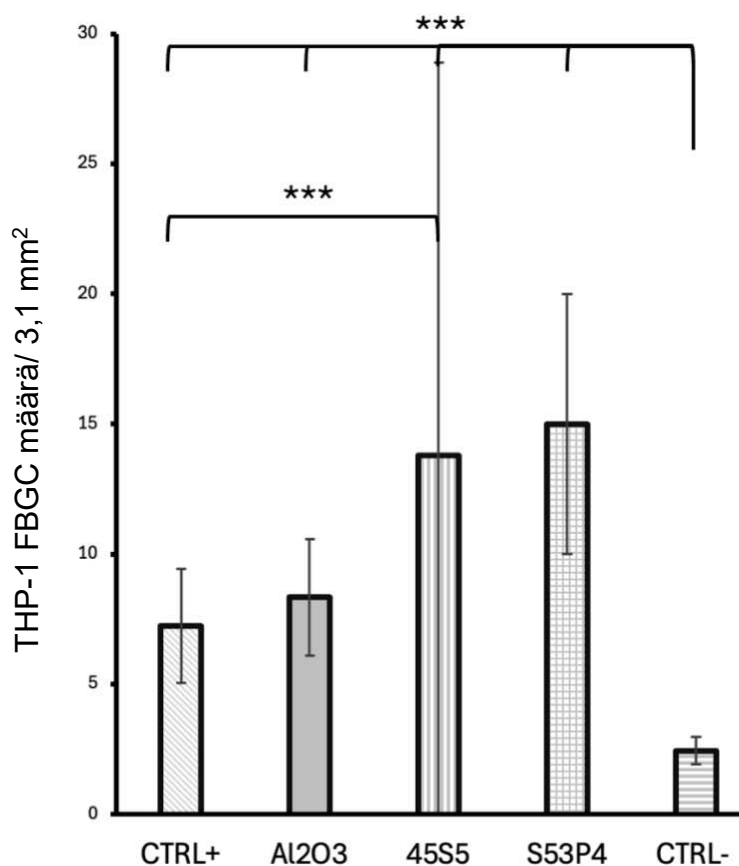
Taulukko 11. RAW 264.7 -solulinjan solujen muodostamien vierasesinejättisolujen keskimääräinen määrä soluviljelykuoppalevyn pinta-alaa kohden.

Koeryhmä	CTRL+	Al2O3	45S5	S53P4	CTRL-
FBGC määrä	8,5 ± 0	8,3 ± 1,5	11,2 ± 1,8	10,7 ± 2,5	2,5 ± 0,5

4.3 Bioaktiiviset lasit S53P4 ja 45S5 edesauttoivat vierasesinejättisolujen muodostumista THP-1 solulinjalla

Vierasesinejättisolujen määrä määritettiin ihmisperäisillä THP-1 soluilla samaa protokollaa hyödyntäen kuin RAW 264.7 solulinjan kanssa työskennellessä. Myös tilastollinen testaus

toteutettiin samaa protokollaa hyödyntäen. Negatiivisessa kontrolliryhmässä, eli kaivoissa, joissa viljeltiin soluja ilman vitronektiinipinnoitetta tai IL-4 käsittelyä, havaittiin ainoastaan satunnaisia yksittäisiä vierasesinejättisoluja. Positiivisessa kontrolliryhmässä havaittujen vierasesinejättisolujen määrä oli huomattavasti suurempi kuin negatiivisessa kontrolliryhmässä ($p < 0,001$, Kuva 9). Myös alumiinioksidi-, 45S5- ja S53P4-koeryhmissäkin havaittiin huomattavasti suurempi määrä vierasesinejättisoluja kuin negatiivisessa kontrollissa ($p < 0,001$). Positiivisen kontrollin ja alumiinioksidin välillä ei ollut havaittavissa merkittävää eroa vierasesinejättisolujen muodostumisessa. Bioaktiivisten lasien kanssa viljellyt makrofagit muodostivat enemmän vierasesinejättisoluja kuin muut koeryhmät. 45S5-koeryhmässä havaittiin tilastollisesti merkitsevä määrä vierasesinejättisoluja verrattuna positiiviseen kontrolliryhmään ($p < 0,001$). S53P4-koeryhmässä havaittiin enemmän vierasesinejättisoluja kuin 45S5-koeryhmässä, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkittävä. Tarkat muodostuneiden vierasesinejättisolujen määrät on esitetty taulukossa 12.



Kuva 9. Kuvassa on esitetty THP-1-solulinjan solujen muodostamien vierasesinejättisolujen keskimääräinen määrä soluviljelykuoppalevyn pinta-alaa kohden.

Tilastollisesti merkittävät tulokset positiiviseen kontrolliin verrattuna on merkitty *** $p \leq 0,001$.
FBGC vierasesinejättisolu, CTRL+ positiivinen kontrolli, CTRL- negatiivinen kontrolli.

Taulukko 12. THP-1 solulinjan solujen muodostamien vierasesinejättisolujen keskimääräinen määrä soluviljelykuoppalevyn pinta-alaa kohden. Tilastollisesti merkittävät tulokset positiiviseen kontrolliin verrattuna on merkitty *** $p \leq 0,001$.

Koeryhmä	CTRL+	Al2O3	45S5	S53P4	CTRL-
FBGC määrä	7,2 ± 0,69	8,3 ± 1,2	13 ± 1,4***	15 ± 1,0	2,4 ± 0,5 ***

5 POHDINTA

Molemmat tutkitut bioaktiiviset lasit saivat aikaan vierasesinejättisolujen muodostumista RAW 264.7 ja THP-1 solulinjojen soluista. Vogel et al. tutkivat kanin elimistössä tapahtuvaa vierasesinejättisolujen muodostumista erilaisten bioaktiivisten lasien pinnoilla, että nopeammin liukenevan materiaalin pinnalle muodostuu enemmän vierasesinejättisoluja (69.) 45S5 bioaktiivisen lasin tiedetään liukenevan elimistössä nopeammin kuin S53P4 ja se sai myös meidän tutkimuksessamme aikaan vierasesinejättisolujen muodostumista RAW 264.7 solulinjalla enemmän kuin bioaktiivinen lasi S53P4. Toisaalta THP-1 solulinjalla toteutetussa tutkimuksessa bioaktiivinen lasi S53P4 indusoi vierasesinejättisolujen muodostumista enemmän kuin 45S5. Lasien väliset erot eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä kummallakaan solulinjalla toteutetuissa tutkimuksissa.

Bioaktiivisten lasien 45S5 ja S53P4 pinnat ovat hydrofiilisiä ja tällaisten pintojen tiedetään aiempien tutkimusten mukaan olevan huonompia makrofagien kiinnittymiselle ja fuusioitumiselle vierasesinejättisoluihin verrattuna hydrofobisiin pintoihin. Hydrofiilisille pinnoille muodostuneiden vierasesinejättisolujen on kuitenkin havaittu olevan metabolisesti aktiivisempia kuin hydrofobisille pinnoille muodostuneiden vierasesinejättisolujen (67.) Tulevaisuudessa olisi olennaista tutkia päteekö tämä myös bioaktiivisten lasien pinnalla muodostuneisiin vierasesinejättisoluihin. Jos vierasesinejättisolut, jotka muodostuvat bioaktiivisten lasien 45S5 ja S53P4 pinnoille eivät ole aktiivisia, ei niiden määrällä välttämättä ole kliinistä merkitystä. Tulevaisuudessa olisikin olennaista tutkia myös sitä, ovatko ne metabolisesti aktiivisia näillä pinnoilla.

Tämän tutkimuksen pohjalta epäselväksi jäi se, mikä tai mitkä bioaktiivisten lasien ominaisuuksista edesauttavat vierasesinejättisolujen muodostumista. Mahdollisia tekijöitä ovat materiaalien pinnalle adsorboituneet proteiinit sekä bioaktiivisten lasien hajotessa vapautuvat ionit. Tätä aihetta voisi tulevaisuudessa tutkia tarkemmin esimerkiksi

vertaamalla kasvatusmediumien ionikonsentraatioita suhteessa muodostuneiden vierasesinejättisolujen määrään.

Kontrollimateriaalina toiminut alumiinioksidi ei puolestaan vaikuttanut merkittävästi muodostuvien vierasesinesolujen määrään RAW 264.7 tai THP-1 solulinjoilla toteutetuissa tutkimuksissa. Tämän voidaan olettaa johtuvan materiaalin biologisesti inertistä luonteesta. Voidaan siis todeta, että tämän partikkelikoon alumiinioksidi ei edesauta vierasesinejättisolujen muodostumista, vaikka *in vivo* -tutkimuksissa alumiinioksidin yhteydessä on havaittu muodostuvan vierasesinejättisoluja (70) Myös bioaktiivisten lasien S53P4 ja 45S5 vaikutuksia vierasesinejättisolujen muodostumiseen tulisi tutkia *in vivo*, jotta voisimme verrata tämän *in vitro*-tutkimuksen tuloksia aiemmin tehtyihin *in vivo* -tutkimuksiin, joita alumiinioksidilla on toteutettu.

VIITTEET

1. Institute of Biomedical Imaging N. Biomaterials Fact Sheet [Internet]. Available from: www.nibib.nih.gov
2. Marjanović-Balaban Ž, Jelić D. Polymeric Biomaterials in Clinical Practice. In: Biomaterials in Clinical Practice. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 101–17.
3. Seppälä Jukka VPNTAAYUA. Uudet polymeeripohjaiset biomateriaalit . Duodecim. 2004;120(10):1203–9.
4. Solati-Hashjin M, Moztarzadeh F. Medical use of ceramic materials [Internet]. 1997. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/296198694>
5. Vaiani L, Boccaccio A, Uva AE, Palumbo G, Piccininni A, Guglielmi P, et al. Ceramic Materials for Biomedical Applications: An Overview on Properties and Fabrication Processes. Vol. 14, Journal of Functional Biomaterials. MDPI; 2023.
6. Salernitano E, Migliaresi C. Composite materials for biomedical applications: a review. Vol. 1, Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics. 2003.
7. Shamika M. sciencing.com. 2017. Advantages & Disadvantages of Biomaterials.
8. Puska M AAVP. Biomateriaalit luun korjauksessa . Duodecim. 2013;129(5):489–96.
9. Biomaterials: Basic principles [Internet]. Available from: www.worldscientific.com
10. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. Journal of the American Ceramic Society. 1991;74(7):1487–510.
11. Cannio M, Bellucci D, Roether JA, Boccaccini DN, Cannillo V. Bioactive glass applications: A literature review of human clinical trials. Vol. 14, Materials. MDPI; 2021.
12. Aalto-Setälä L, Uppstu P, Sinitsyna P, Lindfors NC, Hupa L. Dissolution of amorphous s53p4 glass scaffolds in dynamic in vitro conditions. Materials. 2021 Sep 1;14(17).
13. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. Vol. 9, Acta Biomaterialia. Elsevier Ltd; 2013. p. 4457–86.

14. Rantakokko J, Frantzén JP, Heinänen J, Kajander S, Kotilainen E, Gullichsen E, et al. Posterolateral Spondylodesis Using Bioactive Glass S53P4 and Autogenous Bone in Instrumented Unstable Lumbar Spine Burst Fractures. *Scandinavian Journal of Surgery*. 2012 Mar 1;101(1):66–71.
15. Zhou P, Garcia BL, Kotsakis GA. Comparison of antibacterial and antibiofilm activity of bioactive glass compounds S53P4 and 45S5. *BMC Microbiol*. 2022 Dec 1;22(1).
16. Lindfors NC, Heikkilä JT, Koski I, Mattila K, Aho AJ. Bioactive glass and autogenous bone as bone graft substitutes in benign bone tumors. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90 B(1):131–6.
17. Aalto-Setälä L, Siekkinen M, Lindfors NC, Hupa LC; Dissolution of Glass-Ceramic Scaffolds of Bioactive Glasses 45S5 and S53P4. Available from: <https://doi.org/10.1007/s44174-022->
18. Khalid MD KZZMFIKRNA. Bioactive Glasses and their Applications in Dentistry. *Dent Assoc*. 2017 Dec 8;26(1):32–8.
19. Maximov M, Maximov OC, Craciun L, Fikai D, Fikai A, Andronescu E. Bioactive glass—an extensive study of the preparation and coating methods. Vol. 11, *Coatings*. MDPI; 2021.
20. Eriksson E, Björkenheim R, Strömberg G, Ainola M, Uppstu P, Aalto-Setälä L, et al. S53P4 bioactive glass scaffolds induce BMP expression and integrative bone formation in a critical-sized diaphysis defect treated with a single-staged induced membrane technique. *Acta Biomater*. 2021 May 1;126:463–76.
21. Sirkiä S V. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND CHARACTERIZATION OF BIOCERAMICS AND BIOACTIVE GLASSES FOR BONE REPAIR.
22. Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Müller-Mai CM. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass® particles in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Sep 1;70(3):370–9.
23. Fiume E, Barberi J, Verné E, Baino F. Bioactive glasses: From parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies. Vol. 9, *Journal of Functional Biomaterials*. MDPI AG; 2018.

24. Gobbo VA, Parihar VS, Prato M, Kellomäki M, Vernè E, Spriano S, et al. Surface modification of silicate, borosilicate and phosphate bioactive glasses to improve/control protein adsorption: PART I. *Ceram Int.* 2023 Jan 1;49(1):1261–75.
25. Bahniuk MS, Pirayesh H, Singh HD, Nychka JA, Unsworth LD. Bioactive glass 45S5 powders: Effect of synthesis route and resultant surface chemistry and crystallinity on protein adsorption from human plasma. *Biointerphases.* 2012;7(1–4):1–15.
26. Söderling E, Herbst K, Larmas E, Yli-Urpo A. Protein adsorption to a bioactive glass with special reference to precorrosion. *J Biomed Mater Res.* 1996 Aug;31(4):525–31.
27. Välimäki VV, Aro HT, Aro HT. MOLECULAR BASIS FOR ACTION OF BIOACTIVE GLASSES AS BONE GRAFT SUBSTITUTE. Vol. 95, *Scandinavian Journal of Surgery.* 2006.
28. Holmström A, Meriläinen A, Hyvönen J, Nolvi A, Ylitalo T, Steffen K, et al. Evaluation of bone growth around bioactive glass S53P4 by scanning acoustic microscopy co-registered with optical interferometry and elemental analysis. *Sci Rep.* 2023 Dec 1;13(1).
29. Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive glasses: Where are we and where are we going? Vol. 9, *Journal of Functional Biomaterials.* MDPI AG; 2018.
30. Cowan PT, Launico M V., Kahai P. *Anatomy, Bones.* 2024.
31. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.* Vol. 2015, *BioMed Research International.* Hindawi Publishing Corporation; 2015.
32. Martin R. Bruce, Burr B. David, Sharkey A. Neil. *Skeletal tissue mechanics.* 2010.
33. Sidorenko I, Monetti R, Bauer J, Mueller D, Rummeny E, Eckstein F, et al. Assessing Methods for Characterising Local and Global Structural and Biomechanical Properties of the Trabecular Bone Network. *Curr Med Chem.* 2011 Jul 25;18(22):3402–9.
34. Jones Elena, Yang Xuebin. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. *International journal of the care of the injured.* 2011 Jun;42(6):562–8.

35. Mark C. Horowitz, Alfred L. M. Bothwell, David G. T. Hesslein, David L. Pflug, David G. Schatz. B cells and osteoblast and osteoclast development . immunological reviews . 2005 Nov 22;208(1):141–53.
36. Mullender MG, Huiskes R. Osteocytes and Bone Lining Cells: Which are the Best Candidates for Mechano-Sensors in Cancellous Bone? Vol. 20, Bone. 1997.
37. Quinn JMW, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. Vol. 328, Biochemical and Biophysical Research Communications. Academic Press Inc.; 2005. p. 739–45.
38. Noble BS, Reeve J. At the Cutting Edge Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance [Internet]. Vol. 159, Molecular and Cellular Endocrinology. 2000. Available from: www.elsevier.com/locate/mce
39. Liu Y zhong, Hong-wen Deng. Current topics in bone biology . Singapore: world scientific . 2015;
40. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. Vol. 21, Osteoporosis International. 2010. p. 1457–69.
41. Lee JY, Yang JY, Kim SW. Bone Lining Cells Could Be Sources of Bone Marrow Adipocytes. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Dec 3;12.
42. Miller SC, Bowman BM, Jee WSS. Bone Lining Cells: Structure and Function [Internet]. Vol. 3, Scanning Microscopy. Available from: <https://digitalcommons.usu.edu/microscopy><https://digitalcommons.usu.edu/microscopy/vol3/iss3/27>
43. Zhang H, Shi X, Wang L, Li X, Zheng C, Gao B, et al. Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced osteoporosis and estrogen deficiency-induced osteoporosis. Sci Rep. 2018 Dec 1;8(1).
44. Breeland G SMMR. Embryology, Bone Ossification. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
45. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Angel Alobera Gracia M, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L, Juan Carlos R, Titular DDS P. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process.

46. Hurme T. Kasvuikäisten raajamurtumat. 2015;131(5):457–63.
47. Sheen JR MAGVV. Fracture Healing Overview. In: Sheen JR MAGV, editor. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;
48. Hunter TB, Taljanovic MS. Foreign Bodies. RadioGraphics. 2003 May;23(3):731–57.
49. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Vol. 20, Seminars in Immunology. 2008. p. 86–100.
50. Xue L, Greisler HP. Blood Vessels. 2000.
51. Ward WK. A Review of the Foreign-body Response to Subcutaneously-implanted Devices: The Role of Macrophages and Cytokines in Biofouling and Fibrosis [Internet]. Available from: www.journalofdst.org
52. Stremmel C, Schuchert R, Wagner F, Thaler R, Weinberger T, Pick R, et al. Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development. Nat Commun. 2018 Dec 1;9(1).
53. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Vol. 41, Immunity. Cell Press; 2014. p. 14–20.
54. Carnicer-Lombarte A, Chen ST, Malliaras GG, Barone DG. Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. Vol. 9, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.; 2021.
55. Kim SG. Immunomodulation for maxillofacial reconstructive surgery. Vol. 42, Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020.
56. Grace Foley K, Pritchard MT, Duncan FE. Macrophage-derived multinucleated giant cells: Hallmarks of the aging ovary. Vol. 161, Reproduction. BioScientifica Ltd.; 2021. p. V5–9.
57. Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N, Glogauer M. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. Vol. 8, Materials. MDPI AG; 2015. p. 5671–701.

58. Braga TT, Agudelo JSH, Camara NOS. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2015.
59. Klopfleisch R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model – Phenotypes, functions and markers. Vol. 43, *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd; 2016. p. 3–13.
60. Brodbeck WG, Anderson JM. Giant cell formation and function. Vol. 16, *Current Opinion in Hematology*. 2009. p. 53–7.
61. Milde R, Ritter J, Tennent GA, Loesch A, Martinez FO, Gordon S, et al. Multinucleated Giant Cells Are Specialized for Complement-Mediated Phagocytosis and Large Target Destruction. *Cell Rep*. 2015 Dec 1;13(9):1937–48.
62. Khan UA, Hashimi SM, Khan Shershah, Quan Jingjing, Bakr MM, Forwood MR, et al. Differential Expression of Chemokines, Chemokine Receptors and Proteinases by Foreign Body Giant Cells (FBGCs) and Osteoclasts. *J Cell Biochem*. 2014 Feb 6;(115):1290–8.
63. Ahmadzadeh K, Vanoppen M, Rose CD, Matthys P, Wouters CH. Multinucleated Giant Cells: Current Insights in Phenotype, Biological Activities, and Mechanism of Formation. Vol. 10, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
64. Pagán AJ, Ramakrishnan L. The Formation and Function of Granulomas. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2018;25. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol->
65. Hernandez-Pando R, Bornstein QL, Aguilar Leon D, Orozco EH, Madrigal VK, Martinez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology*. 2000;100(3):352–8.
66. Anderson JM, Jones JA. Phenotypic dichotomies in the foreign body reaction. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(34):5114–20.
67. Anderson James, Cramer Stephanie. Perspectives on the Inflammatory, Healing, and Foreign Body Responses to Biomaterials and Medical Devices. In: Babylak Stephen F., editor. *Host response to biomaterials*. Academic press; 2015. p. 13–36.

68. Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Müller-Mai CM. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass® particles in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Sep 1;70(3):370–9.
69. McNally AK, Jones JA, MacEwan SR, Colton E, Anderson JM. Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Aug;86(2):535–43.
70. Esposito C, Maclean F, Campbell P, Walter WL, Walter WK, Bonar SF. Periprosthetic Tissues From Third Generation Alumina-on-Alumina Total Hip Arthroplasties. *J Arthroplasty*. 2013 May;28(5):860–6.