

Opinnäytetyö (AMK)

Bio-ja elintarviketekniikka

Laboratoriotekniikka

2014

Natalia Habilainen-Kirillov

# HIIREN RUSTOSOLUVILJELYMALLIN PYSTYTTÄMINEN

– Pharmatest Services Oy



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio-ja elintarviketekniikka | Laboratoriotekniikka

Kevät 2014 | Sivumäärä 93

Ohjaajat: FT Katja Fagerlund (Pharmatest Services Oy) ja FM Kari Haajanen (Turun AMK)

Natalia Habilainen-Kirillov

## HIIREN RUSTOSOLUVILJELYMALLIN PYSTYTTÄMINEN

Mesenkymaaliset kantasolut ovat monikykyisiä soluja, joita löytyy useista aikuisen ihmisen kudoksista mm. luuytimestä, nivelkalvon kudoksista ja rasvakudoksesta. Mesenkymisolulla on kykyä uusiutua ja erilaistua useiksi solutyypeiksi. Ne voivat erilaistua rasvasoluiksi, luusoluiksi ja rustosoluiksi riippuen viljelyolosuhteista. Ruston erilaistuminen on monivaiheinen tapahtumasarja, jossa mesenkymisolut tiivistyvät, erilaistuvat rustosoluiksi ja alkavat erittää soluväliaineen muodostavia proteiineja. Erilaistumista säädelään ajallisesti soluvuorovaikutusten ja kasvutekijöiden avulla, jotka muuttavat solun signaalintireittejä ja tiettyjen geenien transkriptiota.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia KS483 hiiren mesenkymaalisten kantasolujen soveltuvuutta ruston erilaistumisen *in vitro*-malliin ja optimoida soluviljelyolosuhteet. KS483 solut kykenevät erilaistumaan rustosoluiksi, rasvasoluiksi ja luuta muodostaviksi osteoblasteiksi. KS483-soluja viljeltiin seerumivapaassa kasvatusmediumissa, joka sisälsi erilaisten kasvutekijöiden lisäksi kolme pitoisuutta (100 ng/ml, 300 ng/ml ja 500 ng/ml) BPM-6 ja ilman BMP-6. Ruston erilaistumisen aikaansaamiseksi soluja viljeltiin 3-ulotteisena (3D) pellettiviljelmänä 96-kuoppalevyllä 17, 24 ja 28 päivän ajan. Kasvatusmediumi vaihdettiin 2 - 3 päivän välein. Erilaistumista rustosoluiksi arvioitiin biokemiallisilla analyyseilla, histologisilla ja immunohistokemian menetelmin. Näillä analyyseilla pystytettiin havaitsemaan muutoksia solujen elinkyvyssä ja ruston soluväliaineen koostumuksessa mm. sGAG ja tyypin II kollageeni. Työssä saadut tulokset osoittavat, että KS483 hiiren solulinjaa voidaan käyttää rustosoluviljelymallin pystyttämiseen ja tämän mallin avulla voidaan jatkossa tutkia ruston erilaistumistapahtumaa ja seuloa uusia yhdisteitä, jotka vaikuttavat ruston erilaistumiseen.

Kolmiulotteisen pellettiviljelmän mahdollistamat solujen ja solu-soluväliaineen vuorovaikutukset sekä pelletin sisälle muodostuva hapen niukkuus ovat tärkeitä ruston tutkimisessa, koska tavanomaisissa 2D-soluviljelmissä nämä keskeiset edellytykset ovat huonosti toteutettavissa. Perinteisten *in vitro* ja *in vivo* mallien lisäksi uusien paremmin ennustavien 3D-soluviljelymallien kehitykselle on kysyntää ja tarvetta.

Opinnäytetyö tehtiin Pharmatest Services Oy:ssä (Pharmatest), joka on tutkimuspalveluja tarjoava yritys. Pharmatest on erikoistunut kliinisesti ennakoiviin prekliinisiin tehokkuustutkimuksiin onkologian ja luuston sairauksien terapia-alueilla. Yritys tarjoaa sekä tutkimuspalvelua varhaiseen lääkekehitykseen että mallien ja määritysten kehittämispalveluita.

ASIASANAT:

rusto, rustosolu, mesenkymaalinen kantasolu, ruston erilaistuminen.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Laboratory Technology

Spring 2014 | Total number of pages 93

Instructors: Katja Fagerlund, Ph.D. and Kari Haajanen, M.Sc.

Natalia Habilainen-Kirillov

## SETUP OF IN VITRO MOUSE MODEL FOR CHONDROGENIC DIFFERENTIATION

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells found in multiple human adult tissues including bone marrow, synovial tissues, and adipose tissues. They have self-renewal capacity and multilineage differentiation potential. Depending on the culture conditions, they can differentiate into adipocytes, osteoblasts or chondrocytes. Chondrogenesis is a multistep process in which mesenchymal cells condense, differentiate into chondrocytes and begin to secrete molecules that form the extracellular matrix. It is regulated in a spatio-temporal manner by cellular interactions and growth factors that modulate cellular signaling pathways and transcription of specific genes.

The aim of this study was to investigate the use of the KS483 mouse mesenchymal progenitor cell line in an in vitro model of chondrogenic differentiation and optimize the culture conditions. KS483 cells are able to differentiate into chondrocytes, adipocytes and osteoblasts. KS483 cells were cultured in serum-free differentiation medium containing a combination of various growth factors, three concentrations (100 ng/ml, 300 ng/ml and 500 ng/ml) of BMP-6 and no BMP6. For the induction of chondrogenic differentiation in 3-dimensional (3D) culture, cells were cultured in pellet culture system in 96-well plates for 17, 24 and 28 days and the medium was replaced every 2 - 3 days. To assess changes in the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, biochemical analyses, histology and immunohistochemistry were used to detect changes in cell viability and in cartilage matrix composition, including sGAG and collagen type II. The results show that the KS483 cell line can be used for setting up an in vitro model for studying chondrogenic differentiation and for the screening of novel compounds which affect chondrogenesis.

Three dimensional cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, together with the development of central hypoxia, are important for the study of cartilage, because in conventional 2D cell culture these conditions are poorly reflected. The inherent limitations of conventional methods, both in vitro and in vivo, prompt the need to develop 3D cell culture systems.

This study was conducted at Pharmatest Services Ltd (Pharmatest), which is a contract research organization, specialized in clinically predictive preclinical efficacy services in the therapeutic areas of oncology and skeletal diseases. Pharmatest provides both full-service research solutions for early drug development and model and assay development services.

### KEYWORDS:

cartilage, chondrocyte, mesenchymal stem cell, chondrogenesis, differentiation.

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT TERMIT JA LYHENTEET</b>	<b>8</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>9</b>
<b>2 TYÖN TEOREETTINEN TAUSTA</b>	<b>11</b>
2.1 <i>In vitro</i> -soluviljelymallit	11
2.2 Synoviaalinivelen anatomia	13
2.2.1 Ihmisen polvinivelen rakenne	14
2.3 Rustokudos	16
2.3.1 Kasvulevy eli epifyysilevy	20
2.3.2 Nivelrusto	22
2.3.3 Rustosolut	25
2.3.4 Ruston soluväliaineen koostumus	27
2.4 Mesenkymaaliset kantasolut	30
2.4.1 Erilaistuminen rustosoluksi	33
2.4.2 KS483 hiiren solulinja	36
2.5 Histologisen näytteen valmistaminen parafiinitekniikalla	38
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE</b>	<b>40</b>
<b>4 TYÖN SUORITUS</b>	<b>41</b>
<b>5 MENETELMÄT</b>	<b>43</b>
5.1 Mesenkyymikantasolujen viljely	43
5.2 KS483 mesenkyymisolujen erilaistaminen rustosoluksi	43
5.3 Rustosolupellettien prosessointi ja analysointi	44
5.3.1 Rustosolupellettien prosessointi	44
5.3.2 Histologiset värjäykset	45
5.3.3 Tyypin II kollageenin immunohistokemiallinen värjäys	47
5.3.4 sGAG määrittäminen	49
5.4 Rustosoluviljelmän kasvatusmediumin analysointi	52
5.4.1 Prokollageenin II C-propeptidin määrittäminen	52

<b>6 MATERIAALIT</b>	<b>55</b>
6.1 KS483 hiiren solulinja	55
6.2 KS483 solujen viljely	55
6.3 Kantasolujen erilaistaminen rustosoluiksi	55
6.4 Rustosolupellettien prosessointi ja analysointi	57
6.4.1 Prosessointi	57
6.4.2 Histologiset värjäykset	57
6.4.3 Tyypin II kollageenin immunovärjäys	59
6.4.4 sGAG määrittäminen	60
6.5 Prokollageenin II C-propeptidin määrittäminen	61
<b>7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>62</b>
7.1 Histologiset värjäykset	62
7.1.1 Toluidiinisininen värjäys	62
7.1.2 Safraniini O värjäys	66
7.1.3 Alcian sininen värjäys	69
7.1.4 Tyypin II kollageenin immunohistokemiallinen värjäys	72
7.2 sGAG määrittäminen	75
7.3 CPII määrittäminen	77
<b>8 POHDINTA</b>	<b>81</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>83</b>

## **LIITTEET**

- Liite 1. Käytetyt laitteet.
- Liite 2. Värjäysten raakatulokset.
- Liite 3. sGAG määrittämisen tulokset.

## **KUVAT**

Kuva 1. Synoviaalinivelen rakenneosat.	13
Kuva 2. Ihmisen polvinivelen rakenne.	15
Kuva 3. Rustolevy jyräjän keuhkoputkessa.	17
Kuva 4. Kasvava lasirusto, toluidiinisininen värjäys.	18
Kuva 5. Elastinen rusto, HE-värjäys.	19

Kuva 6. Koiran välilevy, Weigert-van Geissen.	20
Kuva 7. Syyrusto nikaman välilevyssä, HE-värjäys.	20
Kuva 8. Epifyysilevyn rakenne.	21
Kuva 9. Nivelruston rakenne.	23
Kuva 10. Rustokudoksen soluväliaineen keskeiset rakennekomponentit.	28
Kuva 11. Analysointi MetaMorph-ohjelmalla, tyyppin II kollageeni värjäys.	45
Kuva 12. Tyyppin II kollageeni hiiren rustossa ja kondrosyyttipelletissä.	48
Kuva 13. Toluidiinisinen värjäys.	63
Kuva 14. Safraniinin O värjäys.	66
Kuva 15. Alcian sininen värjäys.	69
Kuva 16. Tyyppin II kollageenin värjäys.	72

## KUVIOT

Kuvio 1. Mesenkyymikantasolujen monilinjainen erilaistumispotentiali.	31
Kuvio 2. Kondrogeneesin eri vaiheet.	34
Kuvio 3. Osteoblastien, kondrosyyttien ja adiposyyttien erilaistuminen.	37
Kuvio 4. Rustosoluviljelmä 96-kuoppalevyllä.	41
Kuvio 5. Toluidiinisinen värjäys päivänä 17.	64
Kuvio 6. Toluidiinisinen värjäys päivänä 24.	65
Kuvio 7. Toluidiinisinen värjäys päivänä 28.	65
Kuvio 8. Toluidiinisinen värjäys ajan funktiona.	65
Kuvio 9. Safraniini O värjäys päivänä 17.	67
Kuvio 10. Safraniini O värjäys päivänä 24.	68
Kuvio 11. Safraniini O värjäys päivänä 28.	68
Kuvio 12. Safraniini O värjäys ajan funktiona.	68
Kuvio 13. Alcian sininen värjäys päivänä 17.	70
Kuvio 14. Alcian sininen värjäys päivänä 24.	71
Kuvio 15. Alcian sininen värjäys päivänä 28.	71
Kuvio 16. Alcian sininen värjäys ajan funktiona.	71
Kuvio 17. Kollageenin II määrä päivänä 17.	73
Kuvio 18. Kollageenin II määrä päivänä 24.	74
Kuvio 19. Kollageenin II määrä päivänä 28.	74
Kuvio 20. Kollageenin II määrä ajan funktiona.	74
Kuvio 21. sGAG määrä päivänä 17.	75
Kuvio 22. sGAG määrä päivänä 24.	76
Kuvio 23. sGAG määrä päivänä 28.	76
Kuvio 24. sGAG määrä ajan funktiona.	76
Kuvio 25. CPII määrä päivänä 7.	78
Kuvio 26. CPII määrä päivänä 10.	78
Kuvio 27. CPII määrä päivänä 14.	78
Kuvio 28. CPII määrä päivänä 17.	79
Kuvio 29. CPII määrä päivänä 21.	79
Kuvio 30. CPII määrä päivänä 24.	79
Kuvio 31. CPII määrä päivänä 28.	80
Kuvio 32. CPII määrä ajan funktiona.	80

## TAULUKOT

Taulukko 1. Kasvutekijät ja niiden vaikutus MSC -soluihin.	34
Taulukko 2. Toluidiinin värjäyksen tulokset.	64
Taulukko 3. Safraniinin O värjäyksen tulokset.	66
Taulukko 4. Alcian sinisen värjäyksen tulokset.	69
Taulukko 5. Tyypin II kollageenin värjäyksen tulokset.	72
Taulukko 6. sGAG määrityksen tulokset.	75
Taulukko 7. CPII määrityksen tulokset.	77

## KÄYTETYT TERMIT JA LYHENTEET

Abs. EtOH	absolutoitu etanoli
BMP	luun morfogeneettinen proteiini ( <i>engl.</i> bone morphogenetic protein)
BSA	lehmän seerumin albumiini ( <i>engl.</i> bovine serum albumin)
ddH <sub>2</sub> O	tislattu vesi
DMEM	kasvatusmediumi ( <i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle's medium)
ECM	soluväliaine eli solukalvon ulkopuolella oleva ekstrasellulaarimatriisi ( <i>engl.</i> extracellular matrix)
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys ( <i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay)
FBS	naudan sikiön seerumi ( <i>engl.</i> fetal bovine serum)
HRP	piparjuuren peroksidaasi ( <i>engl.</i> horseradish peroxidase)
<i>in vitro</i>	tutkimus, jossa soluja tai kudosta voidaan tutkia eliöstä irrotettuna ja kasvattaa maljoissa tai pulloissa tai tutkia reaktiota, joka normaalisti tapahtuu solussa mutta joka suoritetaan maljoissa tai kuoppalevyissä
<i>in vivo</i>	elävässä organismissa tehty tutkimus
MSC	mesenkyymikantasolu ( <i>engl.</i> mesenchymal stem cell)
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos ( <i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PFA	paraformaldehydi
sGAG	sulfoitu glykosaminoglykaani ( <i>engl.</i> sulphated glycosaminoglycan)
TGF- $\beta$	transformoiva kasvutekijä $\beta$ ( <i>engl.</i> transforming growth factor $\beta$ )

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turussa Pharmatest Services Oy yrityksen soluviljelyn yksikön tutkimusryhmässä. Pharmatest on tutkimustyötä tekevää organisaatio, joka on erikoistunut kliinisesti ennakoivan prekliinisen tehokkuuden testaamis- palveluihin onkologian ja luuston sairauksien terapia-alueilla. Soluviljelyn yksikön vetäjänä toimii FT Katja Fagerlund, joka toimi myös opinnäytetyön työpaik- kaohjaajana. Opettajaohjaajana toimi FM Kari Haajanen Turun ammattikorkea- koulun bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelmasta. Pharmatest Services Oy:n soluviljely-yksikön toimintaan kuuluu lääkeainekandidaattien testaukset *in vitro* -malleilla. Tutkimustyössä kehitetään uusia ja pystytetään jo julkaistuja *in vitro* -malleja, joita voidaan hyödyntää sekä eri sairauksien mallinnuksessa että lääkeaineiden tehokkuuden tai aineiden toksisuuden testauksessa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli pystyttää hiiren 3D-rustosoluviljelymalli, löytää optimaaliset olosuhteet ja parhaiten rustosolujen erilaistumista (differentiaatiota) tehostavat aineet. Samalla haluttiin selvittää soveltuuko aiemmin kirjallisuudes- sa kuvattu rustosoluviljelymalli kaupallisesti hyödynnettävään testiyhdisteiden seulontaan. Työssä käytettiin mesenkyymisolujen kaltaisia hiiren KS483 solulin- jan soluja, joita voidaan tietyissä soluviljelyolosuhteissa erilaistaa rustosoluiksi, rasvasoluiksi tai luuta muodostaviksi osteoblasteiksi. Työssä testattiin BMP-6 kykyä tehostaa rustosolujen erilaistumista. Rustosoluja erilaistutettiin pellettivil- jelmissä ja erilaistumista seurattiin eri aikapisteissä histologisten värjäysten ja ruston erilaistumisen merkkiaineiden avulla.

Työssä esitettyjen tulosten perusteella KS483 mesenkyymisolujen erilaistumis- koe on mahdollista suorittaa 96-kuoppalevyn muodossa, mikä teknisesti mah- dollistaa laajempien koe-asetelmien toteuttamisen verrattuna perinteisesti käy- tettyihin falcon-putkiin. Verrattuna eläimistä eristettyihin primaarisoluihin, KS483 solut tarjoavat rajoittamattoman lähteen helposti lisääntyville mesenkyymisoluil- le, joten myöskään isojen koe-asetelmien vaatima suuri solumäärä ei rajoita tutkimusta. Solujen erilaistumista lisättiin ja säädeltiin lisäämällä kasvatusme-

diumiin erilaisia kasvutekijöitä. KS483 solulinjaa soveltuu hyvin tähän malliin nopean kasvu- ja jakautumiskykyänsä takia. Saatua soluviljelymallia on tarkoitus edelleen parantaa ja kehittää lisää, jota voidaan jatkossa hyödyntää rustosolun erilaistumiseen vaikuttavien tekijöiden tutkimisessa ja uusien anabolisten yhdisteiden seulonnassa.

Haluan kiittää lämpimästi ohjaajaani FT Katja Fagerlund saamistani mielenkiintoisesta aiheesta, hyvästä ohjauksesta ja neuvoista ja Turun ammattikorkeakoulun puolelta FM Kari Haajasta yhteistyöstä opinnäytetyön aikana. Suuret kiitokset dosentti Jussi Halleenille ja FT Jukka Rissaselle mahdollisuudesta tehdä lopputyöni Pharmatestissä ja sen järjestämisestä työn ohella. Lisäksi haluan kiittää koko Pharmatestin työryhmää tärkeästä henkisestä tuesta. Haluan kiittää koko sydämestäni perhettäni kärsivällisyydestä minun kiireideni vuoksi.

## 2 TYÖN TEOREETTINEN TAUSTA

### 2.1 *In vitro* -soluviljelymallit

Soluviljelmiä on jo pitkään käytetty solu- ja molekyylibiologisessa sekä farmakologisessa tutkimuksessa selvittämään sairauksien geneettistä ja biokemiallista taustaa sekä tautien syntymekanismeja. Soluviljelymalleja käytetään laajasti biolääketieteellisessä perustutkimuksessa, soveltavassa- ja lääketeollisessa tutkimuksessa. Käytössä on myös monia erilaisia solumalleja uusien lääkeainemolekyylien seulontaan, tutkimaan niiden vaikutuksia ja toksisuutta. Innovatiivinen *in vitro* -malli nopeuttaa prekliinistä lääkekehitystä. Soluviljelymallit mahdollistavat edullisemman, nopeamman sekä eettisesti hyväksyttävämmän keinon useiden erilaisten yhdisteiden testaamiseen *in vivo* -malleihin eli eläinkokeisiin verrattuna. Ihon fibroblastiviljelmiä käytetään kemikaalien syövyttävyysmäärittäykseen, jotka ennen suoritettiin koe-eläimillä. Muovimaljoilla kasvatettavilla soluilla on ratkaiseva rooli selvitettäessä solun toimintoihin kuten jakautumiseen, erilaistumiseen, solukuolemaan eli apoptoosiin ja signaalinvälitykseen liittyviä mekanismeja. Soluviljelmien merkittävät edut ovat hyvä kontrolloitavuus ja solujen elinolosuhteiden helppo muunneltavuus niin etteivät solujen toiminnalliset ominaisuudet muutu. Yhdellä 96-kuoppalevyllä voidaan tutkia esim. useiden kasvutekijä- tai lääkepitoisuuksien tai erilaisten tekijöiden yhteisvaikutuksia tutkittavaan soluvasteeseen. Soluviljelykokeiden avulla on saatu suurin osa arvokasta tietoa, joka liittyy solun terveeseen ja häiriintyneeseen toimintaan ja lääkeaineiden vaikutuksiin (Partanen & Klefström 2008).

Tavallisten muovimaljoilla kasvatettavien 2D yksikerroksisten soluviljelmien rinnalle on kehitetty uusia 3D eli kolmiulotteisia soluviljelymalleja. 3D-soluviljelymallin etu tavanomaiseen soluviljelymään nähden on se, että se tarjoaa tietoa kudoksen organisaatiosta. Varsinaisesti 3D-soluviljelmällä tarkoitetaan väliaineessa muodostuvia erilaistuneita solukkorakenteita, jotka muistuttavat muodoltaan ja toiminnaltaan niitä kudusrakenteita, joista solut alun perin ovat

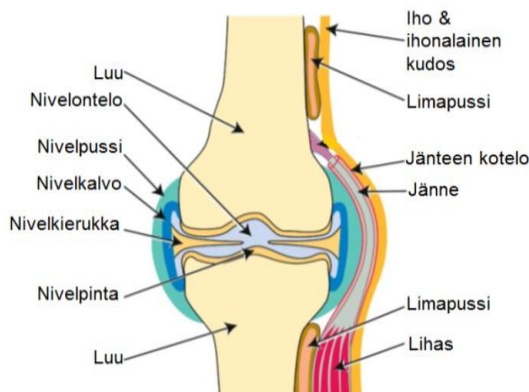
lähtöisin. 3D *in vitro* -malleissa solut kasvatetaan joko ilman väliainetta, väliaineen päällä tai kokonaan tai osittain sen sisällä. Väliaine tarjoaa soluille luonnollisen kasvualustan ja solut kykenevät erilaistumaan ja muodostamaan samankaltaisen organisoituneen yhteisön kuin kudospäristöissäkin. 3D-soluviljelmien erilaistuneiden soluorganisaatioiden toiminta voi hyvin muistuttaa niiden alkuperäisiä toimintoja kudoksessa. Maljalla kasvatettuja soluja vaivaavat useat stressitekijät kuten hyperoksia (korkea hapen osapaine) ja keinotekoinen muovinen tartuntapinta. 3D *in vitro* -solumalli ilmentää fysiologisesti realistista soluarkkitehtuuria, johon kuuluu solujen keskinäisen asettumisen toisiinsa nähdessä, solu-solu-liitokset, sekä solun sisäisten organellien (soluelimet) ja transporttereiden avaruudellinen jakautuminen, kuten myös oikeanlaisten tiivisliitosten muodostuminen. Nykyään 3D-soluviljelmät ovat laajassa käytössä syöpätutkimuksessa syöpägeenien toiminnan, angiogeneesin (verisuonten muodostuminen) ja invaasion (syöpäsolujen tunkeutuminen kudokseen) mekanismien selvittämisessä (Partanen & Klefström 2008).

3D-epiteelisoluviljelmässä väliaineessa kasvavat solut muodostavat epiteelisoluille tyypillisiä liitoksia solujen välille ja tyvikalvoon, jolloin tyvikalvokontakti saa epiteelisolut muodostamaan erilaistuneita pallomaisia rauhasen kaltaisia rakenteita. Samalla erilaistumistapahtuman aikana epiteelisolut ilmentävät monia niille tyypillisiä fysiologisia piirteitä ja toimintoja. 3D-rintaepiteelisoluviljelmissä muodostuneet solurakenteet ilmentävät erilaistuneille epiteelisoluille tyypillisiä proteiineja, kuten estrogeenireseptoria (Partanen & Klefström 2008).

Kehittämällä uusia 3D-malleja pystytään tulevaisuudessa vähentämään *in vivo* -kokeiden käytön tarpeellisuutta erilaisten laajojen geneettisten tai farmakologisten soluseulonnoissa ja tutkimuksissa. Lääkeainetutkimuksissa usein 2D-solukokeet eivät ennusta kovinkaan hyvin lääkeaineiden vaikutuksia prekliinisissä, *in vivo* - tai kliinisissä tutkimuksissa. Mahdollisesti kolmiulotteisilla soluviljelymalleilla lääkeainetestauksessa tullaan osoittautumaan huomattavasti perinteisiä solumalleja informatiivisemmiksi ja ennustavammiksi (Partanen & Klefström 2008).

## 2.2 Synoviaalinivelen anatomia

Synoviaalinivelellä (*articulatio synovialis*) tarkoitetaan liitosta, joka mahdollistaa kahden luun pään välisen liikkeen. Synoviaalinivelen eri rakenneosat ovat niveltä mekaanisesti kuormitettaessa jatkuvassa vuorovaikutuksessa keskenään (kuva 1). Synoviaalinivelen nivelpinnat (*facies articulares*) ovat tasaisen ja kovankimmoisan nivelruston peittämät. Nivelrusto on muodostunut pääsääntöisesti hyaliini- eli lasirustosta. Nivelruston paksuus vaihtelee saman nivelen eri osissa ja nivelestä toiseen. Nivelpussissa (*capsula articularis*) niveltyvät luut yhdistyvät toisiinsa muodostaen nivelontelon (*cavitas articularis*). Nivelpussissa on kaksi kerrosta: ulompi kollageenisäikeistä koostuva sidekudoskalvo (*membrana fibrosa*) ja sisempi löyhemmästä sidekudoskerroksesta koostuva nivelkalvo (*membrana synovialis*). Sisempi nivelkalvo on hyvin verisuonitettu ja sen tehtävänä on tuottaa nivelnestettä eli synovaa. Luukalvon (periosteum) jatkeena pidetyssä nivelpussissa nähdään niveltä tukevia voimakkaammin juosteisia nivelsiteitä (*ligamentum*) (Hervonen 2001; Säämänen *et al.* 2012).



Kuva 1. Synoviaalinivelen rakenneosat (OARSI Primer 2010 [online, viitattu 25.02.2014]).

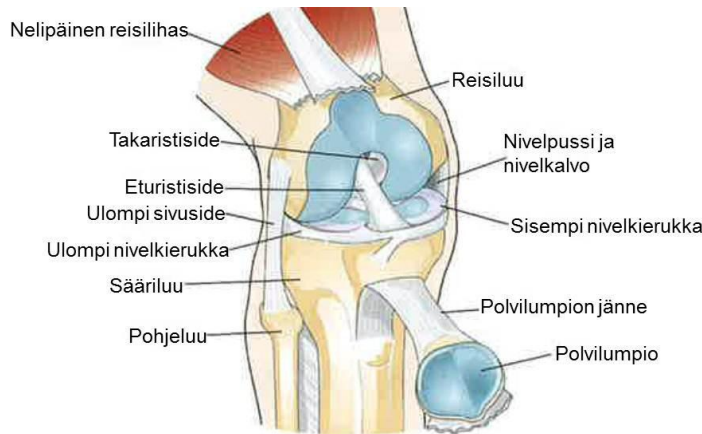
Nivelontelo sisältää vähäisen määrän normaalisti väritöntä tai kellertävää, viskoosia nivelnestettä. Normaalisissa nivelnesteessä on plasman proteiineja, sokeria ja pieniä määriä veren valkosoluja ja nivelkalvon soluja. Vammojen jälkitiloissa ja erilaisten nivelsairauksien yhteydessä nivelonteloon kertyy normaalia enemmän nivelnestettä. Nivelneste toimii voiteluaineena ja huolehtii nivelruston

ravitsemuksesta tarjoamalla ravinnolle diffuusioreitin nivelkalvon verisuonista nivelrustolle. Lihakset liikuttavat ja tukevat niveltä kiinnittymällä luuhun jänteillä (Hervonen 2001; Säämänen *et al.* 2012).

Nivelrusto mahdollistaa liikkeiden mahdollisimman suuren kontaktipinnan säilymisen eri vaiheissa. Nivelruston kulutusta kestävyys, luistavuus, hieman kokonpainuvuus ja elastiset ominaisuudet mahdollistavat luiden esteettömän liikkeen. Nivelrusto kestää lihasten aiheuttamia suuria painerasituksia, joita saavat aikaan liike- ja painovoima. Nivelruston tehtävänä on suojata alla olevaa luuta (subkondraaliluuta) mekaanisilta vaurioilta ja sillä on kyky muokkautua kuormituksen alla ja pienentää kitkaa nivelpintojen välillä yhdessä nivelnesteeseen kanssa. Rustopinnan kuluminen ja muuttuminen epätasaiseksi voi johtua toistuvasta ja voimakkaasta rasituksesta nivelessä. Liikunnan puute taas voi johtaa nivelruston ohenemiseen (Hervonen 2001; Säämänen *et al.* 2012).

### 2.2.1 Ihmisen polvinivelen rakenne

Polvinivel (kuva 2), joka on ihmisen suurin nivel, muodostuu kahdesta nivelestä: reisiluun (*femur*) ja sääriluun (*tibia*) välisestä nivelestä sekä reisiluun ja polvilumpion (*patella*) välisestä nivelestä. Polvinivel ei luonnostaan tarjoa nivelelle tukea, vaan pääosan tuesta luovat nivelpussi, nivelkierukat (*menisci articulares*) nivelsiteet sekä niveltä ympäröivät lihakset. Polvessa on kaksi nivelkierukkaa: ulompi eli lateraalinen nivelkierukka ja sisempi eli mediaalinen nivelkierukka. Polvinivelen nivelkierukat parantavat nivelpintojen yhteensopivuutta nivelen eri asennoissa ja vähentävät nivelpintoihin kohdistuvaa kuormitusta. Ne muodostuvat rustokudoksesta ja ovat C-kirjaimen muotoisia. Nivelkierukka koostuu syyrustosta. Nivelkierukan tärkeimpänä tehtävänä on kantaa niveleen kohdistuvaa kuormaa ja jakaa sitä tasaisesti nivelen alueelle eli toimia iskunvaimentimena reisi- ja sääriluun välissä. Sisäiset ja ulkoiset nivelsiteet ohjaavat nivelliikettä ja estävät mahdolliset nivelelle haitalliset ja epänormaalit liikkeet. Polvinivelessä nivelrustoa on nivelpussin sisällä sääriluun, reisiluun ja polvilumpion pinnoilla (Honkanen 2012; Nienstedt *et al.* 2008).



Kuva 2. Ihmisen polvinivelen rakenne. Reisiluun ja sääriluun päissä sekä polvilumpiossa olevaa lasirustoa kuvattu sinisellä värillä (Säämänen *et al.* 2012).

Nivelpussissa ja nivelsiteissä on sekä kipua aistivia sensorisia hermopäätteitä että nivelasentoa ja liikettä aistivia proprioseptiivisiä hermopäätteitä. Niveltä ympäröivä valtimoiden ja laskimoiden verkosto muodostaa verenkierto sekä nivelpussissa että rustonlaisessa luussa. Polvinivelissä eri rakenneosat ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa keskenään kun niveltä mekaanisesti kuormitetaan. Monissa fysiologisissa kuormitustilanteissa polvinivel toimii juostavasti eri rakenneosien koostumuksen ja biomekaanisten ominaisuuksien ansiosta. Eri kudosten mekaaniset ominaisuudet poikkeavat toisistaan (Säämänen *et al.* 2012).

Nivelessä tapahtuvat vuorovaikutukset kudosten välillä määräävät molekyyllisignaalien tasapainoa. Molekyyllisignaalit säätelevät tasapainon ylläpitämistä (homeostaasia), vauriota ja uusiutumista. Hienosäädetty tasapaino tarvitaan terveelle nivellelle ja homeostaasin ylläpito vaurioituneessa nivelessä voi heikentyä eri tekijöiden ansiosta. On esitetty, että luusta ja rustosta vapautuvat inflammatoriset eli tulehdukselliset tekijät laukaistavat ei-spesifisen tulehduksen nivelkalvossa. Soluvälinesteen, leukosyyttien ja nivelkalvon makrofagien kertyminen nivelessä lisää entisestään kipua ja voi johtaa nivelen toiminnan lakkautumisen. Lisäksi sytokiinit ja kudosta hajoavat entsyymit, joita nivelkalvo tuottaa, voivat edistää ruston tuhoutumista (Taipaleenmäki 2010).

### 2.3 Rustokudos

Ihmisen tukikudokseen kuuluu suuri joukko hyvinkin erilaisia kudoksia. Kaikkien alkumuotona on alkiokautinen sidekudos, joka on peräisin keskimmäisestä alkiolehdestä. Tukikudokselle on tyypillistä soluväliaineen runsas esiintyminen, ja lähinnä juuri soluväliaineen koostumuksen perusteella tukikudos jaetaan varsinaiseen sidekudokseen, rustokudokseen, luukudokseen ja rasvakudokseen. Sidekudos voidaan hyvin karkeasti jakaa kolmeen luokkaan, jotka ovat varsinaisen sidekudoksen erikoisrakenteet (esim. tyvikalvo) ja erilaistuneet sidekudokset (rusto, luu) (Nienstedt *et al.* 2008).

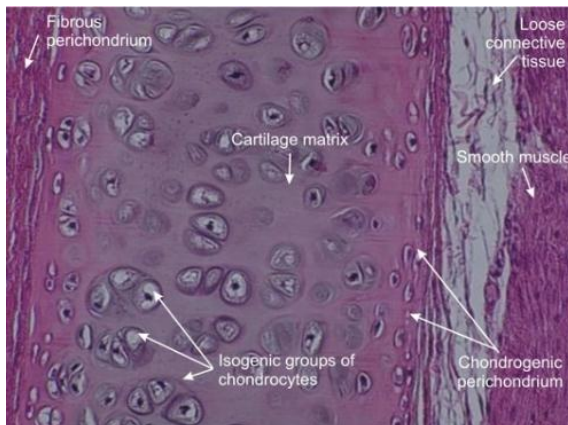
Rustokudos on tärkeä osa tuki- ja liikuntaelimestöä. Tyypillistä rustolle on kestävyys, mutta samalla myös joustavuus (tarpeen esimerkiksi henkitorvessa ja ulkokorvassa). Yksilönkehityksen aikana rusto muodostaa mallin, joka luutuksessaan muovaa kehittyvien luiden muotoa. Rustoa on muun muassa kaikissa nivelpinnoissa, kylkiluissa, henkitorven rakenteissa ja selkärangan nikamien välilevyissä (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]; Nienstedt *et al.* 2008).

Ruston muodostavat rustosolut eli kondrosyytit ja soluväliaine eli solukalvon ulkopuolella oleva ekstrasellulaarimatriisi (*engl.* extracellular matrix, ECM). Menseskymistä erilaistuneet rustosolut tuottavat itse soluväliaineensa ja muodostavat kypsässä rustossa ns. lakuunoja, joissa tiiviin kapselin sisällä on useita rustosoluja. Erilaistumisvaiheen mukaan rustossa vallitsevaa solutyyppiä sanotaan joko kondroblastiksi tai kondrosyytiksi. Ruston soluväliaineessa on runsaasti sulfoituja polysakkaridisyksiköitä (kondroitiinisulfaattia). Soluväliaineen rakennekomponenttien kuten kollageenien ja aggregaanien ansiosta rusto on ominaisuudelta puolijäykkä. Rustosta puuttuvat täysin sekä hermot että verisuonet. Kaikki ravinteet ja toimintaa säätelevät tekijät rustokudos saa ruston pinnalla olevan sidekudoksisen rustokalvon (*fibrous perichondrium*) välityksellä, josta ne diffundoituvat ruston ekstrasellulaarimatriisin kautta rustosoluille. Kypsän ruston rustosolut eivät juuri jakaannu, ja siitä johtuen rustokudoksen vaurioitessa sen kyky uudistua on erittäin rajallinen (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]; Nienstedt *et al.* 2008).

Elimistömme rustokudos voidaan jakaa kolmeen luokkaan: lasirusto eli hyaliinirusto, kimmorusto eli elastinen rusto ja syyrusto. Rustoon kohdistuvat kuormitusvoimat ja niiden laatu (esim. puristus tai hierto) määräävät sen, minkä tyyppinen rustokudos muodostuu (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]).

### Lasirusto eli hyaliinirusto

Kimmoisaa, sinertävää ja hieman läpikuultavaa lasirustoa esiintyy nivelrustossa, kylkiluiden rustossa, luiden kasvulevyissä, nikamavälilevyn sisemmässä osassa sekä nenän, kurkunpään, henkitorven ja keuhkoputken seinämissä. Hyaliinirustosta muodostuu myös varhaisen sikiön luuranko, josta luut myöhemmin kehittyvät endokondraalisen luutumisen kautta. Hyaliinirusto voi siis kalsifioitua.



Kuva 3. Rustolevy jyräjän keuhkoputkessa, HE-värjäys, suurennos x200 (Clermont *et al.* 2014 [online, viitattu 25.02.2014]).

Lasirusto värjäytyy voimakkaasti ns. kationisilla väriaineilla, jotka sitoutuvat negatiivisesti varautuneisiin proteoglykaaneihin. Kationiset väriaineet ovat saaneet nimensä niiden positiivisen sähköisen varauksen johdosta. Kondrosyyttien erittämien proteoglykaanien pitoisuus on suurin lähellä soluja. Kuvassa 3 on esitetty keuhkoputkessa olevaa lasirustoa. Kuvan oikealla puolella on näkyvissä rustoa ympäröivää löyhää sidekudosta. Hyaliinirustoisien rustolevyn ulkoreunan molemmilla puolella näkyy rustokalvoa, jossa rustosolut ovat pieniä ja litteitä. Lukuisat kondrosyytit sijaitsevat enimmäkseen kapselimaisissa onteloissa, joita

kutsutaan lakuunoiksi. Rustosolut usein järjestäytyvät klustereiksi, isogeenisiksi ryhmiksi, joita muodostuu kasvun aikana. Hematoksyliini-eosiini (HE) - värjäyksen mikroskooppivalmistuksessa rusto näkyy violettina ja hieman läpikuultavana, soluväliaine on amorfisen homogeenistä. Hemateiini sitoutuu solujen tumien lisäksi myös rustokudoksen soluväliaineeseen värjäten sen tumman violetiksi (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]).

Kuvassa 4 on nuoren rotan henkitorvissa olevaa lasirustoista levyä. Toluidiinisinisen värjäyksessä ruston soluväliaineen violetti väri, metakromaattinen väri, johtuu happamien glykoproteiinien ja glykosaminoglykaanien läsnäolosta. Kasvavassa rustolevyssä nähdään kondroblastien erilaistumista kondrosyyteiksi eri vaiheissa. Sen huomaa, kun kondroblastin ympärille alkaa kehittyä lakuunaa, joka upottuu soluväliaineeseen (Clermont *et al.* 2014 [online, viitattu 25.02.2014]).



Kuva 4. Kasvava lasirusto, toluidiinisininen värjäys, suurennos x1000 (Clermont *et al.* 2014 [online, viitattu 25.02.2014]).

### **Kimmorusto eli elastinen rusto**

Elastista rustoa on esimerkiksi korvalehdessä, kurkunkannessa ja kurkunpään rustoissa (kuva 5). Nimensä mukaisesti kimmoruston soluväliaine sisältää runsaasti elastisia säikeitä, joita löydetään myös lakuunoiden ympäriltä ja joiden

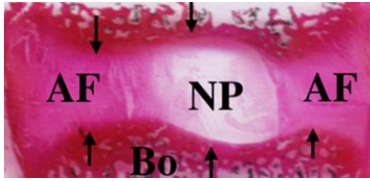
ansiosta rusto on erityisen joustavaa. Elastinen rusto, toisin kuin lasirusto, ei voi kalsifioitua. Rustosolut sijaitsevat lakuunoissa samoin kuin hyaliinirustossa (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]).



Kuva 5. Elastinen rusto, HE-värijäys, suurennos x470 (Antranik 2011 [online, viitattu 25.02.2014]).

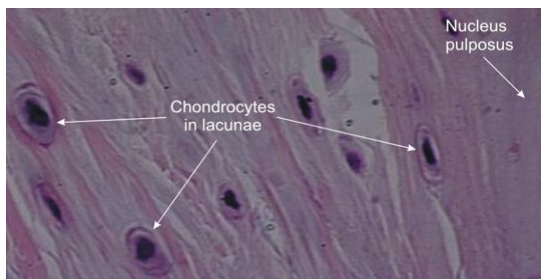
## Syyrusto

Syyrusto on lasiruston ja tiiviin säikeisen sidekudoksen välimuoto. Siinä on erityisen runsaasti kollageenisäikeitä. Syyrustoa esiintyy tyypillisesti paikoissa, joissa vaaditaan vetokestävyyttä kuten nikaman välilevyissä, häpyliitoksessa ja paikoissa, joissa ligamentit ja jänteet kiinnittyvät luuhun. Kuvassa 6 on Weigert-van Geissen värjäyksen histologinen leike, jossa on esitetty koiran selkärangan välilevy. Välilevy sijaitsee kahden nikaman (Bo) välissä. Syykehän eli välilevyn fibroottisen ulko-osan (*Annulus fibrosus*, AF) vyörengasmaiset säiekimput, lamellit, koostuvat pääosin tyypin I kollageenista ja kiinnittävät nikamat toisiinsa. Välilevyn ydinosa (*Nucleus pulposus*, NP) on lasiruston kaltainen, jossa proteoglykaanit sitovat runsaasti vettä. Tämän ansiosta terve välilevy pystyy antamaan tarvittavaa joustoa selkärangalle. Ravitsemus välilevyssä tapahtuu diffuusiolla niin, että noin 2/3 tulee rustoisen päätelevyn kautta (mustat nuolet) ja 1/3 ulkoreunoilta AF kautta (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]).



Kuva 6. Koiran välilevy, Weigert-van Geissen (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]).

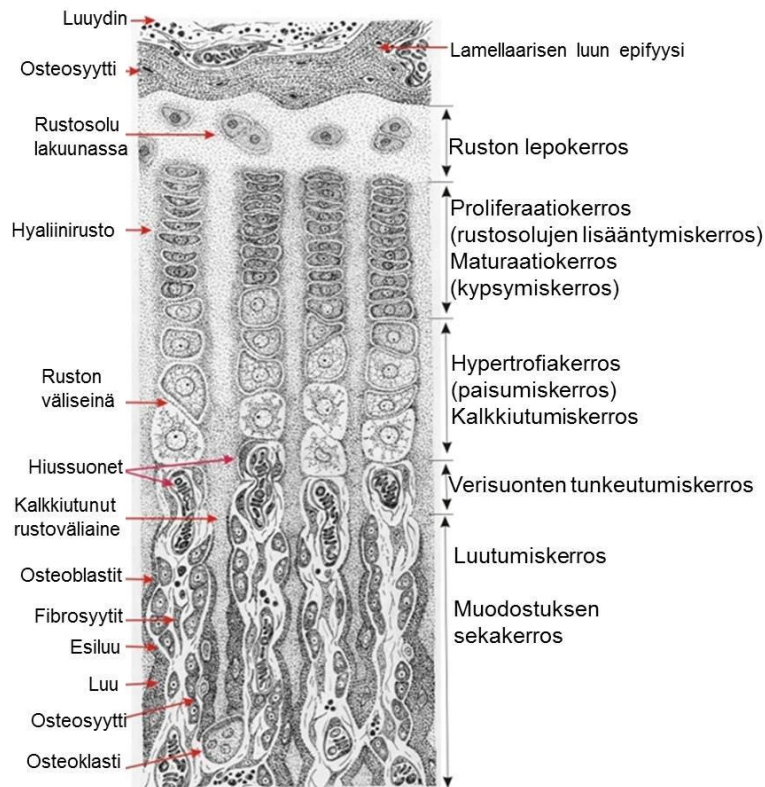
Kuvassa 7 esitetty syyrusto on rakenteellisesti tiheän sidekudoksen ja hyaliiniruston välimuotoa. Lakuunoissa sijaitsevat kondrosyytit erottuvat hyvin näkyvistä kollageenisäiekimpuista.



Kuva 7. Syyrusto nikaman välilevyssä, HE-värijäys, suurennos x400 (Clermont *et al.* 2014 [online, viitattu 25.02.2014]).

### 2.3.1 Kasvulevy eli epifyysilevy

Epifyysilevy on toinen erikoistunut tyyppi hyaliinirustoa. Se sijaitsee metafyysin alueella, joka on pitkän luun epifyysin ja sen keskiosan, diafyysin, välissä. Rustoisessa epifyysilevyssä tapahtuu raajojen pitkien luiden pituuskasvu. Kasvulevyssä voidaan erottaa neljä solukerrosta, jotka vastaavat luutumisen eri asteita (kuva 8). Ensimmäinen kerros on hyaliinirustoa, toisessa kerroksessa rustosolut jakautuvat voimakkaasti, kolmannessa ne kasvavat kokoa ja kypsyvät ja neljännessä kerroksessa soluväliaine alkaa luutua. Nämä kerrokset voidaan havaita alkion kehityksen aikana, mutta kasvulevy tulee esiin selkeämmin syntymän jälkeen, kun toissijainen luutumiskeskus kehittyy ja siitä erottuu kehittyvä nivelrusto (Taipaleenmäki 2010).



Kuva 8. Epifyysilevyn rakenne (Clermont *et al.* 2014 [online, viitattu 25.02.2014]).

Ylimpänä epifyysirustossa on hyaliinirustoa sisältävä lepokerros eli reservikerros. Sen tehtävänä on tarjota erilaistumisreitti kondrosyyteille. Lepokerroksen rustosolut ovat pallomaisia, satunnaisessa järjestyksessä ja suhteellisen lepotilassa. Proliferaatiokerroksessa kondrosyytit lisääntyvät vilkkaasti muodostaen kasvun suuntaisen pylväsorganisaation, jossa ne kasvattavat pylvästä koko ajan ylöspäin. Tämä tapahtuma on juuri luun pituuden kasvua. Pylväissä litteät kondrosyytit tuottavat suuren määrän soluväliaineen komponentteja. Maturaatiokerroksessa on kookkaampia, kypsiä rustosoluja, jotka eivät enää jakaudu. Prehypertrofisessa kerroksessa laajentuneet rustosolut jatkavat lopullista erilaistumista hypertrofiakerroksessa. Hypertrofisessa kerroksessa on jo degeneroituvia ja kuolevia rustosoluja ja rustoväliaine jo kalkkeutunutta. Osteokondraalisessa liitoksessa hypertrofiset kondrosyytit syntetisoivat verisuonen endoteelikasvutekijää (*engl.* vascular endothelial growth factor, VEGF), joka vapautuu soluväliaineesta ja johtaa verenkierron hiussuonten tunkeutumiseen kudokseen. Kun kondrosyytit kuolevat, lakuunat jäävät tyhjiksi ja syntyviin onte-

loihin kasvaa hiussuonia. Osteoklastit ja kondroklastit hajottavat suurimman osan rustoista soluväliainetta. Luutumiskerroksessa olevat osteoblastit tuottavat luun soluväliainetta, joka alkaa heti kalkkiutua ja muuttua luuksi. Osteosyytit ovat osteoblastien pidemmälle erilaistuneita soluja ja veren monosyyteistä erilaistuneet monitumaiset osteoklastit hajottavat luun soluväliainetta (Hervonen 2001; Taipaleenmäki 2010).

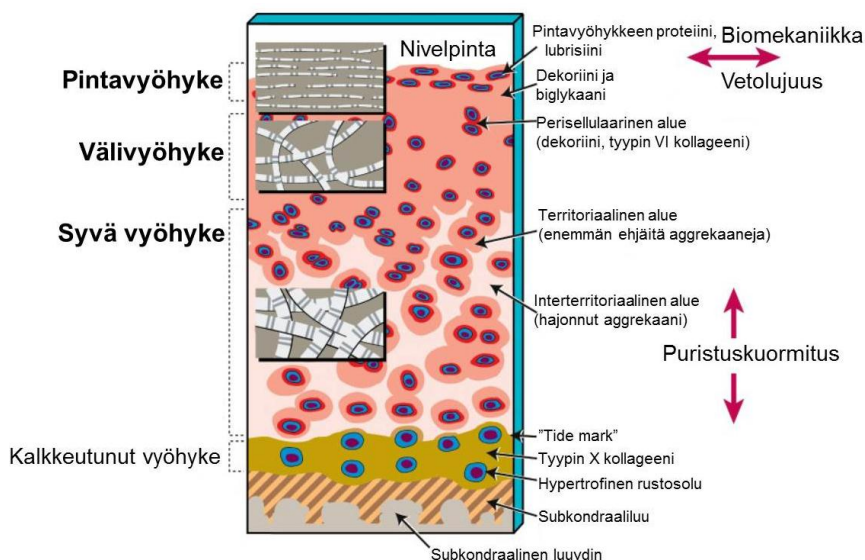
### 2.3.2 Nivelrusto

Synoviaalinivelessä nivelrusto (*cartilago articularis*) on pitkälle erilaistunutta sidokudosta. Sen pääasiallisena tehtävänä on kantaa kuormaa ja mahdollistaa nivelpintojen väliset liukuvat liikkeet. Nivelrustossa ei ole verisuonia, imusuonia eikä hermoja ja se soveltuu ankaraan biomekaaniseen ympäristöön. Nivelruston kyky korjaantua itsestään ja parantua on rajallinen, lähes olematon. Tästä syystä nivelten hyvinvoinnille ja nivelruston toiminnan kannalta on erittäin tärkeää rustokudoksen ehjänä säilyminen. Nivelruston pysyminen toimivana kudoksena riippuu erityisesti sen arkkitehtuurin säilymisestä (Fox *et al.* 2009).

#### **Nivelruston rakenne ja koostumus**

Nivelrustosta noin 5 % koostuu rustosoluista eli kondrosyyteistä ja loppuosa on soluväliainetta. ECM koostuu pääosin vedestä (70 – 80 % märkäpainosta), kollageenista, proteoglykaaneista ja muista ei-kollageenisista proteiineista ja glykoproteiineista. Nivelruston kollageenien osuus on noin 60 % ja proteoglykaanien noin 25 % kuivapainosta. Kollageenit ja proteoglykaanit määräävät nivelruston kudoksen biomekaanisia ominaisuuksia. Kollageenisäikeistä (pääasiassa tyypin II kollageenista) koostuva kollageeniverkosto antaa nivelrustolle vetolujuutta. Negatiivisesti varautuneet proteoglykaanit sitovat itseensä vettä ja siten täyttävät ja tukevat kollageeniverkoston välejä. Näin nivelrustosta muodostuu kimmoisa ja iskunkestävä kerros nivelpintojen suojaksi (Fox *et al.* 2009; Säämänen *et al.* 2012).

Kollageeniverkoston ja solujen morfologian mukaan nivelrustossa voidaan erottaa neljä vyöhykettä: pinta-, väli-, syvä- ja kalkkiutunut vyöhyke (kuva 9). Näissä vyöhykkeissä on erilaiset rustosolujen tiheydet ja kollageenisäikeiden organisaatiot. Ohuen pintavyöhykkeen osuus on noin 10 – 20 % nivelruston paksuudesta ja se suojaa syvempiä kerroksia leikkausjännityksiltä. Pintavyöhykkeessä solujen tumat ja tiivisti pakatut kollageenisäikeet (pääasiassa tyyppin II ja IX kollageeni) ovat järjestäytyneet nivelpinnan suuntaisesti. Pintavyöhyke sisältää suhteellisen paljon litteitä kondrosyyttejä. Pintavyöhykkeen eheyden pysyminen on välttämätöntä syvempien vyöhykkeiden suojeluun ja ylläpitoon. Tämä vyöhyke on kosketuksessa nivelnesteeseen ja vastaa ruston monista veto-ominaisuuksista (Fox *et al.* 2009; Säämänen *et al.* 2012).



Kuva 9. Nivelruston rakenne (OARSI Primer 2010 [online, viitattu 25.02.2014]).

Väliwyöhykkeen kollageeniverkosto on järjestäytynyt sattumanvaraisesti ja rustosolut ovat pallomaisia ja harvinaisia. Tämä vyöhyke muodostaa anatomisen ja toiminnallisen sillan pintavyöhykkeen ja syvän vyöhykkeen välillä. Väliwyöhykkeen osuus on noin 40 – 60 % koko ruston tilavuudesta, ja se sisältää proteoglykaaneja ja paksuja kollageenisäikeitä. Toiminnallisesti väliwyöhyke on ensimmäinen kerros, jolla on kestävyttä puristusvoimia vastaan. Syvä vyöhyke on eniten vastuussa puristusvoimien kestävydestä sillä kollageenisäikeet ovat järjestäytyneet pylväiksi kohti rustoluurajaa. Myös rustosolut ovat tyypillisesti

järjestäytyneet pylväiksi kollageenisäikeiden suuntaisesti. Syvän vyöhykkeen osuus on noin 30 % nivelruston tilavuudesta. Kollageenin pitoisuus on korkein pintavyöhykkeellä kun taas proteoglykaanipitoisuus on korkein syvällä vyöhykkeellä. ”Tide mark” erottaa nivelruston syväkerroksen alla olevasta kalkkeutuneesta vyöhykkeestä. Kalkkeutuneessa vyöhykkeessä muodostuu kasvuruston hypertrofisia rustosoluja. Tämän alla ovat vielä rustonalainen luu (subkondraaliluu) ja luuydin. Rustonalaisen luun verisuonituksen kautta rusto saa ravinteita. Tämän lisäksi ravinteita diffundoituu myös nivelnesteestä (Fox *et al.* 2009; Taipaleenmäki 2010; Säämänen *et al.* 2012).

Vyöhykkeiden lisäksi kondrosyyttien ympäröivä soluväliaine voidaan jakaa useiksi alueiksi koostumuksen ja järjestyksen mukaan: perisellulaariseksi, territoriaalseksi ja interterritoriaalseksi alueeksi. Perisellulaarinen alue on ohut kerros lähellä solukalvoa ja se ympäröi kondrosyytin kokonaan. Se sisältää pääasiassa proteoglykaaneja, glykoproteiineja ja muita ei-kollageenisia proteiineja. Tällä alueella on mahdollisesti toiminnallinen merkitys signaalinvälityksen aloittamisessa ruston sisällä kuormituksen vaikutuksesta. Perisellulaarista matriisia taas ympäröi territoriaalinen alue, joka koostuu pääasiassa hienoista kollageenisäikeistä. Kollageenisäikeet muodostavat korimaisen verkoston solujen ympärille. Territoriaalinen kerros on paksumpi kuin perisellulaarinen ja sen ajatellaan suojaavan rustosoluja mekaanisista rasituksista. Tämä voi myötävaikuttaa nivelruston rakenteen joustavuuteen ja sen kykyyn kestää huomattavia kuormituksia. Interterritoriaalinen alue on kaikista suurin ja vaikuttaa eniten nivelruston biomekaanisiin ominaisuuksiin. Sille tyypillistä ovat satunnaisesti suuntautuneet paksut kollageenisäiekimput, jotka järjestäytyvät pintavyöhykkeessä nivelpinnan suuntaisesti, välivyöhykkeessä vinosti ja syvässä vyöhykkeessä kohtisuoraan nivelpintaa vasten. Proteoglykaaneja on runsaasti interterritoriaalisella alueella (Fox *et al.* 2009).

### 2.3.3 Rustosolut

Varhaisen kehitysvaiheen aikana mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat kondroblasteiksi ja alkavat muodostaa alustavaa ruston soluväliainetta. Myöhemmin kondroblastit uppoavat soluväliaineeseen ja erilaistuvat kondrosyyteiksi. Ruston kasvun aikana kondrosyyttien määrä kasvaa olennaisesti mitoottisesti ja ne tuottavat rustoista soluväliainetta. Lopulta kypsä rusto sisältää vain yhtä solutyyppiä, kondrosyyttejä. Kasvavassa rustossa kaksi muuta solutyyppiä, septoklastit ja kondroklastit/osteoklastit, jotka osallistuvat ruston hajoamiseen. Ne saavat alkunsa hematopoieettisista kantasoluista, monosyyttien/makrofaagien solulinjasta. Kuitenkin näitä soluja ei yleensä pidetä ”ruston soluina” vaan lähinnä osteoklastien alapopulaationa (Morko 2005).

### **Kondrosyytit**

Kondrosyytti on nivelruston tunnusomainen solutyyppi. Kondrosyytit ovat pitkälle erilaistuneita, metabolisesti aktiivisia soluja, joilla on ainutlaatuinen rooli soluväliaineen muodostuksessa, ylläpidossa ja korjaamisessa. Se toteutuu soluväliaineen kautta hajottavien entsyymien avulla. Biokemiallisesti kondrosyyteille on ominaista ECM:n rakennekomponenttien, kuten tyypin II kollageenin, aggregaatin ja muiden ”ruston spesifisten” molekyylien tuotanto. Kondrosyyttien osuus on noin 2 % koko nivelruston tilavuudesta. Kondrosyyttien muoto, lukumäärä ja koko vaihtelee ja riippuu nivelruston anatomisista vyöhykkeistä. Esimerkiksi pintavyöhykkeen kondrosyytit ovat ohuempia ja pienempiä ja esiintyvät suuremmissa tiheydessä kuin soluväliaineessa syvemmillä vyöhykkeillä olevat solut. Morfologisesti kondrosyyttejä on jaettu kolmeen eri alaryhmään: levossa oleviin, jakautuviin ja hypertrofisiin kondrosyytteihin (Morko 2005; Fox *et al.* 2009)

Jokainen kondrosyytti luo erikoisen mikroympäristön, jossa se vastaa välittömässä läheisyydessä olevan ECM:n uusiutumista. Sellaisessa mikroympäristössä kondrosyytti on oman soluväliaineensa sisällä, joten solun muuttoliike eli migraatio ruston lähialueille estyy. Kondrosyytit muodostavat harvoin solu-solu

kontakteja suoraan signaalinvälitykseen ja solujen väliseen viestintään, joten niiden kommunikointi tapahtuu soluväliaineen kautta. Ne kuitenkin reagoivat erilaisiin ärsykkeisiin kuten kasvutekijöihin, mekaaniseen kuormitukseen, piet-sosähköisiin voimiin ja hydrostaattisiin paineisiin. Valitettavasti kondrosyyteillä on rajallisia lisääntymismahdollisuuksia, joten rustovaurion kapasiteetti parantua itsestään on lähes olematon. Kondrosyytin selviytyminen riippuu optimaalisesta kemiallisesta ja mekaanisesta ympäristöstä (Fox *et al.* 2009).

Pääasiallisesti kondrosyytit saavat ravinteita anaerobisella aineenvaihdunnalla, koska niiden lähellä puuttuvat veri- ja imusuonet. Aineenvaihdunnan aktiivisuutta kondrosyyttien ympäröimässä kemiallisessa ja mekaanisessa ympäristössä voidaan säätää erilaisilla tekijöillä. Proinflammatorisilla sytokiineilla kuten interleukiini-1 (IL-1) ja tuumorinekroositekijä- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on katabolisia ja anabolisia vaikutuksia, joilla on merkitystä soluväliaineen makromolekyylien hajoamisessa ja synteesissä. Kondrosyytit syntetisoivat, ylläpitävät ja erittyvät proteoglykaaneja soluväliaineeseen. Useat kasvutekijät ja säätelypeptidit, kuten insuliininkaltaiset kasvutekijät (IGF), transformoiva kasvutekijä- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleukiini-1 ja tuumorinekroositekijä- $\alpha$ , osallistuvat proteoglykaanien aineenvaihdunnan säätöön. Kondrosyyttien ympäröimä ECM suojaa soluja mahdollisesti haitallisista biomekaanisista voimista. Soluväliaineen aineenvaihdunnan homeostaasi tasapainottaa eri makromolekyylien hajoamista korvaamalla niitä juuri syntetisoiduilla tuotteilla (Fox *et al.* 2009).

Kondrosyyttien metabolinen aktiivisuus riippuu erityisesti ympäristötekijöistä ja mekaanisista voimista, jotka vaikuttavat soluihin ja ruston ylläpitoon. Kuormituksen taajuus ja voimakkuus ovat kaksi tärkeää tekijää, jotka vaikuttavat rustosolujen aktiivisuuteen. Soluväliaineen synteesin lisääntymisen ja vähenemisen on havaittu riippuvan kohdistuvan kuorman kestosta ja suuruudesta ja solujen mekaanisesta ympäristöstä. Lisäksi, on havaittu, että solujen muoto vaikuttaa kondrosyytin biokemialliseen aktiivisuuteen (Turunen 2013).

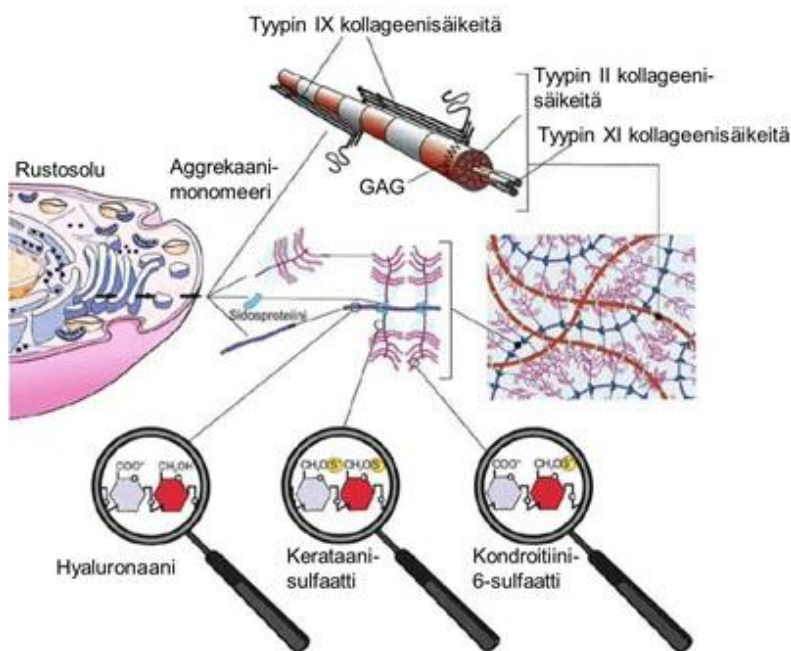
### 2.3.4 Ruston soluväliaineen koostumus

Solut tuottavat ympärilleen proteiineja tai hiilihydraatteja, joista soluväliaine koostuu. Proteiinien tai hiilihydraattien järjestys soluväliaineessa antaa soluille tuki- ja tarttumispinnan. Kudoksen vetolujuus ja elastisuus selittyvät soluväliaineen molekyylien rakenteen erityispiirteillä. Erityisesti soluväliaineen merkitys korostuu rustossa, koska suurin osa rustokudoksesta muodostuu soluväliaineen rakennemolekyyleistä (Heino & Vuento 2010).

Soluväliaineen molekyylit jakautuvat kolmeen pääluokkaan: säikeitä muodostaviin proteiineihin, glykoproteiineihin ja proteoglykaaneihin. Ruston soluväliaine koostuu eri kollageeneista, proteoglykaaneista, glykosaminoglykaaneista ja ei-kollageenisista proteiineista (Morko 2005; Heino & Vuento 2010).

#### **Kollageenit**

Kollageenit ovat suuria säikeitä eli fibrillejä muodostuvia proteiineja. Suuren vetolujuutensa vuoksi ne antavat rustokudokselle mekaanista kestävyttä. Ruston soluväliaineessa esiintyy pääasiassa tyyppin II kollageenia, joka on rustokudoksen tärkein ja runsain säikeiden muodostaja. Yksittäinen kolmoiskierteinen kollageenisäie koostuu kolmesta proteiinialayksiköstä,  $\alpha$ -ketjusta, jotka ovat joko yhden, kahden tai kolmen eri geenin tuotteita. Tyyppin II kollageenissa kaikki  $\alpha$ -ketjut ovat samanlaisia. Alfaketjun primaarirakenteessa on kolmen aminohapon, Gly-X-Y, toistojakso, jossa Gly on glysiini, X on usein proliini ja Y hydroksiproliini tai hydroksilysiini. Hydroksiproliini on tärkeä kollageenin stabiilisuudelle. Kaikki kolme  $\alpha$ -ketjua kiertyvät kolmoiskierteiseksi jäykäksi kollageenisäikeeksi. Suuren vetolujuuden omaavat, paksut, tarkoin järjestäytyneet kollageenisäiekimput muodostuvat kun kolmoiskierteiset kollageenisäikeet asettuvat peräkkäin ja rinnakkain ja niiden väliin syntyy kovalenttisia poikkisidoksia (Heino & Vuento 2010; Säämänen *et al.* 2012).



Kuva 10. Rustokudoksen soluväliaineen keskeiset rakennekomponentit (Säämänen *et al.* 2012).

Ruston soluväliaineen tukiranka muodostuu tyypin II, IX ja XI kollageenien muodostamista heterofibrilleistä (kuva 10). Tyypin IX kollageeni on FACIT (*engl.* Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices) -tyyppinen kollageeni, joka sisältää myös yhden glykosaminoglykaaniketjun (GAG). Tyypin IX kollageeni sitoutuu tyypin II kollageenin pinnalle rajoittaen heterosäikeen paksuuskasvua ja liittää säikeet edelleen soluväliaineen muihin proteiineihin, jolloin syntyy nivelten toiminnalle tärkeä iskunkestävä rakenne. FACIT-kollageeneissa monotoninen Gly-X-Y jaksojen vuorottelu keskeytyy ja kolmoiskierre paikoittaisesti avautuu. Tyypin XI kollageeni muodostaa kollageenikimpun hennompisäikeisen ytimen. Tyypin X kollageeni on hypertrofisen ruston verkkoa muodostava kollageeni (Säämänen *et al.* 2012).

Säikeitä muodostavat kollageenit tuotetaan ensin esimuodossa, prokollageeneina rustosolun sisällä. Prokollageenissa on säiemuodostuksen estävä propeptidi sekä N- että C-päässä. Kolmen  $\alpha$ -ketjujen liittyminen yhteen propeptidin alueelta muodostaa kolmoiskierteisen prokollageenimolekyylin, joka erittyy pois solusta soluvälitilaan Golgin laitteen kautta. Soluvälitilassa proteaasit poistavat N- ja C-päiden propeptidit jolloin tapahtuu spontaani säiemuodostus. Säi-

keet vahvistuvat kollageenimolekyylien välille muodostuvien kovalenttisten poikkisidosten ansiosta (Heino & Vuento 2010).

## **Proteoglykaanit**

Proteoglykaanit rakentuvat ydinproteiinista ja siihen kovalenttisesti kiinnittyneestä haarautumattomasta glykosaminoglykaaniketjusta. Glykosaminoglykaanit (GAG) kuten kerataanisulfaatti, kondroitiinisulfaatti ja hyaluronaani koostuvat happaman tai neutraalin sokerin ja aminosokerin muodostumista toistuvista disakkaridiyksiköistä. Ruston pääasiallinen proteoglykaani on aggregaani, joka koostuu ydinproteiinista ja siihen kovalenttisesti pulloharjan harjasten tavoin sitoutuneista kerataani- ja kondroitiinisulfaattiketjuista. Aggregaanimonomeerien ydinproteiini pystyy kiinnittymään hyaluronaanimolekyyliin liittäjäproteiinin avulla, jolloin muodostuu suuria proteoglykaanikertymiä eli aggregaatteja. Proteoglykaaniaggregaatit täyttävät soluväliaineen kollageeniverkoston hydrofiilisellä geelillä. Hyaluronaani eli hyaluronihappo on soluväliaineen valtava glykosaminoglykaani, jonka sykkyrämäisen rakenteen ansiosta, sitoo vettä soluväliaineeseen, ja on myös välttämätön rustokudoksen muodostumiselle. Nivelneste sisältää runsaasti hyaluronaania, mikä selittää nivelnesteeseen viskositeetin ja sen sopivuuden nivelten voiteluaineeksi (Heino & Vuento 2010; Säämänen *et al.* 2012).

Glykosaminoglykaaniketjut välittävät proteoglykaanien tarttumista moniin molekyyleihin kuten kasvutekijöihin, ja proteoglykaanien vedensitomiskyky perustuu disakkaridien sisältämiin negatiivisesti varautuneisiin karboksyyli- $(\text{COO}^-)$  ja sulfaatti- $(\text{S}^-)$ -ryhmiin, jotka vetävät puoleensa kationeja, kuten  $\text{Na}^+$ -ioneja. Proteoglykaanien turpoamispaine ja veden virtaaminen kudokseen, jota kollageeniverkosto puolestaan rajoittaa, aiheutuu osmoosin vaikutuksesta. Nivelrustokudoksen kimmoisuus syntyy kollageeniverkoston ja proteoglykaanien sitoman veden välisistä vuorovaikutuksista. Ulkoisen kuormituksen kohdistuessa rustokudokseen kudoksen sisäistä nestettä siirtyy pois kuormitusalueelta pienemmän paineen alueelle, jolloin kudoksesta painuu kassan. Tasapainotilassa rusto-

kudos turpoaa takaisin kollageeniverkoston sallimiin rajoihin (Heino & Vuento 2010; Säämänen *et al.* 2012).

Muita nivelruston normaalille toiminnalle välttämättömiä proteoglykaaneja ovat dekoriini, biglykaani ja fibromoduliini. Dekoriini on pieni dermataanisulfaattiproteoglykaani, joka osallistuu kollageenisäikeiden koon säätelyyn. Se on pieni leusiinirikas proteoglykaani, joka pystyy muuntamaan kasvutekijöiden bioaktiivisuutta ja toimimaan suorana signaalintimolekyylinä eri soluissa. Dekoriini osallistuu solujen lisääntymisen ja erilaistumisen säätelyyn koska se kykenee sitoutumaan kasvutekijöihin. Dekoriini, biglykaani ja fibromoduliini ovat pienempiä molekyylejä kuin aggregaani, mutta kuitenkin esiintyvät rustossa ainemäärältään samassa pitoisuudessa. Dekoriini ja fibromoduliini ovat tiiviissä vuorovaikutuksessa soluväliaineessa tyypin II kollageenin säikeiden kanssa ja vaikuttavat säiekimpun muodostukseen ja välisäikeiden vuorovaikutuksiin. Biglykaania esiintyy pääasiassa kondrosyyttien läheisyydessä, jossa se voi olla vuorovaikutuksessa kollageeni VI kanssa (Fox *et al.* 2009; Kelc *et al.* 2013 [online, viitattu 23.03.2014]).

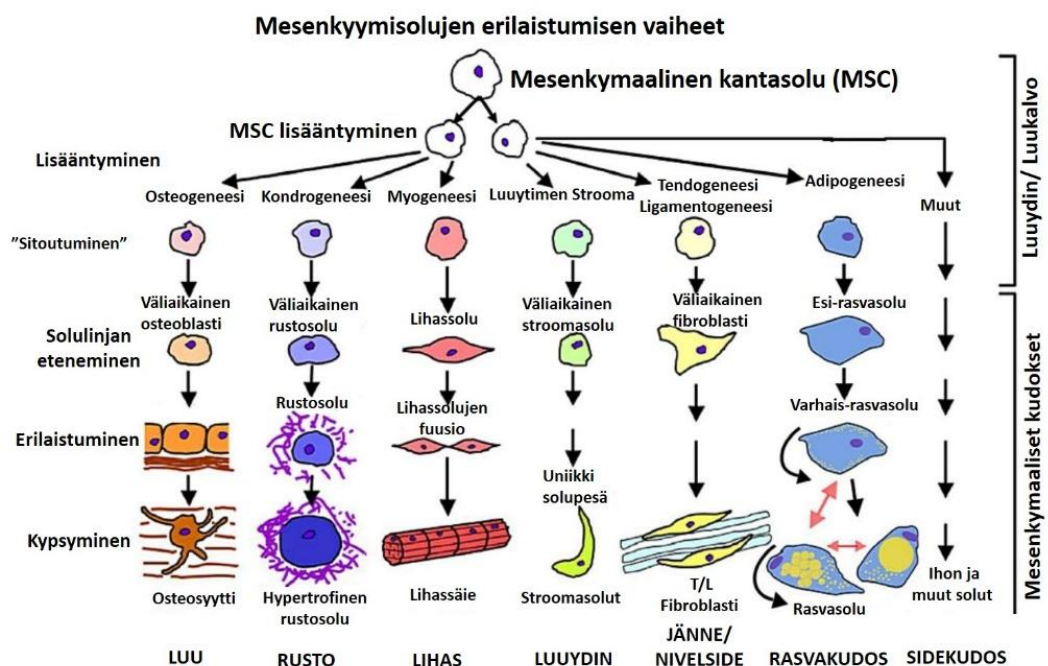
### **Ruston ei- kollageeniset proteiinit ja glykoproteiinit**

Nivelrustossa on useita ei-kollageenisia proteiineja ja glykoproteiineja, joiden toiminta ei ole vielä täysin selvää. Todennäköisemmin molekyylit kuten fibronektiini ja CII, kondrosyytin pintaproteiini, osallistuvat soluväliaineen makromolekulaarisen rakenteen organisaatioon ja ylläpitoon (Fox *et al.* 2009).

#### **2.4 Mesenkymaaliset kantasolut**

Eri solutyypit ja kudokset kehittyvät kantasolujen erilaistumisen myötä (kuvio 1). Kantasolut ovat solujen kantamuotoja ja ne jaetaan kolmeen eri alatyyppiin niiden erilaistumispotentialin ja jakaantumiskyvyn mukaan. Täyskykyinen eli totipotenti kantasolu on alkion varhaiskehityksen solu, joka kykenee erilaistumaan kaikiksi solutyypeiksi, mukaan lukien istukan soluiksi, ja jakaantumaan rajoit-

masti. Lähes täysikykyinen eli pluripotentti kantasolu on alkion myöhemmän kehityksen solu, joka on menettänyt kykynsä erilaistua istukan soluiksi, mutta kykenee muodostamaan muita solutyyppejä. Mesenkyymikantasolut (*engl.* mesenchymal stem cell, MSC) ovat sikiön tai aikuisen yksilön monikykyisiä eli multipotentteja kantasoluja, jotka eivät pysty erilaistumaan rajattomasti kaikkiksi solutyypeiksi. Mesenkyymikantasolut säilyvät erilaistumattomina monikykyisinä soluina ihmisen eri kudoksissa kasvuympäristönsä eli kantasolupesän avulla. Mesenkyymikantasolut ovat kaikkien side- ja tukielimistön kudosten kantasoluja ja niitä voidaan eristää esimerkiksi luuytimeistä, rasvakudoksesta, lihaksesta, luu- ja nivelkalvosta, nivelrustosta ja perisyhteistä, jotka ovat supistumiskykyiset solut ja sijaitsevat verisuonten seinämissä endoteelisolujen ulkopuolella. Kudosten välillä on eroja mesenkyymisolujen määrissä. Kantasolupesää ympäröivän soluväliaineen koostumus ja järjestäytyminen vaikuttavat siihen, miten ulkoiset signaalit pääsevät vaikuttamaan kantasoluihin (Pountos *et al.* 2007; Säämänen *et al.* 2012).



Kuvio 1. Mesenkyymikantasolujen monilinjainen erilaistumispotentiaali. Loppuvaiheen solutyyppi riippuu viljelyolosuhteesta, kasvatusmediumista ja lisäravinteista (Bonfield & Caplan 2010 [online, viitattu 25.03.2014]).

Kaikkien kudosten on havaittu sisältävän esiaste- eli progenitorisoluja. Progenitorisolu voi jakautua rajallisesti ja erilaistua vain kahdeksi tai muutamaksi solutyypiksi, esimerkiksi luuytimen osteokondroprogenitorisolu kykenee erilaistumaan rustosoluksi tai osteoplastiksi. Eri kudoksista eristettyjen mesenkyymisolupopulaatioiden karakterisoinnissa tutkitaan niiden kykyä kiinnittyä soluviljelymaljan muoviin, kykyä ilmentää pinnallaan tiettyjä CD-pinta-antigeenejä ja kykyä erilaistua *in vitro* olosuhteissa erilaistumissignaalien vaikutuksesta tiettyyn mesenkymaaliseen solutyyppiin kuten rustosoluiksi, osteoplasteiksi tai rasvasoluiksi. Mesenkyymisolujen ilmentämiä pintamarkkereita ovat CD9, CD10, CD13, CD44, CD54, CD55, CD90, CD105, CD166, D7- FIB mutta ne ovat negatiivisia CD14, CD34, CD45 ja CD133 pintamarkkereille. Mesenkyymikantasolut ja progenitorisolut erittävät kasvu ympäristöönsä troofisia tekijöitä eli bioaktiivisia välittäjäaineita, kuten erilaisia sytokiineja, kasvutekijöitä sekä immunosuppressiivisia yhdisteitä, jotka estävät immuunijärjestelmän tappajasolujen kuten T-solujen ja dendriittisolujen toimintaa (Pountos *et al.* 2007; Säämänen *et al.* 2012).

Mesenkymaalisten kantasolujen muovautuvuus ja uusiutuvuuskyky antavat valtavat mahdollisuudet tuhoutuneiden kudosten tai elinten kliiniseen korjaamiseen. Mesenkyymisoluja voidaan lisätä *in vitro* ja ohjata erilaistumaan eri kasvutekijöiden läsnäollessa halutuksi mesenkyymisolutyypiksi. Ihmiskehossa mesenkyymikantasoluja voitaisiin pitää sellaisina varastoina, joissa on helposti saatavilla korjaukseen kykeneviä soluja, ne lähtevät liikkeelle, lisääntyvät ja erilaistuvat asianmukaisiksi solutyypeiksi. Loukkaantumista, tulehdusta tai nekroosia seuraavat signaalit voivat laukaista mesenkyymisoluja aktivoitumaan. Nämä mesenkyymisolujen hyödylliset ominaisuudet ovat mahdollistaneet erilaisia MSC-pohjaisia terapiamuotoja esimerkiksi luutumisvaurioiden ja sydäninfarktin hoidossa. MSC suonensisäisen injektion jälkeen on myös havaittu solujen siirtymistä vaurioituneelle alueelle. Luuytimen mesenkyymisolusta erilaistettuja rustosoluja käytetään jo rustovaurioiden korjauksessa sekä eläinmalleissa että ihmisillä. Tieto mesenkymaalisten kantasolujen jakautumisesta ja erilaistumisesta on vähäistä, joten tarvitaan vielä paljon tutkimus- ja

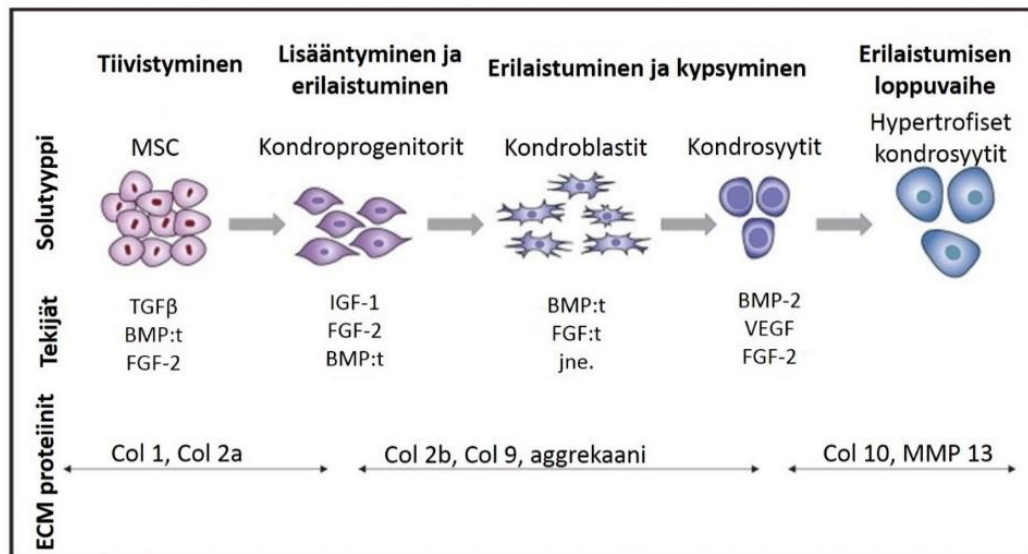
kehitystyötä, ennen kuin niitä voidaan rutiinisti käyttää kliinisessä työssä (Pountos *et al.* 2007; Säämänen *et al.* 2012).

#### 2.4.1 Erilaistuminen rustosoluksi

Kondrogeneesi eli erilaistuminen rustosoluksi on monivaiheinen tapahtumasarja ja luuston kehityksen varhaisin vaihe. Kasvutekijät ja niiden signalointireitit ovat keskeisiä säätelijöitä ruston erilaistumisessa. Solunsisäisten viestintävälitysmekanismien aktivoituminen tapahtuu kun kasvutekijä kiinnittyy reseptoriinsa ja tumassa geenien transkriptiota sääteleviä proteiineja aktivoituu. Kondrogeneesin aikana tapahtuu ensin mesenkyymisolujen rekrytointia ja tiivistymistä, sen jälkeen tapahtuu erilaistumista kondrosyyteiksi, kondrosyyttien kypsymistä, ruston soluväliaineen spesifisten komponenttien eritystä (tyypin II kollageeni, aggregaani ym.), soluväliaineen tuotantoa, kondrosyyttien lisääntymistä kasvulevyssä ja erilaistumista eteenpäin kohti hypertrofiaa ja lopussa ruston korvaamista luukudoksella. Kondrogeneesin kaikki vaiheet ovat riippuvaisia erilaisista signaaleista, jotka saavat alkunsa solu-solu ja solu-soluväliaineen vuorovaikutuksista, sekä lisääntyvien solujen tarttumisesta ja liitosten muodostumisesta (kuvio 2). Erilaistumistapahtumaa ohjaavat solujen vuorovaikutukset yhdessä ympäröivän soluväliaineen kanssa, kasvu- ja erilaistumistekijät ja muut ympäristötekijät (taulukko 1). Ne käynnistävät tai estävät solun signalointireittejä ja spesifisten geenien transkriptiota. Sen lisäksi useat sytokiinit laukaisevat solunsisäisen signalointireittejä ruston erilaistumisen aikana (Taipaleenmäki 2010).

Kehittyvissä raajoissa kondrogeneesi käynnistyy signaloinnilla, jota luun morfogeneettiset proteiinit, BMP:t (*engl.* bone morphogenetic protein), indusoivat ja ohjaavat. Sox9 on yksi varhaisimmista markkereista, joka ekspressoituu mesenkymaalisisessa tiivistymisessä ja on keskeinen transkriptiotekijä rustosolun erilaistumisessa. Sox9 varmistaa kondrogeneesiä estämällä luuston esiasteita ekspressoivan Runx2 toimintaa suoraan sitoutumalla siihen. Kaksi muuta Sox perheenjäsentä, L-Sox5 ja Sox6, säätelevät, ekspressoituvat yhdessä Sox9 kanssa ja niiden toimintaa tarvitaan Sox9 välitteisessä solujen muuntumisessa

varhaisiksi kondroblasteiksi. Sox9, säätelee ruston muodostumista yhteistoiminnassa L-Sox5 ja Sox6 kanssa ja ylläpitää rustosolun fenotyyppiä kypsässä rustossa aktivoimalla useiden ruston spesifisten geenien ilmentymistä, kuten II, IX ja XI kollageeni (*Col2a1*, *Col9a1* ja *Col11a1*), aggregaani (*Acan*) ja ruston soluväliaineen oligomeerinen proteiini (*engl. cartilage oligomeric matrix protein, COMP*) (*Comp*) (Taipaleenmäki 2010).



Kuvio 2. Kondrogeneesin eri vaiheet, sisältäen tärkeimmät kasvutekijät ja soluväliaineen muutokset (Kelc *et al.* 2013 [online, viitattu 23.03.2014]).

Ruston soluväliaine vaikuttaa mesenkyymisolun erilaistumiseen, kondrosyytin kehittymiseen ja endokondraaliseen luutumiseen. Ruston soluväliaineen geenien ilmeneminen on tiukan valvonnan alla. Ruston soluväliaine säätelee ja koordinoi signalointireittejä ruston muodostumisessa. Ruston matriisin proteiinien, kuten tyypin II ja XI kollageenien, aggregaanin, perlekaanin ja sidospoteiinien puute johtaa vakavaan luuston epämuodostumiseen. Soluväliaineen avulla useat signalointireitit yhdistyvät, kuten fibroblastikasvutekijän (FGF)- ja BMP-reitit. Sen lisäksi matriisin komponentit kykenevät mukauttamaan transformoivan kasvutekijän  $\beta$ :n, TGF- $\beta$  (*engl. transforming growth factor  $\beta$* ), bioaktiivisuutta ja muita kasvutekijöitä. Ne aktivoivat tai inaktivoivat kasvutekijöitä proteolyttisillä tapahtumilla tai sitoutumalla suoraan sytokiinireseptoreihin. Yhdistämällä eri kasvutekijöitä pystytään säätelemään kondrosyyttifenotyypin kehitystä. Myös

FGF:n ja BMP:n signalointireittien välillä vallitseva tasapaino määrää erilaistumisen vauhdin jokaisessa kaskadivaiheessa ja säätelee kondroblastien lisääntymistä, kypsymistä ja hypertrofiaa (Taipaleenmäki 2010).

Taulukko 1. Kasvutekijät ja niiden vaikutus MSC-soluihin (Danišovič *et al.* 2012; Kelc *et al.* 2013 [online, viitattu 23.03.2014]).

Kasvutekijä	Vaikutus MSC-soluihin
TGF- $\beta$ 1 transformoiva kasvutekijä	Lisää solujen lisääntymistä ja aiheuttaa rustomaista matriisin tuotannon kiihtymistä, säätelee tyypin I kollageenin geenin ilmentymistä, vähentää katabolista toimintaa.
TGF- $\beta$ 3	Lisää rustomaista soluväliaineen tuotantoa.
BMP-2 luun morfogeneettinen proteiini	Lisää solujen lisääntymistä ja stimuloi rustomaista matriisin tuotantoa, säätelee tyypin I kollageenin geenin ilmentymistä, lisää ECM uusiutumista (lisääntynyt aggregaatin hajoaminen).
BMP-4	Nopeuttaa ruston erilaistumisen etenemistä sen kypsymiseen. Stimuloi tyypin II kollageenin ja aggregaatin synteesiä. Estää tyypin I ja X ilmentymistä.
BMP-7	Estää solun lisääntymistä, saa aikaan ruston erilaistumista, lisävaikutus erilaistumiseen TGF $\beta$ 1 ja IGF-1 kanssa. Stimuloi matriisin synteesiä ja vähentää ruston hajoamista.
GDF-5 kasvu- ja erilaistumistekijä	Lisää rustomaista matriisin tuotantoa. Lisää transkriptiotekijän Sox9 ilmentymistä.
IGF-1 insuliininkaltainen kasvutekijä	Lisää solujen lisääntymistä ja rustomaista ECM tuotantoa, lisävaikutus erilaistumiseen TGF $\beta$ 1 ja BMP-7 kanssa. Vähentää soluväliaineen kataboliaa, säätelee solun apoptoosia
FGF-2 fibroblastikasvutekijä	Lisää solujen lisääntymistä, lisää proteoglykaanin tuotantoa. Vähentää aggregaasin aktiivisuutta.
FGF-18	Estää solun lisääntymistä, aiheuttaa ruston erilaistumista.

TGF $\beta$  kuuluu suureen geeniperheeseen, jossa solujen erilaistumisen säätely tapahtuu seriini/treoniinikinaasireseptorien kautta. TGF $\beta$ :t jaetaan useisiin alaryhmiin, joista TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ja TGF- $\beta$ 3 ovat varsinaiset. Näillä molekyyliellä osoitettiin olevan monenlaisia vaikutuksia solujen kasvussa ja erilaistumisessa, soluväliaineen tuotannossa, rakenteen muodostuksessa ja kudoksen spesifi-

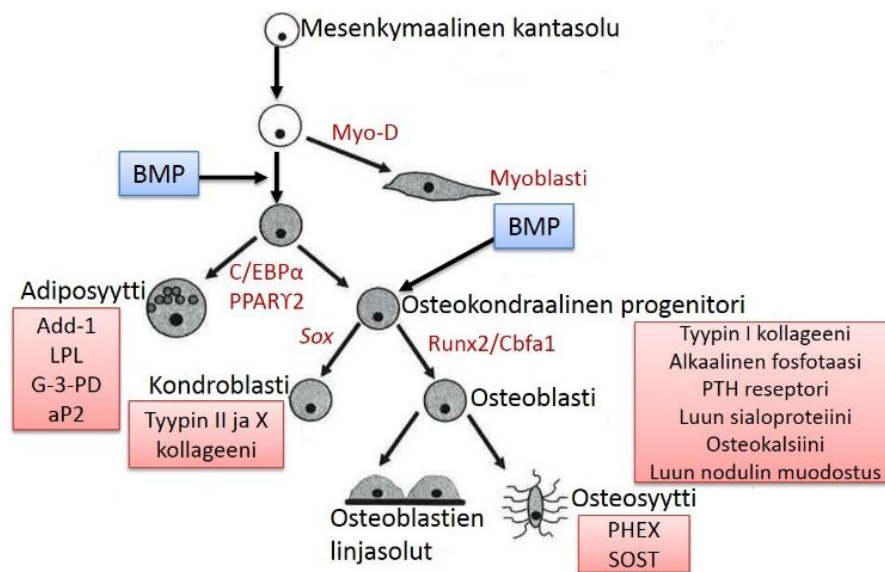
kaatiossa. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 ja TGF- $\beta$ 5 välillä on eroa erilaistumisen vasteessa kun mesenkyymisoluja viljellään solumassana. Muita TGF $\beta$ :n alaryhmiä ovat BMP:t, jotka säätelevät luun kehitystä (Taipaleenmäki 2010).

Toiminnalliset BMP:t ovat dimeerisiä proteiineja, joilla on yksi ketjun sisäinen disulfidisisidos. Dimeeristä muotoa vaaditaan BMP:n biologiseen aktiivisuuteen, molekyylien välisten sidosten vähentäminen johtaa aktiivisuuden menetykseen. BMP:t osallistuvat rustosolun erilaistumisen moniin vaiheisiin, kondroprogenitorisolun ja esiasteiden erilaistumiseen kondrosyyteiksi, myös kondrosyyttien kypsymiseen ja erilaistumisen loppuvaiheeseen. Tämän lisäksi signalointia BMP-reseptorien kautta tarvitaan nivelruston ylläpitoon postnataalisissa organismeissa. Jotkut BMP:t edistävät myös solun kuolemaa ja kondrosyyttien apoptoosia. BMP:t indusoivat Runx2 ilmentymistä ja soluväliaineen metalloproteiinaasi (MMP)-13 ylläpitää sen säätelyä. Loppuvaiheen erilaistumisessa hypertrofiset kondrosyytit erittävät angiogeenisiä tekijöitä, kuten verisuonien endoteelisolujen kasvutekijä, VEGF (engl. vascular endothelial cell growth factor), joka aiheuttaa angiogeneesin versomista perikondriumista. BMP-2, -4, -6, -7, -9 ja -13 on osoitettu kykenevät indusoimaan kondrogeneesiä *in vitro*. Kuitenkin raportoidut BMP:ien aiheuttamat suhteelliset tehokkuudet kondrogeneesissä ovat ristiriitaisia, osittain mallin ja käytettyjen viljelyolosuhteiden vaihtelujen vuoksi. Sen lisäksi eri lajien MSC ja kudosten alkuperä vaikuttavat kykyyn reagoida BMP:iin, mikä johtuu osittain niiden yksilöllisestä reseptorien valikoimista (Heino & Vuento 2010; Taipaleenmäki 2010).

#### 2.4.2 KS483 hiiren solulinja

Varhaisessa kehitysvaiheessa tietyt transkriptiotekijät käynnistävät soluissa erilaistumista. Mesenkymaaliset kantasolut pystyvät erilaistumaan rasvasoluiksi, rustosoluiksi, osteoblasteiksi ja lihassoluiksi. Erilaistumislinjan valintaan vaikuttavat useat eri kasvutekijät ja hormonit, jotka vaikuttavat kohdegeenien luentaan transkriptiotekijöiden välityksellä. Osteoblastisen linjan erilaistumista kontrolloivat ainakin Runx2/Cbfa1-transkriptiotekijät. Suurin osa kypsistä osteoblasteista

ohjautuu apoptoosiin, mutta pieni osa hautautuu valmistamansa väliaineen sisään ja muuntuu osteosyyteiksi. MyoD-geeniperheen transkriptiotekijöiden vaikutuksesta ja ilmaisemisesta mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat myoblasteihin eli lihassoluihin ja luun morfogeneettisten proteiinien vaikutuksesta kantasolut erilaistuvat osteoblastien (luun solut), adiposyyttien ja kondroblastien yhteiseksi esisoluksi eli progenitorisoluksi. Transkriptiotekijöiden PPAR $\gamma$ 2 ja C/EBP $\alpha$  vaikutuksesta nämä progenitorisolut erilaistuvat adiposyyteiksi ja kun BMP on jatkuvasti läsnä ne erilaistuvat osteoblasteiksi ja kondrosyyteiksi. Sox geenien vaikutus on välttämätön kondrosyyttien erilaistumiseen. Kun osteoblastien ympärille tulee soluväliainetta, ne pystyvät edelleen erilaistumaan osteosyyteiksi, luun mekaanikkaa tunnistaviksi soluiksi. Sen lisäksi luun pinnalla levossa olevat solut erilaistuvat osteoblasteiksi niin sanotuiksi luun linjasoluiksi (Yamashita *et al.* 1996; Percuros 2012).



Kuvio 3. Osteoblastien, kondrosyyttien ja adiposyyttien erilaistuminen. Vaaleanpunaisissa laatikoissa olevat geenit ovat tyypillisiä solujen erilaistumisessa (Percuros 2012).

Soluviljelyolosuhteissa luuytimen mesenkymaalisoluja tai progenitorisoluja voidaan stimuloida erilaistumaan eri solutyypeiksi viljelyolosuhteista riippuen. Percuroksen laboratoriossa on kehitetty KS483 mesenkymaalista progenitorisolulinja, jonka avulla voidaan selvittää geenejä ja tekijöitä, jotka vaikuttavat solujen erilaistumiseen. KS483 on klonaalinen, stabiili solulinja, joka peräisin hiiren kal-

vaariasta ja sitoutuu erilaistumaan osteoblastiseen suuntaan, mutta on viljelyolosuhteista riippuen mahdollista erilaistaa myös adiposyyteiksi ja kondrosyyteiksi (Percuros 2012).

Kondrosyyttien muodostamiseksi, KS483 soluista voidaan sentrifugoimalla tehdä solupellettejä, joita kasvatetaan ja erilaistutetaan seerumivapaissa olosuhteissa askorbiinihapon ja TGF- $\beta$ 3: läsnäollessa. Myöhäisemmässä vaiheessa voidaan solujen kypsymistä lisätä BMP:n avulla (Percuros 2012).

## 2.5 Histologisen näytteen valmistaminen parafiinitekniikalla

Histologia eli kudospotti tutkii eri eläin- ja kasvikunnan lajien kudosten hienorakennetta, jotta voidaan monipuolisesti kuvantaa ja tarkastella läpikulkevassa valossa transmissiovalomikroskoopilla. Mikroskooppisessa tutkimuksessa tarkasteltavan näytteen on oltava riittävän ohut ja läpikuultava ja vain kiinteästä näytteestä voidaan valmistaa riittävän ohuita leikkeitä. Lisätietoa kudospöytien rakennepöyistä saadaan käyttämällä erilaisia värjäystekniikoita haluttujen rakenteiden osoittamiseksi. Värjäyksissä käytetään erilaisia kemiallisia väriaineita, jotka sitoutuvat vain tiettyihin rakenteisiin ja molekyyliin (Solunetti 2014 [online, viitattu 5.1.2014]).

Parafiinitekniikassa on seuraavia työvaiheita: 1) näytteen otto, 2) fiksaatio, 3) valaminen eli petaus, 4) leikkaaminen ja 5) värjäys ja sulkeminen peitinlasilla. Näytteenotossa tutkittavan näytteen on oltava edustava ja sen otettaessa on varottava ruhjoutumasta. Fiksaatiovaiheen aikana näyte fiksoidaan mahdollisimman pian ottamisen jälkeen, koska alkaa välittömästi kudosten ja solujen hajoaminen (autolyysi) omien tai bakteerien entsyymien toimesta. Sen lisäksi kudoksessa tapahtuu postmortaalisia eli kuolemanjälkeisiä muutoksia. Fiksointi pysäyttää em. tapahtumat. Kemiallisessa immersioinnityksessä näyte upotetaan heti fiksatiiviin eli kiinnitysaineeseen. Näytteen kiinnitys myös parantaa sekä kudoksen kestävyttä käsittelylle että värjäytyvyyttä. Fiksaation aikana kudoksen vesipitoisuudessa tapahtuu muutos ja valkuaisaineet denaturoituvat, fiksatiivit reagoivat määrättyjen kudospöyenttien kanssa ja osa niistä liuke-

nee fiksatiiviin. Yleisimmät fiksatiivit ovat 10 % fosfaattipuskuroitu neutraali formaliini (4 % formaldehydin vesiliuos), 4 % PFA liuos (paraformaldehydi) ja alkoholit (Solubiologian harjoitustyöt 1 TBIO 2004).

Näytteen valamisessa petausaineena yleensä käytetään parafiiniä. Näytteestä poistetaan vesi dehydraatioissa nousevalla alkoholisarjalla (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 96 % ja Abs.EtOH), jotta parafiini saataisiin imeytettyä kudokseen. Koska parafiini ei liukene myöskään etanoliin, näyte vielä kirkastetaan nousevassa ksyleenisarjassa (Abs.EtOH:ksyleeni 1:1, ksyleeni). Kirkastunut näyte siirretään siten sulaan parafiiniin noin + 54 – 55 °C asteiseen 5 - 12 tunniksi, jolloin parafiini ehtii imeytyä kaikkialle kudokseen. Sen jälkeen näyte valetaan varsinaiseen parafiiniin valumuotissa huomioitten sen orientaatio leikkausta varten. Annetaan parafiinin jähmettyä ja kovettua leikkausta varten seuraavaan päivään. Histologiset parafiiniin valetut näytteet leikataan 4 - 6 µm paksuiksi leikkeiksi mikrotomilla. Koska parafiinileikkeet helposti käyristyvät leikatessa, niitä siirretään ensin huoneenlämpöiselle vesihauteelle oikenemaan. Sen jälkeen niitä suoristetaan lopullisesti + 45 – 51 °C asteisessa vesihauteessa ja kiinnitetään objektilasiin. Lasit kuivataan esimerkiksi yön yli lämpökaapissa + 37 – 38 °C (Solubiologian harjoitustyöt 1 TBIO 2004).

Käsittelyjen jälkeen parafiinileikkeet ovat täysin värittömiä, joten niiden värjääminen tekee mahdolliseksi mikroskooppisen tarkastelun. Silloin solukosta pystytään erottelamaan eri väreillä eri osia. Histologiset väriaineet ovat yleensä vesiliukoisia, joten parafiiniä poistetaan ksyleenissä ja kudosta siirrettään takaisin vesifaasiin rehydraation avulla laskevassa alkoholisarjassa (Abs.EtOH, 96 % EtOH, 70 % EtOH). Värjäyksen jälkeen näyte dehydroidaan yleensä jos petausaine ei ole vesiliukoinen. Petauksessa näytteen päälle tipautetaan pisara päällystysainetta ja suljetaan asettamalla peitinlasia näytteen päälle. Päällystysaineen kuivuttua näyte on valmis mikroskopointiin ja analysoitiin (Solubiologian harjoitustyöt 1 TBIO 2004).

### 3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE

Opinnäytetyön tarkoituksena oli pystyttää hiiren 3D-rustosoluviljelymalli ja selvittää soveltuuko malli sekä kaupallisesti hyödynnettävään testiyhdisteiden seurlontaan että jatkotutkimuksiin. Sen lisäksi yritettiin löytää ja selvittää optimaaliset olosuhteet ja parhaiten rustosoluviljelyä tehostavat aineet.

Opinnäytetyön tavoitteena oli saada mahdollisimman paljon lisää tietoa 3D-rustosoluviljelymallista, sen kehityksestä ja tapahtuvista muutoksista viljelyn aikana.

## 4 TYÖN SUORITUS

Rustosolut erilaistutettiin ja kasvatettiin pellettiviljelmässä U-pohjaisella 96-kuoppalevyllä. Rustosolupellettien kasvatus levyllä tehtiin neljällä rivillä ja kuudella rinnakkaisella näytteellä (kuvio 1). Ensimmäisellä rivillä kontrollirustosolupelletit kasvatettiin kasvatusmediumissa ilman BMP-6, toisella rivillä rustosolujen kasvatusmediumiin oli lisätty 100 ng/ml BMP-6, kolmannella rivillä 300 ng/ml ja neljännellä rivillä 500 ng/ml päivästä 14 eteenpäin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C				ilman BMP6									
D				100 ng/ml BMP 6									
E				300 ng/ml BMP6									
F				500 ng/ml BMP6									
G													
H													

Kuvio 4. Rustosoluviljelmä 96-kuoppalevyllä.

KS483-solut sulatettiin ja kasvatus aloitettiin soluviljelypulloissa. Solumäärää lisättiin kahden solujaon aikana. Solut kasvatettiin Dulbecco´s modified Eagle´s kasvatusliuoksessa (DMEM), sisältäen FBS (*engl.* fetal bovine serum) ja gentamysiiniä ja amfoterisiiniä, jotka estävät hiivan ja homeen kasvua.

Kondrosyyttien erilaistumiskoe aloitettiin 96-kuoppalevyllä. Solut irrotettiin kasvatuspullon pohjalta, laskettiin ja siirrettiin 96-kuoppalevyille (300 000 solua / kuoppa). Kasvatusmediumiin lisättiin askorbiinihappoa, TGF- $\beta$ 3:a ja deksame-tonia. Levyt sentrifugoitiin 5 min 1200 rpm, jolloin pelletit muodostuivat.

Viljelmää ylläpidettiin maksimissaan 28 päivää ja puolet kasvatusmediumin tilavuudesta vaihdettiin kolme kertaa viikossa (maanantaisin, keskiviikkoisin ja perjantaisin). Päivästä 14 eteenpäin viljelymediumiin lisättiin askorbiinihapon ja  $\beta$ -glyserofosfaatin lisäksi eri määrät BMP-6:a. Kontrollipelletit viljeltiin ilman BMP-6 lisäystä. Kasvatusmediumit kerättiin talteen päivästä 3 eteenpäin vaihdon yhteydessä ja säilytettiin  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Viljelmä lopetettiin kolmessa eri aikapisteissä, päivinä 17, 24 ja 28. Puolet pelleteistä (n=3) fiksoitiin ja valettiin parafiiniin histologista analysointia varten. Parafiiniin valetut pelletit leikattiin mikrotomilla 5 µM paksuisiksi leikkeiksi. Parafiinileikkeille tehtiin sekä safraniinin O, toluidiinisisinisen ja Alcain sinisen histologiset värjäykset että tyypin II kollageenin vasta-ainevärjäys. Tulokset analysoitiin valomikroskoopilla. Toinen puoli pelleteistä (n=3) digestoitii proteinaasi K-entsyymillä ja solulysaateista tehtiin glykosamiiniglykaanimittaus. Talteen otetuista kasvatusmedieumeista mitattiin prokollageenin II C-propeptidia. Määritykset tehtiin kaupallisilla menetelmillä.

## 5 MENETELMÄT

### 5.1 Mesenkyymikantasolujen viljely

Kaksi ampullia KS483-soluja (P9; yhdeksäs jako) soluja sulatettiin ja otettiin kasvamaan. Soluja kasvatettiin inkubaattorissa 5 % CO<sub>2</sub>:ssa ja + 37 °C:ssa T175 pulloissa. Solut jaettiin kerran viikossa kunnes soluja oli tarpeeksi kokeen aloittamista varten. Pulloista poistettiin kasvatusmediumi ja solut pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS). Pulloihin pipetoitiin 5 ml trypsiini-EDTA-liuosta, ja solujen annettiin irrottaa inkubaattorissa 5 minuuttia. Solujen kunto ja määrä laskettiin Trypan bluen läsnä ollessa (10 µl otettua solunäytettä + 10 µl Trypan Blue -liuosta), jolloin kuolleet solut värjäytyvät sinisiksi. 10 µl seosta pipetoitiin Bürkerin laskukammioon ja solujen lukumäärä laskettiin valomikroskoopin alla. Solutiheyden perusteella solut jaettiin sopivassa tiheydessä pulloihin. KS483-soluja kasvatettiin DMEM-mediumissa, johon oli lisätty 10 % FBS sekä gentamysiini ja amfoterisiini. Kasvatusta ylläpidettiin vaihtamalla tuore kasvatusliuos 3 - 4 päivän välein.

### 5.2 KS483 mesenkyymisolujen erilaistaminen rustosoluiksi

KS483 hiiren mesenkyymisolujen erilaistumista rustosoluiksi indusoitiin kasvatamalla niitä 3D-pellettilijelmänä seruumivapaassa kasvatusmediumissa, johon oli lisätty erilaiset kasvutekijät.

1. Solut pestiin, irrotettiin ja kerättiin. Irronneet solut sentrifugoitiin 5 min, 800 rpm, solupelletti suspensoitiin peruskasvatusmediumiin (DMEM, 4 mM L-glutamiinia, 40 µg/ml L-proliinia, ITS (1:100) ja GA (1:500)) ja solut laskettiin.
2. Jokaista solupellettiä varten 96-kuoppalevyille laitettiin 300 000 solua/kuoppa 250 µl:n tilavuudessa peruskasvatusmediumia, johon oli lisätty 50 µg/ml askorbiinihappoa, 10 ng/ml TGF-β3 ja 10<sup>-7</sup> M deksametasonia.

3. Kuoppalevy sentrifugoitiin 7 min, 1285 rpm, jonka seurauksena kuopan pohjalle muodostui solupelletti. Seuraavana päivänä 180 µl kasvatusmediumista vaihdettiin, ja samalla irrotettiin varovaisesti solupelletti kuopan pohjasta. Solupelletit kasvatettiin inkubaattorissa 5 % CO<sub>2</sub>:ssa ja + 37 °C:ssa.
4. Päivinä 0 - 14 180 µl kasvatusmediumista vaihdettiin 2 - 3 päivän välein. Kasvatusmediumin oli peruskasvatusmediumi, sisältäen 50 µg/ml askorbiinihappoa, 10 ng/ml TGF-β<sub>3</sub> ja 10<sup>-7</sup> M deksametasonia.
5. Päivinä 14 - 28 kasvatusmediumina oli peruskasvatusmediumi, sisältäen 50 µg/ml askorbiinihappoa, 5 mM β-glyserofosfaattia ja eri määrät BMP-6 (100 ng/ml, 300 ng/ml ja 500 ng/ml).

### 5.3 Rustosolupellettien prosessointi ja analysointi

Kasvatuksen päätyttyä soluviljelymediumi otettiin talteen, rustosolupelletit pesitiin PBS:llä ja käsiteltiin analysoitavaan muotoon.

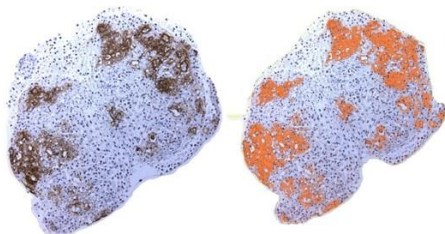
#### 5.3.1 Rustosolupellettien prosessointi

1. Kasvatusmediumi otettiin talteen ja solupelletti fiksoitiin 4 % PFA- liuoksella 2,5 tuntia huoneenlämmössä.
2. Fiksoinnin jälkeen pelletit huuhdeltiin 70 % etanolilla ja siten inkuboitiin 70 % etanolissa 24 tuntia.
3. Pelletit dehydroitiin ensin 85 % etanolissa noin 8 tuntia ja sen jälkeen 96 % etanolissa yön yli (noin 12 tuntia).
4. Pelletin visualisoinnin helpottamiseksi, se värjättiin 96 % etanoli-eosiiniliuoksella (5 tippaa 1 % eosini Y-vesiliuosta 96 % etanolissa) 20 minuuttia. Pelletit siirrettiin histologisiin kasetteihin seuraavaa kuljetusta varten.
5. Dehydrointia jatkettiin seuraavasti: 30 min 96 % EtOH, 2 x 30 min Abs.EtOH, 10 - 20 min Abs.EtOH : Ksyleeni (1:1).
6. Pellettien kirkastus ksyleenissä 2 x 10 min.
7. Pelletit upotettiin sulaan parafiiniin (noin 56 °C) ja inkuboitiin yön yli + 57 – 59 °C lämpökaapissa.
8. Pelletit valettiin parafiiniblokkeihin ja säilytettiin huoneenlämmössä.

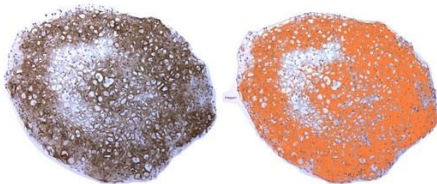
9. Parafiiniblokkit leikattiin 5 µm paksuiksi leikkeiksi mikrotomilla, oikaistiin + 49 – 51 °C asteisessa vesihauteessa ja kiinnitettiin objektilasille.
10. Lasit kuivattiin yön yli lämpökaapissa + 37 – 38 °C ja lasit leikkeineen säilytettiin + 4 °C.

### 5.3.2 Histologiset värjäykset

Histologisia värjäyksiä tehtiin Pharmatest Services Oy:n validoitujen työohjeiden mukaan. Safraniini O ja toluidiinisininen ovat kationisia väriaineita, jotka värjäävät sekä proteoglykaaneja että glykosaminoglykaaneja. On raportoitu, että toluidiinisinisellä tulee voimakkaampi värjäys, koska toluidiinilla on suurempi affiniteetti sitoutua rustossa olevaan rikkiin verrattuna safraniiniin O:hon. Vaikka safraniinilla O:lla värjäytyminen on suoraan verrannollista proteoglykaanin pitoisuuden normaalissa rustossa, se ei ole kuitenkin herkkä proteoglykaanipitoisuuden indikaattori rustossa, jossa glykosaminoglykaaneja ovat osittain hajonneet. Safraniini O -värjäyksessä proteoglykaanit värjäytyvät oranssinpunaiseksi, solun sytoplasma harmaanvihreäksi ja solutumat mustaksi.



Päivä 17 300 ng/ml BMP



Päivä 28 300 ng/ml BMP

Kuva 11. Analysointi MetaMorph-ohjelmalla, tyypin II kollageeni värjäys.

Ruston erilaistumisen etenemistä solupelleteissä arvioitiin mittaamalla toluidiinisinisellä, safraniinilla, Alcian sinisellä ja tyypin II kollageenin vasta-

aineella soluväliaineen värjäytynyt pinta-ala suhteessa pelletin kokonaispinta-alaan. Värjätyt parafiinileikkeet analysoitiin kynnyksarvojen (threshold) avulla MetaMorph-ohjelman avulla (kuva 11).

### **Toluidiinisininen värjäys**

Toluidiinisinisen värjäyksen työvaiheet:

1. Parafiinileikkeiden parafiinin poisto ja rehydraatio:
 

Ksyleeni	3 x 5 min	
Abs.EtOH	2 x 2 min	
96 % EtOH	2 x 2 min	
70 % EtOH	1 min	
Hanavesi	1 min	
2. Toluidiinisininen värjäys 10 min
3. Pesu hanavedessä 1 min
4. Kuivaus lämpökaapissa (+ 37 – 40 °C) 9 min
5. Kirkastus ksyleenissä 2 x 5 min
6. Lasien päällystys Mountex-liuoksella

### **Safraniini O -värjäys**

Safraniinin O -värjäyksen työvaiheet:

1. Parafiinileikkeiden parafiinin poisto ja rehydraatio:
 

Ksyleeni	3 x 5 min	
Abs.EtOH	2 x 3 min	
96 % EtOH	2 x 3 min	
70 % EtOH	3 min	
ddH <sub>2</sub> O	1 min	
2. Värjäys Weigert's rauta hematoksyliinin käyttöliuoksessa 4 min
3. Pesu juoksevassa hanavedessä 10 min
4. Värjäys 0,02 % Fast green (FCF) liuoksessa 3 min
5. Lyhyt huuhtelu 1 % etikkahapon liuoksessa 20 - 30 sec

- |   |                     |
|---|---------------------|
| 6. Värjäys 0,1 % Safraniinin O liuoksessa | 5 min               |
| 7. Dehydraatio:                           | 96 % EtOH 2 x 5 min |
|   | Abs.EtOH 2 x 5 min  |
| 8. Kirkastus ksyleenissä                  | 2 x 5 min           |
| 9. Lasien päällystys Mountex-liuoksella   |                     |

### Alcian sininen -värjäys

Alcian sinisen värjäyksen työvaiheet:

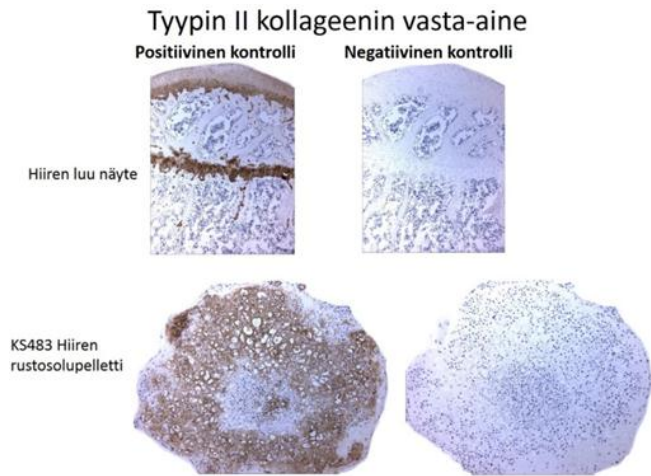
1. Parafiinileikkeiden parafiinin poisto ja rehydraatio:
 

Ksyleeni	3 x 5 min
Abs.EtOH	2 x 3 min
96 % EtOH	2 x 3 min
70 % EtOH	3 min
ddH <sub>2</sub> O	1 min
2. Värjäys Alcian sinisen liuoksessa 15 min
3. Valuminen ja kuivaus huoneenlämmössä 7 min
4. ddH<sub>2</sub>O huuhtelu
5. Taustavärjäys neutraalipunaisen liuoksessa 1 min
6. Nopea dehydraatio Abs.EtOH liuoksessa 2 kertaa
7. Kirkastus ksyleenissä 2 x 5 min
8. Lasien päällystys Mountex-liuoksella

#### 5.3.3 Tyypin II kollageenin immunohistokemiallinen värjäys

Käytetty tyypin II kollageenin vasta-aine sitoutuu nisäkkäiden kollageenin TC<sup>A</sup> fragmenttiin kollageenaasi- tai pepsiinikäsittelyn jälkeen. Sen epitooppi sijaitsee kollageenin kolmoiskierteessä ja vasta-aineella ei ole osoitettu ristireaktiota tyypin I ja III kollageenin kanssa. Kollageenin II immunohistokemiallinen värjäys on kahden päivän värjäys, jossa primaarinen vasta-aine inkuboitii yön yli. Tyypin II kollageenia visualisoitiin DAB (3, 3'-diaminobentsidiini) substraatilla. Tyypin II kollageenin vasta-aineen toimivuus osoitettiin positiivisella kontrollilla. Tässä

tapauksessa kontrollina on toiminut 4 kuukautta vanhaa hiiren rustonäyte (kuva 12).



Kuva 12. Tyypin II kollageeni hiiren rustossa ja kondrosyyttipelletissä, suurenos x 10.

Tyypin II kollageenin värjäyksen työvaiheet:

Ensimmäinen työpäivä:

Näyteleikkeet otettiin huoneenlämpöön 15 - 30 min ennen värjäyksen aloittamista.

1. Parafiinileikkeiden parafiinin poisto ja rehydraatio:

Ksyleeni	3 x 10 min
Abs.EtOH	2 x 10 min
96 % EtOH	2 x 5 min
70 % EtOH	2 x 5 min
ddH <sub>2</sub> O	1 min
PBS	5 min

2. Antigeenin paljastaminen: Leikkeet käsiteltiin pepsiiniliuoksella 15 min lämpökaapissa + 37 °C.

3. PBS-huuhtelu 2 x 5 min

4. Endogeenisen peroksidaasin blokkauk: 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS-liuoksessa, inkubaatio 5 min huoneenlämmössä. 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> laimennettiin juuri ennen käyttöä.

5. PBS-huuhtelu 2 x 5 min

6. Epäspesifisen värjäyksen blokkaukset: 10 % vuohen normaaliseerumi PBS-liuoksessa, lasien inkubaatio 1 h kosteassa kammiossa huoneenlämmössä. Inkubaation jälkeen lasia ei huuhdella vaan normaaliseerumiliuos taputeltiin pois lasista.
7. Primaarisen vasta-aineen inkubaatio: Laimennus 1:300 PBS/3 % BSA-liuoksessa. Negatiivisen kontrollin leikkeelle vain PBS/3 % BSA-liuosta (ei primaarista vasta-ainetta). Inkubaatio yön yli kosteassa kammiossa + 4 °C.

Toinen työpäivä:

8. PBS-huuhtelu 2 x 5 min
9. Sekundaarisen vasta-aineen inkubaatio: Käyttövalmis sekundaarivastaaineliuos pipetoitiin leikkeille ja inkuboitiin 30 min huoneenlämmössä.
10. PBS-huuhtelu 2 x 5 min
11. DAB-reaktio: Leikkeelle pipetoitiin juuri valmistettua DAB-käyttöliuosta. Värikehittymisen sopiva aika oli 1 min. Sen jälkeen DAB-liuos poistettiin lasista jätetpulloon.
12. ddH<sub>2</sub>O-huuhtelu 3 x 3 min
13. Taustavärjäys Mayerin hematoksyliiniliuoksessa 2 min, jonka jälkeen huuhtelu juoksevassa hanavedessä 10 min.
14. ddH<sub>2</sub>O-huuhtelu 3 x 20 sec
15. Dehydraatio:
 

70 % EtOH	2 x 3 min
96 % EtOH	2 x 3 min
Abs. EtOH	2 x 3 min
16. Kirkastus ksyleenissä 2 x 5 min
17. Lasien päällystys Mountex-liuoksella

#### 5.3.4 sGAG määrittäminen

##### **Wieslab® sGAG määrittäminen**

sGAG määrittäminen mittaa sulfoituneita glykosaminoglykaaneja. Se perustuu spesifiseen vuorovaikutukseen sulfoituneiden polymeerien ja Alcianin sinisen värin välillä, joka on neliarvoinen kationi hydrofobisen ytimen kanssa. Neliarvoisen varauksen ansiosta väriaine sitoutuu negatiivisesti varautuneisiin polymeereihin

kuten GAG:hin. Määritys tehdään riittävän matalassa pH:ssa, jotta kaikki karboksyyli- ja fosforihapon ryhmät neutralisoituvat ja riittävän suureessa ionivahvuudessa, jossa eliminoiduu muita ionisia vuorovaikutuksia, jotka eivät ole Alcian sinisen ja sulfoituneiden glykosaminoglykaanien välillä. Alcian sinisen reagenssia on mahdollista saada useista kaupallisista lähteistä, mutta reagenssin laatu ja sen käytettävyys proteoglykaanin määrittämisessä poikkeaa dramaattisesti tuotemerkkien välillä. Wieslab<sup>®</sup> sGAG määrittäminen Alcian sininen (C.I.# 74240) reagenssi on huolella valittu ja optimoitu kyseiseen käyttöön. Hyaluronaani ja ei-sulfoituneet GAG:t eivät reagoi määrittämisessä. Proteiinit ja nukleinihapot eivät myöskään häiritse tässä menetelmässä, toisin kuin dimetyylimetyleenisininenmenetelmässä (*engl.* dimethyl methylene blue, DMMB) tai muissa värinsitoutumismenetelmissä (Instruction 2009 [online, viitattu 3.03.2014]).

PBS:llä pestyt rustosolupelletit siirrettiin eppendorf-putkiin, joihin lisättiin 500 µl 0,1 mM EDTA/PBS liuosta ja 1 µl 20 mg/ml proteinaasi K-liuosta, pelletit digestoitettiin yön yli + 56 °C lämpökaapissa, minkä jälkeen solulysaatit säilytettiin – 20 °C kunnes määrittäminen tehtiin. sGAG määrittämisessä nollanäytteenä (BL) oli ddH<sub>2</sub>O, kontrollinäytteenä (Contr) oli vedellä laimennettu rustouute ja kalibraattoreina (CAL) olivat vedellä laimennettu kondroitiini-6-sulfaatti (CS-6) eri pitoisuuksina, CAL 1 (400 µg/ml), CAL 2 (200 µg/ml), CAL 3 (100 µg/ml), CAL 4 (50 µg/ml), CAL 5 (25 µg/ml) ja CAL 6 (12,5 µg/ml).

sGAG määrittäminen työvaiheet:

1. Eppendorf-putkiin pipetoitiin 50 µl nollanäytettä, kalibraattoria, kontrollinäytettä ja mitattavia näytteitä (S) duplikaatteina seuraavan taulukon mukaisesti:

BL	BL	CAL 6	CAL 6	CAL 5	CAL 5	CAL 4	CAL 4	CAL 3	CAL 3
CAL 2	CAL 2	CAL 1	CAL 1	Cont r	Cont r	S1	S1	jne	jne

2. Putkiin lisättiin 50 µl 8 M GuHCl (guanidiini-suolahappoliuos), sekoitettiin ja inkuboitettiin 15 min huoneenlämmössä.
3. Putkiin lisättiin 50 µl SAT-liuosta (sisältää 0,3 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ja 0,75 % Triton X-100), sekoitettiin ja inkuboitettiin 15 min huoneenlämmössä.
4. Putkiin lisättiin 750 µl Alcian Blue-liuosta, sekoitettiin ja inkuboitettiin vähintään 15 min huoneenlämmössä (vaihtoehtona: näytteet voidaan inkuboida yön yli + 4 °C).
5. Näytteet sentrifugoitiin 15 min, 12000 xg.
6. Supernatantti poistettiin varovaisesti imun avulla, jolloin putkien pohjalle jäi vaa-  
lea sininen pelletti.
7. Pelletin päälle lisättiin 500 µl DMSO-liuosta (sisältää 40 % dimetyylisulfoksidia  
ja 0,05 M MgCl<sub>2</sub>). Sekoitettiin huolellisesti, jotta pelletti saatiin täysin suspentoi-  
tumaan. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 min ravistelijassa.
8. Näytteet sentrifugoitiin 15 min, 12 000 x g
9. Supernatantti poistettiin varovaisesti imun avulla.
10. Pelletin päälle lisättiin 500 µl Gu-Prop liuosta (sisältää 4 M GuHCl,  
33 % 1-propanolia ja 0,25 % Triton X-100) ja sekoitettiin 15 min ravistelijassa.  
Lopuksi tarkistettiin että pelletti on täysin liuennut.
11. Jokaisesta näytteestä siirrettiin 2 x 240 µl tasapohjaiselle 96-kuoppalevyllä ja  
mitattiin absorbanssit 30 minuutin sisällä 605 nm aallonpituudella  
Victor2-mittalaitteella.

sGAG määrittämistä varten MultiCalc 2000-ohjelmaan ohjelmoitiin sGAG MC37 ohjelma, joka on laskenut standardinäytteiden avulla näytteiden GAG pitoisuudet.

## DNA-määrittäminen

Fluorimetria on erittäin herkkä ja yksinkertainen menetelmä näytteen DNA:n määrän kvantitointiin. Fluoresoivalla väriaineella, bisbentsimidi H 33258:lla (Hoechst 33258), voidaan spesifisesti kvantitoida DNA:n määriä nanogrammas-  
tasolla, koska bisbentsimidi sitoutuu ensisijaisesti AT-sekvenssiin kaksijuosteis-  
sessa DNA:ssa (dsDNA). Mittaus suoritetaan 360 nm eksitaatioaallonpituudella  
ja 460 nm emissioaallonpituudella. Bisbentsimidi H 33258 toimii sekä eristetyis-

sä DNA-näytteissä että raakanäytteen uutteisissa, joissa on mukana RNA:ta ja proteiineja. On raportoitu, että raakanäytteen uutteidien DNA-määrän kvantitointi kuitenkin vaatii näytteessä korkean suolapitoisuuden.

DNA-määrityksen työvaiheet:

1. DNA-standardiliuos (1 mg/ml) inkuboitii 15 - 30 min + 50 °C:ssa, jaettiin eriin ja pakastettiin.
2. Tehtiin seuraavat DNA standardit: CAL 0 (0), CAL 1 (0,156 µg/ml), CAL 2 (0,313 µg/ml), CAL 3 (0,625 µg/ml), CAL 4 (1,25 µg/ml), CAL 5 (2,5 µg/ml), CAL 6 (5,0 µg/ml) ja CAL 7 (10,0 µg/ml).
3. Mustalle 96-kuoppalevyille pipetoitiin 50 µl jokaista standardia ja 50 µl näytettä (6,5 µl solulysaattia + 43,5 µl nukleasivapaata vettä).
4. Kuoppiin lisättiin 200 µl 2 µg/ml bisbentsimidi H 33258 liuosta.
5. Mitattiin fluoresenssi 355 nm eksitaatio- ja 460 nm emissioaallonpituudella.

DNA määrittämistä varten MultiCalc 2000-ohjelmaan ohjelmoitiin DNA MC40 ohjelma, joka on laskenut standardinäytteiden avulla näytteiden DNA-pitoisuudet.

## 5.4 Rustosoluviljelmän kasvatusmediumin analysointi

### 5.4.1 Prokollageenin II C-propeptidin määrittäminen

#### **CPII-määrittämisen periaate**

CPII-määrittäminen on kilpaileva immunomäärittäminen, joka mittaa kollageeni II muodostumisessa vapautuvaa karboksipropeptidia. Laimennetut CPII-standardit, positiivinen kontrolli ja näytteet sekoitetaan biotinyloidun CPII:n kanssa ja lisätään kanin anti-CPII vasta-ainetta (pAb). Kilpailu anti-CPII vasta-aineesta tapahtuu biotinyloidun CPII ja vapaan CPII välillä (standardeissa, kontrollissa tai näytteissä), tasapaino saavutetaan kun seos inkuboidaan + 4 °C:ssa yön yli ilman ravistelua. Inkubaation jälkeen seos siirretään streptavidiinillä päällystetylle kuoppalevyille, jolloin biotinyloituja CPII molekyylejä (kompleksissa pAb: n kanssa tai ei) sitoutuu kiinteään faasiin streptavidiniin. Sitoutumattomat aineet pestään pois ja

kiinteään faasiin sidottu biotinyloitu CPII/pAb kompleksi voidaan määrittää vuo-  
hen anti-kani-piparjuuriperoksidaasilla (GAR-HRP). Sitoutumattomat jäämät  
pestään pois ja tetrametyylibentsidiini (TMB)–substraattiliuos lisätään. Värimuu-  
tos (sininen) alkaa kehittyä kun TMB hapettuu sitoutuessaan GAR-HRP komp-  
leksiin. Värin voimakkuus on kääntäen verrannollinen vapaan CPII:n määrään.  
Hapetusreaktio pysäytetään lisäämällä Stop-liuosta (väri muuttuu sinisestä kel-  
taiseksi) ja absorbanssilukemat mitataan 450 - 650 nm aallonpituudella. Stan-  
dardinäytteiden avulla lasketaan näytteessä olevan vapaan CPII pitoisuus.

CPII-määrityksen työvaiheet:

1. Sekoituslevyn (päällystämätön polypropeeni (PP) 96-kuoppalevy) kuoppiin lisät-  
tiin 60 µl Matrix-liuosta, positiivisen kontrollin kuoppaan (lukuun ottamatta stan-  
dardikuopat), ja 20 µl Matrix-liuosta jokaiseen näytteen kuoppaan.
2. Positiiviselle kontrollille varattuun kuoppaan lisättiin 5 µl positiivista kontrollia.  
Huuhdeltiin pipetin kärkeä Matrix-liuksella pipetoimalla edestakaisin kolme ker-  
taa. Käytettiin aina uutta kärkeä seuraaviin lisäyksiin.
3. Näytekuoppiin lisättiin 45 µl kasvatusmediumin näytettä. Jokaisessa lisäykses-  
sä huuhdeltiin pipetin kärkeä Matrix-liuksella pipetoimalla edestakaisin kolme  
kertaa. Liuoksen väri muuttui näytteiden sekoittuessa Matrix-liuokseen, minkä  
avulla oli helppo varmistaa että kaikkiin kuoppiin oli pipetoitu näyte.
4. Standardit tehtiin eppendorf-putkeissa seuraavan taulukon mukaisesti. Jokai-  
nen laimennusliuos sekoitettiin hyvin vorteksoimalla

Standardiliuosten valmistaminen 1 µg/ml CPII stokkiliuoksesta		
Standardi- pg/ml	Matrix-liuos	Stokin tilavuus
Standardi 1 – 40000 pg/ml	440 µl	60 µl 1 µg/ml stokki
Standardi 2 – 20000 pg/ml	250 µl	250 µl standardi 1
Standardi 3 – 10000 pg/ml	250 µl	250 µl standardi 2
Standardi 4 – 5000 pg/ml	250 µl	250 µl standardi 3
Standardi 5 – 2500 pg/ml	250 µl	250 µl standardi 4
Standardi 6 – 1250 pg/ml	250 µl	250 µl standardi 5
Standardi 7 – 0 pg/ml	250 µl	-

Huomautus: edellä esitetyt standardien CPII pitoisuudet ovat lopulliset CPII pi-  
toisuudet kuopissa kilpailun aikana; laimennuskerroin 3 on jo otettu huomioon.

5. Siirrettiin 60 µl/ kuoppa jokaista standardia niille varattuihin kuoppiin sekoituslevylle.
6. Lisättiin 60 µl Biotiini-CPII käyttöliuosta jokaiseen kuoppaan.
7. Lisättiin 60 µl Anti-CPII Ab käyttöliuosta jokaiseen kuoppaan.
8. Inkuboitin sekoituslevyä ravistelijassa (700 rpm) 60 min huoneenlämmössä (+20 – 25 °C).
9. Pestiin streptavidinilevyä 6 kertaa pesupuskurilla.
10. Sekoituslevyn jokaisesta kuopasta siirrettiin 120 µl seosta streptavidinilevyn vastaavaan kuoppaan.
11. Inkuboitin streptavidinilevyä ravistelijassa (700 rpm) 2 tuntia (± 2 min) huoneenlämmössä.
12. Levyt pestiin 6 kertaa pesupuskurilla.
13. Pesun jälkeen lisättiin 100 µl/ kuoppa laimennettua GAR-HRP liuosta.
14. Inkuboitin levyä ravistelijassa (700 rpm) 30 min (± 2 min) huoneenlämmössä.
15. Levyt pestiin 6 kertaa pesupuskurilla.
16. Lisättiin 100 µl/ kuoppa TMB-liuosta, minkä jälkeen levy peitettiin kalvolla ja suojattiin valolta folion avulla. Inkuboitin ravistelijassa (700 rpm) 30 min (± 2 min) huoneenlämmössä.
17. Hapetusreaktio lopetettiin lisäämällä kuoppiin 100 µl Stop liuosta.
18. Mitattiin absorbanssilukemat 450 nm aallonpituudella 10 minuutin sisällä.

CPII määrittämistä varten MultiCalc 2000-ohjelmaan ohjelmoitiin CPII MC39 ohjelma, joka on laskenut standardinäytteiden avulla näytteiden CPII-pitoisuudet.

## 6 MATERIAALIT

### 6.1 KS483 hiiren solulinja

Työssä käytettiin KS483 hiiren mesenkymaalaisia progenitorisoluja (Percuros, Hollanti). 2 ampullia P9 (solujen jako 9) 6.07.2009. KS483 solut säilytettiin nestetyypessä. kryoputkissa.

### 6.2 KS483 solujen viljely

Kasvatusmediumi: DMEM kasvatusliuokseen lisättiin 10 % naudan sikiön seerumi (FBS) ja 1:500 GA (lopullinen pitoisuus 10 µg/ml gentamysiiniä ja 0,25 µg/ml amfoterisiiniä B).

### 6.3 Kantasolujen erilaistaminen rustosoluiksi

Kaikki työssä käytetyt reagenssit olivat puhtausasteeltaan vähintään analyyttistä laatua.

Peruskasvatusmediumi:

DMEM kasvatusliuokseen lisättiin 4 mM L-glutamiinia, 40 µg/ml L-proliinia, ITS (1:100) ja GA (1:500).

Päivinä 0 - 14 solupelletit kasvatettiin peruskasvatusmediumissa, johon oli lisätty 50 µg/ml askorbiinihappoa, 10 ng/ml TGF-β3 ja  $10^{-7}$  M deksametasonia.

Päivinä 14 - 28 solupelletit kasvatettiin peruskasvatusmediumissa, johon oli lisätty 50 µg/ml askorbiinihappoa, 5 mM β-glyserofosfaattia ja eri määrät BMP-6 (100 ng/ml, 300 ng/ml ja 500 ng/ml).

DMEM: Sigma, D6546 (sisältää korkean glukoosipitoisuuden, natriumpyruvaattia ja natriumbikarbonaattia), säilytys + 4 °C.

FBS (fetal bovine serum): Lonza, Cat# DE14-820F, Charcoal filtered, inaktivoitu, säilytys – 20 °C.

L-glutamiini (50x): Sigma, G7513, pitoisuus 200 mM, säilytys – 20 °C.

L-proliini (100x): Sigma, P5607, pitoisuus 4 mg/ml, säilytys – 20 °C.

ITS (insuliini, transferrini, seleeni) (100x): ITS+™ Premix, BD Biosciences, Cat# 354352, säilytys + 4 °C.

GA (gentamysiini/amfoterisiini B) (500x): Gibco (Cascade Biologics), R-015-10, säilytys – 20 °C.

50 mg/ml askorbiinihappo: 250 mg askorbiinihappoa liuotettiin 5 ml:aan steriiliä vettä, steriilisuodatettiin 0,2 µm ruiskusuodattimen läpi ja säilytettiin valolta suojattuna + 4 °C.

Askorbiinihappo: Sigma, A896, MW 289,5 g/mol.

TGF-β3 (1000x): Human recombinant, PeproTech, Cat# 100-36E, pitoisuus 10 µg/ml, säilytys – 70 °C. Liuotus 10 mM sitruunahappoliuokseen, jossa oli 0,1 % BSA.

10<sup>-3</sup> M deksametasoniliuos: 1,1 mg deksametasonia liuotettiin 2,803 ml:aan 96 % etanolia. Tämän liuoksen 1:10 laimennoksesta tehtiin 10<sup>-4</sup> M deksametasonin stokkiliuos, joka säilytettiin – 20 °C:ssa.

Deksametasoni: Sigma, D1756.

100 µg/ml BMP-6 stokkiliuos: 100 µg BMP-6 liuotettiin 1 ml:aan 0,1 % BSA/PBS liuosta, säilytettiin – 70 °C:ssa.

BMP-6: Human recombinant, PeproTech, Cat# 120-06.

1 M β-glyserofosfaatti: 1,53 g β-glyserofosfaattia liuotettiin 5 ml:aan steriiliä vettä, steriilisuodatettiin 0,2 µm ruiskusuodattimen läpi ja säilytettiin valolta suojattuna + 4 °C.

β-glyserofosfaatti: Fluka, Cat# 50020, MW 306,12 g/mol.

PBS: steriili fosfaattipuskuroitu suolaliuos, 0,0067 M (PO<sub>4</sub>) ilman Ca ja Mg, Lonza, Cat# BE17-516F.

Trypsin-EDTA (10x): Sigma, Cat# T4174, - 20 °C.

## 6.4 Rustosolupellettien prosessointi ja analysointi

### 6.4.1 Prosessointi

4 % PFA liuos: tehtiin vetokaapissa, punnittiin ensin 20 g paraformaldehydijauhetta (Merck-Schuchardt, 8.18715.1000) ja lisättiin 360 ml tislattua vettä, sekoitettiin magneettisekoittajalla. Lisättiin vähitellen tipoittain 1 M NaOH:a, kunnes liuos kirkastui. Lisättiin 50 ml 10 x PBS ja säädettiin liuoksen pH 7,4:ksi (NaOH:lla tai HCl:lla). Täytettiin mittapullo tislatulla vedellä 500 ml:ksi. Suodatettiin, pakastettiin erissä ja säilytettiin – 20 °C:ssa.

Ksyleeni: Oy FF-Chemicals Ab FF086.

Abs. EtOH: Absolutoitu etanoli, ETAX Aa, Altia Oyj.

96 % EtOH: ETAX A, Altia Oyj.

Superfrost Plus<sup>®</sup> lasit: Thermo Scientific Menzel-Gläser microscope slides, pre cleaned, ready to use, Art.No.J1800AMNZ.

### 6.4.2 Histologiset värjäykset

#### **Toluidiinisinen värjäys**

0,04 % Toluidiinisinen liuos: 0,1 g Toluidine Blue O liuotettiin 250 ml:aan 0,2 M asetaattipuskuria. Sekoitettiin hyvin ja suodatettiin ennen käyttöä, liuoksen pH 3,75 ja 4,25 välillä.

Toluidine Blue O ( $C_{15}H_{16}ClN_3S$ ): Sigma-Aldrich, Fluka Analytical PCode: 33709076.

Asetaattipuskuriliuos pH 4,0: 27,22 g natriumasettaattia ( $CH_3COONa \times 3H_2O$ ) liuotettiin 800 ml:aan ddH<sub>2</sub>O, säädettiin pH 4,0:ksi väkevällä etikkahapolla (99 – 100 %, J.T.Baker, 6052) ja täytettiin mittapullo tislattulla vedellä 1000 ml:ksi.

Päällystysaine: mounting medium for light microscopy, Mountex™ Histolab Products AB, Art.Nr 00851.

### **Safraniini O värjäys**

Weigertin rauta hematoksyliiniliuos: Sekoitettiin 125 ml stokkiliuosta A ja 125 ml stokkiliuosta B.

Stokkiliuos A: 1,25 g hematoksyliinia (Sigma-Aldrich, PCode: 1001197446) liuotettiin 125 ml:aan 96 % EtOH.

Stokkiliuos B: 5 ml 29 % rautakloridiliuosta, 1,25 ml väkevä suolahappoa (37 - 38 %, J.T.Baker, 6081) ja 118,75 ml ddH<sub>2</sub>O.

29 % rautakloridiliuos: 7,25 g FeCl<sub>3</sub> (Sigma, F7134) liuotettiin 27 ml:aan ddH<sub>2</sub>O.

0,02 % Fast Green (FCF) liuos: 0,05 g Fast Green, FCF, C.I.42053 (Sigma-Aldrich, F7258) liuotettiin 250 ml:aan ddH<sub>2</sub>O.

1 % etikkahappoliuos: 10 ml väkevää etikkahappoa 990 ml:aan ddH<sub>2</sub>O.

0,1 % Safraniini O -liuos: 0,25 g Safraniini O, C.I.50240 (Sigma-Aldrich, S2255) liuotettiin 250 ml:aan ddH<sub>2</sub>O.

### **Alcian sininen-värjäys**

Alcian sininen liuos pH 1,0: 2,5 g Alcian Blue 8GX, C.I.74240 (Sigma-Aldrich, PCode: 1001209554) liuotettiin 250 ml:aan 0,1 M suolahappoliuosta.

0,1 M suolahappoliuos: 250 ml:aan ddH<sub>2</sub>O lisättiin 2,05 ml väkevää suolahappoa.

Neutraali punainen liuos: 2,5 g Neutral Red, C.I. 50040 (Sigma-Aldrich, PCode: 101131683) liuotettiin 250 ml:aan ddH<sub>2</sub>O ja lisättiin 0,25 ml väkevää etikkahappoa. Sekoitettiin hyvin ja suodatettiin ennen käyttöä.

#### 6.4.3 Tyypin II kollageenin immunovärijäys

Tyypin II kollageenin vasta-aine: Mouse anti-collagen type II monoclonal antibody, Chemicon International Inc., Cat# MAB8887, pitoisuus 200 µg/ml, säilytys + 4 °C.

Dulbecco's PBS (pH 7,4): 10,00 g NaCl, 0,25 g KCl, 1,79 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ja 0,25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Aineet liuotettiin 1000 ml:aan tislattua vettä ja liuoksen pH säädettiin 7,4:ksi suolahappoliuoksella. Valmis liuos säilytettiin huoneenlämmössä.

3 % BSA/PBS: 3 g BSA (bovine serum albumin, Sigma, A-7906) liuotettiin 100 ml:aan PBS liuosta. Jaettiin 4 ml:n eriin, jotka säilytettiin -20 °C:ssa.

Vetyperoksidi: 30 % (w/w) hydrogen peroxide solution in H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, H1009-500 ML.

Pepsiiniliuos: Pepsin Reagent, Ready to Use Antigen Retriever, Sigma-Aldrich, PCode: 1001623568, säilytys + 4 °C.

Vuohen seerumi: Goat normal serum, Vector Laboratories, Cat# S-1000, säilytys + 4 °C.

Sekundaari vasta-aine ja DAB reagenssi: DAKO REF: K4065, EnVision<sup>TM+</sup> Dual Link System-HRP (DAB+), säilytys + 4 °C.

Mayerin hematoksyliiniliuos: Mayer's Hematoxylin Solution, Ready to use, Sigma-Aldrich, REF: MHS16-500ML. Suodatettiin ennen käyttöä.

#### 6.4.4 sGAG määrittäminen

Wieslab<sup>®</sup> sGAG quantitative kit, Euro-Diagnostica, REF: GAG 201. Alcian blue-binding assay for the detection of sulphated glycosaminoglycans, säilytys + 4 °C.

20 mg/ml proteinaasi K stokkiliuos: 3,4 mg proteinaasi K:ta liuotettiin 170 µl:aan tislattua vettä.

Proteinaasi K: Proteinase K, recombinant, PCR Grade, Roche, Cat# 03115879001.

0,1mM EDTA liuos: 3,8 mg EDTA liuotettiin 100 ml:aan PBS (Lonza). Liuoksen pH oli 7,3.

40 µg/ml proteinaasi K-liuos: 500 µl:aan 0,1 mM EDTA liuosta lisättiin 1 µl 20 mg/ml proteinaasi K stokkiliuosta.

Alcian Blue työliuos: 50 ml SAT liuosta + 90 ml ddH<sub>2</sub>O + 10 ml Alcian Blue stokkiliuosta.

#### **DNA määrittäminen**

DNA Quantitation Kit, Fluorescence Assay, Sigma-Aldrich, Cat: DNAQF, säilytys + 4 °C.

1 mg/ml DNA Standardiliuos sisältää 1 mg/ml vasikan kateenkorvan DNA: ta, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA.

10x fluorescent assay buffer, 100 mM Tris HCl (pH 7,4), 10 mM EDTA and 2 M NaCl.

2 µg/ml bisbentsimidi H 33258 liuos tehtiin seuraavasti: 1,8 µl 10 mg/ml bisbentsimidi H 33258 stokkiliuosta + 8100 µl steriiliä vettä + 900 µl 10x puskuria

Steriili, nukleasivapaa vesi, B.Braun, Art.nr.3529436

Mittauskuoppalevy, 96 well assay black plate, clear bottom with lid, tissue culture treated, polystyrene, sterile, Corning Incorporated, Costar® 3603.

Steriilit, nukleasivapaat 1,5 ml:n eppendorf putket ja nukleasivapaat pipetin kärjet.

## 6.5 Prokollageenin II C-propeptidin määrittäminen

IB-CPII-SCA™ Cartilage Synthesis Competitive Assay, IBEX Pharmaceuticals Inc., ITEM #60-1019, säilytys +4 °C.

Biotiini-CPII käyttöliuos tehtiin laimentamalla Biotiini-CPII stokkiliuosta suhteessa 1:100 käyttäen Assay liuotinta. Yhdelle täydelle kuoppalevyille: lisättiin 70 µl Biotiini-CPII stokkiliuosta 7 ml:aan Assay liuotinta.

Anti-CPII Ab käyttöliuos tehtiin laimentamalla Anti-CPII Ab stokkiliuosta suhteessa 1:100 käyttäen Antibody puskuria. Yhdelle täydelle kuoppalevyille: lisättiin 70 µl Anti-CPII Ab stokkiliuosta 7 ml:aan Antibody liuotinta.

Pesupuskuriliuos tehtiin laimentamalla 50X pesupuskuristokkia suhteessa 1:50 tislattuun veteen. 40 ml 50X pesupuskuristokkia tislattun veden lopulliseen tilavuuteen 2000 ml.

## 7 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia voidaanko hiiren KS483 soluja käyttää rustosolujen erilaistumisen tutkimiseen ja selvittää optimaaliset viljelyolosuhteet. BMP-6:n ja soluviljelyn keston vaikutuksia selvitettiin tutkimalla ruston soluväliaineen kuten proteoglykaanien, glykosaminoglykaanien ja tyypin II kollageenin määrää rustosolupelletin histologisista leikkeistä. BMP-6 vaikutuksia tutkittiin kolmella eri pitoisuudella: 100 ng/ml, 300 ng/ml ja 500 ng/ml. Kontrollipelletit kasvatettiin ilman BMP-6:a. Rustosoluviljelmät lopetettiin päivinä 17, 24 ja 28. Histologisten analyysien lisäksi glykosaminoglykaanien ja tyypin II kollageenin muodostumista mitattiin biokemiallisten määritysten avulla. Sulfoituneiden glykosaminoglykaanien määrä rustosolupellettien muodostuneessa soluväliaineessa määritettiin sGAG määrittämisen avulla ja tyypin II prokollageenin määrä CPII-määrittämisen avulla. Kaikissa ruston erilaistumiskokeissa oli rinnakkaisia näytteitä kolme kappaletta ja koe suoritettiin kerran.

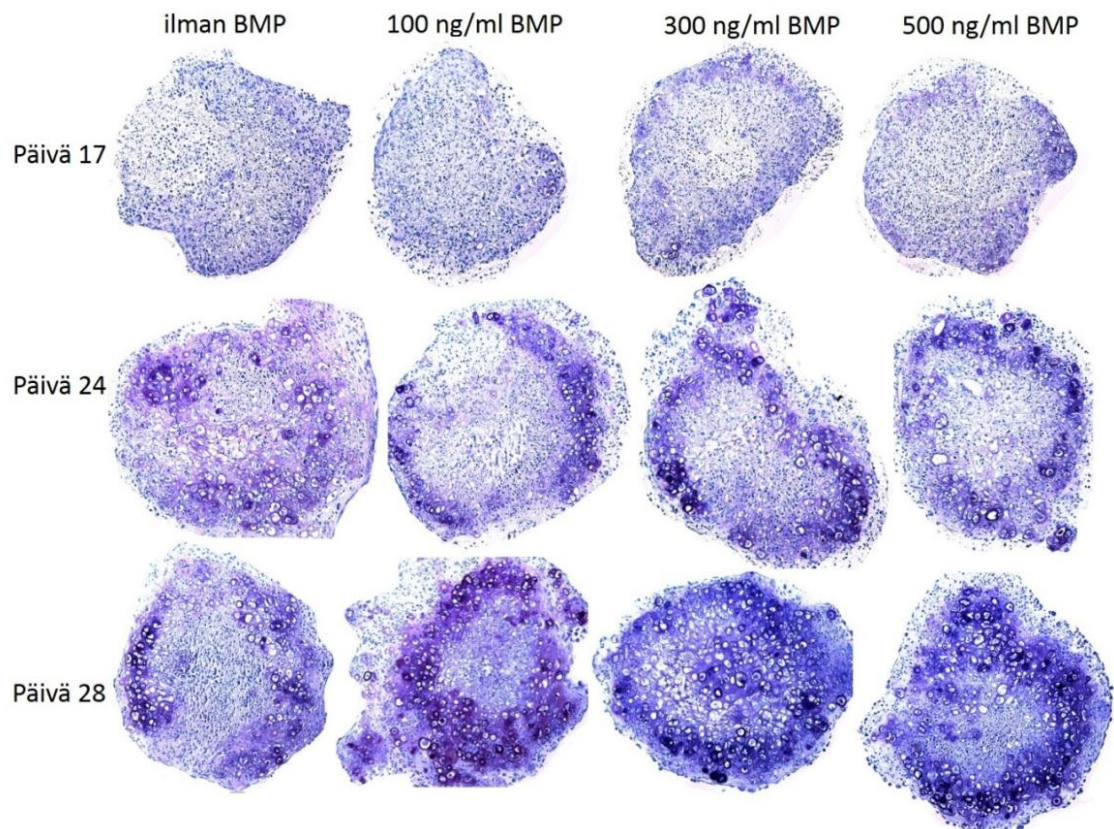
Saatuja tuloksia tarkasteltiin Microsoft Excel-ohjelmalla, jonka avulla laskettiin ryhmien keskiarvot, suhteelliset keskihajonnat ja piirrettiin kuvaajat. sGAG määrittämisen tulokset normalisoitiin rustosolupellettien DNA-määrällä. Ryhmien välisen erojen tilastollista merkitsevyyttä arvioitiin kaksisuuntaisella Studentin t-testillä merkitsevyytasoilla  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) ja  $p < 0.001$  (\*\*\*) Microsoft Excel-ohjelmalla.

### 7.1 Histologiset värjäykset

#### 7.1.1 Toluidiinisininen värjäys

Kuvassa 13 nähdään ruston erilaistumistapahtuman etenemistä rustosolupelletin värjäytyneen soluväliaineen määrästä ja solujen morfologiasta. Rustolle tyypillisen soluväliaineen muodostumista arvioitiin värjäämällä soluväliaineen proteoglykaaneja toluidiinisinisellä. Kuvista (kuva 13) nähdään miten erilaistumis-

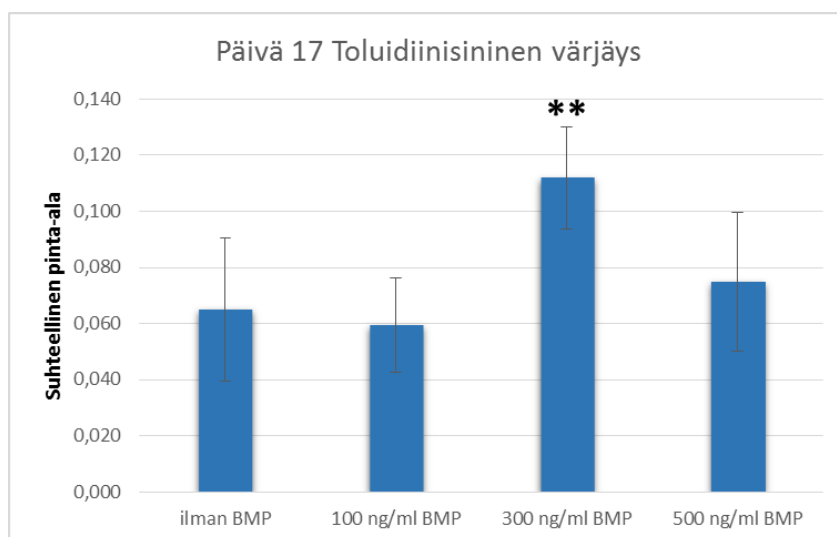
tapahtuma etenee rustopelletissä ulkoreunasta sisäänpäin. Solujen morfologiassa tapahtuva muutos on se, että alkaa muodostua rustosoluille tyypillisiä laakuunoita. Kuvioista 5, 6 ja 7 huomataan, että 300 ng/ml ja 500 ng/ml BMP-6:n lisäävän merkittävästi ruston soluväliaineen muodostumista. Erot ryhmien välillä ovat merkittäviä päivänä 17 kontrolliryhmän (ilman BMP) ja 300 ng/ml BMP-6 välillä ja päivänä 28 kontrolliryhmän, 300 ng/ml BMP-6 ja 500 ng/ml BMP-6 välillä. Kuviossa 8 nähdään rustopelletissä soluväliaineen määrän lisääntyvän suhteessa pinta-alaan ajan funktiona. Päivään 24 asti soluväliaineen määrä lisääntyy kaikissa ryhmissä ja tasaantuu päivänä 28 kontrolliryhmässä. BMP-6:n läsnäollessa matriisin määrä lisääntyy edelleen.



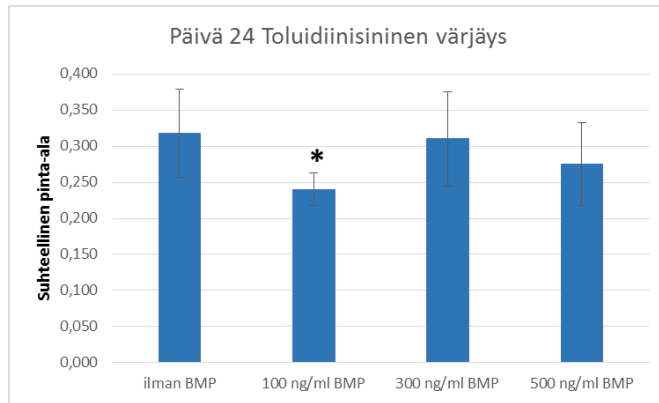
Kuva 13. Toluidiinisinin värjäys, suurennos x10.

Taulukko 2. Toluidiinisinen värjäyksen tulokset (suhteellinen pinta-ala prosentteina).

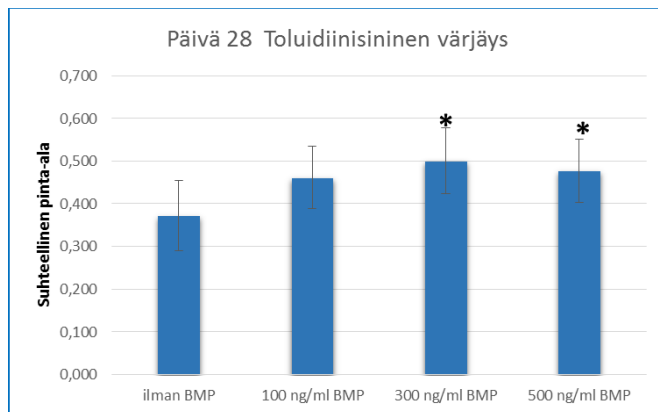
Päivä 17	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,062	0,048	0,136	0,109
	0,076	0,090	0,110	0,077
	0,052	0,054	0,105	0,057
	0,101	0,066	0,083	0,055
	0,034	0,045	0,124	
		0,054	0,114	
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,065</b>	<b>0,059</b>	<b>0,112</b>	<b>0,075</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,026</b>	<b>0,017</b>	<b>0,018</b>	<b>0,025</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,674</b>	<b>0,006</b>	<b>0,580</b>
Päivä 24	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,364	0,229	0,295	0,220
	0,385	0,232	0,323	0,246
	0,231	0,273	0,387	0,355
	0,271	0,216	0,337	0,217
	0,297	0,250	0,210	0,290
	0,360			0,327
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,318</b>	<b>0,240</b>	<b>0,310</b>	<b>0,276</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,061</b>	<b>0,022</b>	<b>0,065</b>	<b>0,057</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,025</b>	<b>0,849</b>	<b>0,244</b>
Päivä 28	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,430	0,421	0,448	0,450
	0,489	0,596	0,410	0,517
	0,329	0,458	0,478	0,583
	0,253	0,467	0,571	0,575
	0,382	0,443	0,613	0,467
	0,352	0,383	0,485	0,392
				0,408
				0,427
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,372</b>	<b>0,461</b>	<b>0,501</b>	<b>0,477</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,082</b>	<b>0,073</b>	<b>0,077</b>	<b>0,073</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,0737</b>	<b>0,0186</b>	<b>0,0264</b>



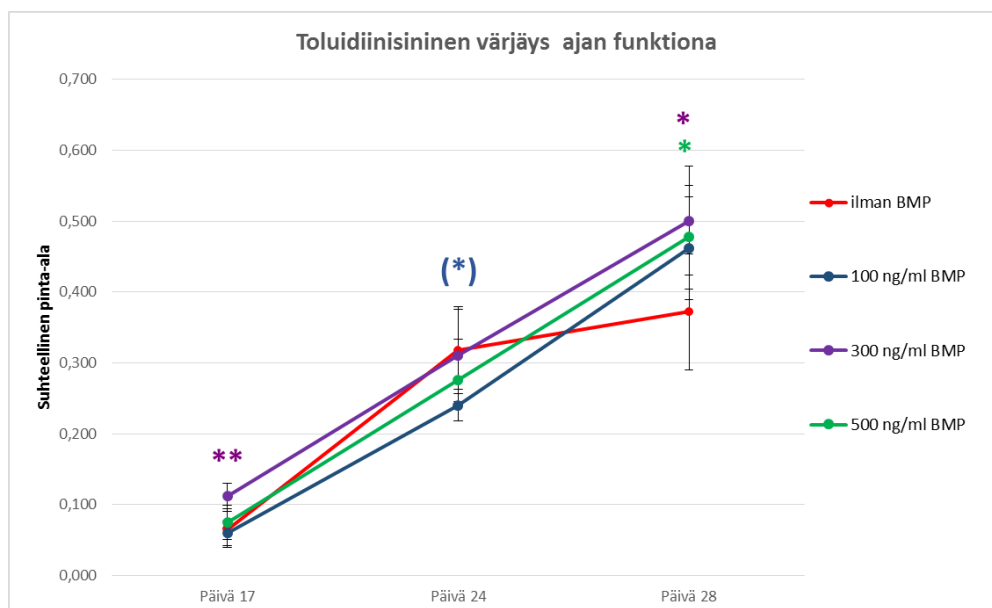
Kuvio 5. Toluidiinisinen värjäys päivänä 17.



Kuvio 6. Toluidiinisinen värjäys päivänä 24.

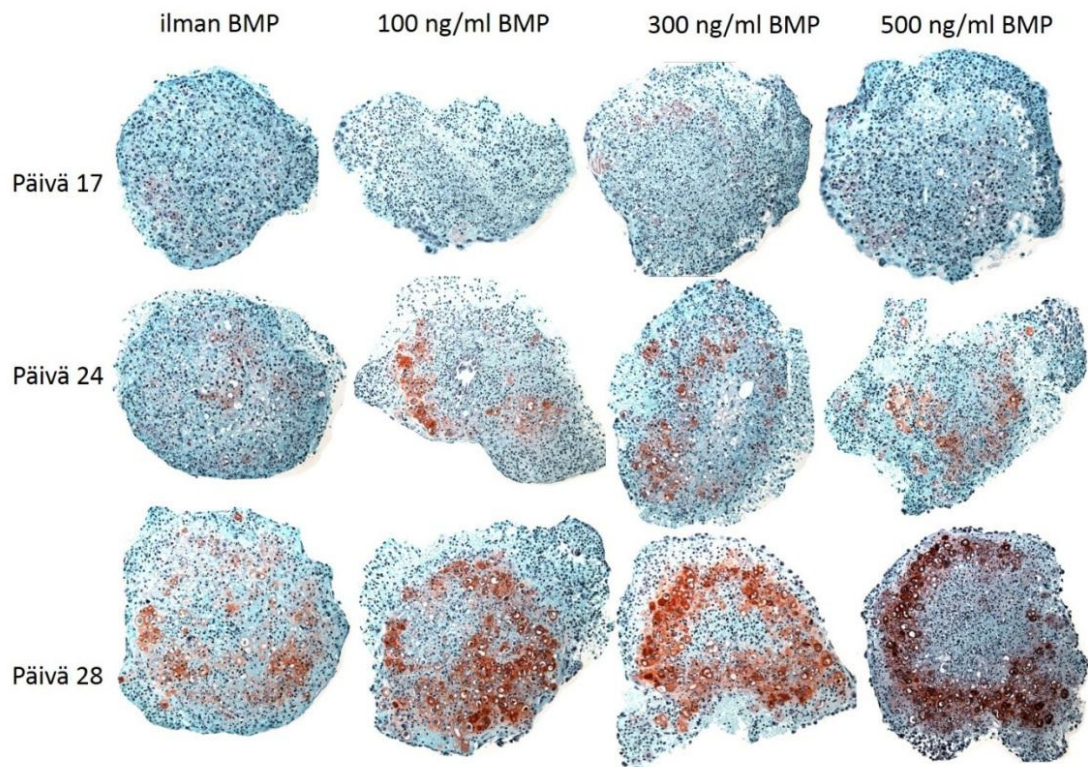


Kuvio 7. Toluidiinisinen värjäys päivänä 28.



Kuvio 8. Toluidiinisinen värjäys ajan funktiona.

### 7.1.2 Safraniini O värjäys



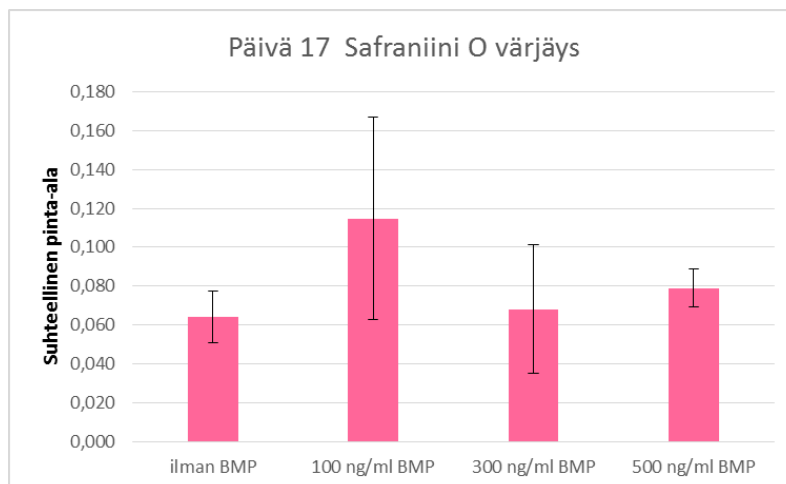
Kuva 14. Safraniinin O värjäys, suurennos x 10.

Myös safraniini O värjäyksen tarkoituksena oli tutkia mitkä olosuhteet ovat optimaalisia ruston erilaistumiselle ja ruston soluväliaineen tuotannolle. Kuvassa 14 on esitetty miten safraniini O-värjäys kuvaa rustopelletissä tapahtuvaa erilaistumista. Safraniini O:lla värjättyjen alueiden (oranssinpunaiset) perusteella voidaan sanoa, että ruston soluväliaineen muodostuminen alkaa rustosolupelletin ulkoreunasta ja etenee pelletin sisäosaan. Kuvista 11 huomataan, että merkittäviä eroja ryhmien välillä näkyy vain päivänä 28 kontrolliryhmän (ilman BMP), 100 ng/ml BMP-6, 300 ng/ml ja 500 ng/ml BMP-6 välillä. Kuvassa 14 esitettyjen kuvien perusteella huomataan, että safraniini O värjäyksellä tuli vähemmän matriisin värjäytymistä rustosolupelletin parafiinileikkeissä toluidiinisiiniseen verrattuna. Tähän voi vaikuttaa glykosaminoglykaanien mahdollinen osittainen hajoaminen jolloin safraniini O ei tunnista niitä tai leikkeiden tasot on osunut huonosti. Kuitenkin näistä tuloksista piirretyssä kuviossa 12 nähdään, että päivänä

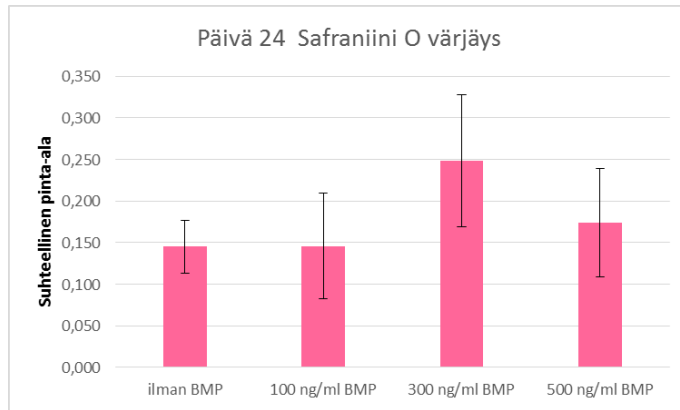
24 kaikissa ryhmissä soluväliaineen määrä on nousussa ja päivänä 28 kaikissa BMP ryhmissä tämä nousu jatkuu lukuunottamatta kontrolliryhmää, ilman BMP lisäystä.

Taulukko 3. Safraniinin O värjäyksen tulokset (suhteellinen pinta-ala prosentteina).

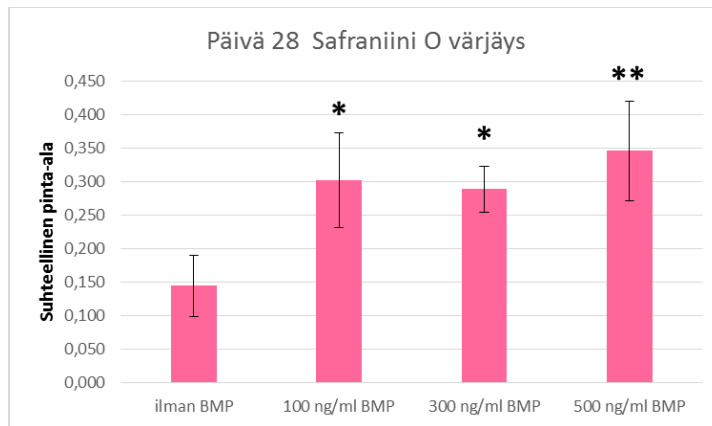
Päivä 17	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,079	0,082	0,106	0,090
	0,055	0,060	0,053	0,075
	0,058	0,168	0,045	0,072
		0,150		
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,064</b>	<b>0,115</b>	<b>0,068</b>	<b>0,079</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,013</b>	<b>0,052</b>	<b>0,033</b>	<b>0,010</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,1679</b>	<b>0,8490</b>	<b>0,1870</b>
Päivä 24	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,128	0,089	0,177	0,240
	0,125	0,214	0,234	0,173
	0,182	0,135	0,334	0,110
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,145</b>	<b>0,146</b>	<b>0,249</b>	<b>0,174</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,032</b>	<b>0,063</b>	<b>0,079</b>	<b>0,065</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,9849</b>	<b>0,1043</b>	<b>0,5226</b>
Päivä 28	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,096	0,377	0,288	0,418
	0,187	0,289	0,323	0,315
	0,149	0,238	0,255	0,225
				0,352
				0,460
				0,356
				0,306
				0,405
				0,271
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,144</b>	<b>0,302</b>	<b>0,289</b>	<b>0,345</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,046</b>	<b>0,071</b>	<b>0,034</b>	<b>0,075</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,0315</b>	<b>0,0118</b>	<b>0,0015</b>



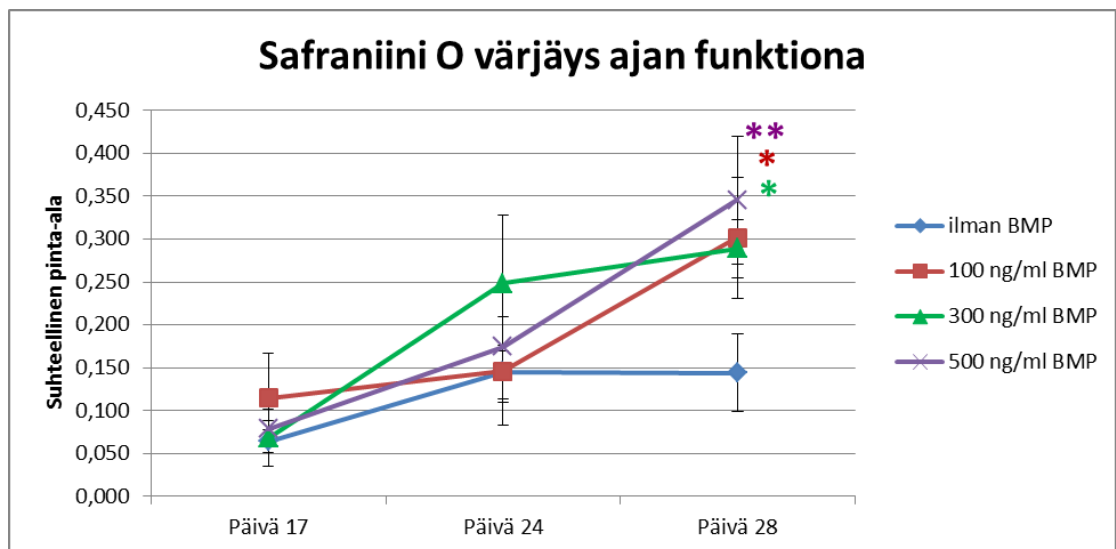
Kuvio 9. Safraniini O värjäys päivänä 17.



Kuvio 10. Safraniini O värjäys päivänä 24.

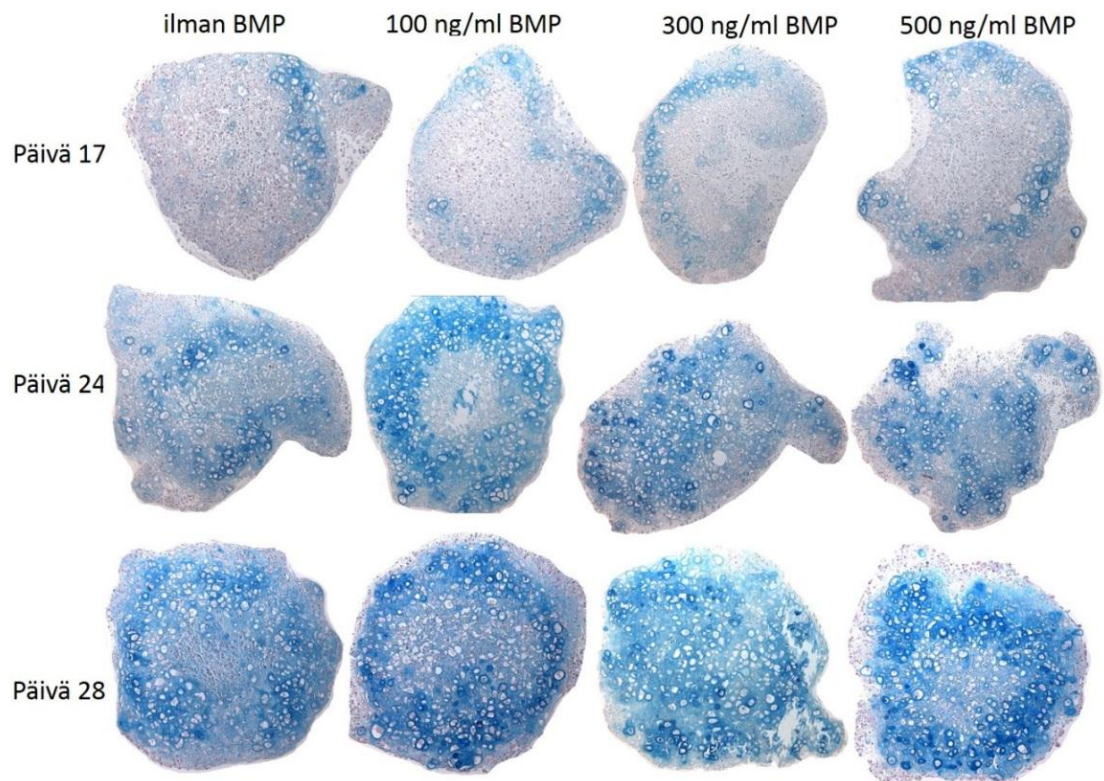


Kuvio 11. Safraniini O värjäys päivänä 28.



Kuvio 12. Safraniini O värjäys ajan funktiona.

### 7.1.3 Alcian sininen värjäys



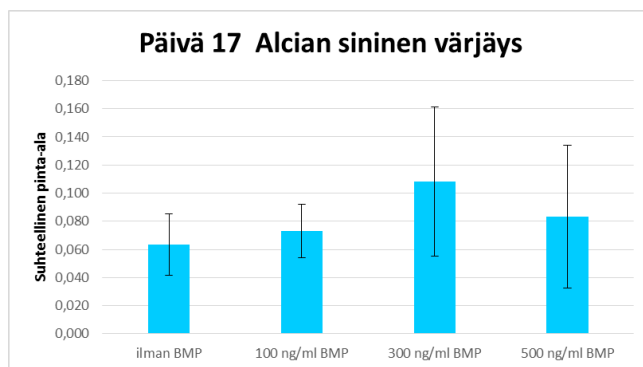
Kuva 15. Alcian sininen värjäys, suurennos x 10.

Rustosolupellettiljelmille haettiin optimaaliset olosuhteet eri BMP-6 pitoisuuksilla, katsottiin näiden pitoisuuksien kykyä aikaansaada kondrogeneesiä *in vitro*. BMP-6 vaikutusta KS483 solujen erilaistumiseen arvioitiin vertaamalla rustosolupelletin kokoa ja analysoimalla Alcian sinisellä värjätyin matriisin suhteellista pinta-alaa. Kuviossa 14 huomataan, että Alcian sinisessä värjäyksessä kondrosyytin kaltaisessa solujen erilaistumisessa oli merkittävää eroa päivänä 24 kontrolliryhmän (ilman BMP), 300 ng/ml ja 500 ng/ml BMP-6 välillä. Kuvassa 15 nähdään että päivänä 17 alkaa rustosolupelletin perifeeristen alueiden soluväliaineen värjäytymistä ja päivänä 24 ja 28 näillä alueilla on runsaampaa ja voimakampaa värjäytymistä verrattuna päivään 17 ja värjäntyminen etenee pelletin keskiosaa kohti. Kuvioista 14 ja 15 nähdään, että 300 ng/ml ja 500 ng/ml BMP-6 pitoisuudet lisäsivät merkittävästi matriisin värjäytymistä verrattu-

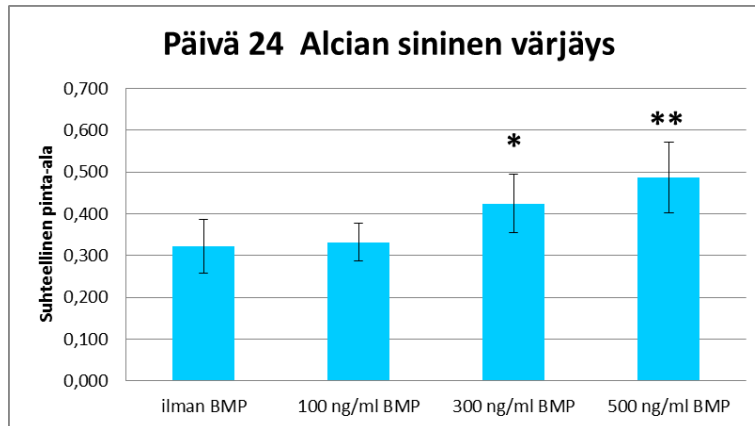
na kontrolliryhmään. Kuvion 16 kuvaajista, joissa on esitetty rustopelletissä värjätyn soluväliaineen suhteellista pinta-ala ajan funktiona, huomataan että päivään 24 kaikilla ryhmillä on jyrkkä nousu proteoglykaanimäärän muodostumisessa ja päivän 24 jälkeen kaikissa ryhmissä tämä nousu jatkuu lukuunottamatta 500 ng/ml BMP-6 ryhmää, jossa ruston matriisin muodostus on tasaantunut.

Taulukko 4. Alcian sinisen värjäyksen tulokset (suhteellinen pinta-ala prosentteina).

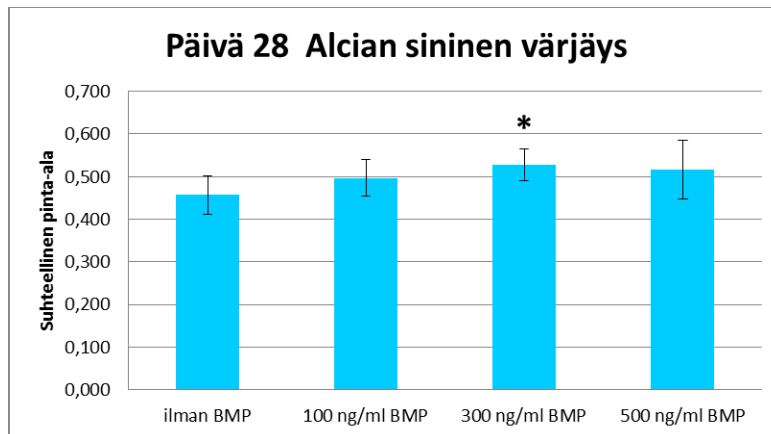
Päivä 17	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,067	0,058	0,174	0,077
	0,060	0,110	0,078	0,159
	0,090	0,066	0,095	0,075
	0,038	0,065	0,091	0,121
		0,078	0,170	0,051
		0,062	0,042	0,016
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,064</b>	<b>0,073</b>	<b>0,108</b>	<b>0,083</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,022</b>	<b>0,019</b>	<b>0,053</b>	<b>0,051</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,4812</b>	<b>0,1528</b>	<b>0,4928</b>
Päivä 24	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,371	0,272	0,389	0,538
	0,349	0,381	0,389	0,512
	0,194	0,332	0,353	0,586
	0,347	0,345	0,464	0,402
	0,350		0,528	0,396
	0,326			
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,323</b>	<b>0,332</b>	<b>0,425</b>	<b>0,487</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,065</b>	<b>0,046</b>	<b>0,070</b>	<b>0,085</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,8051</b>	<b>0,0342</b>	<b>0,0053</b>
Päivä 28	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,449	0,429	0,489	0,472
	0,397	0,552	0,501	0,577
	0,498	0,483	0,507	0,429
	0,484	0,522	0,527	0,469
		0,518	0,559	0,506
		0,479	0,586	0,514
				0,452
				0,660
				0,529
				0,560
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,457</b>	<b>0,497</b>	<b>0,528</b>	<b>0,517</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,045</b>	<b>0,043</b>	<b>0,037</b>	<b>0,069</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,1933</b>	<b>0,0259</b>	<b>0,1369</b>



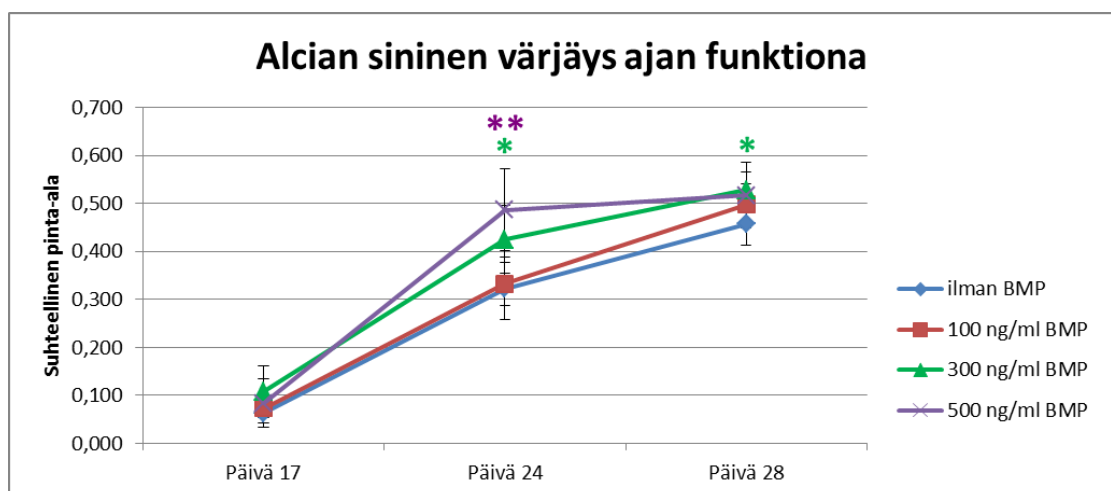
Kuvio 13. Alcian sinisen värjäys päivänä 17.



Kuvio 14. Alcian sininen värjäys päivänä 24.

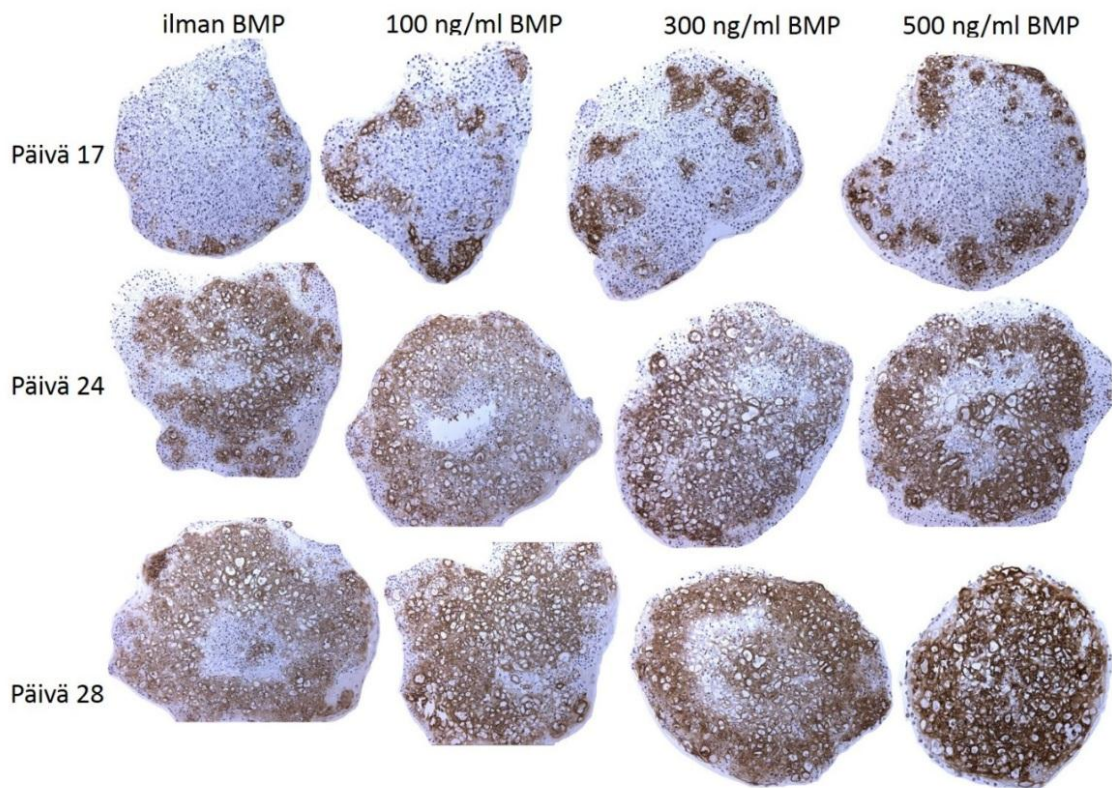


Kuvio 15. Alcian sininen värjäys päivänä 28.



Kuvio 16. Alcian sininen värjäys ajan funktiona.

### 7.1.4 Tyypin II kollageenin immunohistokemiallinen värjäys



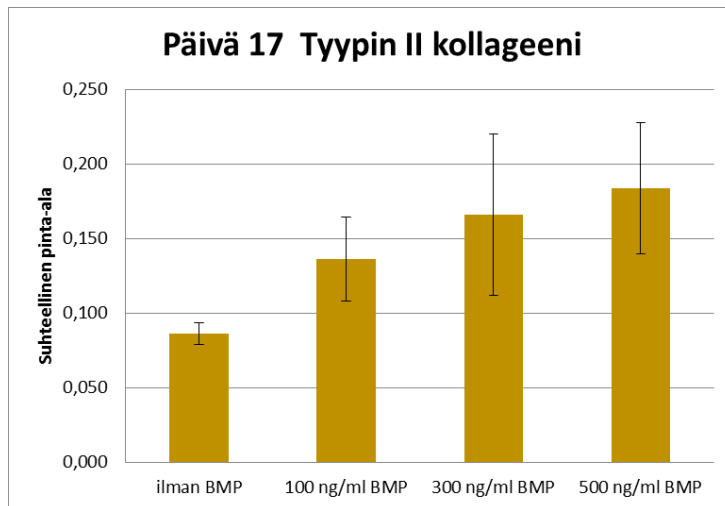
Kuva 16. Tyypin II kollageenin värjäys, suurennos x 10.

Tyypin II kollageeni on myös kondrogeneesin merkkiaine. Rustokudoksen tyypillisessä soluväliaineessa tapahtuva kollageenisäikeiden muodostumista arvioitiin värjäämällä rustosolupellettien parafiinileikkeet tyypin II kollageenin vastaaineella. Kuvasta 16 nähdään ryhmien välillä eroa ja kollageenisäikeiden muodostuksen etenevän pelletin ulkoreunasta keskiosaa kohti. Ulkoreunoilla kollageenin ekspressoitumisen nähdään voimistuvan viljelyn keston ja BMP-6 pitoisuuden vaikutuksesta. Tilastollisesti merkittäviä eroja ryhmien välillä havaittiin päivänä 24 kontrolliryhmän (ilman BMP) ja 100 ng/ml BMP-6 välillä ja päivänä 28 kontrolliryhmän (ilman BMP) ja 500 ng/ml BMP-6 välillä. Kuviossa 20 esitettyjen kuvaajien perusteella huomataan, että tyypin II kollageenin määrä on kasvanut kaikissa ryhmissä päivästä 17 päivään 24. Päivän 24 jälkeen ryhmissä, joissa oli 300 ng/ml ja 500 ng/ml BMP-6, kollageenin II määrän nousu on jatku-

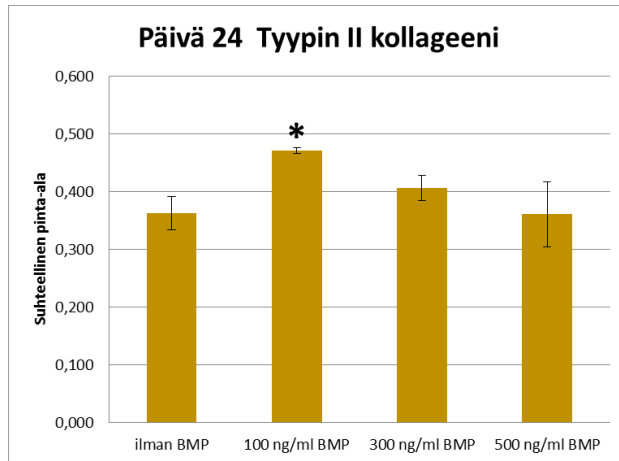
nut ja kontrolliryhmässä ja 100 ng/ml BMP-6 ryhmässä kollageenin II muodostuminen on tasaantunut.

Taulukko 5. Tyypin II kollageenin värjäyksen tulokset (suhteellinen pinta-ala prosentteina).

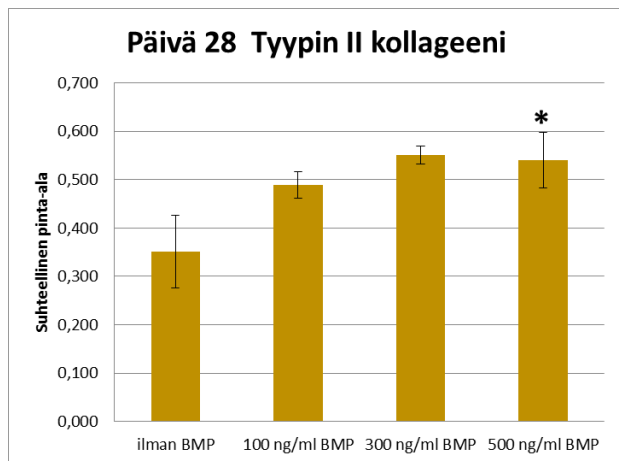
Päivä 17	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,091	0,156	0,204	0,215
	0,081	0,116	0,128	0,153
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,086</b>	<b>0,136</b>	<b>0,166</b>	<b>0,184</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,007</b>	<b>0,028</b>	<b>0,054</b>	<b>0,044</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,1356</b>	<b>0,1747</b>	<b>0,0901</b>
Päivä 24	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,383	0,467	0,422	0,309
	0,342	0,475	0,391	0,421
				0,353
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,362</b>	<b>0,471</b>	<b>0,406</b>	<b>0,361</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,029</b>	<b>0,005</b>	<b>0,022</b>	<b>0,056</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,0354</b>	<b>0,2317</b>	<b>0,9736</b>
Päivä 28	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,405	0,469	0,538	0,487
	0,299	0,508	0,564	0,522
				0,622
				0,530
<b>Keskiarvo</b>	<b>0,352</b>	<b>0,489</b>	<b>0,551</b>	<b>0,540</b>
<b>Keskihajonta</b>	<b>0,075</b>	<b>0,027</b>	<b>0,018</b>	<b>0,057</b>
<b>Merkitsevyys</b>		<b>0,1360</b>	<b>0,0678</b>	<b>0,0251</b>



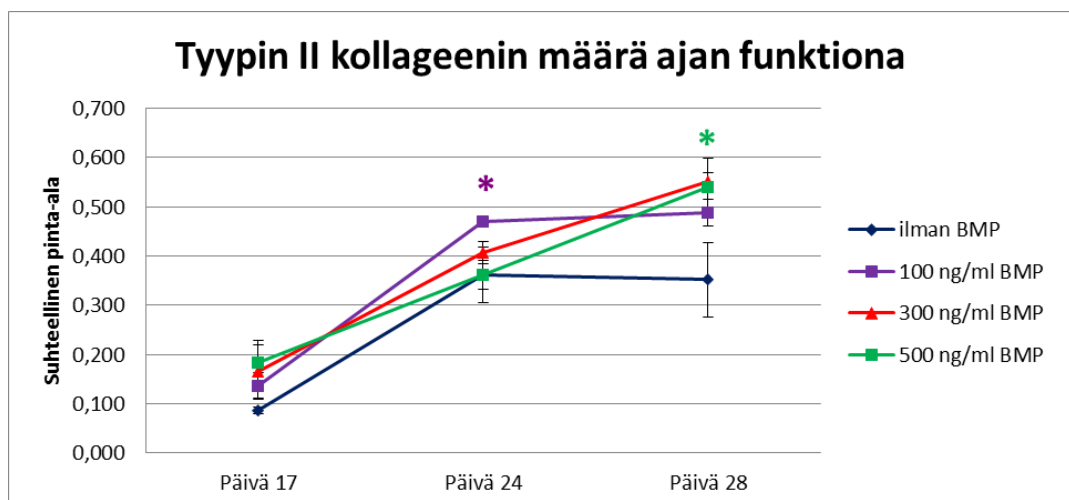
Kuvio 17. Kollageenin II määrä päivänä 17.



Kuvio 18. Kollageenin II määrä päivänä 24.



Kuvio 19. Kollageenin II määrä päivänä 28.



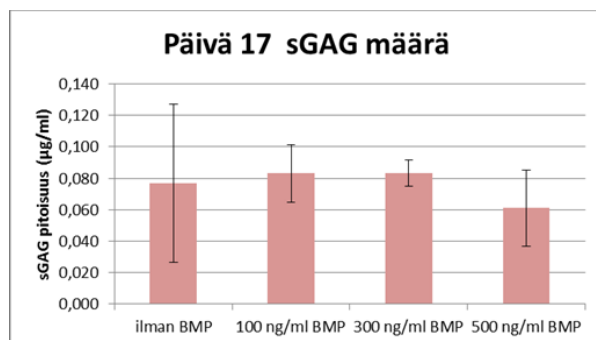
Kuvio 20. Kollageenin II määrä ajan funktiona.

## 7.2 sGAG määrittäminen

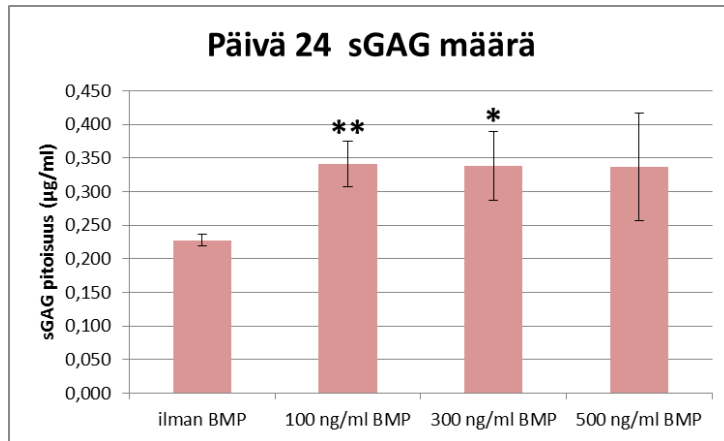
sGAG määrittämisen avulla saatiin kvantitatiivista tietoa solupelleissä muodostuneista sulfoituneiden glykosaminoglykaanien määrästä. Glykosaminoglykaania myös pidetään ruston erilaistumisen merkkiaineena. Tilastollisesti merkitseviä eroja saatiin päivänä 24 kontrolliryhmän (ilman BMP) ja 100 ng/ml ja 300 ng/ml BMP-6 välillä ja päivänä 28 kontrolliryhmän ja 100 ng/ml BMP-6 välillä. Kuviossa 24 esitettyjen kuvaajien perusteella huomataan, että kaikissa ryhmissä päivästä 17 päivään 24 sulfoituneiden glykosaminoglykaanien määrä on kasvanut, BMP-6 ryhmissä tämä nousu oli jyrkempi kontrolliryhmään verrattuna. Päivän 24 jälkeen glykosaminoglykaanien tuotanto on tasaantunut 500 ng/ml BMP-6 ryhmässä, mutta on lisääntynyt muissa ryhmissä.

Taulukko 6. sGAG määrittämisen tulokset, sGAG pitoisuus (µg/ml).

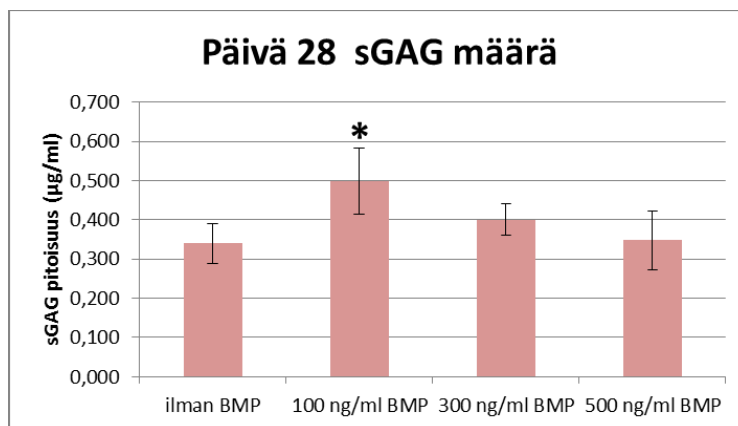
Päivä 17	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,066	0,082	0,092	0,077
	0,132	0,102	0,084	0,033
	0,033	0,065	0,075	0,072
Keskiarvo	0,077	0,083	0,083	0,061
Keskihajonta	0,050	0,018	0,008	0,024
Merkitsevyys		0,8511	0,8349	0,6462
Päivä 24	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,234	0,321	0,375	0,258
	0,217	0,380	0,302	0,333
	0,231	0,324		0,418
Keskiarvo	0,228	0,342	0,338	0,337
Keskihajonta	0,009	0,034	0,052	0,080
Merkitsevyys		0,0048	0,0292	0,0793
Päivä 28	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
	0,302	0,595	0,415	0,287
	0,321	0,443	0,430	0,325
	0,397	0,460	0,355	0,432
Keskiarvo	0,340	0,499	0,400	0,348
Keskihajonta	0,051	0,084	0,040	0,075
Merkitsevyys		0,0478	0,1783	0,8866



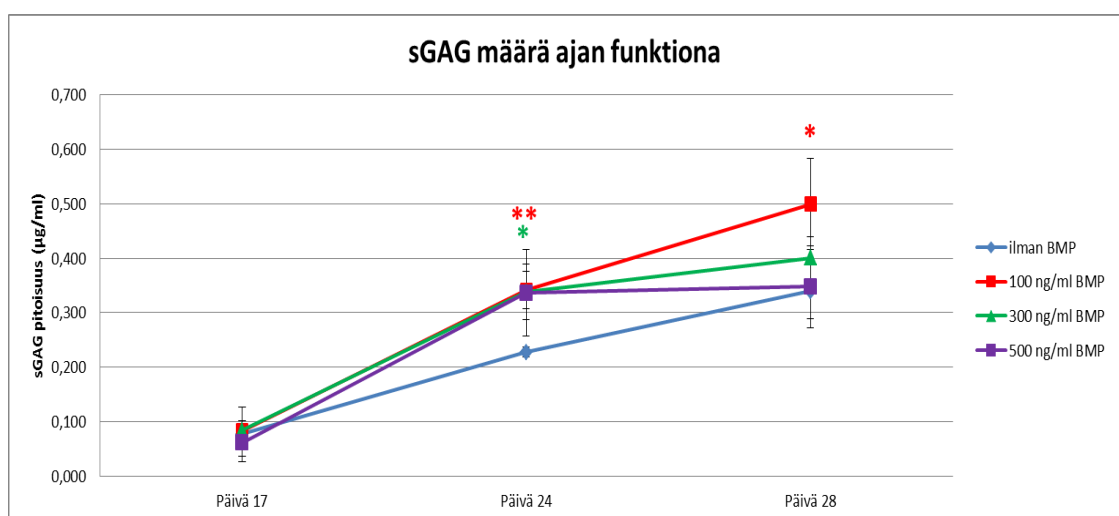
Kuvio 21. sGAG määrä päivänä 17.



Kuvio 22. sGAG määrä päivänä 24.



Kuvio 23. sGAG määrä päivänä 28.



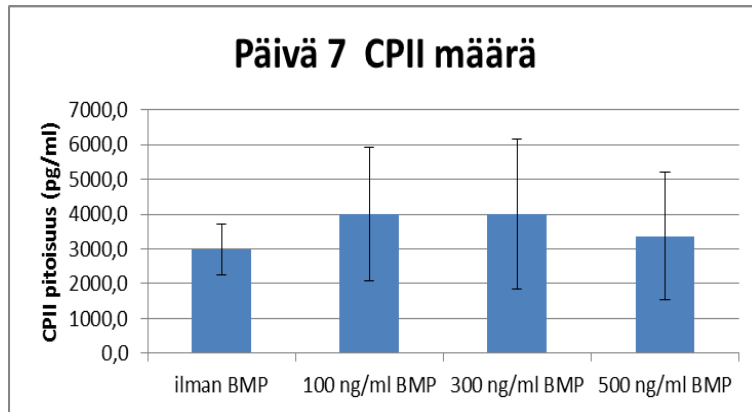
Kuvio 24. sGAG määrä ajan funktiona.

## 7.3 CPII määrittäminen

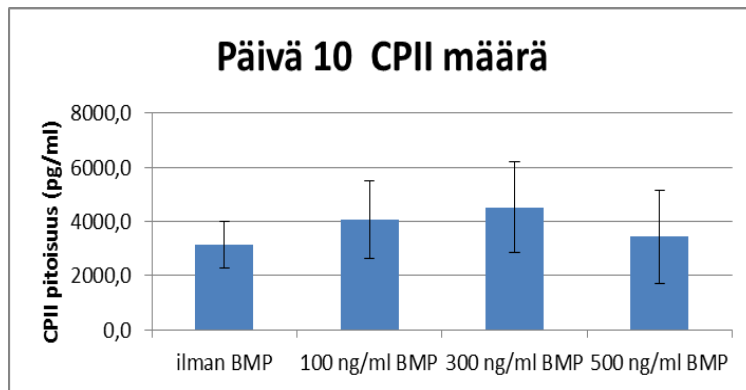
Taulukko 7. CPII määrittämisen tulokset, CPII pitoisuus (pg/ml).

Päivä 7					Päivä 10				
Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP	Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
1	3813,0	3813,0	2326,6	1920,4	1	4412,2	2987,3	3421,6	2101,1
2	3961,2	5952,3	3052,1	1849,9	2	3549,6	6907,6	3433,0	3502,6
3	2165,9	3849,9	3041,3	2531,8	3	2423,3	3886,9	3467,8	2203,4
4	2472,5	6468,4	8239,8	3150,8	4	2165,9	3644,2	7637,8	3262,1
5	2602,0	2138,1	3961,2	3998,8	5	3596,7	3296,1	3936,4	2755,1
6	2923,1	1763,1	3341,4	6711,8	6	2612,1	3680,0	5225,7	6764,8
Keskiarvo	2989,6	3997,5	3993,7	3360,6	Keskiarvo	3126,6	4067,0	4520,4	3431,5
Keskihajonta	737,9	1920,0	2146,1	1828,9	Keskihajonta	864,3	1427,6	1676,6	1725,1
Merkitsevyys		0,2577	0,3039	0,6549	Merkitsevyys		0,1976	0,1004	0,7068
Päivä 14					Päivä 17				
Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP	Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
1	4655,4	3375,7	2765,5	3387,1	1	4438,9	3549,6	7071,1	5588,7
2	4332,9	7293,7	2581,8	3862,2	2	5108,3	9823,8	6943,7	4332,9
3	2786,3	4738,4	4573,5	3813,0	3	3106,7	5079,2	5390,1	5181,5
4	2955,2	4061,9	8533,6	3444,6	4	3800,9	6281,7	7016,4	6231,5
5	3084,9	2541,8	4189,6	4293,6	5	3467,8	6332,2	4921,1	5021,3
6	2672,9	2642,5	4254,5	8157,4	6	3608,5	6659,0	6853,7	7144,8
Keskiarvo	3414,6	4109,0	4483,1	4493,0	Keskiarvo	3921,9	6287,6	6366,0	5583,5
Keskihajonta	854,1	1771,2	2150,3	1824,8	Keskihajonta	729,2	2078,5	952,1	989,9
Merkitsevyys		0,4073	0,2844	0,2192	Merkitsevyys		0,0251	0,0005	0,0079
Päivä 21					Päivä 24				
Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP	Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
1	4822,1	6589,3	5108,3	3948,8	1	5079,2	6800,3	5496,4	4465,6
2	6281,7	7071,1	5808,1	4587,1	2	6485,6	7618,3	4241,5	4228,5
3	5329,9	3364,1	5375,1	5315,0	3	4359,2	5329,9	5666,4	3886,9
4	6082,6	5952,3	7369,1	4112,8	4	4780,2	6889,7	7312,5	3998,8
5	6434,1	3899,1	5405,3	5713,4	5	5255,3	5344,9	4293,6	8219,2
6	6853,7	5285,1	5760,6	7016,4	6	5108,3	5166,8	5527,0	5450,8
Keskiarvo	5967,4	5360,2	5804,4	5115,6	Keskiarvo	5178,0	6191,6	5422,9	5041,6
Keskihajonta	752,8	1477,4	809,8	1153,8	Keskihajonta	715,4	1039,5	1124,0	1654,0
Merkitsevyys		0,3908	0,7256	0,1609	Merkitsevyys		0,0775	0,6621	0,8567
Päivä 28									
Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP	Näyte	ilman BMP	100 ng/ml BMP	300 ng/ml BMP	500 ng/ml BMP
1	5511,7	5619,8	5542,5	6049,8					
2	7218,9	7445,1	4892,8	5375,1					
3	5405,3	5824,0	6366,1	6049,8					
4	4452,2	5211,0	7464,2	4696,9					
5	5021,3	4614,4	5713,4	6265,0					
6	5511,7	5007,0	7854,3	7814,6					
Keskiarvo	5520,2	5620,2	6305,5	6041,8					
Keskihajonta	926,1	992,7	1155,3	1043,6					
Merkitsevyys		0,8604	0,2230	0,3813					

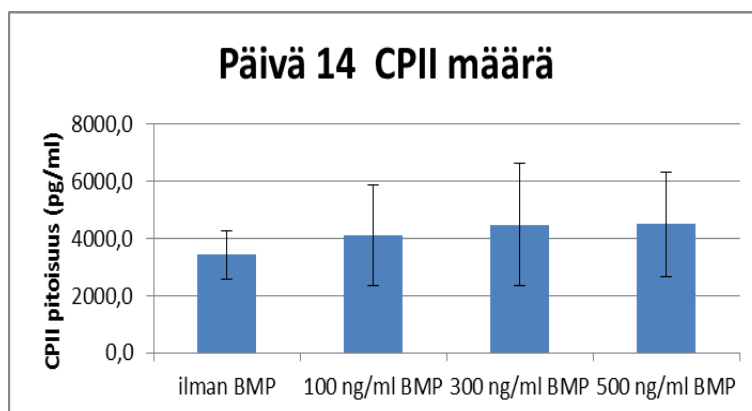
CPII-määrittämisen avulla määritettiin kollageeni II muodostumisessa vapautuvaa karboksipropeptidia. BMP-6:n havaittiin lisäävän CPII-määrää merkitsevästi päivänä 17 (kuviot 27-28). Kuviosta 32 nähdään, että BMP-6-ryhmissä CPII-tasot nousevat voimakkaasti päivänä 17. Kontrolliryhmässä nousu tapahtuu vasta päivänä 21, osoittaen että BMP-6 nopeuttaa tyypin II kollageenin muodostumista. Päivän 17 jälkeen BMP-6 ryhmissä CPII määrässä ei havaita enää nousua, mutta tasot vaihtelevat hieman, mikä voi liittyä rustosolujen aineenvaihduntaan ja ruston soluväliaineen uusiutumiseen (sen hajotukseen ja uudelleen muodostumiseen).



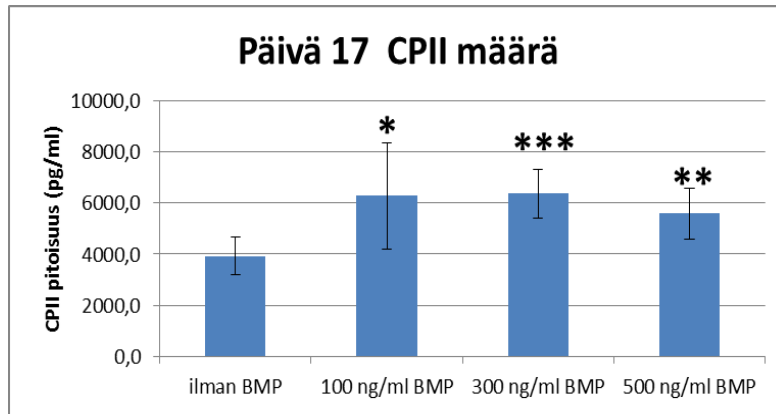
Kuvio 25. CII määrä päivänä 7.



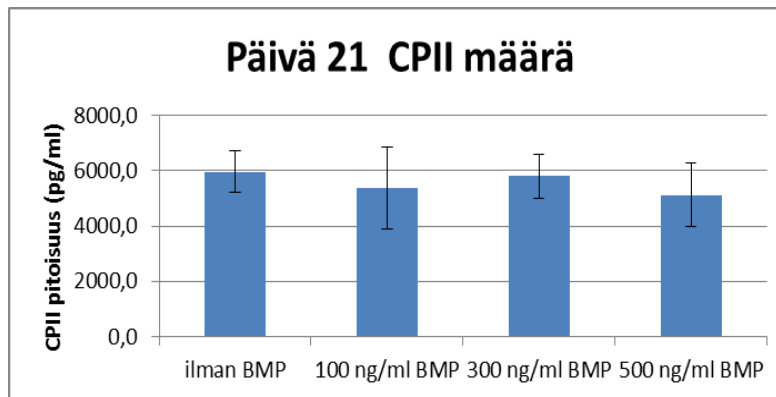
Kuvio 26. CII määrä päivänä 10.



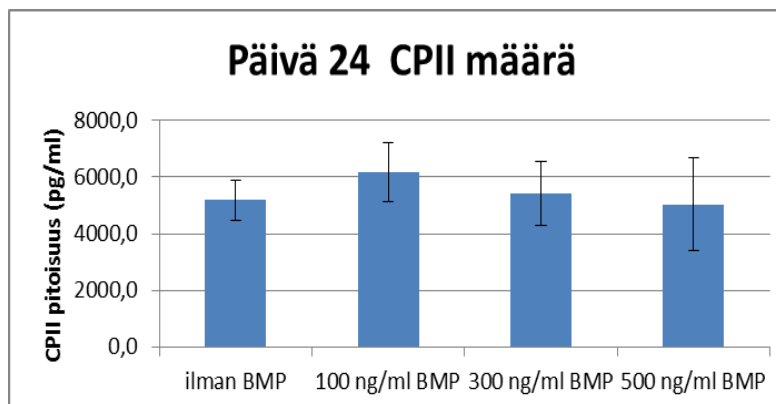
Kuvio 27. CII määrä päivänä 14.



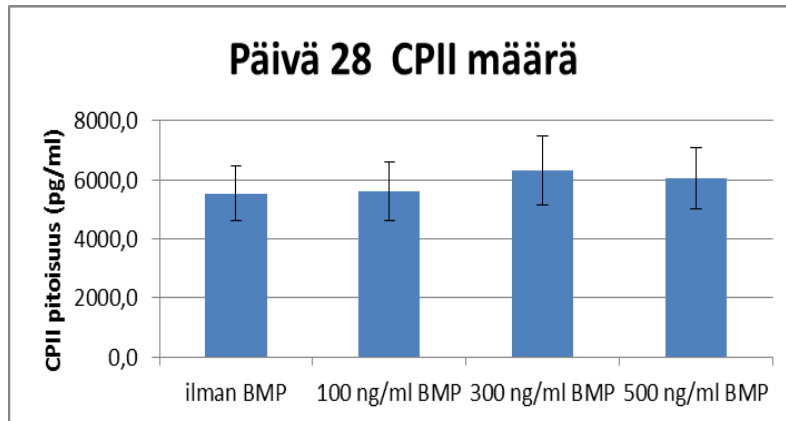
Kuvio 28. CII määrä päivänä 17.



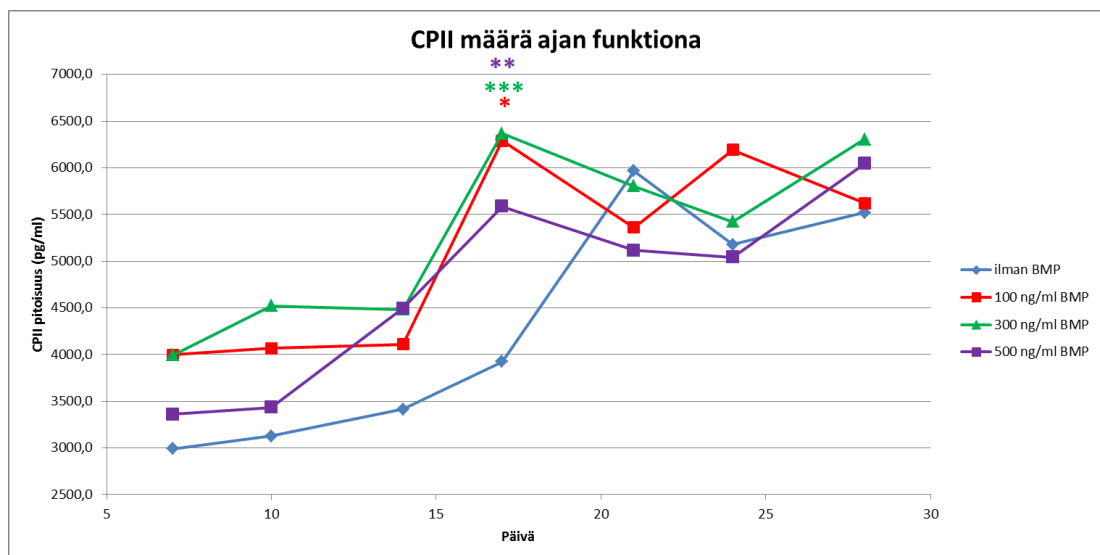
Kuvio 29. CII määrä päivänä 21.



Kuvio 30. CII määrä päivänä 24.



Kuvio 31. CPII määrä päivänä 28.



Kuvio 32. CPII määrä ajan funktiona.

## 8 POHDINTA

Tässä työssä havaittiin KS483-solujen kykenevän erilaistumaan kondrogeeniin suuntaan. Lisäksi BMP-6:n havaittiin edistävän rustosoluviljelmän erilaistumista, joten tulokset tukevat aiemmin kirjallisuudessa julkaisuja tuloksia.

Histologisten värjäysten perusteella havaittiin, että BMP-6 lisäsi merkittävästi ruston erilaistumista verrattuna kontrollisolupellettiin. BMP-6:n stimulaatio ruston erilaistumiseen ja soluväliaineen muodostumiseen oli tehokkainta korkeimmalla 500 ng/ml pitoisuudella. Lisäksi havaittiin, että KS483 mesenkyymisolut kykenevät erilaistumaan rustosoluiksi myös ilman BMP-6:n lisäystä, vaikka BMP:n läsnäolon on ajateltu olevan välttämätön ja keskeinen tekijä ruston kondrogeenin etenemiselle. Histologisten ja immunohistokemiallisen värjäysten perusteella osoitettiin, että KS483-solut kykenivät tuottamaan ruston kaltaista soluväliainetta myös kontrollipelleteissä, joten ne saattavat erittää kasvuympäristöönsä ruston erilaistumistapahtumaan tarpeellisia kasvutekijöitä. Tyypin II kollageenin immunovärjäystuloksista havaittiin, että muodostuneet rustosolupelletit ilmensivät tyypin II kollageenia soluväliaineessa, joten rustokudokselle ominaisen säikeiden muodostus tapahtui.

Tutkimuksessa tarkasteltiin myös sGAG- ja CPII-biokemiallisten määritysten soveltuvuutta ja toimivuutta ruston erilaistumistapahtuman seuraamisessa. sGAG-määrityksen tulokset havaittiin yhdenmukaisiksi rustosolupelletin histologisista näytteistä analysoituihin tuloksiin. Samoin tyypin II kollageenin immunohistokemialliset värjäykset havaittiin yhdenmukaisiksi CPII-tulosten kanssa. BMP-6 stimuloi KS483 hiiren soluja tuottamaan enemmän ja aikaisemmin prokollageenin II C-propeptidia. Samoin soluväliaineen muodostumisen vauhti kiihtyi ja määrä lisääntyi BMP-6 läsnäollessa kontrolliryhmään verrattuna.

## Jatkotutkimukset

Kun rustosolupelletteistä tehtiin solulysaatteja sGAG-määrittystä varten proteinaasi K-digestiolla, havaittiin että joissakin solulysaattinäytteissä oli kovaa valkoista sakkaa. Valkoista sakkaa sisältävät näytteet olivat päivältä 28 ja korkeimmalla BMP-6:n pitoisuudella, mikä voisi selittyä rustosolujen erilaistumisen etenemisellä hypertofiseen vaiheeseen. Ruston erilaistumisen hypertofisessa vaiheessa soluväliaine alkaa mineralisoitua. Soluväliaineen mineralisoitumista voidaan tutkia esimerkiksi histologisella von Kossa värjäyksellä tai tyypin X kollageenin osoittamisella immunohistokemiallisella värjäyksellä.

Tämän lisäksi havaittiin pelletin pallomaisen muodon muodostumisella mesenkyymisolujen tiivistymisvaiheessa olevan tärkeä merkitys rustosolujen erilaistumiselle. Pelletin muodostumiseen vaikuttavat useat eri tekijät. Käytetyn 96-kuoppalevyn muovin laatu on yksi niistä. KS483 mesenkyymisolut ovat muoviin tarttuvia soluja, joten polystyreenin lisäksi muovin materiaalina olisi hyvä testata polypropeenia. Tämän lisäksi kuoppalevyn pohjan muoto, (U- tai V-pohjainen), myös voi vaikuttaa asiaan. Myös solumassan sentrifugointinopeus, pitäisi olla sopiva, jotta kokeen alussa pelletistä ei tule liian tiivis tai löysä, ja solut ovat sopivassa solu-solu kontakteissa ja läheisyydessä. Lisäksi huomattiin, että sentrifugoinnin jälkeisessä solupellettien irtoamisessa kuoppien seinämiltä pelletit ovat hyvin hauraita ja niiden koossa pysymisen varmistamiseksi irrotus on parempi tehdä varovaisesti yksittelen eikä monikanavapipetillä. Irrottaminen olisi myös mahdollista suorittaa kahden päivän kuluttua eikä seuraavana päivänä.

Jatkotutkimuksissa voitaisiin myös testata muita soluja, joilla on osoitettu olevan kyky erilaistua rustosoluiksi, jotta saataisiin tietää niiden erilaistumistehokkuudesta ja lajien ja alkuperän välisistä eroista, esimerkiksi ihmisen prekursorisoluja. Tämän lisäksi olisi hyvä tutkia myös muiden BMP-6:n kaltaisten anabolisten ruston erilaistumista tehostavien yhdisteiden vaikutusta mallissa, joita voitaisiin BMP-6:n lisäksi käyttää kokeissa referenssiyhdisteenä. Rinnakkaisten näytteiden määrät ovat olleet toistaiseksi pieniä ja tulosten luotettavuuden lisäämiseksi tarvitaan lisää tutkimuksia ja kokeita suuremmilla rinnakkaisnäytteiden määrillä.

## LÄHTEET

Antranik. (2011) Cartilage and Bones [online, viitattu 25.02.2014]. Saatavilla [www-muodossa http://antranik.org/cartilage-and-bones/](http://antranik.org/cartilage-and-bones/)

Bonfield, T.L. & Caplan, A.I. (2010) Adult Mesenchymal Stem Cells: An Innovative Therapeutic for Lung Diseases. *Discovery Medicine* [online, viitattu 25.03.2014]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.discoverymedicine.com/Tracey-L-Bonfield/2010/04/15/adult-mesenchymal-stem-cells-an-innovative-therapeutic-for-lung-diseases/](http://www.discoverymedicine.com/Tracey-L-Bonfield/2010/04/15/adult-mesenchymal-stem-cells-an-innovative-therapeutic-for-lung-diseases/)

Clermont, Y., Lalli, M., Bencsath-Makkai, Z. (2014) Light-microscopic histology atlas [online, viitattu 25.02.2014]. Saatavilla [www-muodossa: http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/HAintro\\_E.html](http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/HAintro_E.html).

Fox, A.J.S., Bedi, A. & Rodeo, S.A. (2009) The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health*. 1: 461-468 [online, viitattu 25.02.2014]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3445147/pdf/10.1177\\_1941738109350438.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3445147/pdf/10.1177_1941738109350438.pdf).

Heino, J., Vuento, M.(2010) Biokemian ja solubiologian perusteet. 2. uudistettu painos. ss.181-309., WSOY pro Oy, Helsinki.

Hervonen, A. (2001) Tuki ja liikuntaelimestön anatomia. 6. painos. ss.20-66., Tampere, Lääketieteellinen oppimateriaalikustantamo Oy.

Honkanen, J. (2012) Nivelkierukan ja nivelruston mekaanisten ominaisuuksien karakterisointi vetomittausten avulla. Pro gradu-tutkielma. Itä-Suomen yliopisto, Sovelletun fysiikan laitos.

Instruction (2009) Wieslab® sGAG quantitative kit. Euro-Diagnostica [online, viitattu 3.03.2014]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.eurodiagnostica.com/index.php?headId=3&pageId=3&productId=89](http://www.eurodiagnostica.com/index.php?headId=3&pageId=3&productId=89).

Kelc, R., Naranda, J., Kuhta, M. & Vogrin, M. (2013) Novel Therapies for the Management of Sports Injuries. *Current Issues in Sports and Exercise Medicine* [online, viitattu 23.03.2014]. Saatavilla [www-muodossa: http://dx.doi.org/10.5772/53593](http://dx.doi.org/10.5772/53593).

Morko, J. (2005) Osteopenia and increased resorption of bone and articular cartilage in transgenic mice overexpressing cathepsin K. Ph.D. thesis. University of Turku, Medica-Odontologia, Suomi.

Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A., Björkqvist, S-E. (2008) Ihmisen fysiologia ja anatomia. 15.-17.painos. ss.61-64., 105-109., Helsinki, Werner Söderström Osakeyhtiö.

OARSI Primer (2010) [online, viitattu 25.02.2014]. Saatavilla [www-muodossa: http://primer.oarsi.org](http://primer.oarsi.org).

Partanen, J., Klefström, J. (2008) Soluviljelyn uudet ulottuvuudet- muovilta matriksiin. *Duodecim*. 124: 2444-2451 [online, viitattu 25.02.2014]. Saatavilla [www-muodossa: http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo97615.pdf](http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo97615.pdf).

Percuros (2012) KS483 Mouse Mesenchymal Progenitor Cell Line. henkilökohtainen moniste.

Pountos, I., Corscadden, D., Emery, B., Giannoudis, P.V. (2007) Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Injury, Int. J. Care Injured*. 38S4: 23-33.

Säämänen, AM., Kiviranta, R., Arokoski, J., Jurvelin, J., Järvinen, M., Kiviranta, I. (2012) Tuki- ja liikuntaelimestön kudosten rakenne ja toiminta. Kirjassa: Kiviranta, I. ja Järvinen, M. *Ortopedia*. ss.13-43., Kandidaattikustannus Oy, Otavan Kirjapaino Oy.

Solubiologian harjoitustyöt 1 TBIO (2004) Turun yliopisto, Anatomia.

- Solunetti (2014). [online, viitattu 5.01.2014]. Saatavilla www-muodossa: <http://www.solunetti.fi/fi>.
- Taipaleenmäki, H. (2010) Factors regulating chondrogenic differentiation. Ph.D. thesis. University of Turku, Medica-Odontologia.
- Turunen, S. (2013) Osmotic and Mechanical Loading of Chondrocytes in Situ .Effect of the Extracellular and Pericellular Matrix on Cell Volume and Morphology. Ph.D. thesis. University of Eastern Finland, Department of Applied Physics, Kuopio.
- Yamashita, T., Ishii, H., Shimoda, K., Sampath, T.K., Katagiri, T., Wada, M., Osawa, T., Suda, T. (1996) Subcloning of Three Osteoblastic Cell Lines With Distinct Differentiation Phenotypes from the Mouse Osteoblastic Cell Line KS-4. Bone. Vol.19, 5: 429-436.

**KÄYTETYT LAITTEET:**

1. Kuoppalevyn pesuri: Wallac 1296-026 DELFIA® PLATEWASH.
2. Absorbanssilukija: Wallac VICTOR<sup>2</sup><sub>TM</sub> 1420 MULTILABEL COUNTER.
3. Ohjelma pitoisuuksien laskemisessa: MultiCalc 2000.
4. Eppendorf-putkien sentrifugi: Biofuge primo Heraeus.
5. Vortex IKA® MS2 Minishaker.
6. Kuoppalevyn ravistelija: IKA® MTS 2/4 digital.
7. Mikrotomi: LEICA RM2265.
8. Parafiinilaite: SAKURA Tissue-Tek® TEC<sup>TM</sup> SM C1-042-S0
9. Soluviljelyn sentrifugi: Megafuge 1.0R Heraeus.
10. Kuoppalevyn sentrifugi: Megafuge 1.0R Heraeus.
11. Inkubaattorikaappi: HERA cell 150 Heraeus.
12. Laminaarikaappi: HERA Safe Heraeus.
13. Mikroskooppi: Leica DM4000B.
14. Valokuvakamera: Q Imaging 01-RET-OEM-F-CLR-12 Color 12 Bit SN:Q15811.
15. Ohjelma valokuvauksessa: Adobe® Photoshop 7.0.
16. Ohjelma kuvien analysoinnissa: MetaMorph Version 6.2 r6, Universal Imaging Corporation.

## VÄRJÄYSTEN RAAKATULOKSET

## Toluidiinisisäisen värjäyksen analysointi

Näyte	Pinta-ala	Pikselit		TH alue	Suhde
D28 Toluidine 4.3 (18)	1,90842	0,960849	kokonais alue		
D28 Toluidine 4.3 (18)	1,21567	0,858997	TH alue	0,859	0,450
D28 Toluidine 4.3 (14)	2,90229	1,5019		1,502	0,517
D28 Toluidine 4.3 (6)	1,69254	0,986215		0,986	0,583
D28 Toluidine 4.2 (15)	1,87314	1,20333		1,203	0,642
D28 Toluidine 4.2 (11)	2,44297	1,40544		1,405	0,575
D28 Toluidine 4.2 (7)	2,74214	1,6078	kokonais alue		
D28 Toluidine 4.2 (7)	0,008919	0,004572	TH alue		
D28 Toluidine 4.2 (7)	0,146522	0,096693	TH alue		
D28 Toluidine 4.2 (7)	1,51729	1,17837	TH alue	1,280	0,467
D28 Toluidine 4.1 (14)	2,06061	1,07097	kokonais alue		
D28 Toluidine 4.1 (14)	0,794308	0,264143	Vähennä edel, tyhjä alue	0,807	0,392
D28 Toluidine 4.1 (11)	2,55895	1,31322	kokonais alue		
D28 Toluidine 4.1 (11)	0,857868	0,268217	Vähennä edel, tyhjä alue	1,045	0,408
D28 Toluidine 4.1 (6)	2,69953	1,46848	kokonais alue		
D28 Toluidine 4.1 (6)	1,00331	0,314549	Vähennä edel, tyhjä alue	1,154	0,427
D28 Toluidine 3.3 (11)	3,23881	1,71995	kokonais alue		
D28 Toluidine 3.3 (11)	0,863745	0,269519	Vähennä edel, tyhjä alue	1,450	0,448
D28 Toluidine 3.3 (6)	2,7578	1,39211	kokonais alue		
D28 Toluidine 3.3 (6)	1,00005	0,262647	Vähennä edel, tyhjä alue	1,129	0,410
D28 Toluidine 3.2 (9)	2,77165	1,61773	kokonais alue		
D28 Toluidine 3.2 (9)	1,71605	1,27606	TH alue		
D28 Toluidine 3.2 (9)	0,093254	0,048752	TH alue	1,325	0,478
D28 Toluidine 3.2 (5)	3,67941	2,36389	kokonais alue		
D28 Toluidine 3.2 (5)	0,118321	0,03277	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 3.2 (5)	0,099749	0,051891	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 3.2 (5)	0,150406	0,03225	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 3.2 (5)	0,252545	0,075917	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 3.2 (5)	0,051495	0,026215	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 3.2 (5)	0,093389	0,045497	Vähennä edel, tyhjä alue	2,099	0,571
D28 Toluidine 3.1 (9)	2,62307	1,78646	kokonais alue		
D28 Toluidine 3.1 (9)	0,344168	0,179	Vähennä edel, tyhjä alue	1,607	0,613
D28 Toluidine 3.1 (6)	2,69075	1,69442	kokonais alue		
D28 Toluidine 3.1 (6)	0,687259	0,362366	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 3.1 (6)	0,137996	0,027401	Vähennä edel, tyhjä alue	1,305	0,485
D28 Toluidine 2.4 (9)	3,18171	1,65406	kokonais alue		
D28 Toluidine 2.4 (9)	0,026814	0,017086	TH alue		
D28 Toluidine 2.4 (9)	1,8725	1,32115	TH alue	1,338	0,421
D28 Toluidine 2.4 (5)	3,8597	2,49318	kokonais alue		
D28 Toluidine 2.4 (5)	0,313644	0,077388	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 2.4 (5)	0,226951	0,106397	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 2.4 (5)	0,02816	0,008268	Vähennä edel, tyhjä alue	2,301	0,596
D28 Toluidine 2.2 (5)	3,94339	2,46006	kokonais alue		
D28 Toluidine 2.2 (5)	2,32099	1,8066	TH alue		0,458
D28 Toluidine 2.2 (3)	3,71979	2,37792	kokonais alue		
D28 Toluidine 2.2 (3)	2,10744	1,62706	TH alue		
D28 Toluidine 2.2 (3)	0,143866	0,108986	TH alue	1,736	0,467
D28 Toluidine 2.1 (9)	2,18363	1,225	kokonais alue		
D28 Toluidine 2.1 (9)	0,23843	0,178476	TH alue		
D28 Toluidine 2.1 (9)	1,06233	0,78987	TH alue	0,968	0,443
D28 Toluidine 2.1 (5)	3,30432	1,8343	kokonais alue		
D28 Toluidine 2.1 (5)	1,64064	1,26584	TH alue		0,383
D28 Toluidine 1.3 (9)	4,44239	2,05364	kokonais alue		
D28 Toluidine 1.3 (9)	0,725364	0,094096	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 1.3 (9)	0,440779	0,042168	Vähennä edel, tyhjä alue		
D28 Toluidine 1.3 (9)	0,107168	0,009252	Vähennä edel, tyhjä alue	1,908	0,430
D28 Toluidine 1.3 (5)	4,49654	2,46943	kokonais alue		
D28 Toluidine 1.3 (5)	1,00319	0,272722	Vähennä edel, tyhjä alue	2,197	0,489
D28 Toluidine 1.2 (9)	2,18191	0,793874	kokonais alue		
D28 Toluidine 1.2 (9)	1,45086	0,717825	TH alue		0,329
D28 Toluidine 1.2 (6)	3,06497	1,13674	kokonais alue		
D28 Toluidine 1.2 (6)	1,26283	0,722513	TH alue		
D28 Toluidine 1.2 (6)	0,023162	0,015074	TH alue		
D28 Toluidine 1.2 (6)	0,039504	0,02565	TH alue		
D28 Toluidine 1.2 (6)	0,019211	0,010741	TH alue	0,774	0,253
D28 Toluidine 1.1 (9)	2,39326	1,19834	kokonais alue		
D28 Toluidine 1.1 (9)	0,857748	0,584682	TH alue		
D28 Toluidine 1.1 (9)	0,513624	0,329035	TH alue	0,914	0,382
D28 Toluidine 1.1 (5)	2,59424	1,26603	kokonais alue		
D28 Toluidine 1.1 (5)	1,44665	0,912119	TH alue		0,352

Näyte	Pinta-ala	Pikselit		TH alue	Suhde
D24 Toluidine 4.5 (8)	1,66399	0,577663	kokonais alue		
D24 Toluidine 4.5 (8)	0,504279	0,312966	TH alue		
D24 Toluidine 4.5 (8)	0,091114	0,052366	TH alue	0,365	0,220
D24 Toluidine 4.5 (5)	2,18587	0,772489	kokonais alue		
D24 Toluidine 4.5 (5)	0,087343	0,046204	TH alue		
D24 Toluidine 4.5 (5)	0,77559	0,490548	TH alue	0,537	0,246
D24 Toluidine 4.4 (9)	1,90492	0,863016	kokonais alue		
D24 Toluidine 4.4 (9)	0,062314	0,027693	TH alue		
D24 Toluidine 4.4 (9)	0,193048	0,115144	TH alue		
D24 Toluidine 4.4 (9)	0,800294	0,532555	TH alue	0,675	0,355
D24 Toluidine 4.4 (5)	2,90906	0,925001	kokonais alue		
D24 Toluidine 4.4 (5)	0,915363	0,511877	TH alue		
D24 Toluidine 4.4 (5)	0,012283	0,007221	TH alue		
D24 Toluidine 4.4 (5)	0,217681	0,113427	TH alue	0,633	0,217
D24 Toluidine 4.1 (9)	2,11056	0,777891	kokonais alue		
D24 Toluidine 4.1 (9)	0,02846	0,018085	TH alue		
D24 Toluidine 4.1 (9)	1,1199	0,593616	TH alue	0,612	0,290
D24 Toluidine 4.1 (6)	1,85821	0,753936	kokonais alue		
D24 Toluidine 4.1 (6)	0,711402	0,369108	TH alue		
D24 Toluidine 4.1 (6)	0,392827	0,237614	TH alue	0,607	0,327
D24 Toluidine 3.5 (9)	1,4711	0,628065	kokonais alue		
D24 Toluidine 3.5 (9)	0,364311	0,250218	TH alue		
D24 Toluidine 3.5 (9)	0,272546	0,183055	TH alue	0,433	0,295
D24 Toluidine 3.5 (5)	2,01875	0,857849	kokonais alue		
D24 Toluidine 3.5 (5)	0,56699	0,335837	TH alue		
D24 Toluidine 3.5 (5)	0,500399	0,316678	TH alue	0,653	0,323
D24 Toluidine 3.3 (9)	2,69688	1,18097	kokonais alue		
D24 Toluidine 3.3 (9)	0,297003	0,186262	TH alue		
D24 Toluidine 3.3 (9)	0,649798	0,318994	TH alue		
D24 Toluidine 3.3 (9)	0,985235	0,538246	TH alue	1,044	0,387
D24 Toluidine 3.3 (5)	2,09678	0,834302	kokonais alue		
D24 Toluidine 3.3 (5)	1,35157	0,707077	TH alue		0,337
D24 Toluidine 3.2 (9)	3,74147	0,690035			0,184
D24 Toluidine 3.2 (5)	3,14892	0,693773	Koko alue		
D24 Toluidine 3.2 (5)	1,47903	0,661909	TH alue		0,210
D24 Toluidine 2.6 (9)	2,00152	0,691809			0,346
D24 Toluidine 2.6 (5)	3,22356	1,09508	kokonais alue		
D24 Toluidine 2.6 (5)	1,20517	0,693971	TH alue		
D24 Toluidine 2.6 (5)	0,15029	0,043889	TH alue	0,738	0,229
D24 Toluidine 2.5 (8)	2,02874	0,585673	kokonais alue		
D24 Toluidine 2.5 (8)	0,589897	0,341703	TH alue		
D24 Toluidine 2.5 (8)	0,31878	0,128912	TH alue	0,471	0,232
D24 Toluidine 2.5 (5)	2,34629	0,794465	kokonais alue		
D24 Toluidine 2.5 (5)	0,067515	0,034457	TH alue		
D24 Toluidine 2.5 (5)	0,090269	0,041427	TH alue		
D24 Toluidine 2.5 (5)	0,952102	0,565545	TH alue	0,641	0,273
D24 Toluidine 2.2 (11)	2,06301	0,609232	kokonais alue		
D24 Toluidine 2.2 (11)	0,134023	0,065719	TH alue		
D24 Toluidine 2.2 (11)	0,232268	0,099689	TH alue		
D24 Toluidine 2.2 (11)	0,525679	0,279303	TH alue	0,445	0,216
D24 Toluidine 2.2 (6)	2,74434	0,80081	kokonais alue		
D24 Toluidine 2.2 (6)	0,012279	0,003913	TH alue		
D24 Toluidine 2.2 (6)	1,14768	0,512337	TH alue		
D24 Toluidine 2.2 (6)	0,427142	0,170302	TH alue	0,687	0,250
D24 Toluidine 1.6 (8)	1,96182	0,857931	kokonais alue		
D24 Toluidine 1.6 (8)	0,140525	0,061802	TH alue		
D24 Toluidine 1.6 (8)	0,017172	0,01128	TH alue		
D24 Toluidine 1.6 (8)	1,09981	0,64086	TH alue	0,714	0,364
D24 Toluidine 1.6 (5)	3,2289	1,46998	kokonais alue		
D24 Toluidine 1.6 (5)	1,91056	1,10897	TH alue		
D24 Toluidine 1.6 (5)	0,050151	0,029107	TH alue		
D24 Toluidine 1.6 (5)	0,181372	0,10379	TH alue	1,242	0,385
D24 Toluidine 1.5 (8)	2,70981	0,948372	kokonais alue		
D24 Toluidine 1.5 (8)	0,190766	0,114216	TH alue		
D24 Toluidine 1.5 (8)	0,8172	0,478838	TH alue		
D24 Toluidine 1.5 (8)	0,071166	0,03277	TH alue	0,626	0,231
D24 Toluidine 1.5 (5)	3,02698	1,03128	kokonais alue		
D24 Toluidine 1.5 (5)	1,30864	0,685276	TH alue		
D24 Toluidine 1.5 (5)	0,044001	0,031109	TH alue		
D24 Toluidine 1.5 (5)	0,202813	0,102611	TH alue	0,819	0,271
D24 Toluidine 1.4 (9)	2,17728	0,792527	kokonais alue		
D24 Toluidine 1.4 (9)	0,993391	0,570476	TH alue		
D24 Toluidine 1.4 (9)	0,173613	0,076658	TH alue	0,647	0,297
D24 Toluidine 1.4 (6)	2,49516	1,01475	kokonais alue		
D24 Toluidine 1.4 (6)	1,50515	0,854063	TH alue		
D24 Toluidine 1.4 (6)	0,105743	0,043993	TH alue	0,898	0,360

Näyte	Pinta-ala	Pikselit		TH alue	Suhde
D17 Toluidine 4.6 (5)	2,00838	0,373956	kokonais alue		
D17 Toluidine 4.6 (5)	0,388382	0,158247	TH alue		
D17 Toluidine 4.6 (5)	0,056871	0,019477	TH alue		
D17 Toluidine 4.6 (5)	0,165778	0,040548	TH alue	0,218	0,109
D17 Toluidine 4.5 (7)	1,60627	0,350906	kokonais alue		
D17 Toluidine 4.5 (7)	0,144592	0,064394	TH alue		
D17 Toluidine 4.5 (7)	0,014542	0,007838	TH alue		
D17 Toluidine 4.5 (7)	0,096015	0,035669	TH alue		
D17 Toluidine 4.5 (7)	0,044738	0,016536	TH alue	0,124	0,077
D17 Toluidine 4.5 (4)	1,81599	0,355321	kokonais alue		
D17 Toluidine 4.5 (4)	0,158449	0,073946	TH alue		
D17 Toluidine 4.5 (4)	0,093928	0,030458	TH alue	0,104	0,057
D17 Toluidine 4.4 (7)	1,08531	0,328021	kokonais alue		
D17 Toluidine 4.4 (7)	0,141385	0,060088	TH alue		0,055
D17 Toluidine 4.4 (4)	1,22588	0,253245	kokonais alue		
D17 Toluidine 4.4 (4)	0,108896	0,028381	TH alue		0,023
D17 Toluidine 3.6 (9)	2,51003	0,669705	kokonais alue		
D17 Toluidine 3.6 (9)	0,641672	0,331822	TH alue		
D17 Toluidine 3.6 (9)	0,027483	0,008373	TH alue	0,340	0,136
D17 Toluidine 3.6 (5)	2,49127	0,601465	kokonais alue		
D17 Toluidine 3.6 (5)	0,298649	0,123031	TH alue		
D17 Toluidine 3.6 (5)	0,174499	0,071742	TH alue		
D17 Toluidine 3.6 (5)	0,172789	0,07808	TH alue	0,273	0,110
D17 Toluidine 3.5 (9)	2,08507	0,48561	kokonais alue		
D17 Toluidine 3.5 (9)	0,30294	0,143338	TH alue		
D17 Toluidine 3.5 (9)	0,163302	0,063384	TH alue		
D17 Toluidine 3.5 (9)	0,034898	0,012312	TH alue	0,219	0,105
D17 Toluidine 3.5 (5)	2,04408	0,426539	kokonais alue		
D17 Toluidine 3.5 (5)	0,057544	0,026155	TH alue		
D17 Toluidine 3.5 (5)	0,32266	0,142766	TH alue	0,169	0,083
D17 Toluidine 3.4 (9)	1,12971	0,315866	kokonais alue		
D17 Toluidine 3.4 (9)	0,339814	0,140297	TH alue		0,124
D17 Toluidine 3.4 (5)	1,22753	0,342006	kokonais alue		
D17 Toluidine 3.4 (5)	0,3385	0,13996	TH alue		0,114
D17 Toluidine 2.6 (9)	1,55719	0,243952	kokonais aue		
D17 Toluidine 2.6 (9)	0,194507	0,074556	TH alue		0,048
D17 Toluidine 2.6 (5)	1,65241	0,347936	kokonais aue		
D17 Toluidine 2.6 (5)	0,333165	0,138976	TH alue		
D17 Toluidine 2.6 (5)	0,018605	0,010472	TH alue	0,149	0,090
D17 Toluidine 2.5 (9)	1,35023	0,327269	kokonais aue		
D17 Toluidine 2.5 (9)	0,157555	0,052594	TH alue		
D17 Toluidine 2.5 (9)	0,042774	0,020094	TH alue	0,073	0,054
D17 Toluidine 2.5 (5)	1,93519	0,41633	kokonais aue		
D17 Toluidine 2.5 (5)	0,154218	0,059849	TH alue		
D17 Toluidine 2.5 (5)	0,139302	0,067006	TH alue	0,127	0,066
D17 Toluidine 2.4 (9)	1,06954	0,296771	kokonais aue		
D17 Toluidine 2.4 (9)	0,061139	0,032369	TH alue		
D17 Toluidine 2.4 (9)	0,033544	0,015463	TH alue	0,048	0,045
D17 Toluidine 2.4 (5)	1,40152	0,344655	kokonais aue		
D17 Toluidine 2.4 (5)	0,162217	0,066385	TH alue		
D17 Toluidine 2.4 (5)	0,028112	0,008807	TH alue	0,075	0,054
D17 Toluidine 1.6 (7)	1,69105	0,359713	kokonais alue		
D17 Toluidine 1.6 (7)	0,1746	0,088252	TH alue		
D17 Toluidine 1.6 (7)	0,041666	0,0166	TH alue	0,105	0,062
D17 Toluidine 1.6 (3)	1,44112	0,178802	kokonais alue		
D17 Toluidine 1.6 (3)	0,038883	0,006409	TH alue		
D17 Toluidine 1.6 (3)	0,030154	0,009559	TH alue		
D17 Toluidine 1.6 (3)	0,294488	0,093905	TH alue	0,110	0,076
D17 Toluidine 1.5 (4)	1,09176	0,244038	kokonais alue		
D17 Toluidine 1.5 (4)	0,088342	0,031681	TH alue		
D17 Toluidine 1.5 (4)	0,061716	0,024617	TH alue	0,056	0,052
D17 Toluidine 1.4 (9)	1,24296	0,329626	kokonais alue		
D17 Toluidine 1.4 (9)	0,258625	0,125885	TH alue		0,101
D17 Toluidine 1.4 (5)	1,48269	0,357869	kokonais alue		
D17 Toluidine 1.4 (5)	0,126076	0,049744	TH alue		0,034

## Safraniinin O värjäyksen analysointi

Näyte	Pinta-ala	TH alue			Suhde	Keskiaarvo	Keskihajonta
D28 Safranin O 4.3 (7)	1,89419	0,792224			0,418		
D28 Safranin O 4.3 (13)	2,93131	0,923384			0,315		
D28 Safranin O 4.3 (1)	1,67142	0,375688			0,225		
D28 Safranin O 4.2 (13)	2,20643	0,777648			0,352		
D28 Safranin O 4.2 (6)	2,78047	1,2791			0,460		
D28 Safranin O 4.2 (1)	2,19992	0,783185			0,356		
D28 Safranin O 4.1 (15)	1,7803	0,545586			0,306		
D28 Safranin O 4.1 (7)	2,73941	1,10949			0,405		
D28 Safranin O 4.1 (1)	1,71536	0,464169			0,271	0,345	0,075
D28 Safranin O 3.3 (1)	1,96024	0,565227			0,288		
D28 Safranin O 3.2 (1)	3,36477	1,08807			0,323		
D28 Safranin O 3.1 (1)	3,05989	0,779313			0,255	0,289	0,034
D28 Safranin O 2.4 (1)	2,73979	1,03412			0,377		
D28 Safranin O 2.2 (1)	2,31748	0,669821			0,289		
D28 Safranin O 2.1 (1)	2,52455	0,601102			0,238	0,302	0,071
D28 Safranin O 1.3 (2)	4,08764	0,3942			0,096		
D28 Safranin O 1.2 (1)	3,59392	0,673387			0,187		
D28 Safranin O 1.1 (1)	2,29734	0,341699			0,149	0,144	0,046
D24 Safranin O 4.5 (1)	2,3559	0,56467			0,240		
D24 Safranin O 4.4 (1)	2,45949	0,425129			0,173		
D24 Safranin O 4.1 (1)	2,09067	0,230259			0,110	0,174	0,065
D24 Safranin O 3.5 (1)	2,7731	0,492101			0,177		
D24 Safranin O 3.3 (1)	2,28305	0,533621			0,234		
D24 Safranin O 3.2 (1)	1,52278	0,50912			0,334	0,249	0,079
D24 Safranin O 2.6 (1)	1,02778	0,091047			0,089		
D24 Safranin O 2.5 (1)	2,04299	0,436884			0,214		
D24 Safranin O 2.2 (2)	1,44363	0,195416			0,135	0,146	0,063
D24 Safranin O 1.6 (1)	2,13209	0,273597			0,128		
D24 Safranin O 1.5 (1)	1,65613	0,263073	Pinta-ala ja TH 1	2,394614			
D24 Safranin O 1.5 (1)	0,738484	0,0373563	Pinta-ala ja TH 2	0,300429	0,125		
D24 Safranin O 1.4 (1)	2,05485	0,373032			0,182	0,145	0,032
D17 Safranin O 4.6 (1)	2,265	0,203718			0,090		
D17 Safranin O 4.5 (1)	1,69239	0,127494			0,075		
D17 Safranin O 4.4 (5)	1,11258	0,0798457			0,072	0,079	0,010
D17 Safranin O 3.6 (1)	3,16173	0,335234			0,106		
D17 Safranin O 3.5 (1)	0,911244	0,0484604			0,053		
D17 Safranin O 3.4 (2)	0,901629	0,0407871			0,045	0,068	0,033
D17 Safranin O 2.6 (2)	1,34869	0,110034			0,082		
D17 Safranin O 2.5 (1)	2,01988	0,120805			0,060		
D17 Safranin O 2.4 (6)	1,30212	0,218391			0,168		
D17 Safranin O 2.4 (2)	0,729412	0,109574			0,150	0,115	0,052
D17 Safranin O 1.6 (2)	1,29999	0,102937			0,079		
D17 Safranin O 1.5 (3)	0,875287	0,0480638			0,055		
D17 Safranin O 1.4 (2)	0,573279	0,0331549			0,058	0,064	0,013

## Alcian sinisen värjäyksen analysointi

Näyte	Pinta-ala	TH alue			Suhde	Keskiarvo	Keskihajonta
D28 Alcian 4.3 (19)	1,50395	0,710238			0,472		
D28 Alcian 4.3 (15)	2,75905	1,59242			0,577		
D28 Alcian 4.3 (8)	2,20175	0,945353			0,429		
D28 Alcian 4.3 (2)	1,77502	0,832637			0,469		
D28 Alcian 4.2 (16)	1,79178	0,906238			0,506		
D28 Alcian 4.2 (9)	2,58309	1,32657			0,514		
D28 Alcian 4.2 (2)	2,42356	1,09666			0,452		
D28 Alcian 4.1 (17)	1,30626	0,861886			0,660		
D28 Alcian 4.1 (9)	2,82266	1,49283			0,529		
D28 Alcian 4.1 (2)	1,89629	1,06235			0,560	<b>0,517</b>	<b>0,069</b>
D28 Alcian 2.4 (10)	2,33466	1,0011			0,429		
D28 Alcian 2.4 (2)	4,09041	2,2599			0,552		
D28 Alcian 2.2 (10)	2,03522	0,982971			0,483		
D28 Alcian 2.2 (2)	3,02624	1,57994			0,522		
D28 Alcian 2.1 (10)	1,98539	1,02921			0,518		
D28 Alcian 2.1 (2)	2,73921	1,31079			0,479	<b>0,497</b>	<b>0,043</b>
D28 Alcian 1.3 (10)	2,87412	1,29108			0,449		
D28 Alcian 1.3 (1)	2,86588	0,680701			0,238		
D28 Alcian 1.2 (10)	1,87839	0,745967			0,397		
D28 Alcian 1.2 (2)	3,24783	1,61615			0,498		
D28 Alcian 1.1 (10)	3,08249	1,49216			0,484		
D28 Alcian 1.1 (2)	2,47484	1,52752			0,617	<b>0,447</b>	<b>0,126</b>
D28 Alcian 3.3 (14)	2,16254	1,05709			0,489		
D28 Alcian 3.3 (9)	3,31751	1,28253			0,387		
D28 Alcian 3.3 (2)	2,40424	1,20361			0,501		
D28 Alcian 3.2 (10)	2,27902	1,15571			0,507		
D28 Alcian 3.2 (2)	3,67375	1,93739			0,527		
D28 Alcian 3.1 (11)	2,56035	1,43186			0,559		
D28 Alcain 3.1 (2)	3,32911	1,94962			0,586	<b>0,508</b>	<b>0,063</b>
D24 Alcian 4.5 (2)	2,37611	1,2795			0,538		
D24 Alcian 4.4 (10)	1,67728	0,859024			0,512		
D24 Alcian 4.4 (2)	2,64854	1,55317			0,586		
D24 Alcian 4.1 (10)	1,86824	0,705157	TH alue 1	2,426673			
D24 Alcian 4.1 (10)	0,558433	0,269228	TH alue 2	0,974385	0,402		
D24 Alcian 4.1 (2)	1,83007	0,724687			0,396	<b>0,487</b>	<b>0,085</b>
D24 Alcian 3.5 (8)	1,63263	0,635664			0,389		
D24 Alcian 3.5 (2)	2,51131	0,976012			0,389		
D24 Alcian 3.3 (10)	2,173	0,766716			0,353		
D24 Alcian 3.3 (2)	2,87492	1,33435			0,464		
D24 Alcian 3.2 (10)	1,66619	0,879159			0,528	<b>0,425</b>	<b>0,070</b>
D24 Alcian 2.6 (8)	3,06347	1,73328			0,566		
D24 Alcian 2.6 (2)	2,35574	0,639708			0,272		
D24 Alcian 2.5 (10)	2,277	0,867673			0,381		
D24 Alcian 2.5 (2)	2,36926	0,786515			0,332		
D24 Alcian 2.2 (10)	2,24704	0,775108			0,345	<b>0,379</b>	<b>0,112</b>
D24 Alcian 1.6 (9)	1,28059	0,474854			0,371		
D24 Alcian 1.6 (2)	2,7695	0,966734			0,349		
D24 Alcian 1.5 (9)	2,22803	0,431725			0,194		
D24 Alcian 1.5 (2)	2,33455	0,81004			0,347		
D24 Alcian 1.4 (10)	1,19769	0,419248			0,350		
D24 Alcian 1.4 (2)	2,26136	0,737235			0,326	<b>0,323</b>	<b>0,065</b>

Näyte	Pinta-ala	TH alue			Suhde	Keskiarvo	Keskihajonta
D17 Alcian 4.6 (10)	1,82069	0,139818			0,077		
D17 Alcian 4.6 (2)	2,39648	0,381326			0,159		
D17 Alcian 4.5 (8)	1,28202	0,0967262			0,075		
D17 Alcian 4.5 (2)	1,62786	0,284993					
D17 Alcian 4.5 (2)	0,371711	0,196341	TH alue		0,121		
D17 Alcian 4.4 (2)	1,08149	0,196801					
D17 Alcian 4.4 (2)	0,173201	0,0552994	TH alue		0,051		
D17 Alcian 4.4 (1)	0,723314	0,0956375					
D17 Alcian 4.4 (1)	0,01434	0,00520407	TH alue				
D17 Alcian 4.4 (1)	0,027053	0,00615061	TH alue	0,011355	0,016	<b>0,083</b>	<b>0,051</b>
D17 Alcian 3.6 (10)	1,97133	0,518211					
D17 Alcian 3.6 (10)	0,587604	0,31092	TH alue				
D17 Alcian 3.6 (10)	0,009551	0,0037188	TH alue				
D17 Alcian 3.6 (10)	0,055109	0,0285008	TH alue	0,34314	0,174		
D17 Alcian 3.6 (2)	2,65078	0,328695					
D17 Alcian 3.6 (2)	0,690331	0,205956	TH alue		0,078		
D17 Alcian 3.5 (10)	1,84151	0,242556					
D17 Alcian 3.5 (10)	0,312776	0,122185	TH alue				
D17 Alcian 3.5 (10)	0,154562	0,0533427	TH alue	0,175528	0,095		
D17 Alcian 3.5 (3)	1,51238	0,302495	TH alue				
D17 Alcian 3.5 (3)	0,269523	0,069894	TH alue				
D17 Alcian 3.5 (3)	0,009593	0,00194919	TH alue				
D17 Alcian 3.5 (3)	0,039403	0,0186277	TH alue				
D17 Alcian 3.5 (3)	0,082285	0,0474502	TH alue	0,137921	0,091		
D17 Alcian 3.4 (10)	0,929404	0,20584	koko alue				
D17 Alcian 3.4 (10)	0,374843	0,157645	TH alue		0,170		
D17 Alcian 3.4 (3)	0,953614	0,191933	koko alue				
D17 Alcian 3.4 (3)	0,021995	0,000385348	TH Alue				
D17 Alcian 3.4 (3)	0,162363	0,0392045	TH Alue	0,03959	0,042	<b>0,108</b>	<b>0,053</b>
D17 Alcian 2.6 (10)	0,845245	0,0575179	koko alue				
D17 Alcian 2.6 (10)	0,171671	0,0423285	TH Alue				
D17 Alcian 2.6 (10)	0,051902	0,0069026	TH Alue	0,049231	0,058		
D17 Alcian 2.6 (3)	1,60854	0,225945	koko alue				
D17 Alcian 2.6 (3)	0,573477	0,176445	TH Alue		0,110		
D17 Alcian 2.5(10)	0,804615	0,0531481			0,066		
D17 Alcian 2.5(2)	3,50056	0,422735	koko alue				
D17 Alcian 2.5(2)	0,867894	0,226776	TH Alue		0,065		
D17 Alcian 2.4 (10)	0,993828	0,220797	koko alue				
D17 Alcian 2.4 (10)	0,242893	0,0780012	TH Alue		0,078		
D17 Alcian 2.4 (4)	1,24752	0,084844	koko alue				
D17 Alcian 2.4 (4)	0,025381	0,0067941	TH Alue				
D17 Alcian 2.4 (4)	0,338923	0,0640838	TH Alue				
D17 Alcian 2.4 (4)	0,025093	0,00495341	TH Alue				
D17 Alcian 2.4 (4)	0,008642	0,00117849	TH Alue	0,07701	0,062	<b>0,073</b>	<b>0,019</b>
D17 Alcian 1.6 (4)	1,57723	0,135774	koko alue				
D17 Alcian 1.6 (4)	0,34547	0,104972	TH Alue		0,067		
D17 Alcian 1.5 (2)	1,04779	0,0625274			0,060		
D17 Alcian 1.4 (10)	0,965013	0,0872496			0,090		
D17 Alcian 1.4 (3)	1,30484	0,0489467			0,038	<b>0,064</b>	<b>0,022</b>

## Tyyppin II kollageenin värjäyksen analysointi

Näyte	Pinta-ala	Threshold alue	Suhde	Keskiarvo	Keskihajonta
D28 4.3 (16)	2,60005	1,26628	0,487		
D28 4.2 (8)	2,63534	1,37533	0,522		
D28 4.1 (16)	1,4883	0,92536	0,622		
D28 4.3 (11)	2,65436	1,40741	0,530	<b>0,540</b>	<b>0,057</b>
D28 3.2 (4)	3,8159	2,05228	0,538		
D28 3.1 (8)	2,65078	1,49387	0,564	<b>0,551</b>	<b>0,018</b>
D28 2.4 (4)	3,7145	1,74373	0,469		
D28 2.2 (4)	3,58055	1,81967	0,508	<b>0,489</b>	<b>0,027</b>
D28 1.3 (7)	4,18748	1,69504	0,405		
D28 1.1 (7)	2,76523	0,825783	0,299	<b>0,352</b>	<b>0,075</b>
D24 4.4 (8)	2,51864	0,777244	0,309		
D24 4.1 (7)	3,06418	1,28929	0,421		
D24 4.1 (3)	2,06305	0,728978	0,353	<b>0,361</b>	<b>0,056</b>
D24 3.5 (3)	2,70415	1,14121	0,422		
D24 3.3 (3)	3,67094	1,43453	0,391	<b>0,406</b>	<b>0,022</b>
D24 2.6 (7)	3,38789	1,58332	0,467		
D24 2.2 (5)	2,88174	1,36883	0,475	<b>0,471</b>	<b>0,005</b>
D24 1.6 (4)	3,29385	1,26186	0,383		
D24 1.5 (3)	3,02779	1,03487	0,342	<b>0,362</b>	<b>0,029</b>
D17 4.6 (3)	2,49128	0,535062	0,215		
D17 4.5 (3)	1,8783	0,286942	0,153	<b>0,184</b>	<b>0,044</b>
D17 3.5 (8)	2,08264	0,425866	0,204		
D17 3.6 (4)	2,96631	0,37937	0,128	<b>0,166</b>	<b>0,054</b>
D17 2.4 (3)	1,32458	0,206696	0,156		
D17 2.5 (3)	2,01968	0,23489	0,116	<b>0,136</b>	<b>0,028</b>
D17 1.6 (1)	0,908823	0,0830296	0,091		
D17 1.4 (7)	1,77007	0,1440345	0,081	<b>0,086</b>	<b>0,007</b>

## sGAG MÄÄRITYKSEN TULOKSET

D17	sGAG pitoisuus (µg/ml)	DNA määrä (µg/ml)	sGAG korjattu (µg/ml)	Keskiarvo	Keskihajonta
1.1	4,68	70,95	0,066		
1.2	6,60	50,12	0,132	<b>0,077</b>	0,050
1.3	2,10	63,26	0,033		
2.1	5,85	71,50	0,082		
2.2	7,69	75,22	0,102	<b>0,083</b>	0,018
2.3	4,17	63,91	0,065		
3.1	5,74	62,67	0,092		
3.2	6,18	73,71	0,084	<b>0,083</b>	0,008
3.3	6,42	85,69	0,075		
4.1	4,78	61,76	0,077		
4.2	2,95	88,69	0,033	<b>0,061</b>	0,024
4.3	6,64	91,77	0,072		
D24	sGAG pitoisuus (µg/ml)	DNA määrä (µg/ml)	sGAG korjattu (µg/ml)	Keskiarvo	Keskihajonta
1.1	16,27	69,45	0,234		
1.2	13,79	63,44	0,217	<b>0,228</b>	0,009
1.3	13,62	58,86	0,231		
2.1	18,27	56,97	0,321		
2.3	17,66	46,44	0,380	<b>0,34</b>	0,034
2.4	17,34	53,56	0,324		
3.1	20,02	53,39	0,375		
3.4	16,27	53,92	0,302	<b>0,44</b>	0,179
3.6	26,61	41,52	<b>0,641</b>		
4.2	17,65	68,31	0,258		
4.3	18,42	55,32	0,333	<b>0,34</b>	0,080
4.6	18,27	43,67	0,418		
D28	sGAG pitoisuus (µg/ml)	DNA määrä (µg/ml)	sGAG korjattu (µg/ml)	Keskiarvo	Keskihajonta
1.4	11,95	39,63	0,302		
1.5	15,22	47,48	0,321	<b>0,34</b>	0,051
1.6	18,11	45,58	0,397		
2.3	18,27	30,69	0,595		
2.5	17,80	40,22	0,443	<b>0,50</b>	0,084
2.6	21,82	47,48	0,460		
3.4	20,83	50,09	0,416		
3.5	22,38	52,02	0,430	<b>0,40</b>	0,040
3.6	19,70	55,45	0,355		
4.4	25,57	89,23	0,287		
4.5	19,86	61,12	0,325	<b>0,35</b>	0,075
4.6	21,48	49,75	0,432		