

3D-tulostetun nikkeliivapaan metallin vaikutukset osteoblasteihin *in vitro*

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Teknillinen tiedekunta
Bioteknologian laitos
Molekyylibiotieteet, solubiologia
05/2024
Vilma Tupala

FT, Dos. Terhi Heino
Biolääketieteen laitos
Turun yliopisto

FM Karoliina Kajander
Biolääketieteen laitos
Turun yliopisto

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

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

TUPALA, VILMA: 3D-tulostetun nikkeli vapaan metallin vaikutukset osteoblasteihin *in vitro*

Pro gradu -tutkielma, 47 s.

Molekyylibiologia, solubiologia

Toukokuu 2024

Osteoblastit ovat mesenkymaalisista kantasoluista peräisin olevia luuta muodostavia soluja. Luiden kasvun ja luun uudelleenmuodostumisen aikana ne vastaavat luukudoksen muodostumisesta ja mineralisaatiosta. Ikääntyessä kantasolujen määrä laskee ja niiden erilaistumiskapasiteetti heikkenee, minkä seurauksena luun uusiutumiskyky alenee. Tällöin luumassa vähenee, eivätkä esimerkiksi murtumat parane yhtä tehokkaasti.

Biomateriaalit ovat synteettisiä tai biologista alkuperää olevia materiaaleja, joilla pyritään korjaamaan vaurioitunutta kudosta ja palauttamaan sen toiminta ennalleen. Biomateriaaleja, kuten erilaisia metalleja, voidaan käyttää implanttien valmistamisessa, kun tavoitteena on palauttaa kudoksen tai elimen normaali anatominen rakenne. Metallin 3D-tulostaminen on uusi menetelmä, joka mahdollistaa potilaskohtaisten implanttien valmistamisen. Metalliseoksissa usein käytetty nikkeli aiheuttaa kuitenkin ongelmia, sillä se on yleinen kosketusallergian aiheuttaja ja voi myös mahdollisesti aiheuttaa syöpää.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin 3D-tulostetun nikkeli vapaan metallin, PANACEAn, vaikutusta osteoblasteihin. Tavoitteena oli arvioida sen mahdollista käyttöä tulevaisuudessa implanttimateriaalina. Tutkimuksessa materiaaleina käytettiin nikkeli vapaa metallia (PANACEA) ja kontrollimateriaalina nikkeliä sisältävää metallia 316 SS. Tutkimuksessa tarkasteltiin sitä, miten metallit vaikuttavat osteoblastien viabiliteettiin ja erilaistumiseen. Tämän selvittämiseksi hiirestä eristetyn osteoblastisen solulinjan soluja viljeltiin 3D-tulostettujen metallipalojen päällä. Solujen viabiliteettiä mitattiin AlamarBlue reagenssilla ja metallien vaikutusta osteoblastien erilaistumiseen tutkittiin värjäämällä solut niiden erilaistumisesta kertovan alkalisen fosfaatin suhteen.

Tutkimuksessa havaittiin, että solujen kasvu metallien päällä oli heikkoa, verrattuna solujen kasvuun soluviljelymuovilla. Nikkeli vapaan PANACEAn päällä solut kasvoivat paremmin verrattuna metalliin 316 SS, mutta metallien välinen ero oli pieni. Näin selkeitä eroja ei nähty mitattaessa solujen erilaistumista. Havaittiin, että ne solut, jotka olivat saaneet kasvaa ilman metalleja, erilaistuivat paremmin, mutta erilaistumista oli selkeästi havaittavissa myös metallien päällä kasvaneilla soluilla.

Avainsanat: osteoblasti, biomateriaali, PANACEA, 3D-tulostus, viabiliteetti

Sisällys

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 1.1 | Luun rakenne ja toiminta | 1 |
| 1.1.1 | Luusolut | 2 |
| 1.1.2 | Luun soluväliaine | 5 |
| 1.1.3 | Luun muodostuminen | 6 |
| 1.2 | Ongelmat luun uusiutumisessa | 7 |
| 1.3 | Biomateriaalit | 7 |
| 1.3.1 | Biomateriaalien 3D-tulostaminen | 9 |
| 1.3.2 | Biomateriaalien tutkiminen..... | 10 |
| 1.4 | Tutkimuksen tavoite | 12 |
| 2 | Materiaalit ja menetelmät | 13 |
| 2.1 | Materiaalien käsittely | 13 |
| 2.2 | Osteoblastien kasvatus ja ylläpito | 14 |
| 2.3 | Solujen viabiliteettimittaus | 15 |
| 2.3.1 | Standardisuoran tekeminen solutiheyden määrittystä varten..... | 15 |
| 2.3.2 | Solujen viabiliteetti PANACEAn ja 316 SS:n läsnä ollessa | 16 |
| 2.4 | Osteoblastien erilaistumisen tutkiminen | 17 |
| 2.4.1 | MC3T3-E1 solujen erilaistaminen osteoblasteiksi | 17 |
| 2.4.2 | Alkalisen fosfataasin (ALP) aktiivisuuden mittaus | 18 |
| 2.4.3 | Bradfordi-proteiinimääritys | 18 |
| 2.4.4 | Solujen värjäys alkalisen fosfataasin (ALP) suhteen..... | 19 |
| 2.4.5 | Von Kossa värjäys | 19 |
| 2.4.6 | Metallien vaikutus osteoblastien erilaistumiseen | 19 |
| 2.5 | Tulosten tilastollinen tarkastelu | 20 |
| 3 | Tulokset | 21 |
| 3.1 | Solujen viabiliteetti | 21 |
| 3.2 | Osteoblastien erilaistuminen | 26 |
| 3.2.1 | Osteoblastien ALP-aktiivisuus ilman metalleja..... | 26 |
| 3.2.2 | Osteoblastien erilaistuminen metallien kanssa | 30 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4 | Tulosten tarkastelu | 33 |
| 4.1 | PANACEA vaikutti negatiivisesti osteoblastien viabiliteettiin | 33 |
| 4.2 | Metallit eivät vaikuttaneet solujen erilaistumiseen..... | 36 |
| 4.3 | Deksametasonilla ei ollut vaikutusta solujen erilaistumiseen | 37 |
| 4.4 | Työn jatkotutkimukset | 37 |
| 5 | Yhteenveto | 40 |
| 6 | Kiitokset..... | 41 |
| 7 | Kirjallisuus | 42 |

LYHENTEET

| | |
|----------|--|
| 316 SS | Nikkeliä sisältävä ruostumaton metalli |
| 3D | Kolmiulotteinen (<i>engl.</i> Three dimensional) |
| ALP | Alkalinen fosfataasi (<i>engl.</i> Alkaline phosphatase) |
| ANOVA | Varianssianalyysi (<i>engl.</i> Analysis of variance) |
| BSA | Naudan seerumin albumiini (<i>engl.</i> Bovine serum albumin) |
| EN ISO | Euroopan standardijärjestön määrittämä standardi, joka on hyväksytty kansainväliseksi ISO-standardiksi. |
| FBS | Naudan sikiön seerumi (<i>engl.</i> Fetal bovine serum) |
| MC3T3-E1 | Hiiren kallon luusta eristetty osteoblasti-solulinja |
| M-CSF | Makrofagipesäkkeitä stimuloiva tekijä (<i>engl.</i> Macrophage colony-stimulating factor) |
| MEM | Soluviljelymedium (<i>engl.</i> Minimal essential medium) |
| OB | Osteogeeninen medium |
| OB+D | Osteogeeninen medium deksametasonin kanssa |
| OPG | Osteoprotegeriini |
| p558 | Nikkelivapaa ruostumaton metalli |
| PANACEA | p558 metalleihin kuuluva ruostumaton nikkeli vapaa metalli (<i>engl.</i> protection against nickel allergy, corrosion, erosion, and abrasion) |
| PBF-LB/M | Jauhepetisulatus (<i>engl.</i> Laser Powder Bed Fusion Process for Metals) |
| PBS | Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline) |
| PFA | Paraformaldehydi (<i>engl.</i> Paraformaldehyde) |
| pNPP | P-nitrofenyyli fosfaatti heksahydraatti dinatrium suola (<i>engl.</i> p-Nitrophenyl phosphate disodium hexahydrate) |
| px | Pikseli (<i>engl.</i> Pixel) |
| RANK | Receptor activator of nuclear factor- κ B |
| RUNX | Transkriptiotekijä (<i>engl.</i> Runt-related transcription factor) |
| SEM | Pyyhkäisyelektronimikroskooppi (<i>engl.</i> Scanning Electron Microscope) |
| TEM | Läpäisyelektronimikroskooppi (<i>engl.</i> Transmission Electron Microscope) |
| XRD | Röntgendiffraktio (<i>engl.</i> X-ray diffraction) |

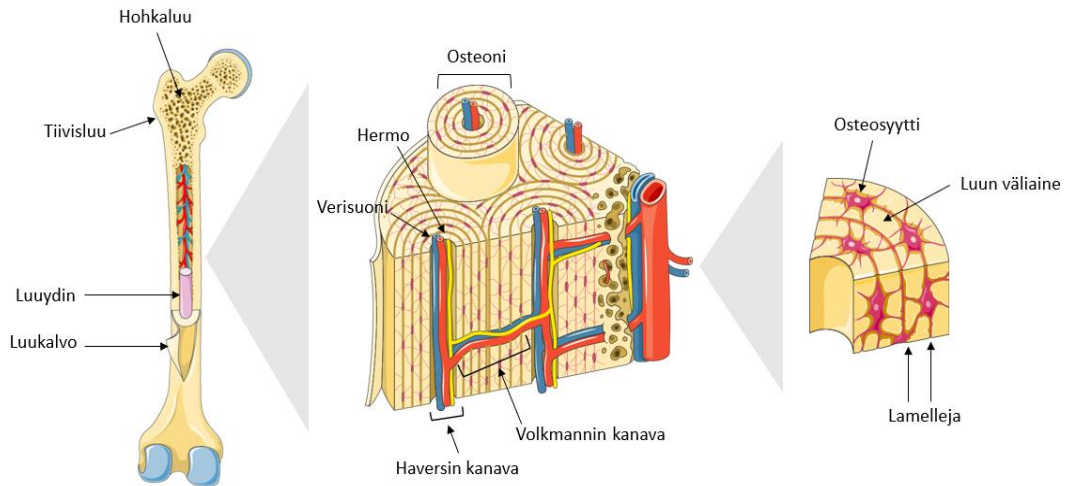
1 Johdanto

1.1 Luun rakenne ja toiminta

Aikuisen ihmisen luuranko muodostuu yli 200 luusta. Luusto voidaan jakaa aksiaaliseen luurankoon ja appendikulaariseen luurankoon. Kallo, selkäranka, kylkiluut ja rintalasta ovat osa aksiaalista luurankoa ja muut, esimerkiksi käsivarren ja jalan luut, ovat osa appendikulaarista luurankoa. (Parker, 2009.) Luut kiinnittyvät toisiinsa nivelillä tai rustokudoksella, jotka mahdollistavat raajojen sujuvan liikkumisen. Luut voidaan karkeasti jakaa pitkiin, lyhyisiin, litteisiin, epäsäännöllisiin ja jänneluihin. (Khurana, 2009.) Pitkiä luita kutsutaan myös putkiluiksi, sillä ne muodostuvat pitkästä putkesta, jonka päässä on hohkaluusta muodostunut paksu pää. Putkiluita ovat esimerkiksi reisiluu ja sääriluu. (Parker, 2009.) Lyhyitä luita esiintyy esimerkiksi ranteessa ja niille tyypillistä on niiden kuutiomainen muoto. Luun kuutiomainen muoto mahdollistaa ranteen notkean ja tarkkaliikkeisen liikkumisen. Lyhyiden luiden alatyypinä pidetään jänneluita, jotka ovat janteen sisällä olevia irtonaisia luita. Esimerkki jänneluusta on polvilumpio. (Khurana, 2009.) Litteät luut ovat nimensä mukaisesti litteitä, ja niillä on suuri pinta-ala lihasten kiinnittymistä varten. Litteiden luiden tehtävänä on suojata elimistöä. Esimerkiksi kallon luut ovat laakeita ja litteitä, ja ne suojaavat aivoja. (Parker, 2009.) Epäsäännölliset luut omaavat monimutkaisemman rakenteen. Epäsäännöllisiä luita ovat esimerkiksi lapaluut. (Khurana, 2009.)

Luu muodostuu kahdesta eri luutyypistä, hohkaluusta ja tiivisluusta. Luusta noin 80 % on tiivisluuta ja 20 % hohkaluuta. Hohkaluun ja tiivisluun määrä riippuu luutyypistä. Tiivisluu muodostaa luun uloimman kerroksen. Se on lujaa ja kestävä, koska se on rakenteeltaan tiheämpää kuin hohkaluu, eikä sisällä hohkaluulle tyypillisiä onteloita. Tiivisluun muodostavat rengasmaiset osteonit, jotka rakentuvat tiiviisti pakkautuneista kerroksittaisista lamelleista (kuva 1). Osteonit muodostavat luun keskelle kanavan, jota pitkin verisuonet ja hermot kulkevat. Kanavaa kutsutaan Haversin kanavaksi. Lamelleja lävistävät Volkmannin kanavat, joiden kautta osteonit ovat yhteydessä toisiinsa. Tiivisluu ympäröi hohkaluuta eli hohkaluu muodostaa solun sisäosan. Se on rakenteeltaan huokoisempaa ja sen rakenteessa voidaan nähdä onteloita, toisin kuin tiivisluussa. Tämä tekee hohkaluusta heiveröisemmän. (Khurana, 2009.) Rakenteeltaan molemmat luutyypit rakentuvat samoista aineksista, mutta rakennusmateriaalien erilainen järjestäytyminen luussa tekee niistä erilaiset ominaisuuksiltaan. Tiivisluu on vahvempi ja kestää

raskaampaa kuormitusta. Hohkaluu ei kestä voimakasta kuormitusta, mutta on joustavampaa. Nämä tekijät tekevät luusta hyvin monipuolisen kudoksen. (Lin & Kang, 2021.)



Kuva 1. Luun rakenne. Luu on osteoblastien muodostamaa vahvaa tukikudosta, joka muodostuu hohkaluusta ja tiivisluusta. Hohkaluu muodostaa pinta-alaltaan suurimman osan luusta ja on rakenteeltaan pesusienimäinen. Tiivisluu muodostuu osteoneista, joiden keskellä kulkevat Haversin kanavat. Haversin kanavien kautta verisuonet pystyvät kuljettamaan sekä happea että ravinteita luustoon. Luussa poikittain kulkevat Volkmannin kanavat mahdollistavat osteonien välisen yhteyden. Osteonit muodostuvat lamelleista sekä soluväliaineesta ja sinne jääneistä osteoblasteista, jotka ovat erilaistuneet osteosyyteiksi. (Kuva tehty Servier medical art).

1.1.1 Luusolut

Luu muodostuu luukudoksesta ja luukudos erilaisista luusoluista sekä soluväliaineesta. Luun korjaamiseen ja ylläpitoon osallistuvat neljä luusolutyyppiä, joista jokaisella on oma tehtävänsä ja morfologinen muotonsa. Luusolut jaetaan osteoblasteihin, osteoklasteihin, osteosyytteihin ja luun pintasoluihin. (Mizoguchi & Ono, 2021.)

Jotta luut pysyvät vahvoina ja säilyttävät mekaaniset ominaisuutensa, luiden tarvitsee uusitua koko ajan. Luu uusiutuu jatkuvasti osteoblastien ja osteoklastien toimesta. Osteoklastit hajottavat vanhaa luuta samalla kun osteoblastit rakentavat uutta luuta. Biokemialliset ja mekaaniset tekijät säätelevät luun hajotusta ja uudelleenmuodostumista. Mikäli signaalinvälityksessä ilmenee ongelmia, luusolut eivät pysty toimimaan normaalisti. Tämä saattaa johtaa luun heikompaan uusiutumiseen, jolloin tuloksena voi olla hauraampi luumassa ja sen aiheuttama luusairaus, kuten osteoporoosi. (Lin & Kang, 2021.)

Osteoblastit

Osteoblastit ovat mesenkymaalisisista kantasoluista peräisin olevia luuta muodostavia soluja. Osteoblastit vastaavat luun soluväliaineen muodostamisesta ja sen mineralisaatiosta. (Florencio-Silva ym., 2015.) Mesenkymaalisten kantasolujen erilaistuminen osteoblasteiksi tapahtuu useiden välivaiheiden kautta ja monien säätelytekijöiden säätelämänä. Mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat pre-osteoblasteista soluväliainetta muodostaviksi osteoblasteiksi, joista erilaistuvat edelleen vielä osteosyyteiksi tai luun pintasoluiksi (kuva 2). Pre-osteoblastit ovat luusoluja, jotka esiintyvät kantasolujen erilaistumisprosessin välivaiheessa, kantasolujen erilaistuessa kypsiksi luuta muodostaviksi osteoblasteiksi. (Florencio-Silva ym., 2015.) Osteoblastien erilaistumiseen osallistuu välttämätön transkriptiotekijä RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*). Se säätelee esimerkiksi RANK-ligandin (*receptor activator of NF kappa B ligand*), tyypin 1 kollageenin ja alkalisen fosfataasin ekspressiota. RANK-ligandi ohjaa luuta hajottavien osteoklastien erilaistumista, kun taas tyypin 1 kollageeni ja alkalinen fosfataasi ovat osa osteoblastien tuottamaa soluväliainetta. (Ponzetti & Rucci, 2021; Salhotra ym., 2020.) Alkalista fosfataasia voidaan pitää osteoblasteiksi erilaistuneiden kantasolujen merkkiaineena, sillä alkalinen fosfataasi on osteoblastien tuottama entsyymi, jota tarvitaan luun mineralisaatiossa. Tutkimuksessa alkalista fosfataasia käytetään merkkiaineena tutkittaessa osteoblastien erilaistumista. (Salhotra ym., 2020.)

Osteosyytit

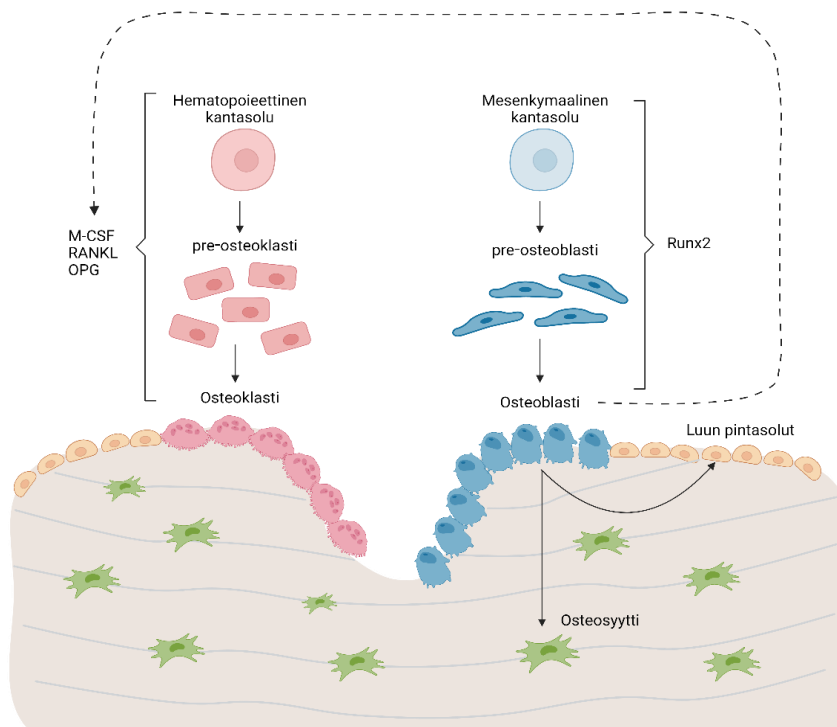
Elinkaarensa lopussa pieni osa osteoblasteista erilaistuu osteosyyteiksi (Kuva 2). Osteosyytit ovat pitkäikäisiä soluja ja niitä kertyy luustoon sen kasvun ja uudelleenmuodostumisen aikana. Osteosyyttien määrä on moninkertainen verrattuna osteoblastien määrään. Kaiken kaikkiaan yli 90 % aikuisen ihmisen luusoluista on osteosyyttejä. Osteosyytit muodostuvat osteoblasteista, jotka ovat jääneet soluväliaineeseen. (Florencio-Silva ym., 2015.) Ollessaan mineralisoituneessa soluväliaineessa, osteosyytit järjestäytyvät osaksi osteonia ja muodostavat verkoston, jonka kautta ne ovat yhteydessä toisiinsa. Verkoston kautta ne pystyvät ohjaamaan myös muiden luusolujen toimintaa. (Khurana, 2009.)

Osteoklastit

Osteoklastit eli luunsyöjäsolut erilaistuvat hematopoieettisista kantasoluista ja niiden päätehtävänä on hajottaa luun soluväliainetta (kuva 2) (Florencio-Silva ym., 2015). Osteoklastien erilaistumista ohjaavat etenkin osteoblastien erittämät M-CSF kasvutekijä (*macrophage colony-stimulating factor*) sekä RANK-ligandi (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*). Kun RANK-ligandi sitoutuu RANK-reseptoriin, jota sekä osteoklastien kantasolut, että kypsät kantasolut ilmentävät, johtaa se osteoklastien kantasolujen fuusioitumiseen ja niiden erilaistumiseen kypsiksi osteoklasteiksi. Tämä prosessi on riippuvainen myös M-CSF kasvutekijästä. (Florencio-Silva ym., 2015.) Osteoblastit pystyvät estämään osteoklastien erilaistumisen, sillä ne tuottavat osteoprotegeriiniä (OPG), joka on liukoinen ns. syöttireseptori. Osteoprotegeriini voi sitoutua RANK-ligandiin, ja siten estää sen sitoutumisen RANK-reseptoriinsa, jolloin osteoklastien erilaistuminen estyy. (Aubin & Bonnelye, 2000.)

Luun pintasolut

Osteoblastit voivat erilaistua luun pintasoluiksi, jotka ovat lepotilassa olevia luun soluja. Pintasolut ovat muodoltaan litteitä ja muodostavat luun uloimman kerroksen, jossa ei tapahdu luun hajoamista eikä uudelleenkasvua. Koska luun pintasolut ovat inaktiivisessa tilassa, niillä on myös vähemmän organelleja ja sytoplasmaa kuin osteoblasteilla. (Downey & Siegel, 2006.) Luun pintasolujen tehtävää luun rakenteessa ei kuitenkaan vielä täysin tunneta ja niillä uskotaan olevan tärkeä merkitys luun metaboliassa siitä huolimatta, että ne ovat inaktiivisia luusoluja. (Florencio-Silva ym., 2015.)



Kuva 2. Luusolut. Luu muodostuu luusoluista, joita ovat osteoblastit, osteoklastit ja osteosyytit. Osteoblastit ovat mesenkymaalisisistä kantasoluista peräisin olevia luuta muodostavia soluja. Osteoblastit voivat erilaistua luun pintasoluiksi tai osteosyyteiksi jäädessään soluväliaineeseen. Osteoklastit ovat hematopoeettisista kantasoluista erilaistuneita luusoluja, joiden tehtävänä on hajottaa luuta. Osteoblastit pystyvät säätelemään osteoklastien toimintaa esimerkiksi erilaisten kasvutekijöiden avulla. Täten osteoblastien viallinen toiminta voi vaikuttaa myös osteoklastien erilaistumiseen ja olla syynä luuston sairauksille. (Kuva tehty Biorender:illa. Muokattu kohteesta Alghazali ym., 2015).

1.1.2 Luun soluväliaine

Luusolujen väliin jäävää tilaa kutsutaan luun soluväliaineeksi (*engl.* extracellular matrix, ECM), jota on noin 90% koko luun painosta ja vain noin 10% muodostuu luusoluista ja esimerkiksi verisuonista (Downey & Siegel, 2006). Luun soluväliaine on osteoblastien tuottamaa ja koostuu epäorgaanisista ja orgaanisista komponenteista. Luun soluväliaineesta 60 % on epäorgaanista ainesta eli mineraalia ja loput 40 % orgaanista ainesta, kuten kollageenia. (Fontcuberta-Rigo ym., 2023.) Soluväliaineen epäorgaanisen aineksen mineraaleista yleisin on hydroksiapatiitti ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Hydroksiapatiitti on kalsiumfosfaattipohjainen mineraali, jota esiintyy luussa kiteisessä muodossa kollageenisäikeiden seassa. Luuston orgaaninen osa koostuu lähes kokonaan kollageenista, joista tärkein on tyypin I kollageeni. Tyypin I kollageeni on säikeistä ja mahdollistaa luulle hyvän vetolujuuden. Kollageenin lisäksi luun orgaaninen aines sisältää monia ei-kollageenisia proteiineja, kuten osteokalsiinia, osteopontiinia ja

osteonektiinia. Orgaanisen osan proteiinit vastaavat luun homeostasian ylläpidosta sekä luun vahvasta rakenteesta. Hydroksiapatiitti, kollageeniset sekä ei-kollageeniset proteiinit yhdessä mahdollistavat luulle tyypillisen kestävä ja jäykän rakenteen. (Florencio-Silva ym., 2015; Fontcuberta-Rigo ym., 2023.)

1.1.3 Luun muodostuminen

Aksiaalisen luuston ja appendikulaarisen raajojen luuston muodostumiseen on kaksi eri tapaa, joista toinen on endokondraalinen eli välillinen luun muodostuminen ja toinen intramembraaninen eli välitön luun muodostuminen. Endokondraalisessa luun muodostuksessa luu muodostuu rustoisen mallin kautta, kun taas intramembraanisessa muodostuksessa luu muodostuu suoraan alkiokautisesta sidekudoksesta eli mesenkyymistä. (Galea ym., 2021; Ihde ym., 2011.)

Erityisesti litteät luut, kuten kallon luut, muodostuvat intramembraanisesti ilman rustoista mallia. Luun muodostuminen alkaa mesenkymaalisisista kantasoluista erilaistuneiden esiastesolujen kertymisellä paikkaan, johon uusi luu muodostuu. Esiastesolut erilaistuvat suoraan luuta muodostaviksi osteoblasteiksi, jotka aloittavat aktiivisesti luukudoksen muodostamisen monien eri säätelytekijöiden ohjaamana. (Galea ym., 2021; Ihde ym., 2011.)

Suurin osa luista, esimerkiksi raajojen pitkät luut, muodostuvat endokondraalisen luutumisen kautta, jossa muodostetaan ensin rustokudosta, joka myöhemmin korvataan luukudoksella. Endokondraalinen luun muodostuminen voidaan jakaa viiteen eri vaiheeseen. (Bernhard ym., 2022; Khurana, 2009). Ensimmäisessä vaiheessa mesenkymaaliset kantasolut aloittavat erilaistumisen rustosoluiksi transkriptiotekijöiden, kuten Pax-1 proteiinin säätelämänä. Seuraavassa vaiheessa mesenkymaaliset kantasolut jatkavat erilaistumistaan kondrosyyteiksi eli rustosoluiksi. Kondrosyytit vastaavat ruston rakenteen ylläpidosta ja toiminnasta. Kolmannessa vaiheessa kondrosyytit jakautuvat ja samalla erittävät soluväliainetta. Jakautumisen aikana ne muodostavat rustoisen mallin, joka myöhemmin korvataan varsinaisella luulla. Neljännessä vaiheessa kondrosyyttien jakautuminen loppuu ja ne muuttuvat hypertrofisiksi. Samalla ruston väliaine kalsifioituu. Hypertrofiset kondrosyytit syntetisoivat suuria määriä tärkeitä soluväliaineen proteiineja kuten tyypin X kollageenia ja fibronektiiniä. Viimeisessä vaiheessa hypertrofiset kondrosyytit kuolevat apoptoottisesti ja ne antavat tilaa mesenkymaalisille kantasoluille,

jotka erilaistuttuaan osteoblasteiksi aloittavat luun muodostamisen. (Bernhard ym., 2022; Khurana, 2009.)

1.2 Ongelmat luun uusiutumisessa

Osteoblasteja erilaistuu jatkuvasti lisää kantasoluista ja sen myötä luun oma uusiutumiskyky on hyvä. Kuitenkin ikääntyessä kantasolujen määrä ja erilaistumiskapasiteetti heikkenevät, minkä seurauksena luun uusiutumiskyky alenee. Vanhetessa luumassaa häviää, joka väistämättä heikentää luun vahvuutta. (Mullender ym., 1996.) Naisilla luukato on nopeampaa kuin miehillä, koska vaihdevuosien jälkeen osteoklastien aktiivisuus on voimakkaampaa kuin osteoblastien. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että estrogeeni eli naishormoni estää osteoblastien ja osteosyyttien apoptoosia ja luun liiallista hajoamista. Vaihdevuosien aikana estrogeenitaso kuitenkin laskee, jolloin osteoblastien ja osteosyyttien määrä vähenee apoptoosin myötä. Uutta luuta ei ehditä muodostamaan yhtä nopeasti kuin vanhaa luuta hajoaa, mikä johtaa luiden haurastumiseen. (Florencio-Silva ym., 2015.) Vanhenemisen lisäksi luupuutokseen vaikuttavia tekijöitä ovat useat sairaudet, kuten syöpä, luutulehdus eli osteomyeliitti ja luukato eli osteoporoosi. Osteoporoosi on tunnetuin luusairaus, jossa luun ulkokuori eli tiivisluu ohenee samalla kun hohkaluussa olevat välit kasvavat entisestään, jolloin luut haurastuvat. Vauriot luussa voidaan korjata esimerkiksi luusiirteillä, jotka saattavat olla vainajalta saatua luukudosta tai keinotekoisista luusiirreainesta. Kudosteknologiassa puolestaan käytetään ihmisen omia kantasoluja ja biomateriaaleja luunkaltaisen rakenteen aikaansaamiseksi. (Gao ym., 2017; Lazner ym., 1999.)

1.3 Biomateriaalit

Erytisesti vanhemmat ihmiset ovat alttiita ortopedisille sairauksille ja murtumille. Muutokset työelämässä ja elintavoissa ovat kuitenkin lisänneet osteoporoosia myös nuoremmilla ihmisillä. Lisääntyvien sairauksien myötä tarve luiden korjaamiseen ja sairauksien hoitamiseen lisääntyy. Biomateriaalien avulla voidaan valmistaa luuta korjaavia ortopedisiä implantteja. (Meng ym., 2023.) Implantit, kuten levyt ja ruuvit, valmistetaan usein biomateriaaleista. Biomateriaalit ovat synteettistä tai biologista alkuperää olevia materiaaleja, joita käytetään erityisesti hammaslääketieteessä. (Gao ym., 2017.) Biomateriaalien käytöllä pystytään välttämään suurempien luusiirteiden tekeminen. Niiden käytön tarkoituksena on pyrkiä palauttamaan vaurioituneen kudoksen tai elimen toiminta ennalleen. Biomateriaalista valmistetut implantit voivat toimia

tukirakenteena, kudoksen korvaajana tai tehostaa uudelleen kasvavan luun toimintaa. Biomateriaalille ja siitä valmistetulle implantille on vaatimuksia, jotta sitä voidaan käyttää halutussa paikassa. Implantin muodon tulee vastata puutosalueen muotoa ja kokoa ja sen tulee olla tarpeeksi vahva. Esimerkiksi lonkan tekonivelen täytyy kestää sen päälle asettuvan kehon paino. (Gao ym., 2017.)

Eniten käytettyjä biomateriaaleja ovat metallit, mutta tietyissä puutoksissa käytetään myös keraameja, muoveja tai biologista alkuperää olevia materiaaleja riippuen siitä, mihin käyttötarkoitukseen ne tulevat. Metalleja käytetään usein korvaamaan suuria puutoksia, koska ne ovat vahvoja ja kestäviä. Pienissä puutoksissa epäorgaaniset keraamit ovat paljon käytettyjä. Esimerkiksi keraameja ja bioaktiivista lasia käytetään pienten ja kantamattomien luiden onteloiden täyttämiseen, koska ne eivät kestä kuormitusta. Vaadittavat ominaisuudet liittyvät siis hyvin paljon kuormituksenkestoon. (Gao ym., 2017.)

Titaani on yleisimmin käytetty biomateriaali ortopedisissä implanteissa. Titaanilla on hyvä korroosionkestävyys, se on metallina hyvin kevyttä ja sillä on hyvät mekaaniskemialliset ominaisuudet. Lisäksi titaani harvoin aiheuttaa allergisia reaktioita elimistössä. Titaani on kuitenkin kova ja jäykkä metalli, mikä aiheuttaa ongelmia sitä muotoiltaessa. Lisäksi se on herkkä kulumaan. Kun titaania käytetään materiaalina esimerkiksi tekonivelessä, siitä saattaa helposti irrota kulumisen ja implantin liikkumisen seurauksena metallihiukkasia elimistöön. Ruostumaton teräs sen sijaan on materiaalina vahvempaa eikä kulu niin helposti. (Huzum ym., 2021; Kaur & Singh, 2019.) Yksi käytetyimmistä ruostumattomista teräksistä implanteissa on 316 SS (*stainless steel*), mikä sisältää suurimmaksi osaksi kromia, nikkeliä ja molybdeeniä (Cr-Ni-Mo). 316 SS on helposti käsiteltävä metalli ja se on hyvin korroosionkestävä. (Sandmeyer Steel Company, 2014.) Lisäksi sillä on suhteellisen hyvä bioyhteensopivuus (Huzum ym., 2021). 316 SS-metallia käytetään lääketieteessä esimerkiksi ruuveissa, mutta lääketieteen lisäksi myös muissa tarkoituksissa kuten koruissa ja kellojen valmistuksessa. (Yang & Ren, 2010.) Verrattuna titaaniin, ruostumaton teräs on myös hyvin halpa metalli. Suurimmat ongelmat ruostumattomien terästen käytössä on niiden jäykkyys ja kyky vastustaa muodon muutosta. Tämä aiheuttaa ongelmia materiaalin työstämisessä. Monien ruostumattomien terästen ongelmana on myös niistä vapautuvat metalli-ionit, kuten nikkeli. (Huzum ym., 2021.) Nikkeli on hyvin yleinen kosketusallergian aiheuttaja ja aiheuttaa mahdollisesti myös syöpää. Tästä huolimatta, ruostumatonta terästä haluttaisiin käyttää jatkossakin implanteissa, joten on luonnollista kehittää lääketieteellisiin

sovelluksiin perinteisten ruostumattomien terästen, kuten 316 SS:n, tilalle nikkelittömiä teräksiä. Yksi esimerkki nikkelivapaasta ruostumattomasta teräksestä on p558-metalleihin kuuluva PANACEA (*protection against nickel allergy, corrosion, erosion, and abrasion*). Se on hyvin korroosionkestävä ja sillä on hyvät mekaaniset ominaisuudet. (Genchi ym., 2020; Thomann & Uggowitzer, 2000.)

1.3.1 Biomateriaalien 3D-tulostaminen

Jo pitkään eri teollisuuden aloilla on käytetty 3D-tulostusta. Tulostamalla on mahdollista tuottaa monia eri materiaaleja kuten muovia, metallia, keraameja sekä lasia. (Tappa & Jammalamadaka, 2018.) Teollisuudessa tulostamista on käytetty esimerkiksi pakkausten valmistamiseen. 3D-tulostaminen on vähitellen tullut myös osaksi lääketiedettä ja lääketieteellisuutta. Lääketieteessä 3D-tulostamista voidaan käyttää ortopedisten implanttien valmistamiseen, jotka tällä hetkellä valmistetaan koneistamalla standardikokoisina. Perinteisistä valmistusmenetelmistä puuttuvat monimutkaisten mallien vaatima tarkkuus ja biolääketieteellisissä implanteissa ratkaisevat yksilölliset ominaisuudet. 3D-tulostaminen mahdollistaisi pientenkin yksityiskohtien tekemisen implanttiin, sillä sen valmistustarkkuus ja muodon hallinta perustuu koneella piirrettyyn kolmiulotteiseen muotoon. Jokaiselle luutyypille voitaisiin tehdä juuri sitä vastaava kopio. Tämä mahdollistaisi kullekin potilaalle räätälöidyn implantin valmistamisen ja samalla vähentäisi niiden korjaamisen ja uusimisen tarvetta. (Tappa & Jammalamadaka, 2018.)

Ongelmana tällä hetkellä implanteissa on niiden materiaali, joka on usein metallia. Metallia on luuhun verrattuna jäykempää eikä joustava kuten luu. Tämän takia implantti rasittaa ympärillä olevaa luukudosta. 3D-tulostaminen mahdollistaa huokoisemman rakenteen muodostamisen. 3D-tulostimella pystytään säätämään ortopedisen implantin huokoisuutta niin, että se on haluttuun paikkaan tarpeeksi vahva, mutta samalla myös tarpeeksi joustava. Huokoisesta materiaalista valmistettu implantti mahdollistaa kudoksen paremman tarttuvuuden siihen. Implantin huokoinen rakenne mahdollistaa myös hermojen ja verisuonten uudelleenkasvun implanttiin. 3D-tulostettuja implanteja voidaan jatkossa hyödyntää monissa ortopedisissä toimenpiteissä, kuten heiveröisen lonkan tai polven luun uusimisessa. (Meng ym., 2023; Wu ym., 2023.)

Sen lisäksi, että 3D-tulostamalla saadaan jokaiselle potilaalle räätälöity implantti, 3D-tulostetun implantin käyttäminen on nopeampaa verrattuna koneistamalla valmistettuun

implanttiin. 3D-tulostamisessa implantin suunnitteleminen ja piirtäminen vie aikaa, mutta koska se on suunniteltu oikean muotoiseksi ja kokoiseksi se voidaan leikkauksessa asentaa suoraan paikoilleen. Koneistamalla valmistettua implanttia tulee jatkokäsittellä esimerkiksi hiomalla sitä, jotta se saadaan oikeanlaiseksi haluttuun paikkaan. Tulostaminen on myös kustannustehokkaampi menetelmä implanttien valmistamiseen kuin perinteinen valmistusmenetelmä. (Attaran, 2017; Attarilar ym., 2021.) Tulostaminen ei vaadi isoa laitteistoa ja lisäksi se koostuu hyvin yksinkertaisista osista. Tulostaminen vaatii tietokoneen ja siihen tarvittavan suunnitteluohjelman sekä tulostimen. Mittatilaustyönä tehtävä implanti piirretään suunnitteluohjelmalla oikeaan geometriseen muotoon hyvin suurella tarkkuudella, jonka jälkeen tulostin tulostaa sen kerros kerrokselta haluttuun muotoon. Tulostimella on mahdollista tulostaa useita eri materiaaleja ja lääketieteessä tulostettava biomateriaali valitaan sen käyttötarkoituksen mukaan. (Meng ym., 2023.)

3D-tulostusmenetelmiä on useita ja yksi yleisimmistä metallien tulostusmenetelmistä on jauhepetisulatus (*PBF-LB/M, Laser Powder Bed Fusion Process for Metals*). Tulostin käyttää mallina tietokoneella piirrettyä kuviota, jonka mukaan jauhelevitin levittää sulatettavaa jauhetta laitteen alustalle. Tulostimen lasersäteet tuottavat lämpöenergiaa, joka saa jauheen sulamaan. Jauhelevitin levittää uuden kerroksen, jonka lasersäteet taas sulattavat. Rakennelma rakennetaan kerros kerrokselta edellä kuvatulla menetelmällä. Sykliä jatketaan, kunnes rakennelma on saatu valmiiksi. (Nayak ym., 2024; Ul ym., 2023.)

1.3.2 Biomateriaalien tutkiminen

Jotta biomateriaaleja pystyttäisiin käyttämään lääketieteessä mahdollisimman tehokkaasti, niiden käyttöä on tutkittava lisää. Biomateriaalien välillä on paljon eroja ja niiden huolellinen ja kontrolloitu tutkiminen auttaa ymmärtämään niiden ominaisuuksien käyttäytymistä käyttökohteessaan. Biomateriaalien ominaisuudet kuten koostumus, kemiallinen rakenne, liukoisuus tai pinnan ominaisuudet vaihtelevat paljon biomateriaalien välillä (Omidi ym., 2017). Biomateriaaleja voidaan tutkia niin biologisin menetelmin kuin fysikaalisilla ja kemiallisilla menetelmillä. Biologiset menetelmät painottuvat biomateriaalien tutkintaan solujen kanssa, kun taas esimerkiksi fysikaaliset ja kemialliset menetelmät käyttävät spektroskopiaa ja mikroskopiaa biomateriaalin ja sen rakenteen tutkimiseen. Tutkimusmenetelmät valikoituvat usein sen mukaan, mitä biomateriaalia halutaan tutkia ja mihin sitä ollaan käyttämässä. (Omidi ym., 2017.)

Biomateriaalien tutkimisen kannalta on tärkeää tietää biomateriaalin tarkka rakenne. Paljon käytetty menetelmä biomateriaalin rakenteen selvittämiseksi on röntgendiffraktio (XRD, *x-ray diffraction*) (Sampath Kumar, 2013). Röntgendiffraktio on hyvin monipuolinen menetelmä, sillä sen avulla pystytään selvittämään biomateriaalin, kuten metallin tai polymeerin rakenne ja ominaisuuksia, jotka vaikuttavat merkittävästi sen bioyhteensopivuuteen. Menetelmän avulla saadaan selville esimerkiksi biomateriaalin sisältämät faasit, faasien kidekoot ja kiderakenne. Näiden tietojen avulla saadaan ymmärrystä esimerkiksi biomateriaalin termisistä ja mekaanisista ominaisuuksista. Toinen laajalti käytetty menetelmä biomateriaalien rakenteen tutkimiseen on infrapunaspektroskopia. Menetelmässä molekyylit vuorovaikuttavat infrapunavalon kanssa, jonka jälkeen infrapunaspektrometri mittaa, kuinka paljon tutkittavan aineen molekyylit absorboivat infrapunasäteilyä. (Sampath Kumar, 2013.)

Jotta biomateriaaleja pystytään käyttämään ortopedisissä implanteissa, tulee selvittää niiden bioyhteensopivuus. Bioyhteensopivuuden tutkimiseen on käytössä sekä *in vitro* -menetelmiä että *in vivo* -menetelmiä. Tutkijat suosivat *in vitro* -menetelmiä, koska ne ovat yksinkertaisempia sekä halvempia kuin *in vivo* -menetelmät. Lisäksi *in vivo* -menetelmiin liittyy usein eettisiä kysymyksiä koskien eläinten käyttöä tutkimuksessa. (Al-Zyoud ym., 2023.)

In vitro -tutkimuksissa käytetään usein viljeltyjä eläinsoluja. Solutyypin valinta riippuu siitä, mitä biomateriaalia halutaan tutkia ja missä kudoksessa sitä halutaan käyttää. Mikäli halutaan tutkia pehmytkudoksessa käytettävää biomateriaalia, on luonnollista käyttää kyseisen kudoksen yleisiä soluja kuten fibroblasteja. (Camps & About, 2003.) Fibroblastit ovat pehmytkudoksessa esiintyviä tukikudossoluja, jotka tuottavat esimerkiksi sidekudoksen proteiineja kuten kollageenia. Mikäli halutaan tutkia luuta ja siellä tarvittavaa biomateriaalia käytetään useimmiten osteoblasteja. Biomateriaalien tutkimisessa on mahdollista käyttää eri solulinjoja, jotka voivat olla peräisin esimerkiksi hiirestä tai ihmisestä. Kun biomateriaaleja tutkitaan erilaisten solulinjojen kanssa, saadaan laajasti tietoa siitä, miten biomateriaalit vaikuttavat eri solutyyppeihin. Kun tutkimuksessa käytettävät solut on valittu, voidaan *in vitro* -tutkimuksissa tutkia biomateriaalien sytotoksisuutta tutkimalla esimerkiksi solujen morfologiaa eli solujen ulkoista muotoa, rakennetta ja kokoa. Morfologiaa voidaan biomateriaalien läsnä ollessa kuvata pyyhkäiselektronimikroskoopilla (SEM, *Scanning Electron Microscope*) tai läpäiselektronimikroskoopilla (TEM, *Transmission Electron Microscope*). Toinen tapa

arvioida biomateriaalien sytotoksisuutta on tutkia solujen elinkykyä ja jakautumiskykyä, esimerkiksi mittaamalla solujen DNA- tai proteiinipitoisuutta tai niiden metabolista aktiivisuutta. (Camps & About, 2003.)

In vivo -tutkimuksissa on mahdollista tutkia materiaalien aiheuttamia patologisia muutoksia. Materiaaleja voidaan asettaa eläimen sidekudokseen, lihakseen tai luuhun ja sen jälkeen seurata kuinka kudokset reagoivat materiaaliin. Materiaali voi aiheuttaa patologisia muutoksia, joiden perusteella pystytään havaitsemaan materiaalin olevan haitallinen kudokselle. Toinen tapa tutkia bioyhteensopivuutta on altistaa iho jollekin biomateriaalille injektoimalla se ihon alle ja seurata sen aiheuttamia ihoreaktioita kuten ihon punoitusta tai turvotusta. (Huzum ym., 2021.)

Biomateriaalien tutkimiseen liittyy paljon rajoitteita, joita tulee tutkimusta suunniteltaessa ottaa huomioon. Biomateriaaleille on asetettu tietyt laatuvaatimukset, joita niiden käytön ja tutkimuksen tulee noudattaa. Biomateriaalien tulee esimerkiksi olla yhteensopivia kudoksen kanssa ja riskihyötysuhde määriteltynä. Tarkka raportointi implantteja valmistettaessa ja asennettaessa on välttämätöntä, jotta vaaratilanteen sattua implanttien jäljittäminen on nopeaa. (Huzum ym., 2021.) Laatuvaatimusten lisäksi on olemassa eurooppalaisia yhdenmukaistettuja standardeja, jotka määrittelevät tarkempia vaatimuksia. Ne esimerkiksi varmistavat, että lääketieteelliset testausmenetelmät ovat turvallisia käyttäjilleen. Yksi keskeisimmistä on EN ISO 10993-sarjan standardit. (Fimea., 2024.) ISO 10993-sarjan standardit määrittelevät menetelmät, joita käytetään arvioitaessa lääketieteellisten laitteiden yhteensopivuutta ihmisen kudosten ja kehon nesteiden kanssa (Fimea., 2024; Huzum ym., 2021). ISO 10993 standardien mukaan laitteen tulee olla myrkytön eikä se saa aiheuttaa mutaatioita tai olla toksinen (Helmus ym., 2008).

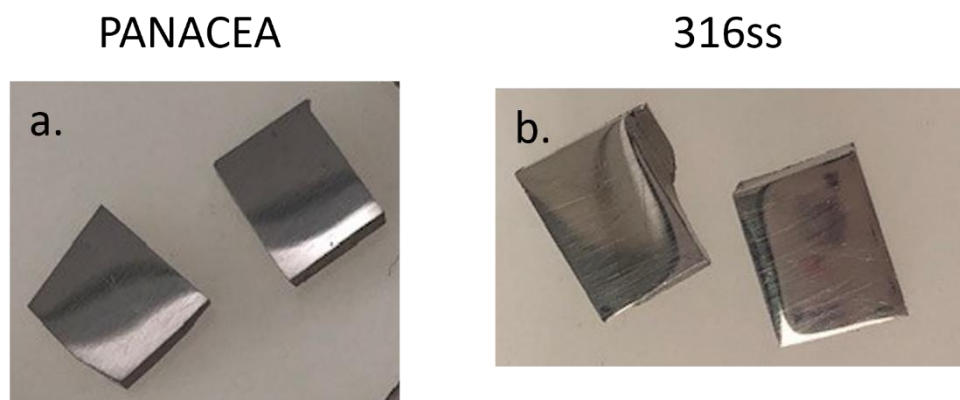
1.4 Tutkimuksen tavoite

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää kuinka hiiren kallon luusta eristetyn osteoblasti-solulinjan (MC3T3-E1) solut reagoivat, kun niitä viljellään metallin kanssa. 3D-tulostimella tuotettuja metallipaloja laitettiin soluviljelmiin yhdessä osteoblastien eli luusolujen kanssa ja selvitettiin, säilyvätkö luusolut elinkelpoisina metallin läsnä ollessa, ja miten metalli vaikuttaa solujen osteoblastiseen erilaistumiseen. Koska kyseistä metallia haluttaisiin tulevaisuudessa käyttää ortopedisten implanttien 3D-tulostuksessa, oli tärkeää ensin selvittää niiden bioyhteensopivuutta *in vitro* -soluviljelmiä käyttäen.

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 Materiaalien käsittely

Työssä tutkittiin 3D-tulostettujen metallipalojen vaikutusta osteoblastien viabiliteettiin. Materiaaleina käytettiin kahta metallia. Toinen metalleista oli jo paljon tutkimuksissa käytetty 316 SS (*stainless steel*) ja toinen uusi metalli PANACEA (*protection against nickel allergy, corrosion, erosion, and abrasion*) (Kuva 3). 316 SS on nikkeliä sisältävä metalli, jota käytettiin kontrollimateriaalina. PANACEA on nikkelivapaa metalli ja työssä haluttiinkin tutkia, kuinka solut reagoivat sen läsnä ollessa. Metallipalat olivat epäsymmetrisen neliön muotoisia ja kooltaan noin 2 mm korkeita ja 4 mm leveitä. Turun yliopiston kone- ja materiaalitekniikan laitoksen apulaisprofessori Ashish Ganvir tutkimusryhmineen 3D-tulosti metallipalat jauhepetisulatuksella (*PBF-LB/M, Laser Powder Bed Fusion Process for Metals*) ja loppukäsitteli ne sahaamalla, hiomalla ja lopuksi kiillottamalla. Tarkempia tietoja tutkittavien materiaalien valmistuksesta voi lukea julkaisusta Nayak ym., (2024). Ennen käyttöä soluviljelmissä metallipalat steriloidtiin 180°C, neljän tunnin ajan. Metallipalojen saatavuusongelmien vuoksi metallipaloja jouduttiin uusiokäyttämään viabiliteettikokeissa. Käyttökertojen välissä metallipaloja pyrittiin puhdistamaan harjaamalla niitä vanupuikolla ja liottamalla vedessä ravistelijassa ja lopuksi viinassa. Puhdistuksen jälkeen metallipalat steriloidtiin uudelleen 180°C, neljän tunnin ajan.



Kuva 3. Tutkimuksessa käytetyt 3D-tulostetut, sahatut ja kiillotetut metallipalat. Tutkittava metalli oli p558-metalleihin kuuluva nikkelivapaa metalli PANACEA (a). Vertailumateriaalina käytettiin nikkeliä sisältävää metallia 316 SS (b).

2.2 Osteoblastien kasvatus ja ylläpito

Tutkimuksessa käytettiin hiiren kallon luusta eristettyjä osteoblastisen solulinjan (MC3T3-E1) soluja. Solut olivat säilöttynä nestetyypeen, josta ne herätettiin ja aloitettiin kasvatus. Solut sulatettiin nopeasti ja siirrettiin lämpimään kasvatusmediumiin (Taulukko 1). Solut sentrifugoitiin 200 x g, 5 min ja resuspensoitiin 5 ml kasvatusmediumia. Solutiheys viljelyn alussa oli $0,5 \times 10^6$ solua T75 kasvatuspulloissa, jota pidettiin soluviljelyinkubaattorissa (37°C, 5 % CO₂). Kasvatuksia ylläpidettiin vaihtamalla kasvatusmedium, joka kolmas päivä ja jakamalla solut neljän päivän välein uusiin T75 pulloihin, joissa solumäärä oli $0,5 \times 10^6 - 1 \times 10^6$. Soluja jaettaessa solut irrotettiin 0,05 % trypsiini-EDTA-liuoksella (Gibco). Ennen liuoksen lisäystä, vanha medium poistettiin ja pullo pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS, Gibco). Pesuliuoksen tilalle lisättiin 3 ml trypsiini-EDTA liuosta. Soluja inkuboitiin kolme minuuttia huoneenlämmössä välillä ravistellen, kunnes solut olivat irronneet. Irrotuksen jälkeen kasvatuspulloon lisättiin 4 ml kasvatusmediumia. Solususpensio kerättiin pullosta sentrifugiputkiin ja sentrifugoitiin (200 x g, 5 min), jonka jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja pelletti resuspensoitiin 4 ml kasvatusmediumia. Pieni määrä solususpensiota laimennettiin 0,4 % trypan-blue väriin 1:1 (Bio-Rad), jonka jälkeen solususpension solutiheys laskettiin käyttämällä Bürker-Türk- laskukammiota. Solut laitettiin uudelleen kasvuun kuten on kuvattu ylempänä.

Taulukko 1. MC3T3-E1 solujen kasvatusmediumin ainesosat.

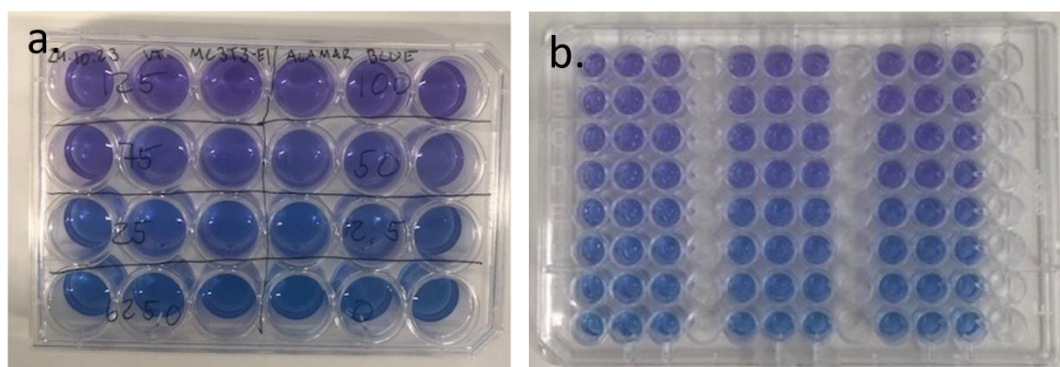
| Reagenssi | Osuus | Valmistaja | CAT-numero |
|-----------------------------|-------|---------------------------------|------------|
| Mem alpha (1x) | 89 % | ThermoFisher Scientific, Gibco™ | 41061-029 |
| Naudan sikiön seerumi (FBS) | 10 % | ThermoFisher Scientific, Gibco™ | 10270-106 |
| Penisilliini-streptomysiini | 1 % | ThermoFisher Scientific, Gibco™ | 15140-122 |

2.3 Solujen viabiliteettimittaus

2.3.1 Standardisuoran tekeminen solutiheyden määrittystä varten

Solujen viabiliteetin mittaamiseen käytettiin AlamarBlue reagenssia. AlamarBlue reagenssi sisältää soluille vaarattoman natriumsuolan resatsuriinin. Resatsuriinin toiminta perustuu solujen mitokondrioiden elektroninsiirtoketjuun, jossa resatsuriini toimii elektroninvastaanottajana. Elinkelpoisten solujen hapettaessa resatsuriinia syntyy voimakkaasti fluoresoiva yhdiste resorufiini. Mitä enemmän eläviä soluja on, sitä voimakkaampi on fluoresenssi ja AlamarBlue reagenssin sininen väri muuttuu vaaleanpunaiseksi. (Munshi ym., 2014; O'Brien ym., 2000)

Koe aloitettiin tekemällä solujen kasvatus standardisuoran määrittämistä varten 24-kuoppalevyllä. Solujen kasvatustiheys standardisuoralla oli 0–125 000 solua/kaivo/1 ml. Jokaisesta solutiheydestä tehtiin kolme toistoa. Soluja inkuboitiin soluviljelyinkubaattorissa 37°C, 5 % CO₂ kolme tuntia, jonka jälkeen soluille vaihdettiin uusi kasvatusmedium (1 ml/kaivo), johon AlamarBlue reagenssi oli sekoitettu suhteessa 1:10. Puolentoista ja kolmen tunnin jälkeen jokaisesta kaivosta kerättiin kolme rinnakkaista näytettä 96-kuoppalevyllä ja mitattiin fluoresenssi (eksitaatio/emissio aallonpituuksilla 560/590 ja 570/585) Ensight levylukijalla (PerkinElmer) (kuva 4). Koe toistettiin käyttämällä 24-kuoppalevyn sijasta 48-kuoppalevyä.



Kuva 4. Osteoplastien kasvatus standardisuoran määrittämistä varten kolmen tunnin jälkeen. Solut kasvatettiin 24-kuoppalevyllä. Puolentoista ja kolmen tunnin inkuboinnin jälkeen lisättiin AlamarBlue reagenssi. Soluja inkuboitiin toiset kolme tuntia AlamarBlue reagenssin läsnä ollessa (a), jonka jälkeen jokaisesta kaivosta kerättiin kolme rinnakkaista näytettä 96-kuoppalevyllä, josta mitattiin fluoresenssi (b).

2.3.2 Solujen viabiliteetti PANACEAn ja 316 SS:n läsnä ollessa

Standardisuoran määrittämisen jälkeen aloitettiin solukasvatus solujen viabiliteetin mittausta varten. 24-kuoppalevyn kaivoihin lisättiin steriloidut metallipalat 316 SS sekä PANACEA varovasti (40 mm²) pinseteillä. Kontrollinäytteisiin istutettiin soluja ilman metalleja. Koeasetelmassa oli neljä rinnakkaista näytettä sekä PANACEA:lle että kontrollille, kun taas metallien saatavuuspulan vuoksi 316 SS-metallipaloja oli vain kaksi rinnakkaista näytettä. Joka kaivoon lisättiin 10 000 solua 10 µl pisarassa kasvatusmediumia. Kaivoissa, joissa olivat metallipalat, pisara lisättiin suoraan metallipalan päälle. Soluja inkuboitiin inkubaattorissa 37°C, 5 % CO₂ kaksi tuntia, minkä jälkeen kaivoihin lisättiin 1 ml solujen kasvatusmediumia. Inkubointia jatkettiin vielä 17 h 45 min. Sen jälkeen kaivoihin lisättiin AlamarBlue reagenssi. AlamarBlue sekoitettiin ensin solujen kasvatusmediumiin 1:10, minkä jälkeen vanha medium poistettiin ja tilalle lisättiin AlamarBlue-medium liuosta 1 ml/kaivo. Puolentoista tunnin inkuboinnin jälkeen kaivoista kerättiin kolmena rinnakkaisena ensimmäiset näytteet 96-kuoppalevylle. Inkubointia jatkettiin ja toiset näytteet kerättiin kolmen tunnin kuluttua AlamarBlue lisäyksestä. Näytteiden fluoresenssin intensiteetti (eksitaatio/emissio 560/590 ja 570/585) mitattiin Ensight-levylukijalla (PerkinElmer) (kuva 5). Lopuksi kaivoihin jäljelle jäänyt AlamarBlueta sisältävä kasvatusmedium poistettiin ja kaivoihin lisättiin uusi kasvatusmedium. Viabiliteettimittaus tehtiin päivinä 1, 3, 5, 7 ja 10 viljelmän aloituksesta.



Kuva 5. Osteoblastien viabiliteettimittaus AlamarBlue reagenssilla. Soluja kasvatettiin ilman metalleja ja metallien kanssa (a). Päivinä 1, 3, 5, 7 ja 10 kaivoihin lisättiin AlamarBlue reagenssia sisältävää mediumia ja levyä inkuboitiin kolme tuntia (b). Kolmen tunnin jälkeen jokaisesta kaivosta kerättiin kolme näytettä 96-kuoppalevylle ja mitattiin fluoresenssi (c).

2.4 Osteoblastien erilaistumisen tutkiminen

2.4.1 MC3T3-E1 solujen erilaistaminen osteoblasteiksi

MC3T3-E1 solujen osteoblastista erilaistamista varten soluja kasvatettiin 24-kuoppalevyille tiheydessä 3800 solua/cm². Levyjä tehtiin kaksi kahta eri aikapistettä varten. Soluja kasvatettiin normaalissa kasvatusmediumissa kaksi päivää, minkä jälkeen kolmeen näytteistä vaihdettiin osteoblastien erilaistumista edistävä OB-medium (taulukko 2) ja kolmelle näytteistä vaihdettiin uusi solujen normaali kasvatusmedium (Taulukko 1). Solujen mediumit vaihdettiin joka kolmas päivä. Soluja kasvatettiin seitsemän ja kymmenen päivän ajan, minkä jälkeen soluista mitattiin alkalisen fosfaatin aktiivisuus.

Osteoblastien erilaistamiskasvatukset toistettiin kasvattamalla soluja seitsemän päivän lisäksi myös neljäntoista päivän ajan. Tässä kokeessa solujen normaalin kasvatusmediumin ja OB-mediumin lisäksi kolmeen näytteistä vaihdettiin OB-medium, johon oli lisätty deksametasoni (OB+D -medium, taulukko 3), joka on glukokortikoideihin kuuluva orgaaninen yhdiste (Bella ym., 2021). Deksametasonin oli tarkoituksena lisätä solujen alkalisen fosfaatin (ALP) aktiivisuutta sekä kollageenisynteesiä, jota voidaan pitää merkinä osteoblastien erilaistumisesta. Uusia kasvatuksia tehtiin neljä 24-kuoppalevyä, joista kahdessa solut värjättiin alkalisen fosfaatin suhteen ja kahdesta mitattiin solujen ilmentämän alkalisen fosfaatin aktiivisuus.

Taulukko 2. OB-mediumin ainesosat. OB-medium oli solujen normaalia kasvatusmediumia (taulukko 1), johon oli lisätty β -glyserofosfaatti ja askorbiinihappo.

| Reagenssi | Osuus | Valmistaja | CAT-numero |
|---------------------------|---------------|---------------------|------------|
| Askorbiinihappo | 70 μ g/ml | Merck Sigma-Aldrich | A8960-5G |
| β -glyserofosfaatti | 10 nM | Fluka, Biochemica | 50020 |

Taulukko 3. OB+D -mediumin ainesosat. OB+D -medium oli OB-mediumia (taulukko 2), johon oli lisätty deksametasoni.

| Reagenssi | Osuus | Valmistaja | CAT-numero |
|---------------------------|--------------------|---------------------|------------|
| Askorbiinihappo | 70 μ g/ml | Merck Sigma-Aldrich | A8960-5G |
| β -glyserofosfaatti | 10 nM | Fluka, Biochemica | 50020 |
| Deksametasoni | 10 ⁻⁸ M | Sigma-Aldrich | D4902 |

2.4.2 Alkalisen fosfataasin (ALP) aktiivisuuden mittaaminen

ALP on luukudoksen osteoblastien tuottama entsyymi, joka emäksisissä olosuhteissa hydrolysoi fosforihapon monoestereitä. ALP:n aktiivisuutta pystytään mittaamaan spektrofotometrisesti mittaamalla absorbanssi lysaateista. (Hagar ym., 2020) Absorbanssin muutos johtuu menetelmässä käytettävästä para-nitrofenyylifosfaatista (p-NPP), joka reagoi muodostaen paranitrofenolia (p-NP), jonka määrä on suoraan verrannollinen ALP-aktiivisuuteen (Wang ym., 2009). Kun ALP-aktiivisuuden arvot suhteutetaan viljelmän proteiinipitoisuuteen, pystytään analysoimaan, kuinka suuri osa soluista on erilaistunut pre-osteoblasteista osteoblasteiksi. (Hagar ym., 2020)

Solujen kasvatuksen ja osteoblasteiksi erilaistamisen jälkeen solut hajotettiin lysaateiksi. Soluviljelykuoppalevyn kaivot pestiin ensin PBS:llä (Gibco), minkä jälkeen kaivoihin lisättiin hajotuspuskuri (50 mM Tris-HCl, 0,1 % Triton x-100, 0,9 % NaCl, pH 7,6). Puskurin lisäyksen jälkeen levy pakastettiin ja sulatettiin kolmesti, jotta solut saatiin kunnolla hajotettua, minkä jälkeen solulysaatit kerättiin kaivoista eppendorf-putkiin. ALP-aktiivisuuden määrittäminen aloitettiin sekoittamalla para-nitrofenyylifosfaatti (0,1 M, Sigma-Aldrich) sekä puskuriliuos (0,1 M TRIS, 1 mM MgCl₂, pH 10) keskenään. 96-kuoppalevylle lisättiin ensin solulysaatit (10 µl/kaivo) ja sen jälkeen para-nitrofenyylifosfaatti -puskuriliuos (100 µl/kaivo). Levyä inkuboitettiin 30 min, valolta suojattuna, kunnes reaktio pysäytettiin lisäämällä kaivoihin natriumhydroksidi (VWR Chemicals). Absorbanssi mitattiin Ensight-levylukijalla (Perkin Elmer) aallonpituudella 405 nm.

2.4.3 Bradfordi-proteiinimäärittäminen

Bradfordi-testillä mitattiin solulysaattien proteiinipitoisuus. Bradfordi-proteiinimäärittäystä varten valmistettiin naudan seerumista eristetystä albumiinista (BSA, Thermo Fisher Scientific) näytteet standardisuoraa varten. BSA-standardit valmistettiin ultrapuhtaaseen veteen pitoisuuksilla 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml ja 2 mg/ml. 96-kuoppalevylle lisättiin BSA-standardit, 10 µl/kaivo, sekä alkalisen fosfataasikokeen yhteydessä kerätyt solulysaatit, 10 µl/kaivo. Kaivot täytettiin ultrapuhtaaseen veteen laimennetulla Bradfordi-reagenssilla, 200 µl/kaivo (BIO-RAD). Levyä inkuboitettiin 15 minuuttia, minkä jälkeen absorbanssi mitattiin Ensight-levylukijalla (PerkinElmer) aallonpituudella 595 nm. Bradfordi-

proteiinimääritys toistettiin laimentamalla solulysaatit ultapuhtaaseen veteen 1:1. Standardisuuraa käytettiin näytteiden proteiinkonsentraatioiden laskemiseen. ALP-arvot suhteutettiin saatuihin proteiinkonsentraatioihin, jolloin tulokseksi saatiin absorbanssiksi proteiinipitoisuutta kohden (mg/ml).

2.4.4 Solujen värjäys alkalisen fosfataasin (ALP) suhteen

ALP-värjäyksessä tapahtuu ALP-entsyymien katalysoima reaktio, jossa väriaine sitoutuu entsyymiin ja saa solut värjäytymään vaaleanpunaiseksi. Väri on sitä vahvempi, mitä enemmän solut ilmentävät ALP-aktiivisuutta. (Hagar ym., 2020)

24-kuoppalevyn kasvatuksen solut kiinnitettiin kaivoon 4 % paraformaldehydillä (PFA, ChemCruz). Ensin poistettiin kaivoista solujen kasvatusmedium ja lisättiin PFA, 300 µl/kaivo, minkä jälkeen levyä inkuboitiin 15 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen PFA poistettiin ja levy pestiin kaksi kertaa PBS:llä. ALP-värjäys tehtiin käyttämällä Sigma Diagnostics 86-R kittiä (Sigma-Aldrich). Värjäys tehtiin valmistajan ohjeen mukaisesti. Värjäyksen jälkeen levy kuvattiin skannerilla (HP Scanjet G4010).

2.4.5 Von Kossa värjäys

Värjäyksessä kaivoihin lisättiin 2 % hopeanitraattia, 200 µl /kaivo, minkä jälkeen soluja inkuboitiin tunnin ajan 60 W hehkulampun alla. Kaivot pestiin kolmesti vedellä, minkä jälkeen kaivoihin lisättiin 2,5 % natriumtiosulfaatti, 200 µl /kaivo. Soluja inkuboitiin viisi minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin ultrapuhtaalla vedellä ja ilmakeivattiin. Kun kaivot olivat kuivuneet, levy kuvattiin skannerilla (HP Scanjet G4010).

2.4.6 Metallien vaikutus osteoblastien erilaistumiseen

Työ aloitettiin kasvattamalla soluja 24-kuoppalevylle 3800 solua/cm² 1,5 ml:ssä kasvatusmediumia. Kaivoihin lisättiin ensin metallit varovasti pinseteillä. Koeasetelmassa oli kolme rinnakkaista näytettä PANACEA:lle, 316 SS:lle ja kontrollille. Kontrollina olivat solut ilman metalleja. Soluja inkuboitiin 37°C, 5 CO₂. Kahden päivän kuluttua mediumit vaihdettiin. Ilman metalleja tehdyssä kokeessa ei havaittu merkittäviä eroja OB-mediumin ja OB+D -mediumin välillä, joten tähän kokeeseen materiaalien kanssa valittiin käytettäväksi OB+D -medium. Solujen kasvatusmedium poistettiin ja tilalle lisättiin 1,5 ml OB+D -mediumia (taulukko 2). Puolet mediumin tilavuudesta

vaihdettiin joka kolmas päivä. Metallien saatavuuspulan vuoksi levyille tehtiin vain alkalisen fosfataasin värjäys. Aikapisteet seitsemän ja neljätoista oli koettu toimiviksi kokeessa ilman metalleja, joten ne tulivat valituksi myös tähän kokeeseen aikapisteiksi. Tässä kokeessa solut lisättiin metallipalan ympärille, toisin kuin solujen viabiliteettimittauksessa. Värjätyt levyt skannattiin kohdan 2.4.4 mukaan.

Skannatut kuvat analysoitiin ImageJ (v1.52p) kuvan analysointiohjelmalla. Kuvat muutettiin mustavalkoisiksi ja jokaisesta kaivosta rajattiin samankokoinen pinta-ala analyysiä varten. Ohjelmalla mitattiin jokaisesta näytteestä keskimääräinen harmaasävyjen arvo (*mean gray value*), jonka ohjelma laskee kunkin näytteen harmaasävyjen keskimääräisestä kirkkaudesta ja intensiteetistä. Ryhmien välisiä arvoja verrattiin toisiinsa.

2.5 Tulosten tilastollinen tarkastelu

Tulosten kuvaajat ja tilastollinen analyysi tehtiin käyttäen GraphPad Prism -ohjelmaa (GraphPad Software version 10). Aineiston normaalijakautuneisuus testattiin Shapiro-Wilk -testillä. Normaalisti jakautuneiden ryhmien keskiarvoja analysoitiin yksisuuntaisella ANOVA-analyysillä. Ryhmien väliseen parivertailuun käytettiin Tukeyn testiä. Tilastollisen analyysin merkitsevyytasoksi valittiin P-arvo $\leq 0,05$. Kuvaajissa tilastolliset merkitsevyydet on merkattu tähdillä, P < 0,05 (*), P < 0,01 (**), P < 0,001 (***), ns (*non significant*, ei tilastollisesti merkitsevää eroa).

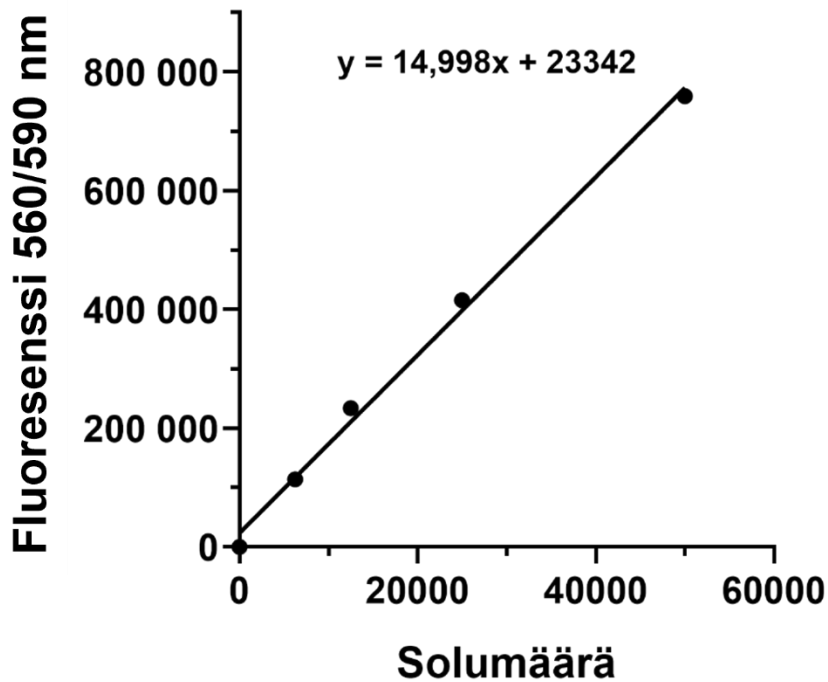
3 Tulokset

3.1 Solujen viabiliteetti

Solujen viabiliteettia mittavaa koetta varten valmistettiin ensin MC3T3-E1-soluista standardisuora, jonka avulla saatiin laskettua varsinaisen kokeen solumäärät eri näytteissä (kuva 6). Standardisuora tehtiin ilman metalleja, käyttäen ainoastaan eri solupitoisuuksia. Kasvatus tehtiin sekä 24-kuoppalevyille, että 48-kuoppalevyille, mutta jatkossa käytettiin 24-kuoppalevyn tuloksista saatua standardisuoraa, sillä 48-kuoppalevyltä saadut tulokset saturoituivat, eikä tuloksia voitu pitää luotettavina.

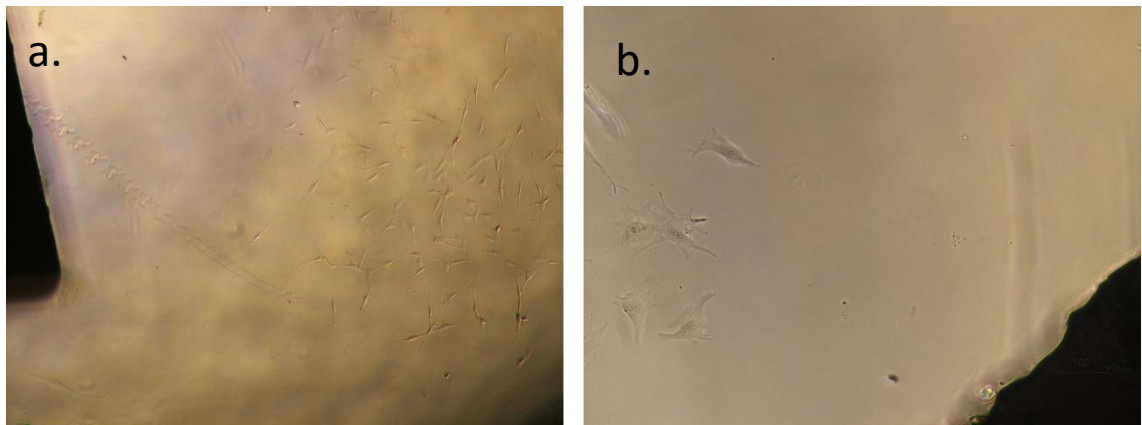
AlamarBlue reagenssin valmistajan menetelmä antoi kaksi vaihtoehtoista aallonpituutta näytteiden fluoresenssin mittausta varten, joten näytteiden fluoresenssi mitattiin aallonpituuksilla 560/590 nm ja 570/585 nm. Kun eksitaatio/emissio oli 570/585 nm, olivat saadut fluoresenssiarvot reilusti korkeampia kuin mitattaessa eksitaatio/emissio aallonpituuksilla 560/590. Koetta jatkettiin käyttämällä arvoja, jotka oli saatu mittaamalla eksitaatio/emissio aallonpituuksilla 560/590.

MC3T3-E1 soluja inkuboitiin kolme tuntia AlamarBlue -reagenssin kanssa standardisuoran määrittämistä varten. Kolmen tunnin inkuboinnin jälkeen ei kuitenkaan nähty minkäänlaista värieroa näytteissä, vaan kaikki näytteet näyttivät silmämääräisesti sinisiltä. Mitatut fluoresenssiarvot kertoivat kuitenkin erot. Fluoresenssiarvot kasvoivat tasaisesti solumäärän kasvaessa kuten oletettiin. Kuvasta 6 nähdään valmis standardisuora, jossa fluoresenssiarvo kasvaa tasaisesti solumäärän kasvaessa ja muodostaa lineaarisen suoran. Tätä standardisuoraa käytettiin varsinaisen solujen viabiliteettia mittaavan kokeen tulosten analysointiin.



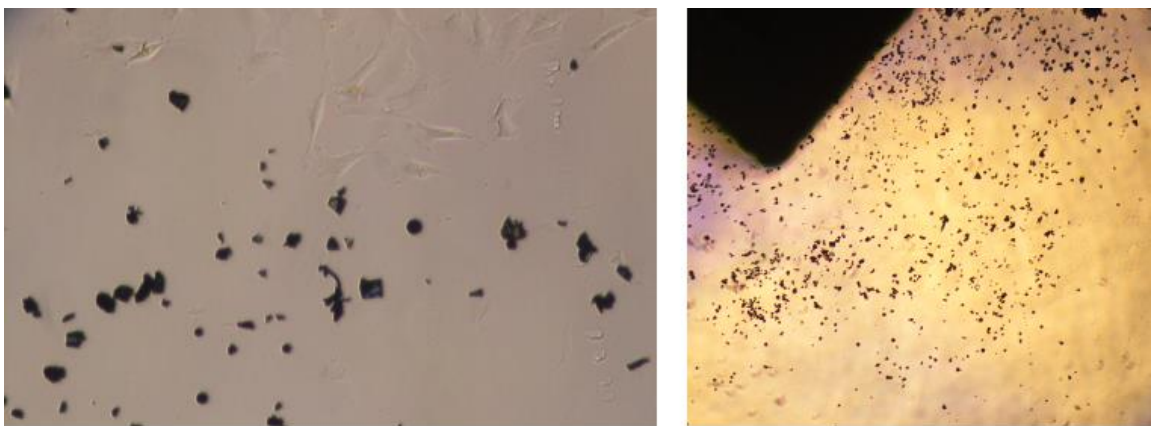
Kuva 6. Osteoblastien AlamarBlue viabiliteettimittauksia varten tehty standardisuora. Soluja kasvatettiin eri tiheyksillä 24-kuoppalevyllä. Kaivoihin lisättiin AlamarBlue reagenssi, jonka aikaansaamaa fluoresenssin muutosta mitattiin aallonpituudella 560/590 nm. Viivadiagrammi kuvaa fluoresenssin muutosta solumäärän kasvaessa. Standardisuoran yhtälön avulla, $y = 14,998x + 23342$, laskettiin solumäärät kussakin näytteessä solujen viabiliteettimittauksessa.

Standardisuorakasvatuksen jälkeen aloitettiin koe PANACEA-metallin ja 316 SS-metallin kanssa. Koe toistettiin viisi kertaa, jotta vertailtavia tuloksia saataisiin mahdollisimman paljon ja tulokset olisivat mahdollisimman luotettavia. Kokeessa solut lisättiin suoraan metallipalan päälle, joten niiden kasvua ei pystytty seuraamaan tavallisella valomikroskoopilla ensimmäisten päivien aikana, sillä valo ei läpäise metallia. Ensimmäisessä ja toisessa kokeessa soluja nähtiin kolmen päivän jälkeen myös metallipalan ympärillä (kuva 7). Metallipalan ympärillä solut jatkoivat jakaantumista ja kasvoivat hyvin. Solut muodostivat ryppäitä etenkin kaivojen reunoille. Tilanne tulkittiin siten, että solut olivat kasvaneet metallipalan päällä, mutta tila oli käynyt ahtaaksi ja osa soluista oli pudonnut metallipalan päältä ja jatkanut kasvua soluviljelymuovilla.



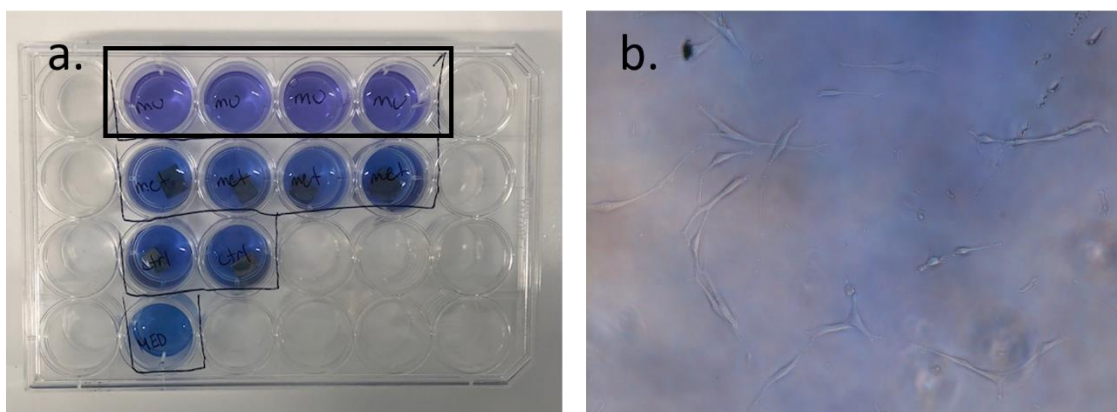
Kuva 7. Päivänä viisi havaittuja soluja PANACEA-metallipalan ja 316 SS-metallipalan ympärillä. PANACEA-metallipalan päältä oli tippunut soluja metallipalan ympärille, ja ne olivat lähteneet jakautumaan hyvin. Soluryppäitä nähtiin erityisesti kaivojen reunoilla (a). Sama huomio havaittiin myös 316 SS-metallipalojen ympärillä (b).

Kolmessa viimeisessä kokeessa soluja näkyi vain vähän metallipalan ympärillä tai ei ollenkaan ja solumäärät olivat selvästi pienempiä kuin ensimmäisissä kokeissa kaikkina päivinä. Huomiota herätti myös kaikkien kokeiden aikana metallipalojen ympärille ilmestyneet partikkelit (kuva 8). Partikkeleiden oletettiin olevan peräisin metallipaloista, sillä samoja partikkeleita ei nähty kontrollinäytteissä. On mahdollista, että partikkelit olivat peräisin metallipalojen valmistusprosessista ja liukenivat kasvatuksen aikana metallipaloista solujen mediumiin. Havaituista partikkeleista huolimatta ensimmäisissä kokeissa solut pysyivät hengissä.



Kuva 8. Solujen viabiliteettikokeen aikana PANACEA- ja 316 SS-näytteissä havaitut partikkelit kuvattuna valomikroskoopilla. Kokeen aikana metallipalojen ympärille ilmestyi tummia partikkeleita, jotka mahdollisesti olivat peräisin metallipaloista.

AlamarBlue -reagenssin lisäyksen ja inkuboinnin jälkeen levyä tarkasteltiin myös silmämääräisesti. Kontrolli- ja metallinäytteiden välillä havaittiin väriero, mutta vasta kymmenentenä päivänä kasvatuksen aloituksesta ja tällöinkin väriero oli heikko, vain hieman violettiin taittava (kuva 9) Heikosta värierosta kuitenkin tulkittiin, että kontrollinäytteissä solujen määrä oli korkeampi, mikä sai aikaan havaitun värinmuutoksen.



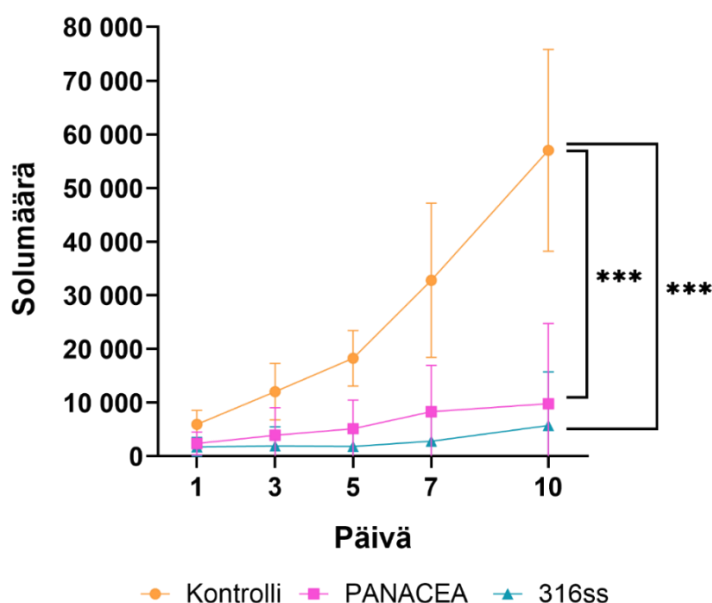
Kuva 9. Solujen viabiliteettikokeessa havaittu värinmuutos päivänä kymmenen. Kaikissa kokeissa päivänä kymmenen havaittiin värinmuutos kontrollinäytteissä (ensimmäinen vaakarivi). Kaivojen väri oli vaihtunut violetiksi, kun taas metallinäytteissä ja mediumkontrollissa väri oli pysynyt sinisenä (a). Kontrollinäytteissä solut kasvoivat hyvin ja niitä nähtiin selkeästi valomikroskoopilla tarkasteltaessa (b).

Mitatuista fluoresenssiarvoista havaittiin, että ensimmäisen aikapisteen kohdalla eli puolentoista tunnin jälkeen kaikkien näytteiden antamat arvot olivat hyvin matalia, eikä selkeitä eroja fluoresenssiarvoissa nähty näytteiden välillä kummallakaan aallonpituudella 560/590 tai 570/585. Sen sijaan kolmen tunnin jälkeen erot fluoresenssiarvoissa olivat jo selkeitä. Kontrollinäytteistä mitattu fluoresenssi oli korkeampi eli niissä solumäärä oli suurempi ja solut kasvoivat paremmin verrattuna PANACEA-näytteisiin ja 316 SS-näytteisiin. Fluoresenssiarvoista kuitenkin nähtiin, että solut kasvoivat selkeästi myös metallinäytteiden kanssa. Metallien kanssa kasvu oli kuitenkin paljon heikompaa kuin kontrollinäytteissä. Mitatut fluoresenssiarvot vahvistivat tulosta myös siitä, että aiemmin mainittu värin muutos päivänä kymmenen (kuva 9), olisi merkinä suuremmasta solumäärästä kontrollinäytteissä. Kontrollinäytteet päivänä kymmenen antoivat selkeästi suuremmat fluoresenssiarvot kuin PANACEA- ja 316 SS-näytteet.

Alussa valmistetun standardisuoran yhtälön ja fluoresenssiarvojen avulla laskettiin todelliset näytteissä olevat solumäärät. Tarkasteltaessa kuvaa 10 nähdään, että

PANACEA-metallin läsnäolo heikensi tilastollisesti merkitsevästi solumäärää verrattaessa kontrolliin ($p < 0,001$). Sama tilastollisesti merkitsevä negatiivinen ero nähdään verrattaessa 316 SS:n vaikutusta kontrolliin ($p < 0,001$), jossa 316 SS:n vaikutus heikensi solujen kasvua ja täten solumäärä oli alhaisempi. Kuvasta nähdään myös, että PANACEAn kanssa solut kasvavat hieman paremmin kuin 316 SS-metallin kanssa. PANACEA- ja 316 SS-metallin välillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa.

Eri kokeiden välillä oli paljon hajontaa. Kahdessa ensimmäisessä kokeessa fluoresenssiarvoista laskettujen solumäärien tuloksista havaittiin, että kontrollinäytteissä ja metallinäytteissä solujen määrä nousi tasaisesti ajan kuluessa. Kolmessa viimeisessä kokeessa tuloksista havaittiin, että solumäärät olivat paljon pienempiä kaikissa näytteissä. Kontrollinäytteissä solut kuitenkin kasvoivat ensimmäisten kokeiden tapaan tasaisesti ajan kuluessa, vaikka määrät olivat alhaisempia. Sen sijaan metallinäytteissä kasvu oli hyvin heikkoa tai kasvua ei näkynyt ollenkaan. Aikaisemmin mainittiin, kuinka soluja ei näkynyt viimeisimmissä kokeissa metallipalan ympärillä ollenkaan katsottaessa soluja valomikroskoopilla. Fluoresenssiarvoista lasketut solumäärät vahvistavat tätä havaintoa.

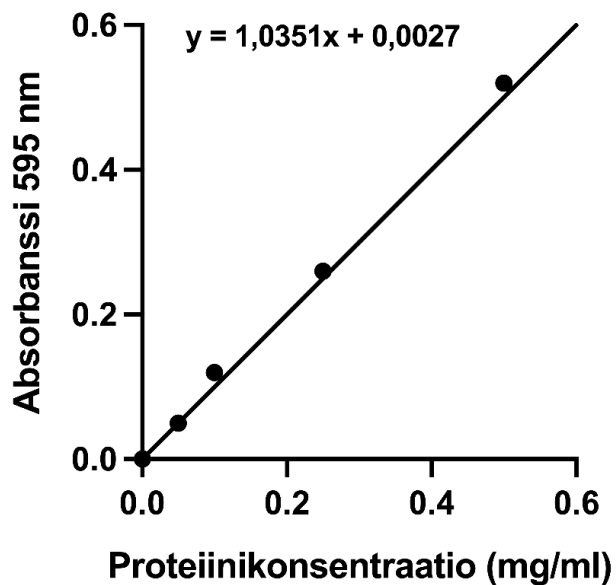


Kuva 10. Metallien vaikutus osteoblastien viabiliteettiin. Osteoblasteja viljeltiin soluviljelymuovilla (kontrolli), PANACEA-metallin päällä sekä 316 SS-metallin päällä. Solut kasvoivat molempien metallien kanssa heikommin kuin kontrollinäytteissä ja ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,001$). PANACEAn kanssa solut kasvoivat kuitenkin hieman paremmin kuin 316 SS-metallin. Sen sijaan metallien välinen ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Kokeen edetessä kontrollinäytteissä solut lisääntyvät tasaisesti. Metallien kanssa solut kasvavat, mutta selvästi heikommin kuin kontrollinäytteissä.

3.2 Osteoblastien erilaistuminen

3.2.1 Osteoblastien ALP-aktiivisuus ilman metalleja

ALP-kokeen yhteydessä tehtiin Bradfordi-proteiinimääritys, jossa tehdyn BSA-standardisuoran avulla saatiin laskettua ALP-kokeesta saaduille solulysaateille proteiinipitoisuudet (kuva 11). ALP:n spesifinen aktiivisuus saatiin jakamalla ALP-kokeesta saadut entsyymiaktiivisuudet bradfordi-proteiinimäärityksestä saaduilla solulysaattien proteiinipitoisuuksilla.



Kuva 11. Bradfordi-proteiinimäärityksessä tehty BSA-standardisuora. Viivadiagrammi kuvaa absorbanssin muutosta proteiinipitoisuuden kasvaessa. Standardisuoran yhtälön avulla, $y = 1,0351x + 0,0027$, laskettiin proteiinipitoisuudet jokaisesta solulysaatista. ALP-kokeesta saadut ALP-aktiivisuudet suhteutettiin solulysaateista saatuihin proteiinipitoisuuksiin tarkan ALP-aktiivisuuden laskemiseksi.

Seitsemän ja kymmenen päivän jälkeen ALP-aktiivisuus oli hyvin alhainen, eikä eroja ALP-aktiivisuuksissa nähty juuri ollenkaan. Sama koe päätettiin toistaa pidemmällä aikavälillä, jotta ALP-aktiivisuutta heijastavia erilaistuneita osteoblasteja olisi enemmän ja ALP-aktiivisuus arvot olisivat korkeampia. Aikapisteiksi valittiin päivät seitsemän ja neljätoista. Ensimmäisestä kokeesta poiketen, kokeeseen lisättiin kolme näytettä, joihin vaihdettiin mediumien vaihtopäivinä OB+D -medium.

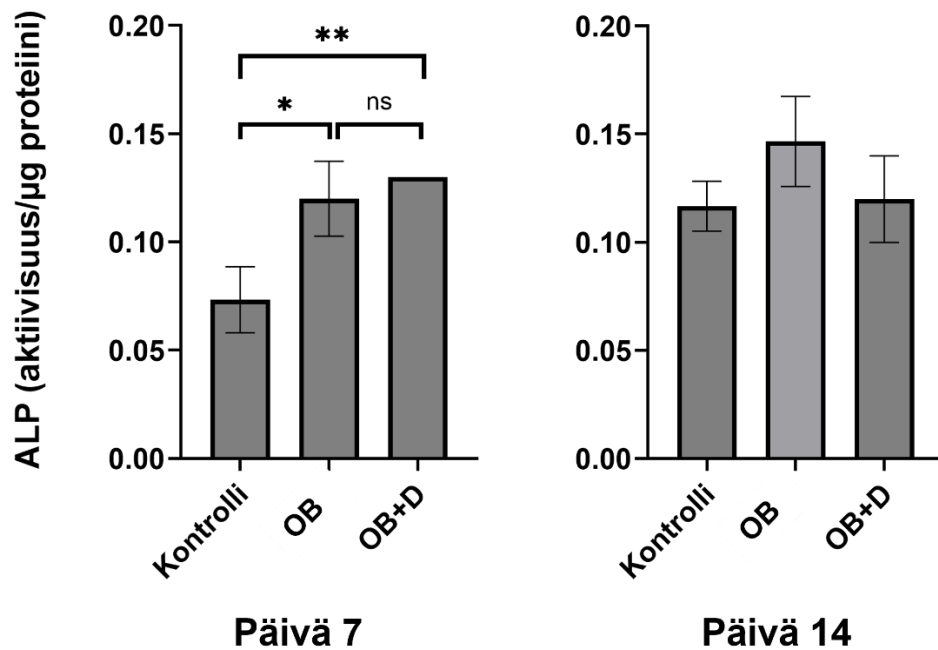
Seitsemäntenä päivänä tuloksissa nähtiin ero ALP-aktiivisuuksissa eri mediuumeissa olevissa koeryhmissä. Erot eivät olleet suuria, mutta selkeästi havaittavissa. Kuvasta 12 nähdään, että kontrollimediuumeissa solujen ALP-aktiivisuus oli odotetusti alhainen, sillä

mediumissa ei ollut osteoblastien erilaistumista edistäviä tekijöitä, β -glyserofosfaattia ja askorbiinihappoa. Sama havainto tehtiin ALP-värjäyksessä, sillä kuten kuvasta 13 nähdään, seitsemäntenä päivänä kontrolliryhmän näytteissä värjäytymistä ei näy ollenkaan. Tuloksista on kuitenkin todettavissa, että myös pre-osteoblastit ilmentävät ALP-entsyymiä, koska myös kontrollikoeryhmä antoi tuloksia ALP-aktiivisuudesta ALP-aktiivisuusmittauksessa.

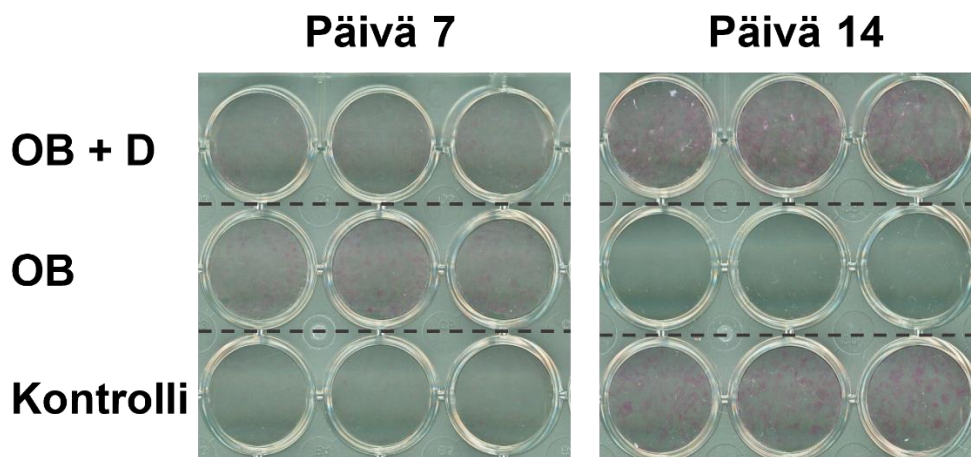
Kun verrattiin kontrolliryhmän aktiivisuuksia OB-mediumissa olevan koeryhmän aktiivisuuksiin, ryhmien välinen ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,05$) (kuva 12). Sama tulos nähtiin OB+D -mediumissa olevan koeryhmän ja kontrollimediumissa olevan koeryhmän välillä ($p < 0,01$).

Verrattaessa ALP-aktiivisuuksia OB-mediumissa ja OB+D -mediumissa olevien koeryhmien välillä havaittiin, että OB+D -mediumissa olevan koeryhmän ALP-aktiivisuus oli hieman korkeampi, mutta ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä (kuva 12). Tulos on ristiriidassa ALP-värjäyksestä saatuun tulokseen, sillä kuvasta 13 nähdään, että OB-mediumissa olevan koeryhmän värjäytyminen olisi voimakkaampaa ja täten ilmentäisi enemmän ALP-aktiivisuutta.

Päivänä neljätoista koeryhmien välillä ei nähty enää eroja ALP-aktiivisuuksissa. Kuvan 12 tulosten mukaan OB-mediumissa olevan koeryhmän ALP-aktiivisuus oli korkein, mutta minkään koeryhmien välillä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Tuloksista siis todettiin, että deksametasonin vaikutus solujen erilaistumiseen ei ollut merkittävä, eikä kokeen toistaminen pidemmällä aikavälillä tuottanut suuria eroavaisuuksia ALP-aktiivisuuksiin eri koeryhmien välillä. ALP-värjäyksestä saatuja tuloksia ei pystytty vertailemaan OB-mediumissa olleiden solujen epäonnistuneen kiinnityksen vuoksi. OB+D -mediumissa olevassa koeryhmässä sekä kontrolliryhmässä nähdään vahva vaaleanpunainen väri eli ainakin näissä koeryhmissä pre-osteoblastien erilaistumista osteoblasteiksi oli tapahtunut.



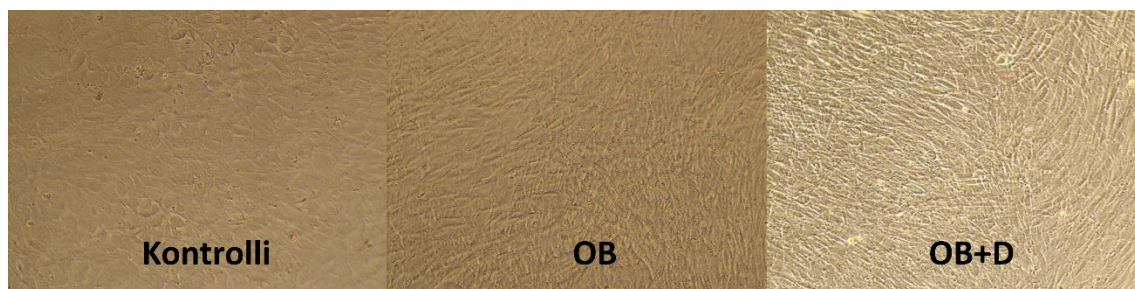
Kuva 12. Alkalisen fosfataasin aktiivisuus (ALP) normalisoituna proteiinien kokonaismäärään ALP/BSA ($\mu\text{g/ml}$). Osteoblasteja kasvatettiin normaalissa kasvatusmediumissa (kontrolli), osteoblastien erilaistumismediumissa (OB) ja erilaistumismediumissa deksametasonin kanssa (OB+D). Seitsemän ja neljäntoista päivän jälkeen ALP-aktiivisuus mitattiin solulysaateista spektrofotometrillä. Proteiinkonsentraatio määritettiin standardisuoran avulla.



Kuva 13. Kuvia ALP-värjätyistä soluista päivänä seitsemän ja neljätoista. Soluviljelyn jälkeen päivinä seitsemän ja neljätoista solut värjättiin alkalisen fosfataasin suhteen. Kuvassa näkyvät värjätyt ja skannatut soluviljelykaivot. Päivän neljätoista OB-mediumissa olleiden koeryhmien kaivot ovat tyhjiä solujen epäonnistuneen kiinnityksen vuoksi.

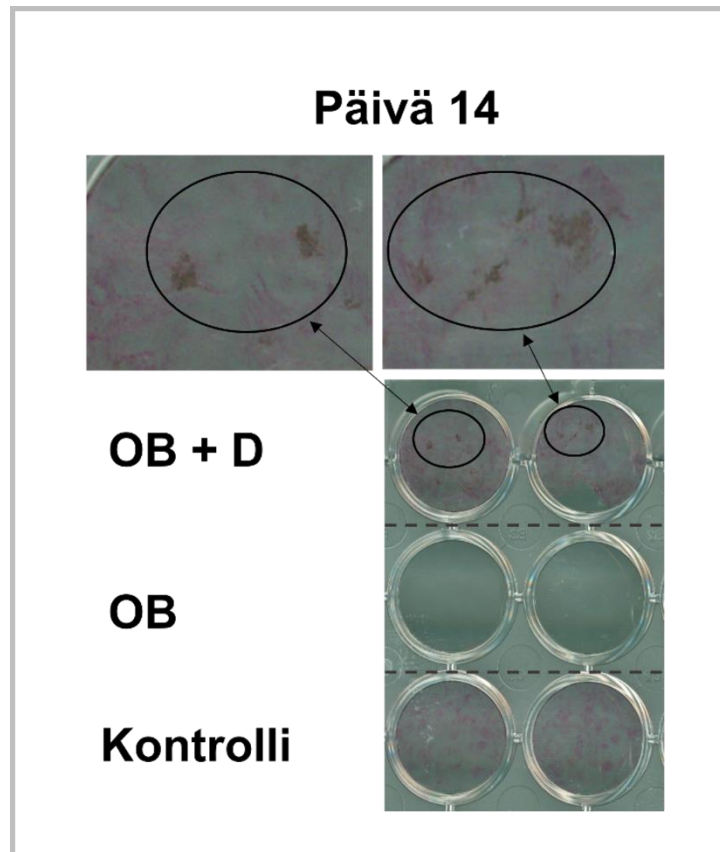
Osteoblastien erilaistumista tutkittiin myös silmämääräisesti valomikroskoopilla. Valomikroskoopilla katsottaessa nähtiin selkeitä eroja koeryhmien välillä jo seitsemäntenä päivänä. Kun soluja oli viljelty seitsemän päivän ajan OB-mediumissa tai

OB+D -mediumissa, havaittiin, että osteoblastit kasvoivat järjestäytyneemmin (Kuva 14). ALP-aktiivisuuden mittaustulokset osoittivat, että deksametasonilla ei ollut vaikutusta solujen erilaistumiseen, eikä sitä nähty myöskään tutkittaessa solujen erilaistumista silmämääräisesti. Kuten oli odotettavissa, kontrollimediumissa solut olivat säilyneet niille ominaisessa pyöreässä muodossa.



Kuva 14. Valomikroskoopilla otettuja kuvia osteoblastien erilaistumisesta. Osteoblasteja kasvatettiin normaalissa kasvatusmediumissa (kontrolli), erilaistumismediumissa (OB) sekä erilaistumismediumissa deksametasonin kanssa (OB+D). Solut kuvattiin valomikroskoopilla päivänä seitsemän.

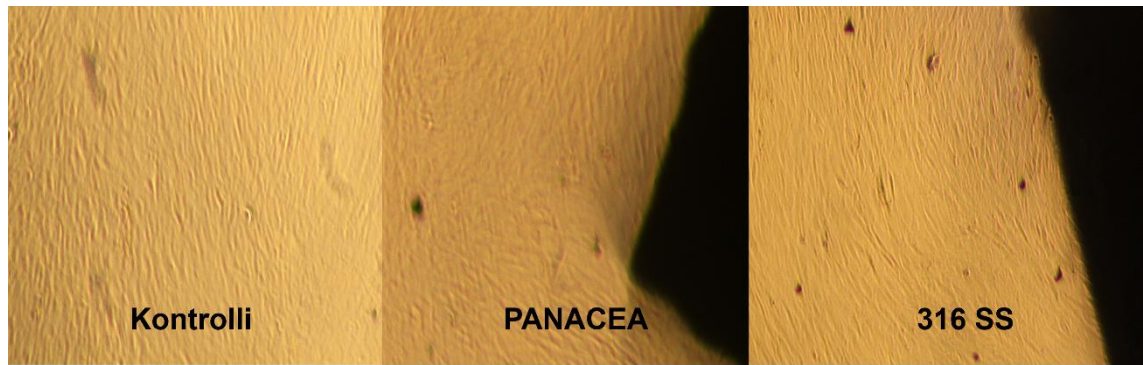
Alkalisen fosfataasi -värjäyksen jälkeen solut värjättiin vielä Von Kossa-värjäyksellä. Värjäyksessä hopeaionit reagoivat kalsiumionien kanssa muodostaen hopeasuoloja. Hopeasuolat nähdään tummina värjäytyminä. Värjäyksellä pystytään havaitsemaan luuaineksen mineralisoitumista, joka kuvastaa osteoblastien erilaistumista ja toimintaa. Päivänä seitsemän Von Kossa-värjäyksen jälkeen ei havaittu tummentumia kaivojen pohjalla. Sen sijaan päivänä neljätoista pieniä mustanruskeita alueita havaittiin koeryhmässä, joissa mediumina oli käytetty OB+D -mediumia (Kuva 15). Koeryhmästä, jossa oli käytetty OB-mediumia, tuloksia ei voitu lukea solujen epäonnistuneen kiinnittymisen vuoksi. Aikaisemmissa tuloksissa kuitenkin havaittiin, että päivänä seitsemän ALP-värjäyksessä muodostunut vaaleanpunainen väri oli vahvin OB-mediumissa olevassa koeryhmässä, joten on mahdollista, että myös Von Kossa olisi tuottanut värimuutoksia näihin näytteisiin.



Kuva 15. Alkalisen fosfataasi värjäyksen jälkeen tehty Von Kossa -värjäys. Neljäntoista päivän soluviljelyn jälkeen solut värjättiin alkalisen fosfataasin suhteen ja sen jälkeen vielä Von Kossa -värjäyksellä. Värjäyksen tuloksena saadut tummat värjäytymät päivänä neljätoista näkyvät kuvassa ympyröitynä.

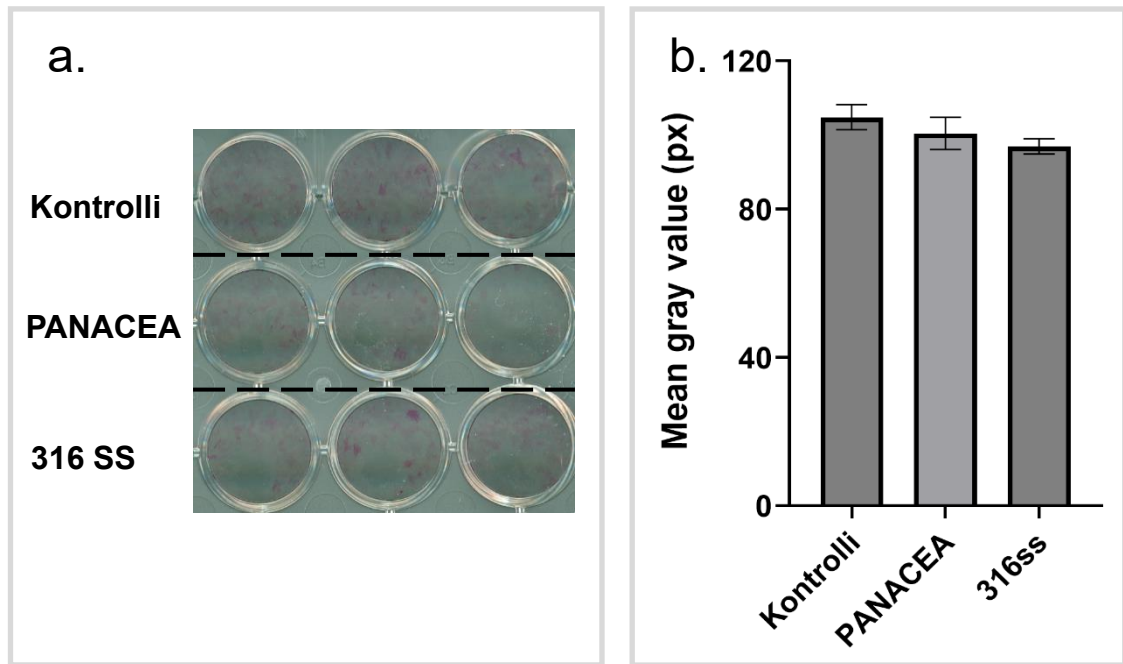
3.2.2 Osteoblastien erilaistuminen metallien kanssa

Osteoblastien erilaistumiskoe metallien kanssa toistettiin samalla tavalla kuin ilman metalleja tehdyssä kokeessa käyttäen ALP-värjäystä. Kontrolliryhminä olivat solut ilman metalleja. Kolmeen näytteistä lisättiin PANACEA-metallipalat ja kolmeen 316 SS-metallipalat. Tässä kokeessa solut lisättiin metallipalan ympärille, toisin kuin solujen viabiliteettimittauksessa. Lisäämällä solut metallipalan ympärille pystyttiin seuraamaan solujen kasvua päivittäin valomikroskoopilla ja havaittiin, että ne kasvavat hyvin metallipalan ympärillä. Kuvasta 16 nähdään, kuinka osteoblastien erilaistuminen on havaittavissa kaikissa näytteissä päivänä 11. Osteoblastit kasvavat järjestäytyneemmin ja niille ominainen pyöreä muoto on muuttunut pitkulaisemmaksi. Mikroskoopilla katsottaessa ei kuitenkaan osattu arvioida, oliko osteoblastien erilaistumisessa eroja kontrollinäytteiden ja metallinäytteiden välillä.



Kuva 16. Metallien vaikutus osteoblastien erilaistumiseen. Soluja viljeltiin ilman metalleja (kontrolli) sekä metallien kanssa osteoblastien erilaistumiseen tarkoitetussa mediumissa, jossa mukana oli deksametasonia. Solut kuvattiin päivänä 11 käyttäen valomikroskooppia.

Seitsemän ja neljäntoista päivän kasvatuksen jälkeen soluille tehtiin ALP-värjäys. Päivänä seitsemän värinmuutos oli hyvin heikko. Värinmuutos nähtiin ainoastaan kontrollinäytteissä ja sekin hyvin haaleana. Sen sijaan päivänä neljäntoista värinmuutos näkyi selkeästi kaikissa näytteissä (kuva 17a). Näin ollen todetaan, että osteoblastien erilaistumista oli tapahtunut myös metallien läsnä ollessa. Silmämääräisesti oli vaikea arvioida, oliko päivänä neljäntoista näkyvä värinmuutos vahvempi kontrollinäytteissä kuin PANACEA-näytteissä tai 316 SS-näytteissä. Kuten kuvasta 17a nähdään, metallipalat ovat jättäneet vaaleat soluttomat alueet PANACEA- ja 316 SS-näytteiden pohjalle, jotka vääristävät värjäytymisen voimakkuutta. Päivän neljäntoista tulosten analysointia jatkettiin vielä käyttäen ImageJ-ohjelmaa. Tavoitteena oli selvittää, onko näytteiden välillä eroa värjäytymisen voimakkuuden suhteen, koska sitä oli silmämääräisesti vaikea nähdä. Värjäytymisen voimakkuuden mittaamiseen käytettiin arvoa, joka laskee yhteen kunkin näytteen harmaasävyjen keskimääräisen kirkkauden ja intensiteetin (mean gray value). Kuvasta 17b nähdään, että värjäytyminen oli voimakkainta kontrollinäytteissä. Kontrollinäytteissä osteoblastien erilaistuminen vaikuttaisi olevan siis hieman suurempaa, vaikka erot kontrollinäytteiden, PANACEA-näytteiden ja 316 SS-näytteiden välillä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.



Kuva 17. Metallien vaikutus osteoblastien erilaistumiseen. Kuvassa on skannattu kuoppalevy, jossa solut on värjätty alkalisen fosfataasin suhteen (a). Näytteiden värieröjen tulkitsemiseksi skannatulta kuoppalevytlä mitattiin ImageJ-ohjelmalla harmaasvyjen keskimääräinen kirkkaus ja intensiteetti (mean gray value) ja arvoja verrattiin toisiinsa (b).

4 Tulosten tarkastelu

4.1 PANACEA vaikutti negatiivisesti osteoblastien viabiliteettiin

Solujen viabiliteettia metallien läsnä ollessa tutkittiin AlamarBlue reagenssilla ja havaittiin, että tutkittava metalli PANACEA ja kontrollimetalli 316 SS vaikuttavat negatiivisesti solujen viabiliteettiin.

Kaikissa viabiliteettikokeissa nähtiin selkeä ero solujen kasvussa, kun verrattiin solujen kasvua ilman metalleja ja metallien kanssa. Ilman metalleja solut lähtivät hyvin kasvuun kokeen edetessä, kun taas metallien kanssa solujen kasvu oli selvästi heikompaa.

Solujen heikkoon kasvuun metallien kanssa on saattanut vaikuttaa metallipaloista mahdollisesti liuenneet metalli-ionit. Metallionien vaikutus soluihin riippuu käytettävästä metallista sekä solutyypistä (Hallab ym., 2005). Kobolttia ja nikkeliä käytetään paljon implanteissa ja niiden on osoitettu olevan myrkyllisimpiä implanteissa käytettyjä metalleja. Erityisesti koboltilla on osoitettu olevan hyvin myrkyllistä soluille. Jo alle 1 mM pitoisuus kobolttia, nikkeliä tai vanadiinia on myrkyllinen osteoblasteille. Muita implanteissa käytettyjä metalleja ovat esimerkiksi kromi ja molybdeeni. Nämä metallit ovat vähemmän myrkyllisiä ja vaativat suuremman yli 1 mM pitoisuuden aiheuttaakseen myrkyllisen vasteen soluissa. (Hallab ym., 2005.) Omassa tutkimuksessani käytetty 316 SS sisältää näistä metalleista kromia, nikkeliä ja molybdeeniä, joista ainoastaan nikkeli kuuluu erittäin myrkyllisten metallien ryhmään. On siis mahdollista, että esimerkiksi nikkeli-ionien liukeneminen 316 SS-metallipaloista on aiheuttanut myrkyllisen vasteen ja heikentänyt solujen kasvua. Tämä ei päde kuitenkaan kaikkiin soluihin, sillä solujen reagoimisen metalleihin on havaittu olevan riippuvaista solutyypistä (Hallab ym., 2005). Esimerkiksi kromin ja molybdeenin pitoisuuden ollessa 5 mM ne inhiboivat voimakkaammin osteoblastien jakautumista kuin fibroblastien jakautumista (Hallab ym., 2005).

Solujen heikkoon kasvuun metallien kanssa saattoi myös vaikuttaa solujen pienempi kasvupinta-ala kaivoissa, joissa metallipalat olivat mukana. Pienemmän kasvupinta-alan takia solumäärä saattoi jäädä myös alhaisemmaksi. Lisäksi aiemmin mainitut metallipalojen ympärille kertyneet partikkelit saattoivat häiritä solujen kasvua ja veivät samalla myös kasvutilaa. Kokeen aikana kuoppalevyä, jossa solut kasvoivat, jouduttiin

liikuttamaan useasti. Levyn liikuttaminen on mahdollisesti aiheuttanut metallipalojen liikkumisen kaivoissa solujen päälle, joka on johtanut solujen kuolemaan.

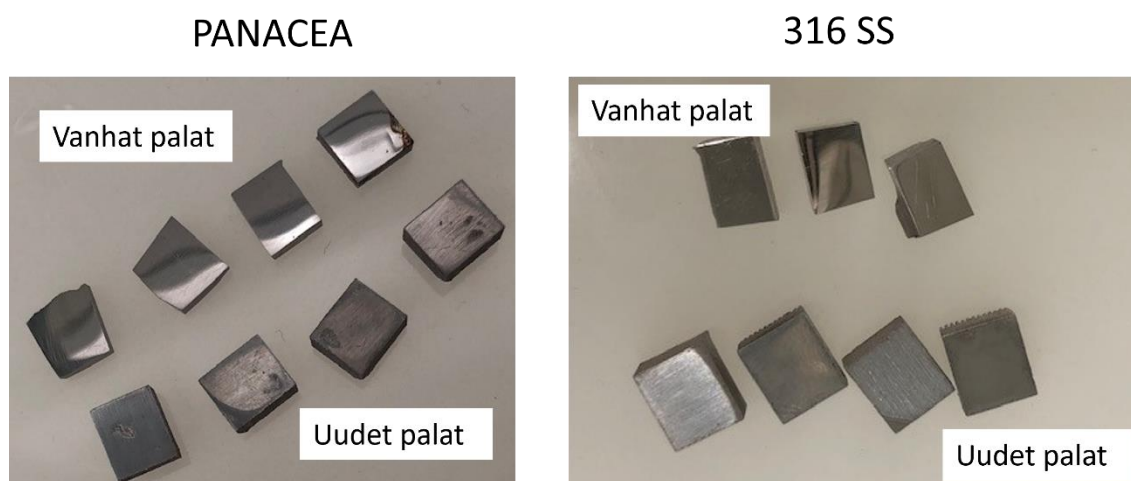
Lisäksi yksi vaikuttava tekijä solujen heikompaan kasvuun metallien kanssa saattoi olla solujen erilainen kasvualusta. Kontrollinäytteissä solut kasvoivat soluviljelymuovilla, kun taas metallien kanssa metallin päällä. Metallipalojen pinta oli käsitelty hiomalla ja kiillottamalla, mutta sen eroa esimerkiksi karheudessa soluviljelymuoviin ei osattu arvioida. Solujenkasvualustan ominaisuuksilla, kuten edellä mainitulla karheudella, tiedetään kuitenkin olevan vaikutuksia solujen kasvuun (Majumdar., 2006).

Sen lisäksi, että kontrolli- ja metallinäytteiden välillä oli eroja, havaittiin eroja myös PANACEAn ja 316 SS:n välillä. Tuloksista nähtiin, että PANACEAn kanssa solut kasvavat hieman paremmin. Merkittävä ero metallipalojen välillä oli niiden koko ja muoto. PANACEA-palat olivat litteitä ja leveämpiä, kun taas 316 SS-palat korkeampia ja kapeampia. PANACEA-näytteissä soluilla oli enemmän tilaa kasvaa metallipalan päällä, mutta toisaalta kasvutilan tullessa täyteen metallipalan päällä, kasvutilaa oli vähemmän metallipalan ympärillä. 316 SS-näytteissä tilanne oli päinvastainen. Rakenteellisten erojen lisäksi tärkeä ero metallien välillä oli niiden koostumus ja erityisesti 316 SS:n sisältämä nikkeli. Kuten edellä todettiin, nikkeli on hyvin myrkyllinen metalli ja sen liuetessa solujen mediumiin se saattoi heikentää solujen kasvua merkittävästi. Tätä ongelmaa ei ollut PANACEA-näytteissä, joka saattoi olla syy solujen parempaan kasvuun niissä.

Viabiliteettimittaus toistettiin viisi kertaa ja kokeiden välillä havaittiin merkittäviä eroja. Ensimmäisissä kokeissa solut lähtivät kasvuun kaikissa näytteissä, mutta kuten edellä todettiin, heikommin metallien kanssa. Sen sijaan viimeisissä kokeissa solut eivät lähteneet ollenkaan kasvuun metallien kanssa. Ilman metalleja solut kuitenkin kasvoivat normaalisti, joten ongelmat solujen kasvatusmediumissa tai työn toteuttamisessa poissuljettiin. Syynä kokeiden tulosten välisiin eroihin saattoi olla metallipalojen uusiokäyttö. Metallien saatavuuspulan vuoksi ensimmäisissä kokeissa käytettyjä paloja käytettiin uudelleen viimeisissä kokeissa. Vaikka paloja yritettiin puhdistaa kokeiden välillä, on mahdollista, että puhdistus ei ole onnistunut toivotulla tavalla ja metallipaloihin on jäänyt kiinni solujätteitä kuten proteiineja, mitkä ovat häirinneet solujen kasvua seuraavissa kokeissa. Toinen syy kokeiden välisiin eroihin saattoi olla PANACEA- ja 316 SS-palojen vaurioituminen kokeiden tai puhdistuksen aikana. 316 SS ja PANACEA ovat ruostumatonta terästä ja täten hyvin korroosionkestäviä metalleja.

Ruostumattoman teräksen korroosionkestävyys perustuu teräksen, esimerkiksi 316 SS:n, pinnalla olevaan suojaavaan kalvoon (J. Wu ym., 2022). Tällainen suojaava kalvo muodostuu kemiallisten yhdisteiden vaikutuksesta ja se suojaa metallia syöpymiseltä ja korroosiolta. Mesenkymaalisten kantasolujen erittämät tekijät, kuten proteiinit, voivat vaikuttaa metallin suojaavaan kalvoon vaurioittamalla sitä ja täten mahdollistaa ionien helpomman liukenemisen metallista. (J. Wu ym., 2022.) On siis mahdollista, että osteoblastien kasvattaminen suoraan metallipalan päällä on vaurioittanut PANACEA- ja 316 SS-palojen suojaavaa kalvoa ja mahdollistanut ionien helpomman liukenemisen solujen mediumiin. Kun valmiiksi vaurioituneita paloja on käytetty seuraavissa kokeissa, metalli-ionien liukeneminen on ollut mahdollista heti kokeen alusta loppuun asti.

Viimeiseen viabiliteetikokeeseen saatiin käyttöön uudet käyttämättömät PANACEA- ja 316 SS-palat. Vaikka palat olivat kokonaan uusia, tulokset olivat samanlaisia, kontrollinäytteissä solut kasvoivat hyvin, mutta metallien kanssa hyvin heikosti tai ei ollenkaan. Syynä solujen heikkoon kasvuun saattoi olla uusien metallipalojen erot vanhoihin metallipaloihin. Uudet metallipalat olivat valmiiksi vaurioituneita. Palojen pinnassa oli kolhuja ja sahauksesta jääneitä viiltoja. Lisäksi palojen pinnan kiillotus oli epätasainen toisin kuin aikaisemmissa metallipaloissa (Kuva 18).



Kuva 18. Viabiliteetikokeessa käytettyjen uusien ja vanhojen metallipalojen erot. Viabiliteetikokeen viimeiseen kokeeseen saatiin käyttöön uudet metallipalat, jotka poikkesivat merkittävästi vanhoista metallipaloista. Uudet palat olivat kolhiintuneita ja kiillotus oli heikompi verrattuna aikaisemmin käytettyihin metallipaloihin.

Kokeiden välisiin hajontoihin vaikuttavia tekijöitä olivat varmasti myös solujen laskeminen kokeen aloittamisessa sekä solujen kasvutahti, vaikka kasvuolosuhteet pyrittiinkin pitämään mahdollisimman samanlaisina.

4.2 Metallit eivät vaikuttaneet solujen erilaistumiseen

Osteoblastien erilaistumiskoe tehtiin ensin ilman metalleja. Kokeen aikana ongelmaksi muodostui proteiinipitoisuudenmäärittystä varten valmistettu BSA-standardisuora. Bradford-proteiinimäärittäyksestä saadut arvot menivät yli tehdyn standardisuoran lineaarisen alueen, joten tuloksia ei voitu pitää luotettavina. Bradford-proteiinimäärittäys toistettiin laimentamalla lysaatit, jonka myötä arvot saatiin osumaan paremmin suoralle ja proteiinipitoisuuksista saatiin luotettavimpia. Tuloksissa ei kuitenkaan havaittu muutoksia uudesta suorasta huolimatta.

Metallien kanssa tehdyissä kokeissa alkalisen fosfataasin värjäyksessä havaittu ALP-aktiivisuudesta kertova solujen positiivinen värjäytyminen oli nähtävissä haaleana värjäytymisenä päivänä seitsemän vain kontrollinäytteissä. On siis mahdollista, että solut olivat jakautuneet paremmin ilman metalleja, jonka myötä niitä oli enemmän kontrollinäytteissä ja näin ne aikaan saivat vahvemman värimuutoksen. Päivänä neljätöistä värimuutos näkyi kaikissa näytteissä. Väri oli vahvistunut edellisestään myös kontrollinäytteissä. Näytteissä, joissa mukana olivat metallit, väri näkyi myös selkeästi. Ja koska väri oli lähes yhtä vahva kaikissa näytteissä, solujen erilaistumista pre-osteoblasteista osteoblasteiksi oli tapahtunut myös metallien läsnä ollessa. Näin ollen metallit eivät ole vaikuttaneet negatiivisesti solujen elinkelpoisuuteen eikä erilaistumiseen erilaistumiskokeeseen tehdyissä solukasvatuksissa. Viabiliteettimittauksessa solut kuitenkin kasvoivat heikosti metallien kanssa, joten solujen erilaistumiskokeessa syynä solujen parempaan kasvuun oli mahdollisesti solujen lisääminen metallipalan ympärille, toisin kuin viabiliteettikokeessa. Von Kossa -värjäyksestä saadut tulokset vahvistivat tuloksia solujen erilaistumisesta.

MC3T3-E1 solujen erilaistumista on tutkittu myös muiden metallien kanssa. Esimerkiksi titaanin kanssa tehdyt kokeet ovat osoittaneet, että se ei vaikuta merkittävästi solujen erilaistumiseen (J. Wu ym., 2022). Osa tutkimuksista on käyttänyt p558-metallia *in vitro*-tutkimuksissaan ja havainnut, että se vaikuttaa positiivisesti osteoblastien erilaistumiseen ja mahdollisesti myös edistää osteoblastien erilaistumista verrattuna usein kontrollimateriaalina käytettyyn titaaniseokseen (Ti6Al4V) (Fini ym., 2003, 2004). Pidentämällä solujen viljelyaikaa omassa tutkimuksessani, voitaisiin mahdollisesti havaita suurempia muutoksia ja eroja kontrolli- ja metallinäytteiden välillä. Aikaisemmissa tutkimuksissa MC3T3-E1 solujen kanssa on käytetty seitsemän ja neljäntoista päivän lisäksi kolmatta aikapistettä. Usein kolmantena aikapisteenä on

käytetty päivää 21, jolloin solujen määrä on kasvanut ja erot näytteiden välillä selkeämmin havaittavissa. (Tabassum, 2022; Techaniyom ym., 2020.)

4.3 Deksametasonilla ei ollut vaikutusta solujen erilaistumiseen

Osteoblastien erilaistumiskokeen yhteydessä tutkittiin osteoblastien erilaistumista deksametasonin läsnä ollessa. Tässä kokeessa deksametasonin vaikutukset eivät näkyneet ALP-aktiivisuuden mittaustuloksissa eikä ALP-värjäyksessä. MC3T3-E1 soluilla tiedetään olevan korkea erilaistumiskapasiteetti sekä mineralisaatio kasvatuksissa, joissa on käytetty askorbiinihappoa. (D. Wang ym., 1999.) Kuten omista tuloksistani havaittiin, MC3T3-E1 solut eivät vaadi deksametasonia erilaistukseen eikä deksametasonin havaittu edistävän solujen erilaistumista ainakaan tämän viljelyajan aikana. Deksametasonin vaikutus solujen erilaistumiseen riippuu paljon myös käytettävistä soluista (Tabassum, 2022). Joidenkin solujen erilaistumiselle se on välttämätön. Aikaisemmissa tutkimuksissa on käytetty ihmisen hampaan soluja ja havaittu deksametasonin vaikuttavan solujen erilaistumiseen. Tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu muutoksia vasta kuin päivänä 20. (Tabassum, 2022.) Omassa tutkimuksessani ALP-aktiivisuuden mittauskokeen sekä ALP-värjäyksen voisi toistaa pidentämällä soluviljelyaikaa ja lisätä seitsemän ja neljäntoista aikapisteen lisäksi kolmannen aikapisteen kuten päivän 20. Tämä vahvistaisi tuloksia siitä onko deksametasonilla vaikutusta MC3T3-E1 solulinjan solujen erilaistumiseen.

4.4 Mahdolliset jatkotutkimukset

Merkittävä tutkimuksen yhteydessä ilmennyt kysymys liittyi solujen lisäämiseen metallipalan päälle viabiliteettikokeessa ja metallipalan viereen erilaistumiskokeessa. Kokeen aikana havaittiin, että solut voivat metallien kanssa huonommin. Tästä syystä osteoblastien erilaistumiskokeessa solut päätettiin lisätä metallipalan ympärille. Erilaistumiskokeen aikana solujen kasvua pystyttiin seuraamaan ja solut näyttivät kasvavan yhtä hyvin metallien kanssa kuin kontrollinäytteissä. Erilaistumiskokeen voisikin toistaa lisäämällä solut suoraan metallipalan päälle ja samalla seurata vaikuttaako se eri tavalla solujen erilaistumiseen ja kasvuun eli heikentäisikö se solumäärää ja solujen erilaistumiskapasiteettia. Solujen morfologiaa metallipalojen päällä voitaisiin seurata myös pyyhkäisyelektronimikroskoopin avulla ja samalla pystyttäisiin näkemään, kuinka solut ovat kiinnittyneenä metallipalan pinnalla ja eroaako kiinnittymistapa mahdollisesti solujen kiinnittymisestä soluviljelymuoviin. Vastaavasti solujen viabiliteettikokeen voisi

toistaa lisäämällä solut metallipalan viereen ja katsoa parantaako tämä solujen kasvua metallipalojen kanssa.

Viabiliteettikokeen yhteydessä pohdittiin myös mahdollisten metalli-ionien liukenemistä solujen kasvatusmediumiin. Tutkimuksen aikana kerättiin talteen soluviljelmistä konditoidut mediumit, joiden kanssa tutkimusta voisi jatkaa. Konditoiduista mediuumeista voisi tutkia, ilmeneekö niissä mahdollisesti metalleista liuenneita metalli-ioneja, kuten aikaisemmin mainittua nikkeliä, kromia, molybdeeniä tai muita tekijöitä, jotka olisivat voineet vaikuttaa solujen kasvuun. Lisäksi aikaisemmin todettiin, että eri solut reagoivat eri tavalla metalli-ioneihin. MC3T3-E1 solulinjan sijasta kokeen voisi toistaa toisella solulinjalla ja katsoa, miten se vaikuttaa kokeen tuloksiin.

Omassa tutkimuksessani havaittiin, että metallien vaikutus MC3T3-E1 osteoblastien erilaistumiseen oli hyvin vähäinen. Tutkimusta voisi jatkaa tekemällä ALP-värjäyksen lisäksi ALP-aktiivisuuden mittauksen metallien läsnä ollessa. Metallien saatavuuspulan vuoksi kokeen rinnakkaiset näytteet jäivät vähäisiksi eikä kokeen riittävään toistoon uusilla, tasalaatuisilla metallipaloilla ollut mahdollisuuksia. Kokeen voisi kuitenkin toistaa vielä uudelleen ja katsoa vahvistavatko sen tulokset aikaisemmin saatuja tuloksia. Erilaistumiskokeen yhteydessä voisi pidentää solujen viljelyaikaa ja lisätä toimiviksi todetun seitsemän ja neljäntoista päivän lisäksi yhden pidemmän aikapisteen, kuten päivän 21. Jatkettaessa työtä deksametasonia sisältävän mediumin kanssa, saataisiin mahdollisesti tuloksia myös sen vaikutuksesta soluihin pidemmällä aikavälillä ja mahdollisesti myös selkeämpiä tuloksia Von Kossa värjäyksestä.

Kokeessa käytetyissä 3D-tulostetuissa metallipaloissa oli eroavaisuuksia, joten viabiliteettikokeen voisi toistaa käyttämällä samasta erästä ja samalla tavalla valmistettuja metallipaloja ja katsoa, oliko metallipalojen välinen eroavaisuus syynä vaihteleviin tuloksiin. 3D-tulostamalla tuotetut metallipalat eroavat perinteisesti valmistetuista metallipaloista esimerkiksi rakenteeltaan. Tutkimuksen voisi tehdä vielä perinteisesti valmistetuilla 316 SS- ja PANACEA-metallipaloilla ja verrata tuloksia 3D-tulostetuilla metallipaloilla saatuihin tuloksiin. Näin pystyttäisiin selvittämään, vaikuttaako metallin valmistusmenetelmä solujen viabiliteettiin tai erilaistumiseen. Lisäksi tulostamisen jälkeinen metallipalojen loppukäsittely voitaisiin toteuttaa eri tavoin. Osa paloista voitaisiin hioa sileiksi ja osa karheammiksi ja osasta paloja voitaisiin jättää viimeisenä tehtävä kiillotus pois. Tällä tavoin voitaisiin tarkastella kuinka pinnan topografia vaikuttaa solujen kiinnittymiseen ja viabiliteettiin. Metallin pinnan karheuden

vaikutuksista soluihin on tehty tutkimuksia jo aiemmin 316 SS-metallilla (Majumdar, 2006.), mutta saman voisi toistaa vielä PANACEA-metallilla.

5 Yhteenveto

Työssä tutkittiin, kuinka 3D-tulostettu nikkeli vapaa PANACEA-metalli ja nikkeliä sisältävä 316 SS-metalli vaikuttavat osteoblastien viabiliteettiin ja erilaistumiseen *in vitro*. Tutkimustulosten mukaan metallit vaikuttavat negatiivisesti osteoblastien viabiliteettiin heikentämällä niiden kasvua. Sen sijaan osteoblastien kasvussa PANACEA-metallin ja 316 SS-metallin välillä ei ollut merkittävää eroa, joten nikkelillä ei havaittu olevan merkittävää vaikutusta osteoblastien viabiliteettiin. Viabiliteettikokeiden tulokset on myös julkaistu osana tieteellistä artikkelia alan lehdessä (Nayak ym., 2024). Osteoblastien erilaistumiseen metallit eivät vaikuttaneet, vaan osteoblastit erilaistuivat metallien kanssa yhtä hyvin kuin ilman metalleja. Tutkimusta jatkettaessa olisi tärkeää selvittää, oliko syy solujen heikkoon kasvuun viabiliteettikokeessa solujen kasvattaminen suoraan metallipalan päällä. Tutkittava PANACEA on uusi metalli biologisissa tutkimuksissa, joten sen käyttöönotto ortopedisissä implanteissa vaatii paljon lisätutkimuksia esimerkiksi viabiliteettikokeita käyttäen ihmisen soluja. Nikkelittömänä ja 3D-tulostettavana metallina PANACEA on lupaava materiaali käytettäväksi lääketieteessä.

6 Kiitokset

Haluan kiittää ohjaajaani Terhi Heinoa asiantuntevasta ohjauksesta ja mahdollisuudesta tehdä tämä projekti hänen tutkimusryhmässään. Erityiskiitokset haluan osoittaa toiselle ohjaajalleni Karoliina Kajanderille ohjauksesta työn käytännön toteuttamisessa sekä kaikesta avusta ja tuesta koko Pro Gradu -työn aikana. Lisäksi kiitän muita ryhmäläisiä ja Medisiina C4:n henkilökuntaa.

Sain toteuttaa Pro Gradu -työni yhteistyössä kone- ja materiaalitekniikan laitoksen kanssa, joten haluan kiittää myös apulaisprofessori Ashish Ganviria tutkimusryhmineen yhteistyöstä.

7 Kirjallisuus

- Alghazali, K. M., Nima, Z. A., Hamzah, R. N., Dhar, M. S., Anderson, D. E., & Biris, A. S. (2015). Bone-tissue engineering: Complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies. *Teoksessa Drug Metabolism Reviews* (Vsk. 47, Numero 4, ss. 431–454). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1115871>
- Al-Zyoud, W., Haddadin, D., Hasan, S. A., Jaradat, H., & Kanoun, O. (2023). Biocompatibility Testing for Implants: A Novel Tool for Selection and Characterization. *Teoksessa Materials* (Vsk. 16, Numero 21). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ma16216881>
- Attaran, M. (2017). The rise of 3-D printing: The advantages of additive manufacturing over traditional manufacturing. *Business Horizons*, 60(5), 677–688. <https://doi.org/10.1016/j.bushor.2017.05.011>
- Attarilar, S., Ebrahimi, M., Djavanroodi, F., Fu, Y., Wang, L., & Yang, J. (2021). 3D Printing Technologies in Metallic Implants: A Thematic Review on the Techniques and Procedures. *International Journal of Bioprinting*, 7(1), 21–46. <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i1.306>
- Aubin, J. E., & Bonnelye, E. (2000). *Osteoprotegerin and its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption**.
- Bella, E. Della, Buetti-Dinh, A., Licandro, G., Ahmad, P., Basoli, V., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2021). Dexamethasone induces changes in osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells via sox9 and pparg, but not runx2. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094785>
- Bernhard, J. C., Marolt Presen, D., Li, M., Monforte, X., Ferguson, J., Leinfellner, G., Heimel, P., Betti, S. L., Shu, S., Teuschl-Woller, A. H., Tangl, S., Redl, H., & Vunjak-Novakovic, G. (2022). Effects of Endochondral and Intramembranous Ossification Pathways on Bone Tissue Formation and Vascularization in Human Tissue-Engineered Grafts. *Cells*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/cells11193070>
- Camps, J., & About, I. (2003). *Cytotoxicity Testing of Endodontic Sealers: A New Method*.
- Downey, P. A., & Siegel, M. I. (2006). Number 1. *Physical Therapy*, 86, 77. <https://academic.oup.com/ptj/article/86/1/77/2805118>

- Fimea. *Biomateriaalit*. Luettu 16.05.2024. Noudettu 19. toukokuuta 2024, osoitteesta https://fimea.fi/laakinnalliset_laitteet/mita-ovat-laakinnalliset-laitteet-/erikoislaiteryhmat/biomateriaalit
- Fini, M., Aldini, N. N., Torricelli, P., Giavaresi, G., Borsari, V., Lenger, H., Bernauer, J., Giardino, R., Chiesa, R., & Cigada, A. (2003). A new austenitic stainless steel with negligible nickel content: An in vitro and in vivo comparative investigation. *Biomaterials*, *24*(27), 4929–4939. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00416-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00416-2)
- Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R., Lenger, H., Bernauer, J., Rimondini, L., Torricelli, P., Borsari, V., Chiusoli, L., Chiesa, R., & Cigada, A. (2004). A new austenitic stainless steel with a negligible amount of nickel: An in vitro study in view of its clinical application in osteoporotic bone. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *71*(1), 30–37. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30068>
- Florencio-Silva, R., Rodrigues Da, G., Sasso, S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Fontcuberta-Rigo, M., Nakamura, M., & Puigbò, P. (2023). Phylobone: a comprehensive database of bone extracellular matrix proteins in human and model organisms. *Bone Research*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00281-w>
- Galea, G. L., Zein, M. R., Allen, S., & Francis-West, P. (2021). Making and shaping endochondral and intramembranous bones. Teoksessa *Developmental Dynamics* (Vsk. 250, Numero 3, ss. 414–449). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/dvdy.278>
- Gao, C., Peng, S., Feng, P., & Shuai, C. (2017). Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Research 2017 5:1*, *5*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.59>
- Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human health and environmental toxicology. Teoksessa *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vsk. 17, Numero 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>
- Hagar, M. N., Yazid, F., Luchman, N. A., Hisham, S., Ariffin, Z., Megat, R., & Wahab, A. (2020). Comparative evaluation of osteogenic differentiation potential of stem cells derived from dental pulp and exfoliated deciduous teeth cultured over granular hydroxyapatite based scaffold. *BMC Oral Health*, *21*, 263. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01621-0>

- Hallab, N. J., Anderson, S., Caicedo, M., Brasher, A., Mikecz, K., & Jacobs, J. J. (2005). Effects of soluble metals on human peri-implant cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 74(1), 124–140.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.30345>
- Helmus, M. N., Gibbons, D. F., & Cebon, D. (2008). Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. *Toxicologic Pathology*, 36(1), 70–80. <https://doi.org/10.1177/0192623307310949>
- Huzum, B., Puha, B., Necoara, R., Gheorghievici, S., Puha, G., Filip, A., Sirbu, P., & Alexa, O. (2021). Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(5).
<https://doi.org/10.3892/etm.2021.10750>
- Ihde, L. L., Forrester, D. M., Gottsegen, C. J., Masih, S., Patel, D. B., Vachon, L. A., White, E. A., & Matcuk, G. R. (2011). Sclerosing bone dys-plasias: Review and differentiation from other causes of osteosclerosis. *Radiographics*, 31(7), 1865–1882. <https://doi.org/10.1148/rg.317115093>
- Kaur, M., & Singh, K. (2019). Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. Teoksessa *Materials Science and Engineering C* (Vsk. 102, ss. 844–862). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.064>
- Khurana, J. S. (2009). Bone pathology. Teoksessa *Bone Pathology*. Humana Press.
<https://doi.org/10.1007/978-1-59745-347-9>
- Lazner, F., Gowen, M., Pavasovic, D., & Kola, I. (1999). Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. Teoksessa *Human Molecular Genetics* (Vsk. 8, Numero 10).
- Lin, C. Y., & Kang, J. H. (2021). Mechanical properties of compact bone defined by the stress-strain curve measured using uniaxial tensile test: A concise review and practical guide. Teoksessa *Materials* (Vsk. 14, Numero 15). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ma14154224>
- Majumdar, P. (2006). *Cell Viability and Growth on Metallic Surfaces: in vitro Studies*.
<http://www.sbaoi.org>
- Meng, M., Wang, J., Huang, H., Liu, X., Zhang, J., & Li, Z. (2023). 3D printing metal implants in orthopedic surgery: Methods, applications and future prospects. *Journal of Orthopaedic Translation*, 42, 94–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jot.2023.08.004>

- Mizoguchi, T., & Ono, N. (2021). The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *Teoksessa Journal of Bone and Mineral Research* (Vsk. 36, Numero 8, ss. 1432–1447). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4410>
- Mullender, M. G., Van Der Meer, D. D., Huiskes, R., & Lips, P. (1996). Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*, *18*(2), 109–113. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)00444-0](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)00444-0)
- Munshi, S., Twining, R. C., & Dahl, R. (2014). Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *70*(2), 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.06.005>
- Nayak, C., Anand, A., Kamboj, N., Kantonen, T., Kajander, K., Tupala, V., Heino, T. J., Cherukuri, R., Mohanty, G., Čapek, J., Polatidis, E., Goel, S., Salminen, A., & Ganvir, A. (2024). Tribological behavior and biocompatibility of novel Nickel-Free stainless steel manufactured via laser powder bed fusion for biomedical applications. *Materials and Design*, *242*. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2024.113013>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, *267*(17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- Omidi, M., Fatehinya, A., Farahani, M., Akbari, Z., Shahmoradi, S., Yazdian, F., Tahriri, M., Moharamzadeh, K., Tayebi, L., & Vashae, D. (2017). Characterization of biomaterials. *Teoksessa Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering* (ss. 97–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100961-1.00007-4>
- Parker, S. (2009). *Ihmiskeho - Suuri ensyklopedia*. Hung Hing Offset Printing.
- Ponzetti, M., & Rucci, N. (2021). Osteoblast differentiation and signaling: Established concepts and emerging topics. *Teoksessa International Journal of Molecular Sciences* (Vsk. 22, Numero 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22136651>
- Salhotra, A., Shah, H. N., Levi, B., & Longaker, M. T. (2020). Mechanisms of bone development and repair. *Teoksessa Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vsk. 21, Numero 11, ss. 696–711). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>

- Sampath Kumar, T. S. (2013). Physical and Chemical Characterization of Biomaterials. Teoksessa *Characterization of Biomaterials* (ss. 11–47). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00002-4>
- Sandmeyer Steel Company. (2014). *Specification Sheet: Alloy 316/316L*.
<https://www.sandmeyersteel.com/images/316316l/316-316l-317l-spec-sheet.pdf>
- Tabassum, A. (2022). Effect of dexamethasone on the growth and differentiation of osteoblast-like cells derived from the human alveolar bone. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 17(4), 707–714.
<https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2021.12.008>
- Tappa, K., & Jammalamadaka, U. (2018). *Functional Biomaterials Review Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques*.
<https://doi.org/10.3390/jfb9010017>
- Techaniyom, P., Tanurat, P., & Sirivisoot, S. (2020). Osteoblast differentiation and gene expression analysis on anodized titanium samples coated with graphene oxide. *Applied Surface Science*, 526. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146646>
- Thomann, U. I., & Uggowitz, P. J. (2000). Wear-corrosion behavior of biocompatible austenitic stainless steels. Teoksessa *Wear* (Vsk. 239).
www.elsevier.com/locate/wear
- Ul, A., Mohsan, H., & Wei, D. (2023). *materials Review Advancements in Additive Manufacturing of Tantalum via the Laser Powder Bed Fusion (PBF-LB/M): A Comprehensive Review*. <https://doi.org/10.3390/ma16196419>
- Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., & Franceschi, R. T. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(6), 893–903.
<https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.6.893>
- Wang, J. H., Wang, K., Bartling, B., & Liu, C. C. (2009). The detection of alkaline phosphatase using an electrochemical biosensor in a single-step approach. *Sensors*, 9(11), 8709–8721. <https://doi.org/10.3390/s91108709>
- Wu, J., Li, M., Zhou, Y., Xu, K., Li, X., Lin, C., Zhang, J., & Cai, K. (2022). *Pitting behavior of 316L stainless steel in direct culture with mesenchymal stem cells*.
<https://doi.org/10.1016/j.corsci.2022.110380>
- Wu, Y., Liu, J., Kang, L., Tian, J., Zhang, X., Hu, J., Huang, Y., Wang, H., & Wu, Z. (2023). *An overview of 3D printed metal implants in orthopedic applications: Present and future perspectives*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17718>

Yang, K., & Ren, Y. (2010). Nickel-free austenitic stainless steels for medical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1), 014105.
<https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014105>