

# Mikrokuvioidin vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen adheesioon, levittäytymiseen ja luuksi

Emilia Kaivosoja<sup>1,2</sup>, Sami Myllymaa<sup>3</sup>, Katja Myllymaa<sup>3,4</sup>, Tarvo Sillat<sup>1,2</sup>, Reijo Lappalainen<sup>3</sup>, Yrjö T. Konttinen<sup>1,5,6</sup>

<sup>1</sup>Sisätautien osasto, Kliininen laitos, HY

<sup>2</sup>Anatomian osasto, Biolääketieteen laitos, HY

<sup>3</sup>Fysiikan laitos, KY

<sup>4</sup>Mikrosensorilaboratorio, Savonia AMK

<sup>5</sup>Tieteellinen tutkimus ORTON

<sup>6</sup>Tekonivelsairaala COXA

It was hypothesized that human mesenchymal stromal cell (hMSC) can be guided by patterned and plain amorphous diamond (AD), titanium, tantalum and chromium coatings, produced on silicon using photolithography-physical vapour deposition. At 7.5h hMSCs density was 3.0-3.5x higher (except Ti) and cells were smaller (68 vs 102  $\mu\text{m}$ ) on patterns than on silicon-background. Vinculin adhesions and actin cytoskeleton were outgoing from pattern edges so cells assumed geometric square shapes. Patterns allowed induced osteogenesis, but less effectively than plain surfaces, except for AD, which could be used to avoid osseointegration. The biomaterial patterns exert direct early, intermediate and late guidance on hMSCs and osteogenic differentiation, but indirect interactions exist with cells on silicon background.

Pinnan kuvioinnin vaikutusta soluihin on tutkittu enimmäkseen mikromittakaavassa (1–3). Kuvioinnin avulla on mahdollista säädellä solujen adheesioita, lisääntymistä, erilaistumista ja liikkumista (4,5). Viimeaikoina ihmisen mesenkymaaliset kantasolut ovat herättäneet runsaasti mielenkiintoa, koska niiden avulla voidaan korjata kudoksia ja niitä voidaan potentiaalisesti hyödyntää regeneratiivisen lääketieteen ja kudosteknologian sovelluksissa. Mesenkymaaliset kantasolut kykenevät uusiutumaan ja säilyttämään kantasolunomaisuutensa sekä erilaistumaan tiettyjen signaalien vaikutuksesta fenotyypiltään erilaisiksi soluiksi, kuten luu-, rusto- ja rasvasoluiksi (6). Regeneratiivisen lääketieteen tavoitteena on korjata ja korvata kudoksia ja jopa kokonaisia elimiä käyttämällä potilaan omia soluja ja biomateriaaleja hyväksi. Tämän vuoksi solu-biomateriaalivuorovaikutusten ymmärtäminen on tullut yhä tärkeämmäksi.

Tässä tutkimuksessa tutkittiin metallien vaikutusta mesenkymaalisiin kantasoluihin ja verrattiin tuloksia amorfiseen timanttiiin (AD) vaikutuksiin. Tutkit-

tuja metalleja käytetään implanteissa sellaisenaan tai seoksissa ja amorfista timanttia on kehitetty potentiaalisena implanttipinnoitteena (7,8). Stiehler et al. raportoivat aikaisemmin sileiden tantaali-, titaani- ja kromipinnoitteiden vaikutuksista soluihin (9). Tässä työssä tutkimusta laajennettiin valmistamalla samoista metalleista 75  $\mu\text{m}$  x 75  $\mu\text{m}$  neliöillä kuvioituja pintoja valolitografian ja ohutkalvopinnoituksen avulla. Lisäksi näiden metallien vaikutusta verrattiin samalla tavalla kuvioituun timanttiiin. Kudosteknologian sovellusten lisäksi solu-biomateriaalivuorovaikutukset ovat tärkeitä kaikissa solu-biomateriaali kontakteissa implantoitaessa proteeseja, stenttejä, suntteja ja muita implantteja. Tulevaisuudessa älykkäiden implanttien, kuten biologisten mikroelektromekaanisten systeemien (bioMEMS) käyttö tulee lisääntymään. BioMEMS implantit valmistetaan tyypillisesti piille, minä vuoksi tässäkin työssä käytettiin piitä pinnoituksen taustamateriaalina.

Ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja voidaan pitää herkkinä ja monipuolisina solutaso antureina, ja

niitä voidaan käyttää biomateriaalien bioyhteensopi-  
vuuden tutkimiseen. Solujen adheesio, levittäytymi-  
nen ja erilaistuminen kertovat solujen ja biomateri-  
aalin välisen vuorovaikutuksen laadusta ja tarjoavat  
tietoa eri materiaalien ja erilaisten kuvioiden vaiku-  
tuksesta. Aikaisemmat tutkimukset mesenkymaali-  
silla kantasoluilla ja mikrokuvioituilla pinnoilla ovat  
keskittyneet polymeereihin (10–17) sekä nanokuvioi-  
tuun titaaniin (18). Tämä on ensimmäinen tutkimus,  
joka käsittelee mesenkymaalisten kantasolujen morfo-  
logiaa, adheesiota, levittäytymistä ja luuksi erilaistu-  
mista hyvin karakterisoiduilla metalleilla ja keraami-  
sella timantilla mikrokuvioituilla piipinnoilla. Työn  
hypoteesina oli, että mikrokuvioidut materiaalit oh-  
jaavat mesenkymaalisten kantasolujen käyttäytymistä  
eri tavoin.

### **Menetelmät**

Mikrokuvioidut pinnat valmistettiin käyttäen aiem-  
min kuvattuja menetelmiä (19). Tässä työssä tutkittiin  
timantilla, titaanilla, tantaalilla ja kromilla kuvioituja  
piipintoja. Kuvioina oli  $75\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$  biomateri-  
aalinelioita  $100\ \mu\text{m}$  etäisyydellä toisistaan ja pinnoite  
peitti  $18,4\ \%$  kokonaispinta-alasta.

### **Atomivoimamikroskopia**

Pinnan nanomittakaavan topografia mitattiin käyttä-  
mällä PSIA XE-100 -atomivoimamikroskooppia (Park  
Systems Corp., Suwon, Korea). Alumiinipinnoitettu-  
ja piipalkkeja käytettiin ilman kontaktia (Acta-10, ST  
Instruments B.V., LE Groot-Ammers, Hollanti) ja  
pinnasta tutkittiin  $2 \times 2\ \mu\text{m}$  alue  $0,25\ \text{Hz}$  taajuudella.  
Keskimääräinen pinnankarheus (Ra) ja huippu-laakso  
(peak-to-valley) karheus (Rpv) määritettiin kuudesta  
satunnaisesti valitusta kuvasta käyttäen XIA-analyysiohjelmaa.

### **Soluviljelmät**

Ihmisen mesenkymaalisia kantasoluja (Poietics™, Lonza, Basel, Sveitsi) soluja viljeltiin  $10\ \text{cm}$  Petri-  
maljoissa (Corning Inc., Corning, NY, USA). Vilje-  
lynesteenä käytettiin Lonzan Mesenchymal Stem Cell  
Basal (MSCGM)-mediaa, joka sisältyi L-glutamiinia  
ja penisilliiniä (elektronimikroskooppikoe) tai GA-  
1000:aa (Gentamicin/Amphotericin-B). Soluja kasva-  
tettiin  $80\ \%$  konfluenssiasteeseen saakka  $37^\circ\text{C}$  lämpö-  
tilassa soluviljelykaapissa ( $\text{CO}_2\ 5\ \%$ ). Tämän jälkeen  
kasvatusneste poistettiin ja solukerros pestiin kahdesti  
fosfaattipuskuroidulla  $10\ \text{mM}$  fysiologisella suolaliu-

oksella (pH 7.4). Solut irrotettiin inkuboimalla solu-  
ja huoneen lämpötilassa  $5\ \text{min}$   $2,5\ \text{mg/ml}$  trypsiini-  
etyleenidiamiinitetraetikkahappoliuoksessa ( $0,05\ \text{ml/cm}^2$ ),  
jonka jälkeen maljalle lisättiin vastaava määrä  
kasvatusnesteä ja suspensio siirrettiin Falcon-put-  
keen. Trypsiini poistettiin sentrifugoimalla soluja  $600 \times g$   
 $5\ \text{min}$ . Solut suspensoitiin kasvatusnesteeseen ja  
jaettiin biomateriaalipinnoille  $0,52 \times 10^4\ \text{cm}^{-2}$  tihe-  
ydessä. Kaikissa kokeissa käytettiin 12-kuoppalevyjä  
(Corning Inc., Corning, NY, USA). Soluja kasvateti-  
ttiin  $7,5\ \text{tuntia}$  tai  $5\ \text{päivää}$  ( $80\ \%$  konfluenssi).

Luunmuodostuskoetta varten  $7.$  pasasiin solut istu-  
tettiin näytteille  $0,31 \times 10^4\ \text{cm}^{-2}$  tiheydessä. Puolet  
näytteistä indusoitiin  $24\ \text{tunnin}$  jälkeen vaihtamalla  
MSCGM-media luunmuodostusta indusoivaan kas-  
vatusnesteeseen (Lonza). Indusoitujen näytteiden indu-  
soiva kasvatusneste vaihdettiin  $3\text{--}4$  päivän välein ja  
kontrollinäytteiden MSCGM-media vaihdettiin sam-  
an aikataulun mukaisesti. Luunmuodostusta tutkit-  
tiin alkaliinifosfataasi-, osteokalsiini ja mineralisaatio-  
värjäyksillä.

### **Elektronimikroskopia**

Soluja kasvatettiin näytteiden päällä  $7,5\ \text{tuntia}$  tai  $5$   
 $\text{päivää}$ . Kustakin näytetyypistä analysoidtiin vähintään  
kolme rinnakkaista näytettä. Inkubaation jälkeen  
näytteet siirrettiin uudelle kuoppalevyille, pestiin kah-  
desti fosfaattipuskuroidulla fysiologisella suolaliuok-  
sella ja kiinnitettiin  $2,5\ \%$  glutaraldehydissä (Sigma  
Chemical, St. Louis, MO, USA) yön yli  $4^\circ\text{C}$  lämpöti-  
lassa. Fiksoinnin jälkeen näytteet huuhdeltiin fosfaat-  
tipuskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella ja kuivat-  
tiin etanolisarjassa ( $50\ \%$ ,  $70\ \%$ ,  $90\ \%$ ,  $96\ \%$  sekä  
absoluuttinen etanoli). Kuivaus viimeisteltiin kriitti-  
sen pisteen kuivaus menetelmällä Bal-Tec CPD 030  
-laitteella (BAL-TEC AG, Balzers, Lichtenstein). Kui-  
vatut näytteet kiinnitettiin alustoille ja pinnoitettiin  
ohuella platinakerroksella Agar-sputterointilaitteella  
(AGAR, Stansted, Englanti). Näytteet kuvattiin Zeiss  
DSM 962 -elektronimikroskooppilla (Carl Zeiss, Ober-  
kochen, Saksa) käyttäen  $8\ \text{kV}$  kiihdytysjännitettä.

Näytteistä laskettiin solujen tiheys ja peittävyys.  
Solujen peittävyys laskettiin  $0,490\ \text{mm}^2$  alueelta, jos-  
sa kuviointi peitti  $0,097\ \text{mm}^2$  kokonaispinta-alasta.  
Peittävyys laskettiin puoliautomaattisesti Matlabil-  
la (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Taus-  
ta, joka ei ollut peittynyt soluilla, saatiin segmentoitua  
soluista ja kuvioista Cannyn reunanhakuoperaatto-  
ria alueella. Kuviot ja solut saatiin vielä segmentoitua  
manuaalisesti soveltamalla Cannyn reunoja toistami-

seen aiemmin segmentoituun kuvaan ja vertaamalla tätä kuvaa alkuperäiseen kuvaan ja valitsemalla peittymättömät kuviot. Menetelmä ei ole 100 %:sen tarkka, mutta syntyneet virheet ovat systemaattisia, eli eri näytteitä voidaan verrata keskenään luotettavasti. Solujen koko saatiin laskettua yksinkertaisesta jakamalla solujen peittämällä prosentuaalinen pinta-ala niiden tiheydellä.

#### **Fokaaliadheesiovärjäys**

Kustakin näytetyypistä värjättiin yksi näyte 7,5 tunnin ja 5 päivän inkubaation jälkeen. Näytteet pestiin kolmesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, jonka jälkeen ne kiinnitettiin 4 % padaformaldehydissä (PFA) 10 min ajan. Näytteitä permeabilisoitiin 10 min ajan 0,1 % Triton X-100 liuoksessa, jonka jälkeen ne pestiin kahdesti samalla liuoksella. Epäspesifi värjäytyminen estettiin inkuboimalla näytteitä tunti vuohen seerumissa (1:30 laimennos). Tämän jälkeen näytteitä inkuboitettiin tunti primaarisessa anti-vinkuliini IgG vasta-aineessa (20), jonka jälkeen näytteet pestiin kolmesti Triton X-100 liuoksessa ennen 30 min Alexa fluor 488-konjugoidun sekundaari vasta-aineen (vuohen anti-hiiri IgG 1:400 laimennos; Molecular Probes, Eugene, USA) inkubaatiota. Aktiini värjättiin inkuboimalla Alexa fluor 568-konjugoitua falooidiinia (1:30 laimennos Invitrogen, Carlsbad, USA) yhdessä sekundäärisvasta-aineen kanssa. Näytteet pestiin kolmesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, jonka jälkeen tuma värjättiin inkuboimalla DAPI:a (1:1000 laimennos tislatussa vedessä, Sigma) 10 min. Näytteet pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja kerran vedellä ennen kiinnitystä alustalle. Laimennokset tehtiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, jossa oli 0,1 % naudan albumiinia, ellei erikseen muuta ole mainittu.

#### **Alkaliinifosfataasivärjäys**

14 päivän näytteet pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella, jonka jälkeen näytteitä inkuboitettiin tunti 0,1 M Tris puskuri (pH 8) liuoksessa, joka sisälsi naftoli-AS-MX fosfaatti natriumsuolaa (Sigma, 1 mg/ml) ja Fast red TR (Sigma, 1 mg/ml) -kromogeeniä. Inkubaation jälkeen näytteet pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja kiinnitettiin 15 min ajan PFA:ssa. Tämän jälkeen näytteet pestiin kolmesti tislatussa vedellä, permeabilisoitiin Triton X-100-liuoksessa 10 min ajan ja pestiin kolmesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella. Tumat värjättiin inkuboimalla näytteitä DAPI:ssa (1:1000 laimennos

tislatussa vedessä) 10 min, jonka jälkeen näytteet pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja kerran tislatussa vedellä ennen kiinnitystä.

#### **Osteokalsiinivärjäys**

17 päivän näytteet pestiin kolmesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja kiinnitettiin 4 % PFA:ssa 20 min ajan. Näytteet permeabilisoitiin Triton X-100-liuoksessa 10 minuutin ajan ja epäspesifi värjäytyminen estettiin inkuboimalla näytteitä tunti aasin seerumissa (1:10 laimennos). Näytteitä inkuboitettiin osteokalsiini-vasta-aineessa (AbD Serotec 7060-1515; 1:40 laimennos) yön yli 4°C asteen lämpötilassa. Tämän jälkeen vaiheet toteutettiin pimeässä. Näytteet pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja inkuboitettiin Alexa Fluor 488 -konjugoidussa sekundäärisvasta-aineessa (aasin anti-kani IgG 1:100 laimennos) 60 min. Näytteet pestiin kolmesti fosforipuskuroidulla suolaliuoksella ja aktiinisäikeet värjättiin inkuboimalla Alexa fluor 568 -konjugoitua falooidiinia 20 min. Näytteet pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja kerran tislatussa vedellä. Laimennokset tehtiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, jossa oli 0,1 % naudan albumiinia.

#### **Mineralisaatiovärjäys**

21 päivän näytteet pestiin kahdesti fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella ja kiinnitettiin 4 % PFA:lla 15 minuutin ajan. Näytteet siirrettiin lasiselle Petri-maljalalle (pesuissa käytettävät asetoni ja ksyleeni ovat voimakkaita liuottimia), pestiin kolmesti tislatussa vedellä ja värjättiin 2 % Alizarin punaisella 2 minuutin ajan. Värjäyksen jälkeen näytteet huuhdeltiin 20x asetonisessa ja 20x asetoni-ksyleeni-liuoksessa (1:1) sekä kerran puhtaassa ksyleenissä.

#### **Mikroskopointi ja kuvaus**

Värjäyksen jälkeen ylimääräinen neste imaistiin paperin kulmalla pois näytteiltä. Näytteet liimattiin objektilaseille pikaliimalla ja upotettiin Vectashield (vinkuliini-, ALP- ja osteokalsiinivärjäyset; Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, England) tai Mountex-nesteeseen (mineralisaatiovärjäys; Göteborg, Sweden) ja niiden päälle asetettiin peitinlasi. Näytteet kuvattiin Leitz Diaplan -mikroskoopilla (mineralisaatiovärjäys; Wetzlar, Germany) tai Olympus-fluoresenssimikroskoopilla (muut värjäykset; Olympus, Tokyo, Japan). Kuvattaessa käytettiin yhtä pitkiä valotusaikoja, jotta näytteitä voitaisiin verrata.

## Tilastollinen analyysi

Ryhmien välisten erojen tilastollista merkittävyyttä arvioitiin varianssianalyysin (one-way ANOVA) ja Tukey HSD Post-Hoc testin avulla. Tulokset on esitetty keskiarvo ± keskiarvon keskihajonta.

## Tulokset

### Pinnankarheus

Nanomittakaavan keskimääräinen pinnankarheus (Ra) ja huippu-laakso-karheus (Rpv) olivat tilastollisesti merkittävän paljon pienemmät timantilla verrattuna kaikkiin muihin pinnoitteisiin ( $p < 0,001$ ). Myös erot kromin ja tantaalin tai titaanin välillä olivat tilastollisesti merkittävät ( $p < 0,001$ ; taulukko 1). Erot ovat kuitenkin hyvin pieniä ja tutkitut pinnan hyvin sileitä, peilimäisiä.

### Kantasolujen varhainen adheesio

7,5 tunnin kasvatuksen jälkeen solut suosivat biomateriaalisaarekkeitä ja asettautuvat usein kuvioiden reunojen mukaisesti nelikulmaiseen muotoon (kuva 1, paneelit a-d). Solutiheyksianalyysi (kuva 2, paneeli a) havainnollistaa ohjausvaikutuksen suuruutta; kaikilla muilla materiaaleilla, paitsi titaanilla, soluja on biomateriaalikuvioidella 3,0–3,5 kertaa enemmän kuin taustalla ( $p < 0,0003$ ). Titaanisaarekkeilla solujen tiheys ei eronnut taustalla kasvaneiden solujen tiheydestä. Peittävyysanalyysi (kuva 2, paneeli b) vahvisti havainnon ohjausvaikutuksesta; solut peittivät biomateriaalikuvioiden suuremman osan kuin piitaustasta ( $p < 0,02$ ) kaikilla muilla näytteillä, paitsi titaanilla. Peittävyysanalyysissä havaittiin näytteiden välisiä eroja; titaanikuvioiden peittävyys oli pienempi kuin kromi- ja tantaalikuvioiden ( $p < 0,03$ ). Lisäksi solujen tiheys titaaninäytteiden piitaustalla oli alhaisempi kuin timanttinäytteiden piitaustalla ( $p < 0,02$ ).

Solujen keskimääräinen halkaisija (jos solut oletetaan pyöreiksi) 7,5 tunnin aikapisteessä oli piitaustalla 102  $\mu\text{m}$  ollen merkittävästi suurempi kuin biomateriaalikuvioidella, jossa halkaisija oli vain 68  $\mu\text{m}$  (kuva 2, paneeli c). Näytteiden välillä ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja.

### Kantasolujen levittäytyminen

Levittäytymistä tutkittiin 5 päivän kasvatuksen (noin 80 % konfluenssi) jälkeen (kuva 1 e-h). Tässä vaiheessa solut olivat jo huomattavasti suurempia kuin kuviot, minkä vuoksi solujen laskeminen oli mahdoton-

**Taulukko 1. Karheusparametrit Rpv ja Ra määritettiin atomivoimamikroskoopilla. Tulokset on esitetty keskiarvo ± keskihajonta ja mittauksia tehtiin kustakin materiaalista vähintään n=6 satunnaisesti valittua paikkaa.**

Materiaali	Rpv(nm)	Ra(nm)
AD	2,4 ± 1,0	0,3 ± 0,1
Ti	11,1 ± 1,5	1,8 ± 0,2
Ta	8,5 ± 2,0	1,5 ± 0,3
Cr	5,4 ± 1,0	0,8 ± 0,1
Si	1,4 ± 0,5	0,2 ± 0,1

ta (yksittäisen solun kohdalla ei voitu määrittää, onko se taustalla vai kuviolla). Tässä aikapisteessä pystyttiin kuitenkin analysoimaan, kuinka suuren osan pinnasta solut peittävät (kuva 2, paneeli d). Solut peittivät kuvioista 1,0–1,9 kertaa enemmän kuin taustasta, mutta ainut tilastollisesti merkitsevä ero näytteiden sisällä oli timanttinäytteillä. Näytteiden välillä kuitenkin oli eroa ja piitaustalla tantaalia ja titaania sisältävillä näytteillä solut peittivät suuremman osan kuin timantilla ( $p < 0,006$ ) ja kromilla ( $p < 0,04$ ). Kuvioista titaanilla oli peittynyt suurin osa, tantaalilla toiseksi suurin, timantilla ja kromilla vähiten. Timantilla ( $p < 0,02$ ) ja kromilla ( $p < 0,0008$ ) solut peittivät pienemmän osan kuvioiden pinnasta kuin titaanilla ja tantaalilla.

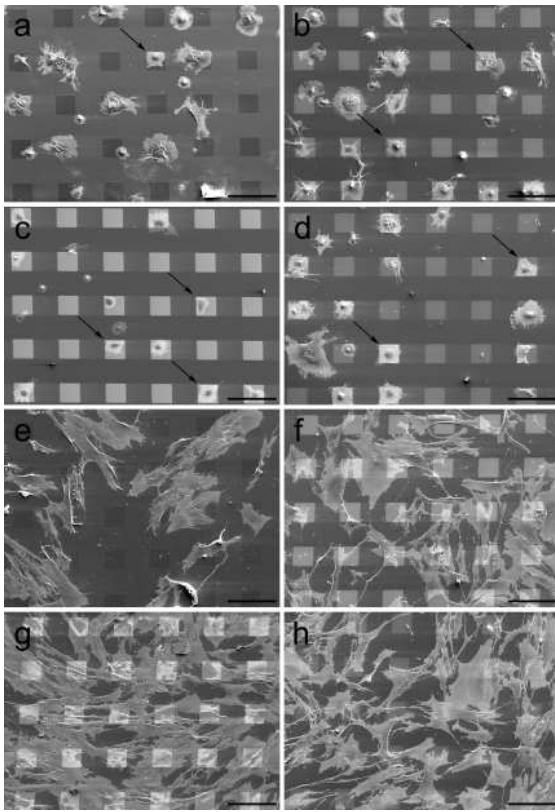
### Kantasolujen adheesio

7,5 tunnin kasvatuksen jälkeen aktiinifilamentit olivat jo hyvin järjestäytyneet, mutta vinkuliinia sisältäviä fokaaliadheesioita oli muodostunut vasta vähän. Solut olivat alkaneet levittäytyä enimmäkseen kuvioiden nurkista, kuten nähdään kuvasta 3 paneeleista a-d.

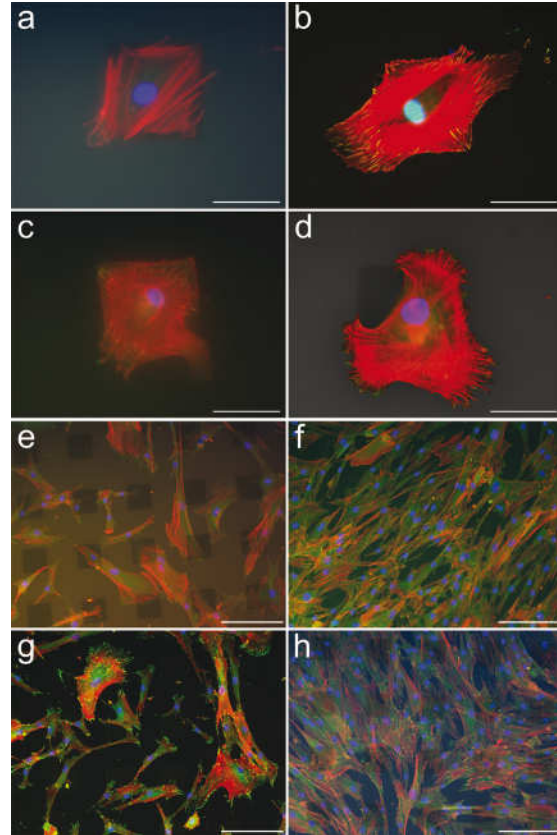
5 päivän kasvatuksen jälkeen fokaaliadheesiot olivat jo hyvin muodostuneet (kuva 3, paneelit e-h). Aiemman SaOS-2 soluilla tehdyn tutkimuksemme (21) perusteella odotimme näkevämme vinkuliinien suosivan biomateriaalikuviota ja välttelevän piitaustaa, mutta tällaista käyttäytymistä kantasoluilla ei havaittu.

### Luunmuodostus

Kantasolujen luuksi erilaistuminen osoitettiin käytämällä kolmea luunmuodostuksen merkkiainetta; alkaliinifosfaatin (ALP) aktiivisuus, osteokasliinin muodostus ja mineralisoituminen (kuvat 4, 5 ja 6). Kuvassa 4 punainen väri esittää ALP:tä ja sininen tumia. 14 päivän kasvatuksen jälkeen ALP näkyy selvästi

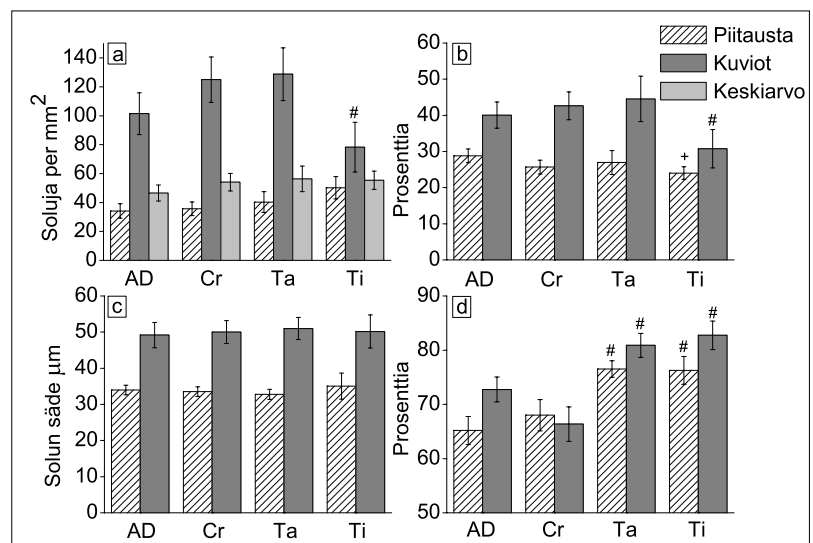


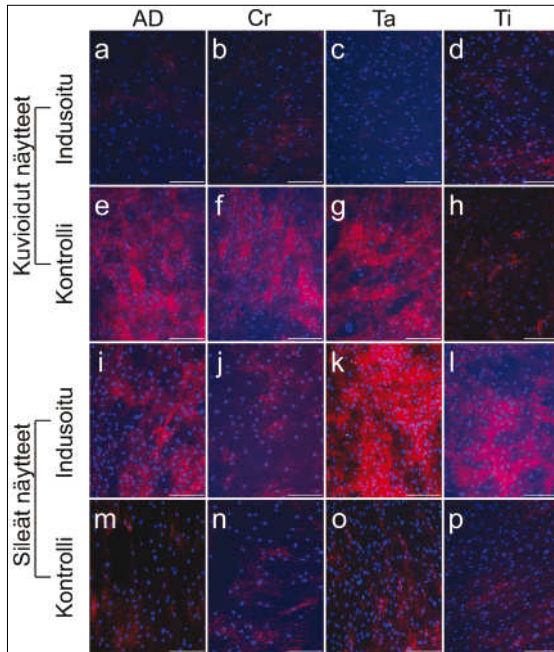
Kuva 1. Mesenkymaaliset kantasolut 7,5 tunnin (a-d) ja 5 päivän (e-f) kasvatuksen jälkeen (a, e) timantti-, (b, f) kromi-, (c, g) tantaali- ja (d, h) titaanikuvioiduilla piipinnoilla. Mittajana on 200  $\mu\text{m}$ . Nuolet osoittavat soluja, jotka ovat asettautuneet kuvioiden mukaisesti neliskulmaiseen muotoon.



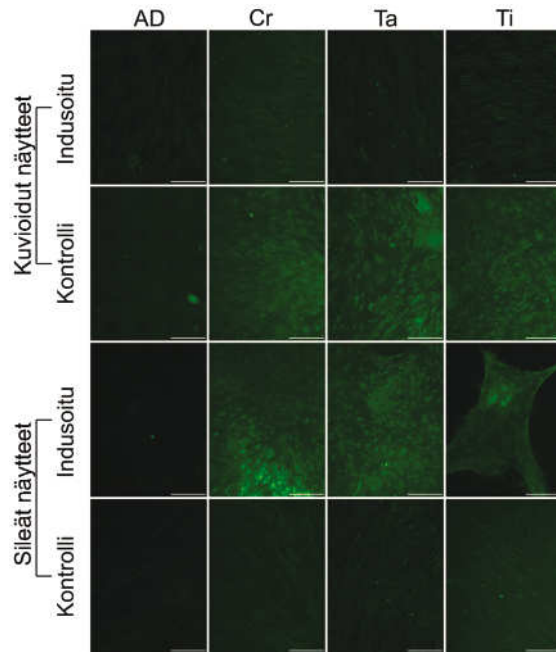
Kuva 3. Mesenkymaalisten kantasolujen värjäys (a-d) 7,5 tunnin ja (e-h) 5 päivän jälkeen. Aktiinifilamentit näkyvät punaisena, tumat sinisenä ja vinkuliini vihreänä. Näytteet (a, e) timantti-, (b, f) kromi-, (c, g) tantaali- ja (d, h) titaani. Mittajana on (a-d) 50  $\mu\text{m}$  ja (e-f) 200  $\mu\text{m}$ .

Kuva 2. Mesenkymaalisten kantasolujen (a) tiheys, (b) peittävyys ja (c) koko 7,5 tunnin kasvatuksen jälkeen ja (d) peittävyys 5 päivän jälkeen. Marginaalinen (a) tai merkittävä (b) ero verrattuna kromiin ja tantaaliin ja merkittävä ero verrattuna timanttiiin ja kromiin (d) on merkitty #-merkillä ja merkittävä ero verrattuna timanttiiin on merkitty +-merkillä.

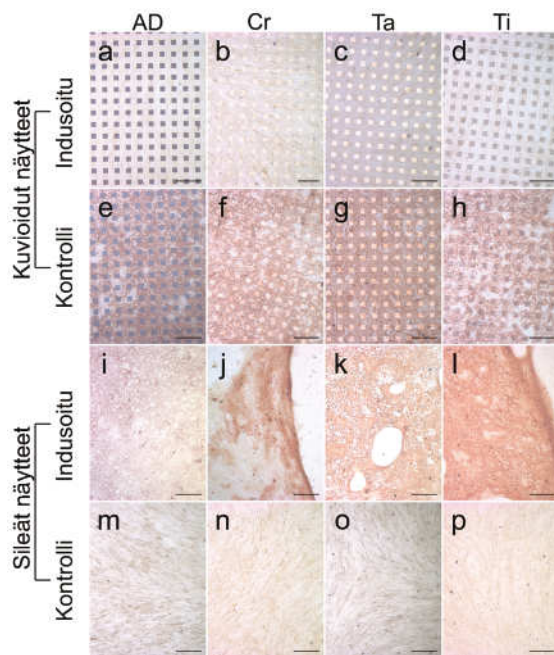




Kuva 4. Mesenkymaalisten kantasolujen alkaliinifosfa-taasivärjäys. Näytteet: (a-d) kontrollit ja (e-h) indusoidut solut kuvioiduilla pinnoilla, (i-l) indusoidut solut ja (m-p) kontrollit sileillä pinnoilla. Ensimmäisessä sarakeessa on timantti, toisessa kromi, kolmannessa tantaali ja neljännessä titaani. Mittajana on 200 µm.



Kuva 5. Mesenkymaalisten kantasolujen osteokalsiinivär-jäys (vihreä). Näytteet: (a-d) kontrollit ja (e-h) indusoidut solut kuvioiduilla pinnoilla, (i-l) indusoidut solut ja (m-p) kontrollit sileillä pinnoilla. Ensimmäisessä sarakeessa on timantti, toisessa kromi, kolmannessa tantaali ja neljännessä titaani. Mittajana on 200 µm.



Kuva 6. Mesenkymaalisten kantasolujen mineralisaatiovärjäys (punainen). Näytteet: (a-d) kontrollit ja (e-h) indusoidut solut kuvioiduilla pinnoilla, (i-l) indusoidut solut ja (m-p) kontrollit sileillä pinnoilla. Ensimmäisessä sarakeessa on timantti, toisessa kromi, kolmannessa tantaali ja neljännessä titaani. Mittajana on 400 µm.

indusoiduissa soluissa (kuva 4, kaksi keskimmäistä riviä), mutta kontrollisolut eivät värjäytyneet (kuva 4, reunimmat rivit). Selviä eroja sileiden ja kuvioitujen pintojen välillä ei havaittu. Materiaaleja verrattaessa tantaalinäytteillä ALP:n aktiivisuus vaikutti voimakkaimmalta.

Kuvassa 5 osteokalsiini näkyy vihreänä. Selvyyden vuoksi kuva esitettiin ilman aktiinitukirankaa (joka näkyisi punaisena kuten kuvassa 3). 17 päivän kasvatuksen jälkeen osteokalsiini näkyi yhä voimakkaana kromilla, tantaalilla ja titaanilla, mutta amorfisella timantilla värjäytymistä ei juurikaan havaittu. Myöskään kontrollinäytteet eivät värjäytyneet. Kuvioitujen ja sileiden pintojen välillä ei havaittu merkittäviä eroja.

Soluväliaineen mineralisoituminen nähdään punaisella värillä kuvassa 6. 21 päivän kasvatuksen jälkeen indusoidut solut tuottavat selvästi mineraaleja soluväliaineeseen, mutta kontrollinäytteet eivät värjäydy. Kuvioituilla pinnalla kasvavat solut tuottivat mineraaleja selvästi vähemmän kuin solut sileillä pinoilla. Sileillä pinoilla DLC:llä mineralisaatiota tapahtui selvästi vähemmän kuin kromilla, tantaalilla ja titaanilla.

### *Pohdinta*

Pinnan karheus vaikuttaa proteiinien adsorptioon ja solutason vasteisiin; esimerkiksi osteoblastiset solut suosivat karheita pintoja kun taas fibroblastit viihtyvät paremmin sileillä pinoilla (22). Atomivoimamikroskoopin avulla voitiin määrittää pinnankarheus nanomittakaavassa, ja osoitettiin pintojen olevan erittäin sileitä; keskimääräinen karheus oli alle 2 nm. Solujen tunnuslueliminä toimivien filopodien on todistettu huomaavan 10 nm korkuisia pinnaneroja (23,24), joten ainut pinnanmuoto, johon solut tässä tutkimuksessa reagoivat oli porras kuvion ja taustan välillä ( $\approx 200$  nm), koska pinnat olivat niin sileitä (karheus  $< 2$  nm). Riski, että näytteiden välillä havaitut erot johtuisivat eroista pinnan topografiasta, on olematon ja vaikuttaa siltä, että havaitut erot johtuvat pintakemiasta ja kuvioiden muodosta. Aikaisemmin on havaittu, että kuvioiden reunalla on vaikutusta solujen jakautumiseen, solujen tukirankaan ja solujen liikkumiseen (25–29) ja että kuvioiden geometria vaikuttaa hMSC-solujen erilaistumiseen, kuten adipogeneesiin (16) ja sen ajoitukseen (30).

Tässä tutkimuksessa materiaalit ja kuviot yhdessä ohjasivat mesenkymaalisia kantasoluja, mikä nä-

kyi erona solujen lukumäärässä kuvioilla ja piitaustalla, kun solut suosivat metalli- ja timanttikuvioita ja välttelivät taustan piitä. Tämä ohjausvaikutus edelleen heijasteli solujen kokoon siten, että solut olivat kuvioilla pienempiä kuin piitaustalla. Mikrotubulukset kasvavat pitkin pintaa kunnes törmäävät rajapintaan, jossa bioyhteensopiva pinta vaihtuu epämuokavammaksi. Yksittäisen solun muotoon vaikuttaa siis ympäristön geometria (26). Tämä ilmiö voi selittää eroja solujen koossa suhteellisen pienillä biomateriaalikuvioiden ja laajemmalla piitaustapinnalla. Havainto, että kuvioilla kasvaneet solut suosivat kuvioiden reunoja vahvisti tätä teoriaa. Ohjausvaikutus havaittiin siten, että yleensä pyöreähköt solut ottivat geometrisen neliömuodon biomateriaalikuviolla. Parker et al. (31) tekivät samanlaisia havaintoja tutkiessaan neliön muotoisia kuvioita; solujen lamellipodit, filopodit ja mikropiikit levittäytyivät kuvioiden kulmista. Tutkimukset viittaavat siihen, että fysikaalinen solusubstraatti-kontakti säätelee solujen ohjausvaikutusta. Solujen lukumäärä, koko ja peittävyys, tukirangan uudelleenjärjestäytyminen ja vinkuliinia sisältävien fokaaliadheesioiden muodostuminen ja solun muoto kaikki viittaavat siihen, että substraatin kemiallisen koostumuksen lisäksi myös kuvioiden fyysinen muoto ja reunat vaikuttavat niillä kasvaviin kantasoluihin. Näitä havaintoja voidaan hyödyntää esimerkiksi ohjaamalla solujen liikettä haluttuun suuntaan käyttäen kolmion muotoisia kuvioita.

Tätä koetta suunniteltaessa ajatuksena oli, että kuvioituja pintoja voitaisiin käyttää standardisoimaan kokeiden välisiä eroja, mitä usein havaitaan soluviljelykokeissa. On hyvin tunnettu ilmiö, että soluviljelykokeissa tapahtuu jonkin verran variaatioita vaikka kaikki kokeen vaiheet toteutetaan samalla tavalla. Toisin sanoen ajatuksena oli, että jos solut jostain syystä kasvavat yhdessä kokeessa hitaammin kuin toisessa, tämä ero voidaan korjata laskemalla kuvio-piitausta suhde solutiheydelle. Tätä lähestymistapaa on käytetty hyvällä menestyksellä bakteeriviljelmäkoikkeissa (32). Näistä syistä oli yllättävää, että solujen peittävyys piitaustalla vaihteli tilastollisesti merkittävästi riippuen siitä, mitä kuvioita piille oli pinnoitettu. 7,5 tunnin kasvatuksen jälkeen titaaninäytteiden piitaustalla solut peittivät pienemmän osan kuin timantinäytteiden taustalla, mutta 5 päivän kasvatuksen jälkeen tilanne oli päinvastainen. Tämä viittaa siihen, että suorien materiaali-solu vuorovaikutusten lisäksi, kuvioilla kasvavilla soluilla on etävaikutuksia piillä kasvaviin soluihin. Näitä vuorovaikutuksia oletettavasti säätele-

vät esim. liukoiset kasvutekijät, joita kuvioilla kasvavat solut vapauttavat soluviljelynesteeseen. Luonnollisesti myös piillä kasvavat solut voivat vaikuttaa kuviolla kasvaviin soluihin, mutta koska kaikkien näytteiden tausta oli samaa piitä, eroja näytteiden välillä ei voida selittää tällaisella vuorovaikutuksella.

Mesenkymaaliset kantasolut kykenevät erilaistumaan useiksi eri soluiksi, esimerkiksi osteoblasteiksi. Osteogeenistä erilaistumista tutkivat kokeet ovat suhteellisen aikavieviä, mutta niiden avulla saadaan tietoa solujen ja biomateriaalin välisestä vuorovaikutuksesta pitkällä (viikkojen) aikavälillä verrattuna aiemmin kuvattuihin nopeisiin (tunteja) ja keskipitkiin (päiviä) vuorovaikutuksiin. Indusoitu osteogeeninen erilaistuminen osoitettiin tunnetuilla luun muodostuksen merkkiaineilla; alkaliinifosfaatin aktiivisuudella sekä osteokalsiinilla ja mineraalien muodostuksella. Osteogeneesia tapahtui kuvioituilla tantaali, titaani ja kromi näytteillä, mutta ei yhtä voimakkaasti kuin sileillä näytteillä. Syy tähän eroon ei ole täysin selvä, mutta mahdollinen vaikutin on, että solut tarvitsevat pinnan, jossa ne voivat järjestäytyä useiden solujen muodostamaksi luukudostyyppiseksi rakenteeseen. Myös kuvioiden reuna voi vaikuttaa erilaistumiseen (16). Fibronektiinikuvioita polymetyylisiloksaanilla käsitellyt tutkimus osoitti, että kuvioiden koko kontrolloi mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista. Adipogeneesia tapahtui pienillä kuvioilla (1024  $\mu\text{m}^2$ ), ja osteogeneesia suurilla (10000  $\mu\text{m}^2$ ), ja molempia keskikokoisilla (2025  $\mu\text{m}^2$ ) kuvioilla (11). Tässä työssä käytettiin keskikokoisia kuvioita (5625  $\mu\text{m}^2$ ) ja voimme vetää johtopäätöksen, että kuvioiden koolla on vaikutusta hMSC solujen ohjaukseen ja erilaistumiseen. Kantasolut turvautuvat ympäristönsä tarjoamaan informaatioon (17) ja fokaaliadheesioiden muodostuksella ja muilla solun signaalintiprosesseilla voi olla kriittinen vaikutus luunmuodostukseen (18). Timanttinäytteillä alkaliinifosfaatin aktiivisuus oli kutakuinkin yhtä voimakas, kuin muilla näytteillä, mutta myöhäisemmät luunmuodostuksen merkkiaineet eivät viitanneet luunmuodostukseen kuvioituilla eivätkä sileillä timanttipinnoilla. Timantti vaikuttaa lupaavalta pinnoitteelta sovelluksiin, jossa implantti on kontaktissa luun kanssa, mutta poistetaan myöhemmin.

Yhteenvetona voidaan sanoa, että materiaalien kemiallisen rakenteen ja pinnan arkkitehtuurin ja näiden yhteisvaikutuksen avulla voidaan säädellä mesenkymaalisten kantasolujen käyttäytymistä.

### **Kirjallisuus**

1. Curtis A, Wilkinson C: Topographical control of cells. *Biomaterials*. 1997;18:1573–1583.
2. Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF: Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*. 1999;20:573–588.
3. Mwenifumbo S, Li M, Chen J, Beye A, Soboyejo W: Cell/surface interactions on laser micro-textured titanium-coated silicon surfaces. *J Mater Sci: Mater Med*. 2007;18:9–23.
4. Falconnet D, Csucs G, Michelle Grandin H, Textor M: Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*. 2006;27:3044–3063.
5. Ito Y: Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials*. 1999;20:2333–2342.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, ym.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143–147.
7. Lappalainen R, Santavirta SS: Potential of coatings in total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;430:72–79.
8. Lappalainen R, Selenius M: Joint bearing surfaces and replacement joint design. In: Revell PA, editor. *Joint replacement technology*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited; 2008. p. 176–189.
9. Stiehler M, Lind M, Mygind T, Bastrup A, Dolatshahi-Pirouz A, Li H, ym.: Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86:448–458.
10. Pirone DM, Qi L, Colecraft H, Chen CS: Spatial patterning of gene expression using surface-immobilized recombinant adenovirus. *Biomed Microdevices*. 2008;10:561–566.
11. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS: Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004;6:483–495.
12. Hart A, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Oreffo RO, Dalby MJ: Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam lithography. *J Mater Sci: Mater Med*. 2007;18:1211–1218.
13. Berry CC, Curtis ASG, Oreffo ROC, Agheli H, Sutherland DS: Human fibroblast and human bone marrow cell response to lithographically nanopatterned adhesive domains on protein rejecting substrates. *IEEE Trans Nanobiosci*. 2007;6:201–109.
14. Kim SJ, Lee JK, Kim JW, Jung JW, Seo K, Park SB, ym.: Surface modification of polydimethylsiloxane (PDMS) induced proliferation and neural-like cells differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008;19:2953–2962.
15. Ber S, Köse ST, Hasirci V: Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study. *Biomaterials*. 2005;26:1977–1986.
16. Luo W, Jones SR, Yousaf MN: Geometric control of stem cell differentiation rate on surfaces. *Langmuir*. 2008;24:12129–12133.
17. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Wilkinson CD, Oreffo RO: Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials*. 2006;27:1306–1315.
18. Sjöström T, Dalby MJ, Hart A, Tare R, Oreffo RO, Su B: Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their



interactions with human skeletal stem cells. *Acta Biomater.* 2009;5:1433–1441.

19. Levon J, Myllymaa K, Kouri VP, Rautemaa R, Kinnari T, Myllymaa S, ym: Biomateriaalien bakteeridheesion vastustuskyky: tantaali, titaani ja kromi verrattuna timantinkaltaiseen hiileen. *Suom Ortop Traumat.* 2008;31:290–295.

20. Lehto V-P, Virtanen I: Vinculin in cultured bovine lens-forming cells. *Cell Differ* 1985;16:153–160.

21. Kaivosoja E, Myllymaa S, Kouri V-P, Myllymaa K, Lappalainen R, Konttinen YT: Enhancement of silicon using micropatterned surfaces of thin films. *Eur Cells Mater*, in press.

22. Kunzler TP, Huwiler C, Drobek T, Vörös J, Spencer ND: Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients. *Biomaterials.* 2007;28:5000–5006.

23. Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, Curtis AS: Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nanotopography and fibroblast filopodia. *Cell Biol Int.* 2004;28:229–236.

24. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, ym.: Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials.* 2006;27:2980–2987.

25. Théry M, Racine V, Piel M, Pépin A, Dimitrov A, Chen Y, ym: Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:19771–19776.

26. Jiang X, Bruzewicz DA, Wong A, Piel M, Whitesides GM: Directing cell migration with asymmetric micropatterns, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:975–978.

27. Hoover DK, Chan EWL, Yousaf MN: Asymmetric peptide nanoarray surfaces for studies of single cell polarization. *J Am Chem Soc.* 2008;130:3280–3281.

28. Chan EWL, Yousaf MN: A photo-electroactive surface strategy for immobilizing ligands in patterns and gradients for studies of cell polarization. *Mol Biosyst.* 2008;4:746–753.

29. Brock A, Chang E, Ho CC, LeDuc P, Jiang X, Whitesides GM, ym: Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir.* 2003;19:1611–1617.

30. Chaubey A, Ross KJ, Leadbetter RM, Burg KJ: Surface patterning: Tool to modulate stem cell differentiation in an adipose system. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;84:70–78.

31. Parker KK, Brock AL, Brangwynne C, Mannix RJ, Wang N, Ostuni E, ym: Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J.* 2002;16:1195–2004.

32. Levon J, Myllymaa K, Kouri V-P, Rautemaa R, Kinnari T, Myllymaa S, ym: Patterned macroarray plates in comparison of bacterial adhesion inhibition of tantalum, titanium, and chromium compared with diamond-like carbon, *J Biomed Mater Res Part A.*