

Molekyylibiologinen analyysi bioaktiivisen lasin pinnan mikrokarhentamisen vaikutuksesta uudisluun muodostumiseen

Ari Itälä, Ville-Valtteri Välimäki, Riku Kiviranta, Heimo Ylänen, Mikko Hupa, Eero Vuorio, Hannu Aro

Kirurgian klinikka, Turun yliopisto ja TYKS. Lääketieteellinen biokemia ja molekyylibiologia, Turun yliopisto. Epäorgaanisen kemian laitos, Åbo Akademi

In a recent study, chemical microroughening of bioactive glass surface was shown to enhance attachment of MG-63 osteoblastic cells to glass. The current study was designed to delineate the effects of microroughening on the gene expression patterns of bone markers during new bone formation and resorption on microroughened bioactive microspheres in vivo. Using a rat model, a portion of the medullary canal in the proximal tibia was evacuated through cortical windows and filled with microroughened or smooth bioactive glass microspheres. The primary bone healing response and subsequent remodelling were analysed at 1, 2, and 8 weeks, respectively, using radiography, pQCT, histomorphometry, BEI-SEM and molecular biologic analyses. The expression of various genes for the bone matrix components (type I collagen, osteocalcin, osteopontin, osteonectin) and proteolytic enzymes (cathepsin K, MMP-9) were determined by Northern analysis of the respective mRNAs. The results showed that microroughening of the bioactive glass surface triggered temporal changes in the expression of specific genes involved in bone healing process. Metallimplantin karhennettua pintaa käytetään parantamaan implantin mekaanista kiinnittymistä luukudokseen. Karhennetulla implantin pinnalla on mahdollista parantaa luutamuodostavien solujen vastetta materiaalille ja nopeuttaa implantin mekaanista kiinnittymistä luukudokseen^{1,2}.

Aikaisemmassa työssämme pyrimme sovelta-
maan pinnan mikrokarhentamisesta bioaktiivi-
seen lasiin. Tavoitteena oli lisätä lasin luunmuo-
dostumista stimuloivia ominaisuuksia. Olemme
kehittäneet bioaktiivisen lasin pinnan etsausme-
netelmän, jonka avulla lasin pinta voidaan mik-
rokarhentaa kontrolloidusti³. Osoitimme, että
mikrokarhealla bioaktiivisen lasin pinnalla on
mahdollista merkittävästi lisätä osteoblastien
kiinnittymistä lasin pintaan in vitro ja myös
nopeuttaa uudisluun muodostumista ja huokoi-
sen lasirakenteen mekaanista kiinnittymistä luu-
kudokseen^{4,5}.

Bioaktiivinen lasi on pinta-aktiivinen, osteopro-
motiivinen, biohajoava biomateriaali, jonka pinta-
aktiiviteettia ja kudosvaikutuksia voidaan säädellä
muuttamalla sen kemiallista koostumusta^{6,7}.
Materiaalin avulla saavutetaan luja suora kemiallinen
sidos luun ja biomateriaalin välille, ilman sidekudoksen
muodostumista välipinnalle. Bioaktiivisen lasin
kudosvaikutuksia voidaan säädellä muuttamalla lasin
kemiallista koostumusta⁸, tämä ominaisuus puuttuu esim.
hydroksiapatiitilta.

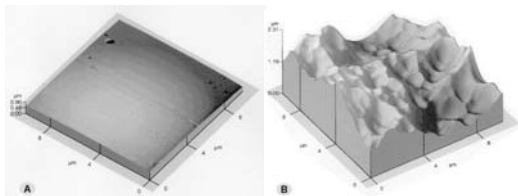
Tämän in vivo tutkimuksen tavoitteena oli sel-
vittää yksityiskohtaisemmin mekanismia, jolla
bioaktiivisen lasin pinnan mikrokarhennuksen
vaikutus välittyy uudisluun muodostumiseen.

Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksessa käytettiin bioaktiivisesta lasista
liekkipuhallusmenetelmän avulla valmistettuja
mikropalloja (lasi 13-93, ϕ 215-350 μ m). Lasipal-
lojen pinta mikrokarhennettiin aikaisemmin tätä
tutkimusta varten kehitetyllä kemiallisella etsaus-
menetelmällä (ammoniumfluoridin ja sitruuna-
hapon seos)³. Atomivoimamikroskoopilla mitat-
tuna sileän lasipinnan epätasaisuus oli n. 0.1 μ m
(Roughness (Ra)) ja etsatun lasipinnan n. 0.6 μ m
(Kuva 1).

Koe-eläimenä käytettiin Harlan Sprague Dawley
rottia (n=42, paino 225-300g). Satunnaistetussa
järjestyksessä eläinten vasemman ja oikean sääri-
luun proksimaaliseen ydinonteloon porattiin
kaksi kortikaaliluu-aukkoa (ϕ 2.8 mm ja ϕ 1 mm),
joiden kautta ydinontelo tyhjennettiin huuhtelee-
malla (Kuva 2). Tämän jälkeen ydinontelo

täytettiin joko mikrokarhennetuilla tai sileillä mikropalloilla. Uudislun määrää sekä uudislun muodostumiseen osallistuvien geenien aktiivisuutta analysoitiin 1, 2, 8 viikon kuluttua operaatiosta. Analysointimenetelminä käytettiin histomorfometriä, kvantitatiivista tietokone-tomografiaa (pQCT), elektronimikroskopiaa ja Northern -tekniikalla mitattuja lähetti-RNA pitoisuustasoja. Lähetti-RNA pitoisuudet mitattiin kuudelle eri luumatriksin rakenneproteiinille tai entsyymille (kollageeni-I, osteonektiini, osteokal-siini, osteopontiini, ka-tepsiini-K ja MMP-9).



Kuva 1. Atomivoimamikroskooppikuva sileästä (Kuva A) ja mikrokarhennetusta (Kuva B) bio-aktiivisen lasin pinnasta.

Tulokset

Histomorfometrinen ja elektronimikroskooppinen analyysi osoitti

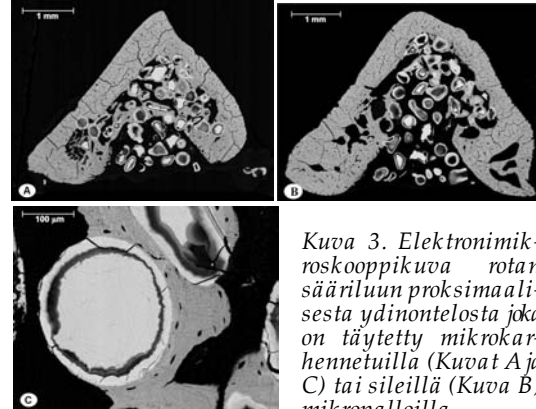


Kuva 2. Röntgenkuva bioaktiivisilla lasipalloilla täytetystä rotan sääriluusta.

uudislun määrän lisääntyvän ajan funktiona, mutta luun määrässä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa mikrokarhennetun ja sileän lasipinnan välillä (Kuva 3). Uudislun kasvun todettiin olevan tiiviissä kontaktissa sekä mikrokarhennettujen että sileiden lasipallojen ulimpiin reaktiokerroksiin (Kuva 3C).

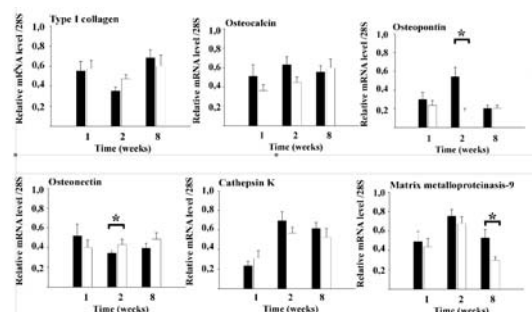
karhennettujen lasipallojen yhteydessä verrattuna sileisiin lasipalloihin.

Pohdinta



Kuva 3. Elektronimikroskooppikuva rotan sääriluun proksimaalisesta ydinontelosta joka on täytetty mikrokarhennetuilla (Kuvat A ja C) tai sileillä (Kuva B) mikropalloilla.

Tulokset osoittivat, että bioaktiivisen lasin pinnan mikrokarhentaminen muutti väliaikaisesti uudislun muodostumiseen ja remodellaatioon osallistuvien geenien ekspressiota, vaikka tässä koelmallisissa ei todettu merkittäviä uudislun määrän eroja mikrokarhennetun ja sileän lasipinnan välillä.



Kuva 4. Eri rakenneproteiinien ja entsyymien suhteelliset lähetti-RNA pitoisuudet mikrokarhennetuilla (mustat pylväät) tai sileillä (valkoiset pylväät) mikropalloilla täytetyn rotan sääriluun proksimaalisen ydinontelon ympäristössä ($n=6$) (keskiarvo \pm SEM).

Aikaisemmin on osoitettu, että luukudoksen rakenneproteiinien geeniekspressio on sensitiivinen implantin pinnan kemialliselle koostumukselle ja muodolle⁹. Tähän tutkimukseen valittiin kuusi erilaista luumatriksiin rakenneproteiinia ja entsyymiä. Tavoitteena oli saada yksityiskohtaista tietoa mikrokarhennetun lasipinnan vaikutuksesta sekä uudislun muodostumiseen (kollageeni-I,

osteonektiini, osteopontiini, osteokalsiini), että resorptioon (katepsiini-K, MMP-9). Tulosten perusteella voidaan olettaa, että bioaktiivisen lasin pinnan mikrokärsäntäminen vaikuttaa suoraan luukudossolujen toimintaan muokkaamalla solujen aktiivisuutta. Lasin pinnan mikrokärsäntäminen indusoi korkeammat lähetti-RNA pitoisuudet osteopontiinia koodaavilla alueilla. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että osteopontiinilla on tärkeä rooli biomateriaalin ja luun rajapinnalla. Osteopontiini osallistuu sekä luutamuodostavien solujen kiinnittymiseen että luumatriksin mineralisoinnin säätelyyn¹⁰.

Osteonektiiniä koodaavilla alueilla lähetti-RNA pitoisuudet olivat matalammat mikrokärsäntätyjen lasipallojen ympärillä. Osteoblastit syntetisoivat osteonektiiniä ja kyseinen proteiini ilmeisesti osallistuu kollageeniverkon mineralisointiin¹¹. Proteolyttisistä entsyymeistä MMP-9:n lähetti-RNA taso oli merkittävästi korkeampi mikrokärsäntätyjen lasipallojen ympärillä verrattuna sileisiin lasipalloihin. Osteoklastit erittävät MMP-9 entsyymiä ja se osallistuu luukudoksen hajotusprosessiin¹².

Molekyylibiologian kehittyminen antaa uusia mahdollisuuksia aikaisempaa yksityiskohtaisemmin analysoida luun ja biomateriaalin välistä vuorovaikutusta. Tämä tutkimus osoitti bioaktiivisen lasin pinnan mikrokärsäntämisen muuttavan solujen geeni-ekspressiota. Jatkotutkimuksissa voidaan tarkemmin verifioida affisioituneet solut ja niiden lokalisaatio sekä selvittää, ovatko todetut muutokset materiaalispedifisiä vai yleisiä mikrokärsäntäyksen aiheuttamia biologisia vasteita.

Kirjallisuutta

1. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, Snetivy D, Nolte L-P. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 45:75-83,1999.
2. Boyan BD, Schwartz Z. Modulation of osteogenesis via implant surface design. In: Davies JE (ed). *Bone engineering*. Toronto: Em squared incorporated 232-239, 2000.
3. Itälä A, Nordström E, Ylänen H, Aro HT, Hupa M. Creation of microrough surface on sintered bioactive glass microspheres. *J Biomed Mater Res* 56(2):282-288, 2001.
4. Itälä A, Ylänen HO, Yrjans J, Heino T, Hentunen T, Hupa M, Aro HT. Characterization of microrough bioactive glass surface: Surface reactions and osteoblast responses in vitro. *J Biomed Mater Res* 62(3):404-411, 2002.
5. Itälä A, Koort J, Ylänen HO, Hupa M, Aro HT. Biologic significance of surface microroughening in bone incorporation of porous bioactive glass implants. *J Biomed Mater Res* (in press).
6. Hench LL. *Bioceramics*. *J Am Ceram Soc* 81(7):1705-1727, 1998.
7. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20:2287-2303, 1999.
8. Karlsson KH, Rönnlöf M. Property-composition relationships for potentially bioactive glasses. *Glastech Ber Glass Sci Technol* 71(5):141-145, 1998.
9. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 20:2311-2321, 1999.
10. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 19(7):615-622, 2000.
11. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26:99-105, 1981.
12. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411-422, 1998.