



Mekanisk belastning og bencellefunksjon - In vitro modeller

Av Ingrid Karine Fjærvik
kull-v99 2003

Takk

Jeg vil starte med å rette en takk til alle som har hjulpet meg med denne oppgaven.

En særlig takk til bioingeniør Camilla S. Mollatt for hennes hjelp på laboratoriet. Hun har vært til stor hjelp under utførelsen av forsøkene og til god hjelp ved analysene.

Deretter vil jeg rette en stor takk til mine veiledere. Jan Eirik Ellingsen har stilt laboratoriet og alt utstyr til min disposisjon og Janne E. Reseland har vært en utrolig dyktig og engasjert veileder. Hun har deltatt med særdeles mye faglig input.

Sammendrag

Skjelettet blir utsatt for krefter påført av tyngdekraft, muskler og andre ekstreme faktorer, som gir variasjon av både kompresjon, strekkende og bøyende krefter. Denne fysiologisk mekaniske belastning er essensielt for opprettholdelsen av ben styrke og struktur. Dette kommer tydelig frem hos mennesker med osteoporose. Denne sykdommen kan deles inn i postmenopausal og alders relatert osteoporose.

Osteoporose fører ofte til benfrakturer og raskere benresorpsjon enn nødvendig. Resorpsjonen kan bla skyldes kalsium malabsorpsjon eller østrogen mangel og er et særdeles stort problem for eldre. Under forskning av romfart er det vist at mikrobeklastning vil kunne redusere benmineral tettheten og at både antall benceller og aktiviteten på disse går ned. De aktive cellene involvert i benmoduleringen er *osteoklaster* som bryter ned skadet, svak benstruktur, og *osteoblaster* som bygger ben ved å legge ned extracellulær matriks og differensiere osteocytter.

Den hastighets begrensende delen i dette samspillet er mobilisering og differensiering av osteoblaster og deres aktivitet. Osteoblaster regulerer ved hjelp av en antatt 'mecnostat' benvekst som respons på mekanisk belastning. Kunnskap om stimulering til økt benvekst i form av proliferasjon og differensiering av osteoblaster er viktig ved behandling av osteoporose, skader etter strålebehandling av kreftsvulster, adaptasjon og feste av proteser og tannimplantater. Vi vet i dag at flere cytokiner og vekstfaktorer stimulerer osteoblastene, men mekanismene for hvordan belastning og aktivitet stimulerer humane primære osteoblaster er i stor grad ukjent.

Jeg har i en pilotstudie undersøkt hvordan ulike faktorer (paratyreoideahormon, leptin og vannløselige emalje matriks proteiner) sammen med økende belastning påvirker humane osteoblaster. Jeg observerte størst effekt av høy belastning alene eller i kombinasjon med ben stimulerende faktorer på relativt udifferensierte osteoblaster.

Bakgrunn

Galileo observerte skjelettets respons på fysisk aktivitet allerede i det 17 århundre, men det er først nå at forskere prøver å finne ut hvordan ben responderer på krefter.

Skjelettet er et feedback – steady state system som kontinuerlig integrerer signaler og responser som opprettholder dets funksjoner i å levere kalsium til kroppen, gi mekanisk støtte for bløt vevet, være vektstenger for muskelsystemet, og gi beskyttelse for de indre organer og nervesystemet. Hos mange individer starter denne benmasse homeostasen å svikte 40-50 årene. Dette fører da gjerne til bentap, osteoporose og til og med spontan frakturer.

Benmatriks

Ekstracellulær benmatriks består av organisk matriks og uorganiske salter. Av den organiske matriks er 90 % kollagene fibrer hovedsaklig type 1, mens ca 10 % er grunnsubstans. Benets hardhet og motstandsdyktighet mot kompresjon skyldes innholdet av uorganiske salter, mens dens elastiske egenskaper og strekkfasthet i all hovedsak skyldes kollagenet.

Grunnsubstansen inneholder en karbohydratholdig komponent bestående av proteoglykaner, hovedsaklig kondroitinsulfat og små mengder hyaluronan. Dessuten forekommer flere mindre molekyler som er satt i relasjon til kalsifikasjons mekanismen. Bla osteocalcin som er det vanligste forekommende ikke-kollagene proteinet i voksent knokkelvev.

Osteocalcin syntetiseres i ben av osteoblasten og er K-vitamin avhengig. Det binder seg til hydroxyapatitt. Produksjonen av osteocalcin stimuleres av den aktive formen av vitamin-D. Etter at det har blitt produsert blir det delvis inkorporert i ben matriks, mens resten finnes i blod systemet. Det forekommer kun i knokkelvev og er således spesifikt for dette. Den nøyaktige funksjonen til osteocalcin er fortsatt uviss. En rekke studier viser at det sirkulerende nivået av osteocalcin reflekterer raten på bendannelse. Runx2 (= cbfa-1/OSFII) er en transkripsjonsfaktor som regulerer uttrykket av osteocalcin.

Mineralsaltene utgjør ca. 75 % av tørr vekten til knokkelen. Kalsiumfosfat i krystallisk form er overveiende, men det inneholder også andre ioner som bl.a. magnesium, natrium kalium mm.

Benceller

Vi deler gjerne bencellene inn i 2 hovedtyper: Osteoblasten og osteoklasten. De har forskjellige funksjoner og forskjellig opphav.

Osteoblaster utvikles ved bendannelse fra osteoprogenitor celler. Disse differensierer fra de mer primitive, mesenchymale celler. Den pluripotente mesenchymale stamcelle er i stand til å gi opphav til osteoprogenitorceller, men også fibroblaster, condrocytter, fettceller, muskelceller og endotel. En annen betegnelse for disse opphavscellene er CFU-F (fibroblast colony forming unit). Osteoprogenitor celler forekommer i fosterets mesenchym nær ossifikasjonssentrene samt i endost og de dype lag av periost etter fødselen og resten av livet.

Osteoblaster er bendannende celler som produserer nytt eller gjenoppbygger det resorberte benet ved å tilføre en matriks (osteoid) av organisk materiell dvs. kollagene fibrer, proteoglycaner, samt mindre molekyler som osteocalcin, osteonektin og osteospondin. Dette blir senere mineralisert. I tillegg sesernerer de cytokiner som interleukin (IL)- 1, IL-6 og IL-11 som alle stimulerer dannelsen av osteoklaster. Produksjonen av disse cytokinene stimuleres av sirkulerende faktorer som PTH (paratyreoidea hormon) og den aktive formen av vitamin-D som begge har reseptorer på osteoblasten. I tillegg produserer osteoblasten en rekke andre regulerende faktorer som IGF-1 (insulinlike growth factor) PGF2 (Prostaglandin) og TGF beta (transforming growth faktor) og BMP (bone modelling protein) s. Sistnevnte er benmodellerende proteiner som stimulerer til rekruttering av osteoprogenitorceller som igjen differensierer til osteoblaster. Den samlede verdi blir økt bendannelse. Ca. 10 % av osteoblastene innleires i benvevet og omdannes til osteocytter, mens resten undergår apoptose eller omdannes til benbekledende celler (overflate osteocytter). Osteocytter har kontakt med de benbekledende cellene via canaliculi som er små celleutløpere.

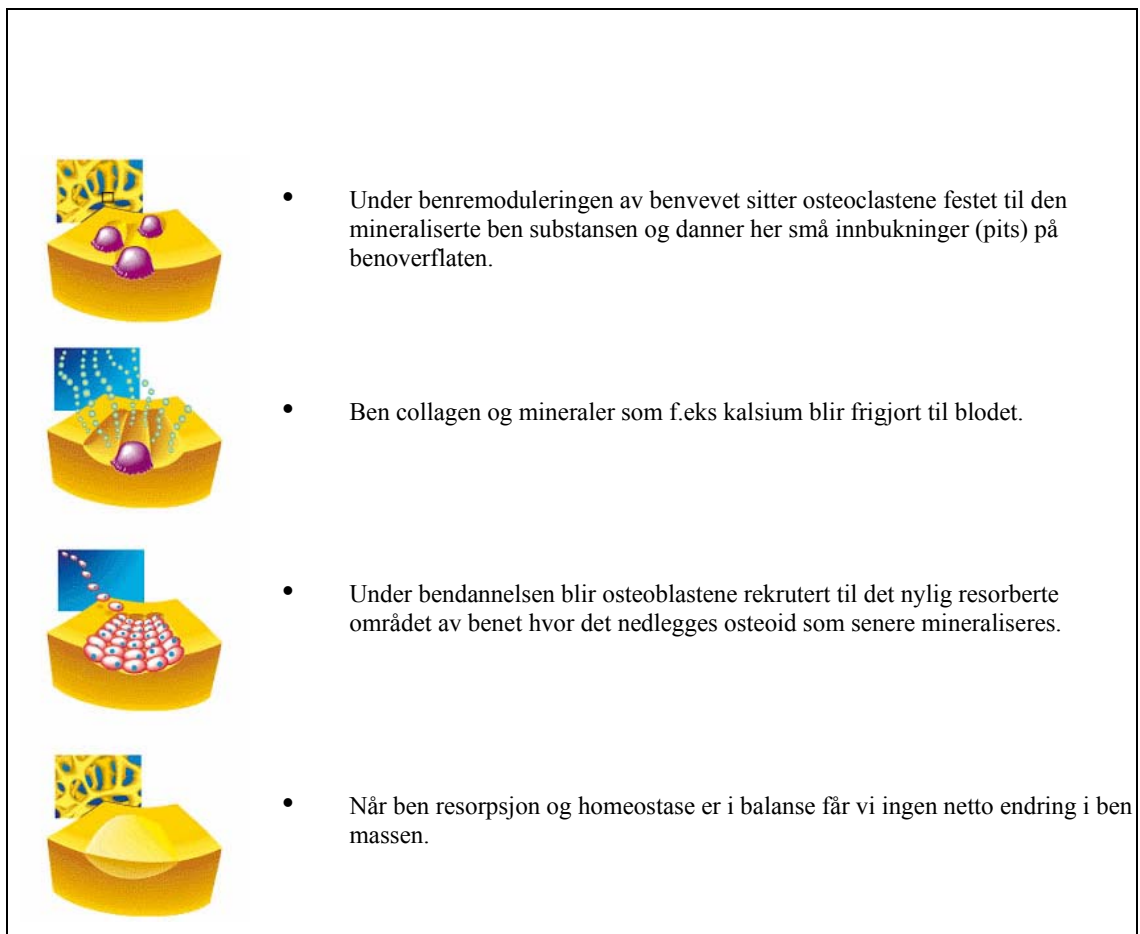
Overflateosteocyttene er lag av inaktive celler som hviler på et tynt lag av osteoid. Dette laget må fjernes for at osteoklastene skal komme til. Cellene sesernerer collagenase som bryter ned laget av osteoid.

Osteoklaster er multinukleære kjempeceller av sterkt varierende form og størrelse. De kan være alt fra 5 og opp til 50 kjerner selv om 5-10 kjerner er mest vanlig. Cellene kan utskille bla. lysosomale enzymer som igjen nedbryter organisk knokkelmatriale. De er også

i stand til å fagocyttere osteocytter, kollagen og mineraler (Se figur 1). Cellene dannes ut ifra granulocyt og makrofag stamceller i benmargen. Altså de samme cellene som gir opphav til nøytrofile granulocytter, monocytter og makrofager. De som dannes heter osteoklastprogenitor celler, og de når benvevet enten ved direkte vandring eller via blodsystemet. Når de når benvevet differensierer de til pre- osteoklaster, som i mindre grad kan resorbere ben. Ved å stimuleres fra osteoblastene kan de differensiere til modne osteoklaster. Etter avslutningen av resorpsjonsprosessen undergår osteoklasten sannsynligvis celledød ved apoptose (Genser et al.1999).

Ben homeostase

Figur 1.



Det er svært mange faktorer involvert i reguleringen og differensieringen av osteoblastene for proliferasjon og mineralisering. Noen av de kjente regulatorne stimulerer

collagensynesen slik som TGF beta, insulin, PTH, IGF-1, osteocalcin syntese dannere og inhibitorer. Noen interleukiner som IL-1 Og IL-2, PTH og IGF-1 stimulerer osteoklast ben resorpsjon og remodelering.

Osteoblastene og osteoklastene blir regulert via en rekke ulike stoffer slik som cytokiner, PTH og andre vekstfaktorer. Det at ben blir resorbert av osteoklaster og samtidig eller deretter erstattet av osteoblaster indikerer en direkte link mellom osteoblast og osteoklast aktiviteten. Den parakrine eller autokrine regulering av ben homeostasen kan bli fremkalt av osteoblast deriverte faktorer som TGF beta, IGF-1, tumor nekrose faktor (TNF) og interleukiner.

PTH er i dag det eneste virkestoffet som farmakologisk brukes i stimulering av benvekst (Harada et al. 2003).

Kalsium i blodet regulerer sekresjonen av PTH som igjen stimulerer osteoklastene til benresorpsjon og dermed økte mengder kalsium til blodet (figur 1).

De viktigste faktorene som regulerer denne homeostasen er kalsium nivået i blodet, kjønnshormoner og mekanisk belastning. Av kjønnshormoner er det særlig sett på østrogen som inhiberer resorpsjonen ved å redusere antall osteoklaster, og testosteron som er ansvarlig for oppbygning av kraftigere benbygning.

Alle faktorer som påvirker kalsium nivået, kjønnshormonene eller den fysiske belastningen på benet vil igjen påvirke benstrukturen. Slike faktorer kan være kosthold, nyrefunksjon, Gi- funksjon, kjønn, genetikk, sykdommer, medisiner m.fl. Frost hevder her at ulike faktorer kan endre terskelen og resultere i effekter på benmassen (Frost. et. al. 1997).

F. eks vil kalsium mangel og østrogenmangel øke terskelen for bentilvekst.

Noe av det vi har valgt å se på er osteoprotegrin (OPG). OPG tilhører TNF reseptor familien som inhiberer osteoklast dannelsen på et sent stadium i utviklingen. Liganden for denne er kjent som osteoklast differensierings faktor eller RANKL eller OPG ligand en annen mediator vi har sett noe på.

Mineraliserings prosessen

Deponering av mineraler i den organiske matriks kalles ossifikasjon eller forbening. Det skjer en utfelling av amorft kalsiumfosfat. Dette omdannes videre til krystallisk hydrokxyapatitt. Osteoblaster utskiller store mengder av basisk forfatase som ved aktivering frigjør fosfationer. Dette fører til lokal pH økning og et basisk miljø og fremmer utfelling av kalsium ved å øke overskridelsen av kalsiumforfatenes oppløselighetsprodukt.

Alkalisk fosfatase spiller en viktig rolle i osteoid mineralisering, og brukes som mål på ben matriks dannelse. Dens funksjon er uviss.

Leptin

Leptin er et adiposytt derivert signalmolekyl som fungerer som et multipotent cytokine som har direkte eller indirekte perifer effekt i forskjellige organer, vev og celler. Leptin virker også i sentral nerve systemet (SNS). Det virker på ben både via SNS og lokalt direkte på benvevet.

Sirkulerende leptin utskilles i hovedsak fra fettvev hos voksne, men leptin polypeptid og mRNA er også oppdaget i andre celler som muskel-, ben-, gastrisk epitel- og bryst epitel celler (Reseland, et al.2002). I tillegg er de funnet i annet vev som arterie veggcellene, kjertelceller mm.

Direkte effekt:

Leptin reseptor mRNA og protein ekspresjon er påvist i humane osteoblast celler. Dette indikerer sterkt en direkte effekt av leptin på ben metabolismen.

Det er også bevist at osteoblast cellene uttrykker en funksjonell leptin reseptor. Denne reseptoren har evne til å stimulere intracellulære signal veier (Reseland et al. 2001, Swick et al. 1998) via Jak/Stat signalveien (Lee et al 2002). Tilførsel av leptin stimulerer proliferasjon, differensiering og hemmer programmert celledød av osteoblaster i kultur. Forskning har vist at leptin tilført eksogent øker gen ekspresjonen av TGF beta, IGF-1, collagen 1, alkalisk fosfatase (ALP) og osteocalcin mRNA (Gordeladze et al. 2002) disse markørene er som nevnt tidligere viktige markører for ben homeostasen, differensiering og proliferasjon.

Leptin er altså bevist å påvirke osteoblast celleproliferasjon og differensiering og også føre til en mer effektiv mineralisering. Den virker også anti-apoptotisk på osteoblasten.(Gordeladze et al. 2003).

Leptin promoterer angiogenesen og økt mikrovaskularisering kan fasilitere forholdet mellom hematopoetiske celler, stroma celler og vaskulære endotel celler ved å øke ekspresjonen av integriner, heparaner og matriksmetalloproteinaser nødvendig for benvekst. Nylig har leptin blitt demonstrert til å indusere stromale celler til å differensiere til osteoblaster, og ikke fettceller.

Sentral effekt:

Selv om leptin sentralt i hovedsak er uttrykt i hypothalamus finnes den også i flere områder av SNS.

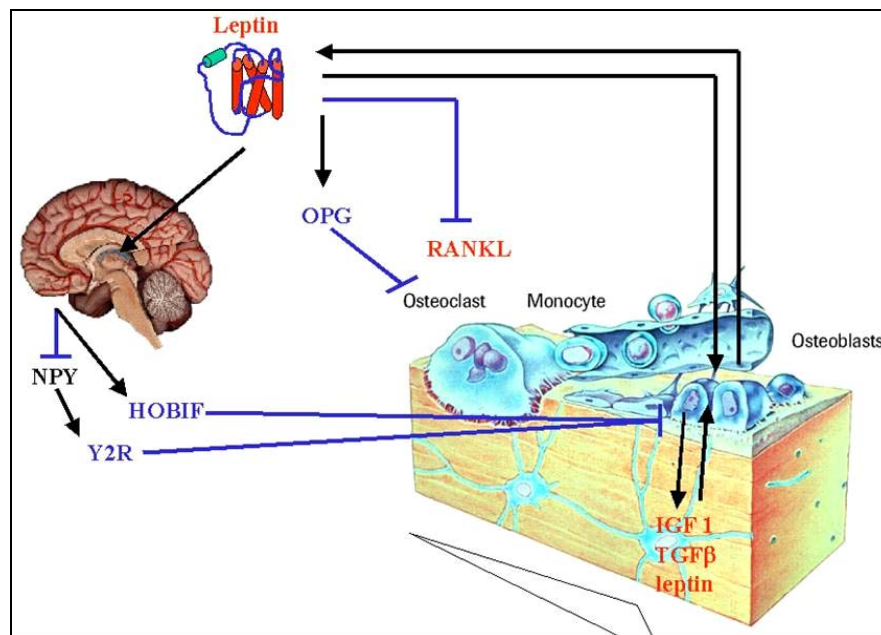
Leptin er vist å virke sentralt på benveksten ved å stimulere hypothalamus til å regulere kroppsvekt og fettmasse gjennom appetitt suppresjon og økt energi forbruk.

Man vet ikke nøyaktig signalveien fra hypothalamus til benet, men benvev er et mål for nervesystemet og nervefibre bl.a. sympatiske fiber via neuropeptid Y (NPY) er funnet i benvev. NPY er kjent som en potent stimulator av energi inntak, men NPY fører til bentap om injisert intracerebralt. Dette kan tyde på at leptin bruker flere signalveier fra hypothalamus. NPY bindes til Y2 reseptoren, hemmer osteoblasten eller virker ved at HOBIF frigjøring stimuleres.. HOBIF (human osteoblast inhibitor faktor) har tilsvarende virkning på benvevet som NPY (figur 2.) altså hemmer osteoblastene.

Høy ben masse er observert hos mus med Leptin reseptor svikt(OB-R reseptoren). Leptin kan altså sentralt injisert føre til suppresjon av bendannelse og redusert ben masse (Harada et al.2003).

Demonstrasjon av leptins direkte og indirekte virkning på Bencellene.

Figur 2



Parathyrideahormone (PTH)

PTH er et hormon som fungerer som et benremodelerings mediator. PTH fungerer som beskytteren av kalsium nivået ekstracellulært. For å hindre hypokalsemia aktiverer hormonet en mekanisme for å frigjøre kalsium fra benvevet som er kalsiums hovedlager i kroppen. Dette gjøres ikke ved at PTH direkte virker på osteoklastene, men indirekte ved at hormonet påvirker forstadier cellene inkludert osteoblastene. Aktivering av osteoblaster via PTH resulterer i ekspresjon av gener som er viktige for degradering av ekstra cellulær matriks, produksjon av vekst faktorer og stimulering og rekruttering av osteoklaster (Swarthout et al.2002).

Hormonet har en veldig kompleks funksjon vist ved at om det gies i doser fører det til en netto benvekst ved å øke antall og aktiviteten til osteoblastene. Gies det konstant altså over lengre tid vil det stimulere til benresorpsjon (Yanfei et al.2001). Hvordan dette foregår molekylært er uvisst. PTH fungerer som en beskytter for det ekstracellulære kalsium nivået i kroppen og trår inn f. eks ved hypocalsemia altså kalsium mangel i ekstra cellulær væsken (ECV). Hormonet aktiverer en mekanisme for frigjøring av kalsium fra ben. Dette skjer indirekte på osteoklastene via reseptorer på ben forstadie cellene inkludert osteoblastene. PTH linker på denne måten osteoblastenes ben oppbygging direkte sammen med osteoklastene og ben resorpsjonen. Bendannelsen blir stimulert av PTH ved å konvertere ikke-prolifererende kantceller til ikke-prolifererende osteoblaster ved å stimulere modne osteoblaster til å produsere vekstfaktorer som fibroblast growth factor (FGF)-2 og IGF-1. Disse stimulerer til proliferasjon av osteoprogenitor celler. PTH fungerer ikke til å stimulere benvekst ved mikrogravitet, men må ha belastning for at PTH skal ha effekt.

I gropen etter osteoklast resorpsjonen, er preosteoblastene og osteoblastene utsatt for høy $[Ca^{2+}]$ som er pro-apoptotisk (programmert celledød). PTH signal reduserer apoptose ved å øke fosfat konsentrasjonen, samtidig som Ca^{2+} sensorer i cellen stimulerer til økt PTH uttrykk og sekresjon (Jilka et al.1999, Swarthout et al 2001).

Mekanostat prinsippet

Frosts mekanostat prinsipp går ut på antagelsen om at ben remodelerer seg selv etter pålagte mekaniske krav. Mekanostat er et navn på de biologiske mekanismene som tilpasser skjelettmasse og arkitektur til en persons normale fysiske aktivitetsnivå (Frost el

al. 1998). Konseptet er basert på en antagelse om at det foreligger en terskelverdi (set point) for minimum effektiv deformasjon (MES). Dersom mekanisk belastning over MES oppstår vil mekanostat, modelering og remodelering bli iversatt. Dermed kan bemassen påvirkes. Videre medfører dette at mekanisk belastning over en viss terskelverdi (Frosts spekulasjoner sier 1500-2000 μ strain) vil gi en positiv respons og dermed økt benmasse. Dvs. bensyntesen utført av osteoblastene vil bli større en benresorpsjonen utført av osteoklastene.

Man kan si at mekanostat er en feedback kontrollmodell basert på 2 hovedantagelser: 1. Det finnes terskler for mekanisk belastning og belastning/deformasjon som faller utenfor tersklene vil føre til endring i benstrukturen med enten tilvekst eller resorpsjon. 2. Tersklene kan påvirkes av ikke-mekaniske faktorer (Torstveit et al. 2002).

Mekanotransduksjon er den prosessen som fører til at benceller responderer på ytre krefter.

Status for litteratur på osteoblaster, ben og belastning

Ved trening regner vi med at kroppen utsettes for belastning fra 2-30 G. Denne type makrobelastning er det gjort lite forskning på. Vi har derfor valgt å begrense oppgaven til makrobelastning, og sett bort fra mikrobelastning som ved romfart, og G under 1.

Gravitasjon er et nyttig hjelpemiddel for å undersøke belastning på cellene siden gravitasjonen fører til en endring i cellens geometri slik at cellen blir utsatt både for trykk og strekk krefter.

Hatton og kolleger viser at kortvarig G belastning (15 min ved 12 G) er nok til å indusere signifikant proliferasjon av osteoblaster 24 timer etter stimulering (Hatton et al. 2003). Han klarte å vise at ved 12 G var det signifikant økning av EGR1 (early growth respons 1), osteocalcin og bFGF (basic fibroblast growth factor) sammenlignet med kontroll gruppen. Videre viste de at G kraft induserte ERK (ekstracellulær signalregulert kinase-1) når G verdien økte til mer enn 3 G. Celleantallet økte også med 64 % etter innkubering i 24 timer ved 37 grader celsius.

Et annet forsøk (Gebken et al. 1999) viser at hyperaktivitet (celler behandlet ved 13 G i 24 timer) fører til økning av kollagensyntesen per celle med 42 % i snitt sammenlignet med celler ved 1G. Man fant økt kollagen 1 gen expressjon. Dette ble sett på sammenlignet med fibroblaster der ikke denne gen expressjonen øker tilsvarende ved samme behandling. De mener ut fra sin forskning å kunne si at MAP (mitogen-aktivert protein, ERK-1, ERK-2) kinase veien spiller en viktig rolle i hypergravitasjons induert økning av collagen syntesen i humane osteoblast celler (tabell 1).

Yoneda og kolleger har gjort forsøk på muse osteoblast celler og kunnet vise at EMD stimulerer til økt celle proliferasjon ved at EMD stimulerte til økt alkalisk fosfatase aktivitet i celle typene sine. De fant også at EMD stimulerte matriks metalloproteinase produksjon. Yoneda konkluderte med at EMD virker stimulatorisk og har en potensiell terapeutisk betydning i forbindelse med ben tilheling (Yoneda et al.2003). De så også på at EMD akselererte ny ben dannelse på en rotte skalle.

Tabell 1:

referanser	Metode	In vitro / in vivo system	resultater
Hatton et al. 2003	Sentrifugering 15 min 4-30 G	murin osteoblast cellelinje	Økt proliferasjon Økt fosforylering av ERK
Gebken et al. 1999	Sentrifugering 24 timer v/13 G	Primære humane osteoblaster	Økt collagen protein mengde Og collagen gen ekspresjon
Yoneda S et al. 2003	Cellekulturer tilsatt EMD	Murine osteoblaster, rotte skalle	Økt proliferasjon ikke cellevekst. Økt hastighet på benvekst på rotteskalle

NB ikke samme effekt i fibroblaster

Praktisk problemstilling

Vi ønsket å studere hvordan mekaniske krefter sammen med PTH, leptin og PBS løselig EMD påvirket vekst og differensiering av primære humane osteoblaster.

Hypotese

Belastning i form av økende G-verdi gir en ytterligere stimulering av beinvekst in vitro.

Materiale og metode

Celler og dyrkningsbetingelser

Primære humane osteoblast celler (NHO-celler; BioWhittaker Cambrex, USA) isolert fra femur på en 16 år gammel gutt ble brukt i oppsettet. Jeg utførte et pilot studie med et forsøk og celler fra en donor.

Cellene ble dyrket i OBM (osteoblast basal medium) (BioWhittaker Cambrex, USA) tilsatt 2 flasker a 25ml 10 % FBS (føkalt kalveserum), 0,5ml Askorbinsyre og 0,5ml Getamysin. Deretter ble cellene differensiert i 1-2 uker på OGM mediet som inneholdt 0,5ml hydrocortison 21 hemisuccinate (200 nM) og 5ml β -glycerophosphate (10 mM).

Cellene ble stimulert til differensiering med Hydrokortison og B- glyserofosfat.

Ved konfluens ble cellen splittet. Først ble cellene skylt i fosfatbuffret saltvann to ganger, deretter ble det tilsatt 3 ml 0.5 g trypsin til 0.2g EDTA. Cellen ble innkubert med trypsin i 2-5 minutter ved 37 grader celsius til de løsnet. Da cellene var løsnet fra flaskene tilsatt vi OBM medium og sentrifugerte cellene ved 1200rpm i 3 min. Supernatanten (en blanding av mediet trypsinet og cellerester) ble fjernet, deretter ble cellen løst i nytt medium og resuspendert for utplanting i nye dyrkningsflasker eller på plater.

Cellene ble fordelt en gang på nye flasker fortynt 1:3 eller, og deretter i 16 6 brønners brett.

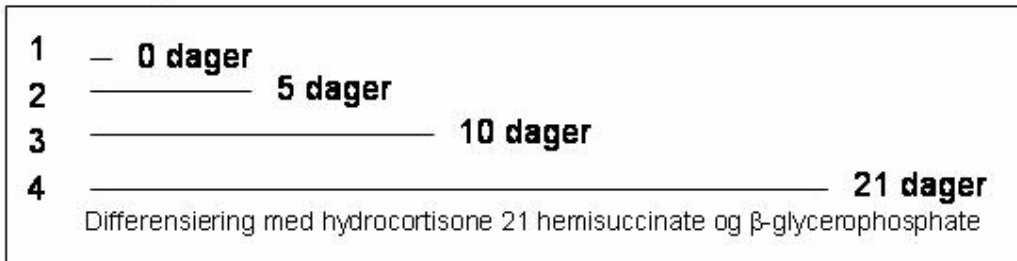
Da cellene ble plantet ut i brett og dyrket til konfluens (til cellene ble tette) ble differensiering startet.

Cellene ble undersøkt udifferensiert, diff. i 21 dager, 10 dager, 5 dager (figur 3).

Brettene ble satt opp på parallelle behandlinger med 3 brønner per tilsetning merket hhv A, B, C, D. A var tilsatt bare medium som kontroll, B var tilsatt 100 ng/ml leptin C var tilsatt 10^{-8} M PTH og D var tilsatt PBS løselig EMD.

Figur 3

Behandling av celler



Emdogain eller emalje matriks derivat (EMD) er et protein derivert fra porcine tann anlegg. Det ble først presentert som en mulig agent for å promotere nytt feste for tenner med periodontalt festetap. I dag brukes det klinisk til å regenerere periodontalt vev, sement, periodontalligament (PDL) og alveolar ben, men mekanismene som fører til dannelsen av sement, periodontal ligament og ben er ikke velkjent. Forskning på EMD på PDL celler har vist at EMD stimulerer celle proliferasjon, migrasjon, ALP, Mineralisert nodule (MN) dannelse og TGF-beta1 produksjon (Yoneda et al. 2003).

Effekt på ben in vivo har blitt rapportert: EMD øker ben dannelsen induert av ben morfogenisk protein (BMP) (Boyan et al.2000)

I våre forsøk har vi brukt PBS (fosfatbuffret saltvann) løselig EMD. Den PBS løselige delen av EMD har vist seg å stimulere proliferasjon hos humane osteosarcom celler (Rikshospitalet, personlig kommunikasjon) og differensiering av humane osteoblaster (Berner, upublisert data).

Mekanisk belastning

Sentrifugen som ble brukt var en AllegraTM 21 med en S2096 microplate Rotor.

G- kraft ble regnet ut fra formelen $RCF = 1.12r (RPM/1000)^2$

RPM=hastighet S2096 har r =110mm

RCF tilsvarer G kraft og RPM er rotasjoner per minutt.

Vi brukte henholdsvis G verdiene: 6, 22, 50. Cellene ble sentrifugert i 30 min og deretter incubert ved 37 grader celsius i henholdsvis 24 og 48 timer før høsting.

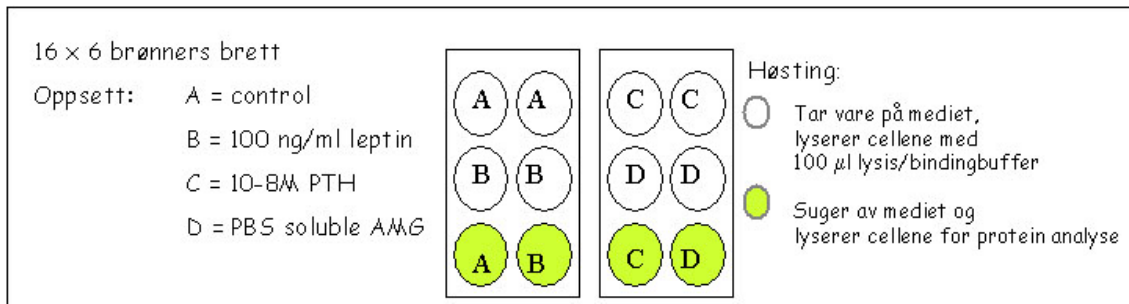
PBS løselig EMD (50microgram/ml), leptin (100 μ gram/ml) og PTH (10⁻⁸M) ble tilsatt cellene.

Høsting

Ved avslutning av hvert forsøk ble de ulike mediene over cellene tatt av og oppbevart ved -20 grader.

Cellene i 2 brønner ble lysert med $100\mu\text{l}$ lysis/ bindingsbuffer resten ble tilsatt 100 eller $300\mu\text{l}$ trizol etter at mediet var sugd av. Mediet ble overført til $1000\mu\text{l}$ tappenglass og fryst ved -20 grader celsius. Celler i løsning ble skrapet løs fra brønnene og raskt overført til $1000\mu\text{l}$ tappenglass og fryst ved -80 grader celsius etter hurtigfrysing i flytende nitrogen.

Figur 4



Lysatet ble homogenisert.

Cellene ble spunnet ned på en kjølesentrifuge maks hastighet i 10 min.

Supernatanten ble overført til nytt rør. Lysatet ble lagt på flytende nitrogen og lagret i fryser til videre behandling.

Bestemmelse av mengde total protein i mediet og celle lysat

Mengden proteiner i prøven ble relatert til bovint serum albumin (BSA) i en konsentrasjon fra 1 mg/ml til $15,6\text{ }\mu\text{g/ml}$. $10\text{ }\mu\text{l}$ BSA og prøve ble tilsatt $200\text{ }\mu\text{l}$ Bio-Rad protein assay fargereagens preparert i henhold til produsentens instruksjoner (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) og absorbansen ble lest av ved 560 nm i en mikrotiterplate leser (Lapsystem multiscan RC)(Software var fra Thermo Labsystem, Helsinki, Finland).

Bestemmelse av alkalisk fosfatase aktivitet (ALFA)

ALF (Promega, Madison, USA) ble fortynnet med fosfat buffer til en standardrekke fra 1.2 nmol til 0.24 nmol i 30 mikroliter standard og prøve ble tilsatt 100 mikroliter substrat (Nitrofenyl phosphat liquid substrat system) (Sigma, St.Louis. MO, USA) og innkubert i 30 min . Reaksjonen ble stoppet med 50 mikroliter 3N NaOH og lest av ved 405nm i en

mikrotiterplate leser (Lapsystem multiscan RC). Svarene ble kalkulert i nanomol ALF aktivitet/ mikrogram total protein/min.

Osteocalcin ble målt ved å bruke human osteocalcin Elisa (Biosource, Nivelles, Belgia) som beskrevet i protokollen fra produsenten (Cytoscreen Immunoassay kit protocol booklet) 2001.

Lactate dehydrogenase (LDH) aktiviteten i mediet er et mål på ødelagt cellemembran og celledød og denne ble bestemt ved cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland). I henhold til beskrivelsen fra fabrikanten.

Celledød ble beregnet som en ratio til kontroll, der kontroll ble satt lik 1 ved belastning 1G.

Effekten av sentrifugeringen er presentert som prosent av kontroll.

Eks. når jeg har sett på osteocalcin(OC) blir regnestykket slik:

For hver individuell behandling i form av PTH, leptin og PBS løselig EMD ved hver G verdi:

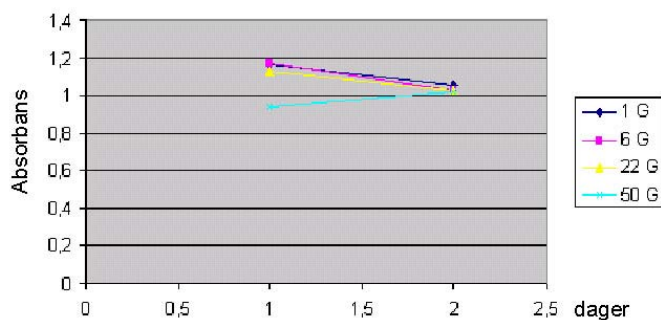
$$\frac{(OC / total\ protein)}{(OC\ kontroll / total\ protein\ kontroll)} * 100\ %$$

(OC kontroll/total protein kontroll)

Resultater

Det ble ikke observert noen toksisk effekt i form av LDH aktivitet i mediet fra økende belastning. Behandlingen med leptin resulterte i en maksimal økning i LDH aktivitet med 6 % i forhold til ubehandlede celler, PTH gav 5 % økning, og PBS løselig EMD gav 20 % (figur 5).

Figur 5



Alkalisk fosfatase aktivitet

I de udifferensierte celler gav leptin en 2 gangers økning i ALP aktiviteten i mediet ved 1G. Ved økende G ble aktiviteten redusert ned til 60 % av kontroll etter 2 dager. I de differensierte celler gav leptin ingen endring i ALP aktiviteten.

PTH hadde ingen effekt i udifferensierte celler eller i celler differensiert i mer enn en uke. I celler differensiert i 5 dager gav PTH sammen med 50 G belastning en 2 gangers økning i ALP aktiviteten.

PBS løselig EMD hadde ingen effekt i differensierte celler, alene eller i kombinasjon med økende belastning. I udifferensierte celler gav faktorene en 2.5 gangers økning i ALP aktiviteten med belastning over 22 G.

Osteocalcin

I de udifferensierte celler fant vi ingen effekt av leptin.

PTH derimot ga en 20 ganger økning ved 24 timer og 22 G, 48 ganger økning ved 48 timer og 22 G og en 3 ganger økning ved 24 timer og 50 G.

Vi fant også økninger ved PBS løselig EMD. PBS løselig EMD ga ved 24 timer og 22 G en 35 ganger økning og en 63 ganger økning ved 48 timer og 22 G.

Ved de differensierte cellene fant vi når det gjelder leptin i celler differensiert i 5 dager en 2 ganger økning med leptin ved 6 og 22 G etter 24 timer. PTH ga 9 ganger økning ved 50 G etter 48 timer og 4 ganger økning ved 22 G etter 48 timer. PBS løselig EMD ga på celler differensiert i 5 dager en 5.5 ganger økning ved 24 timer og 22 G og en 5,3 ganger økning etter 48 timer og 50 G.

Leptin tilsatt celler differensiert i 10 dager gav i kombinasjon med 50 G en 3.5 ganger økning av osteocalcin etter 48 timer. Vi fant ingen effekt ved de andre G-verdier i celler differensiert i 21 dager ble det ikke observert noen effekt av økende G-verdi eller av faktorer tilsatt.

Diskusjon

Det mest studerte så langt av de aktuelle temaene vi har undersøkt er akutte mekanismer for signaloverføring i osteoblaster (se tabell). Det er lite fokus på differensiering og effekt på mineraliseringsparametre. Vi fant størst effekt av høy belastning alene eller i kombinasjon med leptin, PTH og PBS løselig EMD på relativt udifferensierte osteoblaster. Her kan man se en økning i osteoid dannelse(ALP) og differensiert til mineralisering (OC). Vi fant at det vi utførte i forsøkene ikke var toksisk for cellene, selv med ”høy” belastning, altså her 50 G. For å se på nekrose ved apoptose kunne vi brukt flere og andre parametre enn LDH. Vi kunne f. eks. farget med fluorecense prober, eller brukt DNA tunnelering for å se på ødelagt DNA, nekrose og apoptose.

Forsøket er utført bare en gang på celler fra en donor. Dette gjør det vanskelig å trekke bastante konklusjoner basert på observasjonene. Funnene støtter likevel observasjonene gjort av Gebken et al.1999 (in vitro studie) og Yoneda et al. 2003 (in vivo) (tabell 1).

Dette kan også sammenlignes med forskning utført i rommet. Der man har sett på mikrogravitet og hva redusert belastning gjør med benvevet. Det er der vist (Bikle et al. 1999) at osteocalcin nivået går ned.

For å kunne bekrefte våre funn videre er det viktig å repetere forsøkene på celler fra flere donorer. Det er videre viktig å analysere gen uttrykket for ALP, collagen, osteocalcin osv. Vi må altså analysere gener som beskriver differensiering av celler.

Likevel kan vi ut i fra litteratur søkene se at funnene ved den praktiske delen av oppgaven utfyller tilgjengelig kunnskap på området og forsøkene danner derfor basis for videre studier. Det finnes nå utstyr på labratoriet som gjør slike studier mulig.

Referanser

Bikle D. D and Halloran B.P The response of bone to unloading. J. Bone and mineral metabolism 17:233-244.1999

Boyan BD, Wesner TC, Schwartz et al. Pricine fetal enamel matrix derivative enhances bone formation induced by demineralized freeze dried bone allograft in vivo. J Periodontol 2000; 71:1278-1286

Frost HM. Bone “mass” and the “mekanostat”: a proposal. Anat Rec 219:1-9, 1987

Frost HM. From Wolff's law to the mechanostat: A new “face” of physiology.J. Ortopaedic science3:282-286

Gebken J. et al. Hypergravity stimulates collagen syntesis in human osteoblast-like cells: Evidence for the involvement of p44/42 MAP-kinases (ERK ½) J.Biochem.126:676-682, 1999

Genser F.: Histologi på molekylærbiologisk grunnlag, Munksgaard kap.12 s.285-292, 1999

Gordeladze J. O. and Reseland J.E. Unified model for the action of leptin on bone turnover.J. of cellular biochemistry, 88:706-712,2003

Harada Shun-ichi and Rodan G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. 2003

Hatton JP et al. A Short Pulse of mechanical Force induces gene Expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an ERG ½ Pathway. J. of bone and mineral research, 18:nr.1 2003

Lee,Y-J.,Park;J.H.,Ju,S.-K,You,K.-H.,Ko;J.S og Kim,H.-M FEBS letters 528.40-42 2002

Jilka Robert L. et al: Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. The J. of clinical investigation, 104,439-446, 1999

Reseland JE og Gordeladze JO. Role of leptin in bone growth: Central player or peripheral supporter? FEBS letters 158 2002;

Swarthout J.T et al. Parathyroid hormone- dependent signalling pathways regulating genes in bone cells. Elsevier ScienceB.V 282:1-17, 2002

Torstveit M.K. Skjelettets adaptasjon til mekanisk belastning. Tidsskrift Norske lægeforening nr 21,122:2109-2111,2002

Yanfei L.Ma,Rick L. Cain et al.Catabolic effects of continuous human PTH (1-8) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and Gene-Associated bone formation, 2001

Yoneda S. et al. The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. J. Periodont Res. 38:333-342, 2003

Jilka Robert L. et al: Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. The J.of clinical investigation, 104,439-446, 1999