

Biohajoavien ja biostabiilien polymeerien aiheuttamat
pehmytkudosreaktiot

Reija Randén

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Biotekniikka

12.11.2007

Alkusanat

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin tamperelaisen bioalan yrityksen Inion Oy:n aineistosta. Yritys kehittää, valmistaa ja markkinoi biohajoavia implantteja, ja haluan lämpimästi kiittää Inion Oy:tä mahdollisuudesta osallistua tähän projektiin sekä yhtiön henkilökuntaa avusta ja kannustuksesta. Pro gradu -työtä rahoitti Pirkanmaan sairaanhoitopiirin tutkimusyksikkö, ja työ tehtiin Pirkanmaan sairaanhoitopiirin Laboratoriokeskuksen patologian vastuualueella vuosien 2006 ja 2007 aikana. Tutkielman ohjaajina toimivat dosentti, sairaalaselubiologi Immo Rantala Laboratoriokeskuksen patologian vastuualueelta ja LT, DI Tuomo Nieminen Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksen kliinisen farmakologian tutkimusryhmästä. Haluan lämpimästi kiittää molempia ohjaajiani tuesta ja neuvoista tässä projektissa.

Lisäksi haluan erityisesti kiittää solubiologi Teemu Honkasta Tampereen yliopiston patologian laitokselta. Hänen tietämyksensä ja neuvonsa mikroskooppimorfometriassa ja tilastanalyseissä olivat suureksi avuksi. Haluan kiittää myös ystäviäni sekä perhettäni kärsivällisyydestä ja kannustuksesta tämän projektin aikana.

Tekijä:	Reija Randén
Tutkielman nimi:	Biohajoavien ja biostabiilien polymeerien aiheuttamat pehmytkudosreaktiot
English title:	Soft tissue reactions after implantation of biodegradable and biostable polymers
Päivämäärä:	Sivumäärä: 58
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Biotekniikka
Tutkielman ohjaajat:	Tuomo Nieminen ja Immo Rantala

Tiivistelmä:

Biomateriaalit ovat synteettisiä tai luontoperäisiä materiaaleja, joista valmistettuja tuotteita käytetään lääketieteellisiin sovelluksiin sekä biotekniikan tarkoituksiin siten, että ne eivät häiritse tai haittaa elävän organismin elintoimintoja. Usein biomateriaalista valmistettu tuote on implantti, jota käytetään kudos- tai kudostenestekontaktissa proteettisissa, diagnostisissa ja terapeuttisissa tarkoituksissa. Biohajoava implantti on valmistettu materiaalista, joka hajoaa elimistössä entsyymaattisesti tai ei-entsyymaattisesti. Biostabiili materiaali ei häviä itsestään elimistöstä. Kudossyhteensopivuus eli biokompatibiliteetti on välttämätön biomateriaaleille, joita käytetään *in vivo*. Biomateriaaleista valmistettujen tuotteiden kehittäminen ja niiden ominaisuuksien parantaminen vaatii kudoksissa tapahtuvien reaktioiden hyvää tuntemusta ja perinpohjaista tutkimusta. Isäntäkudoksen reaktioita implanttimateriaalia kohtaan ovat akuutin tai kroonisen tulehdusvasteen syntyminen, vierasesinereaktio, fibroosi ja fibroosikapselin muodostuminen. Tulehdusvasteen syntyminen laukaisee prosessin, joka parantaa ja korjaa normaalia kudosta. Tämän korjausvaiheen aikana vaurioitunut kudos korvataan alkuperäisillä parenkyymisoluluilla tai fibroblastisella arpikudoksella tai molemmilla.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli analysoida fibroosikapselin muodostumista eri implanttimateriaaleissa ja -tyypeissä sekä eri implantointipaikoissa. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää implantoidussa kudoksessa esiintyviä ei-tulehdusellisia reaktioita, kuten verisuonten uudismuodostusta ja proliferoivien solujen tyyppiä sekä niiden yhteyttä tulehdusreaktioihin. Tutkimuksen tarkoituksena oli myös selvittää, kuinka immunohistokemiallinen menetelmä soveltuu kudosreaktioiden tutkimiseen. Tutkimuksessa käytetty materiaali koostui implantoiduista kudoksenäytteistä, jotka oli otettu kahdenoista täysikasvuisen naaraspuolisen Suomen maatiaislampaan leukaluusta sekä selän ihonalaiskudoksesta. Implantoitu materiaali sisälsi Inion CPS[®]-tuoteperheen biohajoavia ruuveja ja levyjä 56 kappaletta sekä biostabiileja polyeetterieetteriketonia (PEEK) valmistettuja levyjä 24 kappaletta. Näytteet olivat otettu kolmen vuoden seurantajakson aikana 6 viikon, 3, 6, 12, 24 sekä 36 kuukauden kuluttua implantaatiosta. Tutkimusmenetelminä käytettiin kudoksenäytteiden histologista prosessointia, fibroosikapselin paksuuden mittausta, immunohistokemiallista värjäystä, mikroskooppimorfometriaa ja tilastoanalyysijä.

Fibroosikapselin paksuudessa ei ollut merkittävää eroa eri implanttimateriaalien välillä. Levytyypin implanttien ympärillä fibroosikapseli oli huomattavasti paksumpi kuin ruuvityyppisten implanttien ympärillä. Samoin leuasta otetuissa näytteissä kapseli oli paksumpi kuin selästä otetuissa näytteissä. Merkittävää yhteyttä fibroosikapselin paksuuden ja eri tulehdusparametrien välillä ei havaittu. Fibroosikapselin paksuuden ja Ki-67 -positiivisesti värjäytyneiden eli jakautuvien solujen väliltä ei löydetty positiivista korrelaatiota. Sen sijaan eri tulehdusparametrien ja jakautuvien solujen välillä havaittiin merkitsevä korrelaatio. Proliferoivien solujen määrässä ei havaittu eroa implanttimateriaalien, -tyyppien ja implantointipaikkojen välillä. Faktori VIII:n perusteella määritetty verisuonten määrä implantoidussa kudoksessa ja fibroosikapselin paksuus korreloivat erittäin merkitsevästi keskenään. Samoin merkitsevä ero saatiin levy- ja ruuvi-implanttien välille, jossa levyimplanttien ympärillä verisuonten muodostus oli huomattavasti suurempi. Implanttimateriaalilla tai implantointipaikalla ei havaittu olevan merkitystä verisuonten uudismuodostukselle. Vasta-aineita Hsp47 ja TGF beeta ei saatu toimimaan lampaan kudoksessa.

Tulokset osoittavat implantointipaikan sekä implanttityypin vaikuttavan fibroosikapselin muodostumiseen. Proliferoivat solut olivat todennäköisesti tulehdussoluja. Implantoidussa kudoksessa verisuonitus lisääntyi samanaikaisesti fibroosivaipan kasvun kanssa. Tulosten perusteella voidaan todeta immunohistokemiallisen menetelmän soveltuvan implantoinnista aiheutuvien kudosreaktioiden tutkimiseen, joskin tällä hetkellä vielä tietyin rajoituksin spesifisten vasta-aineiden puuttuessa. Kokonaisuudessaan biohajoavien ja ei-biohajoavien biopolymeerien aiheuttamat pehmytkudosreaktiot olivat hyvin pieniä, eikä niiden välillä havaitut erot olleet merkittävän suuria.

Author: Reija Randén
Title of thesis: Soft tissue reactions after implantation of biodegradable and biostable polymers
Finnish title: Biohajoavien ja biostabiilien polymeerien aiheuttamat pehmytkudosreaktiot
Date: **Pages:** 58

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Biotechnology
Supervisors: Tuomo Nieminen and Immo Rantala

Abstract:

Biomaterials are synthetic or natural materials from which manufactured products are used in medical applications and biotechnology purposes. They should not disturb or harm vital functions of live organisms. Usually a product made of biomaterial is an implant, which is used in contact with tissue or tissue fluid for prosthetic, diagnostic and therapeutic purposes. Biodegradable implant possesses manufactured material which degrades in organs enzymatically or non-enzymatically. Biostable material does not disappear from the organs by itself. Biocompatibility is essential for biomaterials which are used *in vivo*. Development of products manufactured of biomaterials needs good knowledge and exhaustive research of tissue's reactions. Reactions of the host tissue with the implanted material are acute or chronic inflammatory response, foreign-body reaction, fibrosis and formation of fibrous capsule. Inflammatory response triggers a process which heals and repairs normal tissue. During this repairing phase injured tissue is replaced by native parenchymal cells or fibroblastic scar tissue or both.

The purpose of this study was to analyse formation of the fibrous capsule in different implanted materials, types and different implantation sites. In addition, the purpose was to clarify non-inflammatory reactions such as neovascularization and cell proliferation and their connections to the inflammatory reactions in implanted tissue. The purpose was also to examine whether immunohistochemistry staining method is suited to research of tissue reactions. The used material included implanted tissue samples which had been obtained from twelve skeletally mature female Finnish landrace sheep mandible and dorsal subcutis. Implanted material consisted of 56 samples of biodegradable screws and plates of Inion CPS[®] product family and 24 samples of biostable polyetheretherketone (PEEK) plates. Samples had been taken during three-year follow-up period 6 weeks, 3, 6, 12, 24 and 36 month post implantation. Histological processing, measurement of fibrous capsule thickness, immunohistochemical staining, microscopy morphometry and statistical analyses were used as methods.

There was not significant differences in tissue reactions between the different implanted materials. Fibrous capsule was substantially thicker around plates than screws. Likewise, fibrous capsule was thicker in samples taken from the mandible than those from dorsal subcutis. Notable connection between thickness of fibrous capsule and inflammatory parameters was not observed. Between thickness of capsule and Ki-67 -antibody positive proliferative cells no positive correlation was found. However, there was significant correlation between inflammatory parameters and Ki-67 -positive cells. In the amount of proliferative cells there was not difference between implanted materials, types and different places of implants. Factor VIII -antibody stained blood vessels correlated remarkably with thickness of fibrous capsule. There was also significant difference between plates and screws where vascularization surrounding plates were substantially stronger than surrounding screws. The material or place of the implants was observed to have no importance for vascularization. Hsp47 and TGF beta antibodies did not work in sheep tissue.

The results prove that the place of implant and type of implant affect the formation of fibrous capsule and that proliferative cells were probably inflammatory cells. In implanted tissue vascularization increased at the same time with growth of capsule. On the grounds of the results it can be said that immunohistochemistry suits for study of tissue reactions caused by implantation, though in this moment with some limitations. In its entirety reactions of soft tissue of biodegradable and biostable biopolymers were very small and the differences between them were not marked.

Keywords: sheep, test animal, implant, biodegradable, biostable, tissue reaction, inflammation

Sisällys

1. JOHDANTO	8
1.1. BIOMATERIAALIT.....	8
1.2. IMPLANTIT	9
1.3. BIOMATERIAALIEN KÄYTTÖ IMPLANTEISSA.....	9
1.3.1. Metallit.....	10
1.3.2. Keraamit	12
1.3.3. Komposiitit.....	12
1.3.4. Luonnon materiaalit.....	13
1.3.5. Polymeerit.....	13
1.3.5.1. Luonnon polymeerit	13
1.3.5.2. Synteettiset polymeerit.....	14
1.3.5.3. Biostabiilit polymeerit.....	14
1.3.5.4. Polyeteerietteriketoni (PEEK) biomateriaalina.....	15
1.3.5.5. Biohajoavat polymeerit	15
1.4. SATUROIDUT ALIFAATTISET POLYESTERIT BIOMATERIAALEINA	17
1.4.1. PGA.....	17
1.4.2. PLA ja sen isomeerit PLLA, PDLA, PDLLA ja PLDLLA.....	18
1.5. BIOPOLYMEERIEN HAJOAMINEN ELIMISTÖSSÄ.....	19
1.6. KUDOSYHTEENSOPIVUUS ELI BOKOMPATIBILITEETTI	20
1.6.1. PGA:n biokompatibiliteetti	21
1.6.2. PLA:n ja sen isomeerien biokompatibiliteetti	22
1.6.3. PEEK:n biokompatibiliteetti.....	22
1.7. KUDOSVAURIO PEHMYTKUDOKSESSA.....	22
1.7.1. Tulehdusreaktio pehmytkudoksessa	23
1.7.2. Implantin aiheuttama kudosreaktio.....	25
1.7.3. Fibroosikapselin muodostuminen implantin ympärille.....	26
1.7.4. Angiogeneesi kudosvauriossa	27
1.7.5. Solujen proliferaatio kudosvauriossa.....	29
2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....	30
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	31
3.1. TUTKIMUKSESSA KÄYTETTY MATERIAALI	31
3.1.1. Aikaisemmin saadut tulokset.....	33
3.2. TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT MENETELMÄT	34
3.2.1. Kudosnäytteiden histologinen prosessointi.....	34
3.2.2. Fibroosikapselin paksuuden mittaus.....	34
3.2.3. Immunohistokemiallinen värjäys	35
3.2.4. Mikroskooppimorfometria.....	36
3.2.5. Tilastoanalyysit.....	39
4. TULOKSET	40
4.1. FIBROOSIKAPSELI	40
4.1.1. Fibroosikapseli ajan funktiona	40
4.1.2. Fibroosikapseli eri implanttityypeissä.....	41
4.1.3. Fibroosikapseli eri implantointipaikoissa.....	43
4.1.4. Fibroosikapselin suhde eri tulehdusparametreihin.....	43
4.1.4.1. Korrelaatiot implanttityypeittäin ja -paikoittain	44
4.2. IMMUNOHISTOKEMIALLINEN VÄRJÄYS	44
4.2.1. Ki-67 ja Faktori VIII ajan funktiona.....	45
4.2.2. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde fibroosikapselin muodostumiseen	46
4.2.3. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde eri implanttityypeissä.....	46
4.2.4. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde eri implantointipaikkoihin.....	46
4.2.5. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde eri tulehdusparametreihin.....	47
5. TULOSTEN TARKASTELU	48
5.1. FIBROOSIKAPSELIN PAKSUUS IMPLANTOINTIALUEELLA	48
5.2. SOLUJEN PROLIFERAATIO IMPLANTOINTIALUEELLA	50

5.3. VERISUONTEN MUODOSTUS IMPLANTOINTIALUEELLA	51
5.4. YHTEENVETO.....	52
6. VIITTEET.....	54

LYHENTEET

a/bFGF	acidic/basic fibroblast growth factor
FBR	foreign body reaction, vierasesinereaktio
HE	hematoksyliini-eosiini
PDLLA	D,L-polylaktidi
PEEK	polyeetterieetteriketoni
PGA	polyglykoli
PLA	polylaktidi
PLDLLA	L,D,L-polylaktidi
PLLA	L-polylaktidi
PMN	polymorfonukleaarinen neutrofiili
TGF	transforming growth factor
TMC	trimetyleenikarbonaatti
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. JOHDANTO

Biomateriaalien ja niistä valmistettavien tuotteiden kuten implanttien kehittämiseen sekä niiden elimistövaikutuksien ja käytöstä aiheutuvien vaurioiden tutkimiseen vaaditaan monien eri tieteen ja tekniikan alojen yhteistyötä. Asiantuntijoiden osaamista tarvitaan esimerkiksi kemian, fysiikan, materiaalitieteen, anatomian, fysiologian, histopatologian, solu- ja molekyylibiologian, kokeellisen kirurgian sekä kliinisten tieteiden aloilta. Yksi tärkeimmistä tavoitteista biomateriaalien ominaisuuksia kehitettäessä on niiden kudossyhteensopivuuden eli biokompatibiliteetin parantaminen. Biomateriaalista riippuen tällä tarkoitetaan materiaalien pintaominaisuuksien kehittämistä, jotta biomateriaalista valmistettu tuote voi suoraan integroitua sitä ympäröivään kudokseen ilman erillistä kudosterrosta niiden välissä. Biokompatibiliteettia voidaan parantaa myös kehittämällä tuotteista bioaktiivisia lisäämällä niihin esimerkiksi keraameja, kasvutekijöitä tai kemoterapeuttisia aineita, jotka aktivoivat kudoksen kasvua ja tehostavat paranemista (Törmälä, 2003).

Biomateriaaleista valmistettujen tuotteiden kehittäminen ja niiden ominaisuuksien parantaminen vaatii ennen kaikkea kudoksissa tapahtuvien reaktioiden hyvää tuntemusta ja perinpohjaista tutkimusta. Läheskään kaikkia näistä reaktioista ei vielä tunneta, ja tällä poikkitieteellisellä alalla tarvitaankin vielä runsaasti tutkimustyötä.

1.1. Biomateriaalit

Biomateriaaleiksi kutsutaan synteettisiä tai luontoperäisiä materiaaleja, joista valmistettuja tuotteita käytetään lääketieteellisiin, hammaslääketieteellisiin sekä biotekniikan tarkoituksiin siten, että ne eivät häiritse tai haittaa elävän organismin elintoimintoja. Synteettiset biomateriaalit ovat yleensä metalleja, keraamisia aineita, polymeerejä tai yhdistelmä-materiaaleja eli komposiitteja. Luontoperäiset materiaalit voivat olla alkuperältään ihmisen tai eläimen luusta, rustosta, sidekudoksesta, keuhkosta ja ihosta (Ratner ym., 2004).

1.2. Implantit

Implantti eli istuke on biomateriaalista valmistettu tuote, jota käytetään kudosis- tai kudosisnestekontaktissa proteettisissa, diagnostisissa ja terapeuttisissa tarkoituksissa (Törmälä, 2003). Implanttien kehittäminen ja valmistus sekä niiden aiheuttamien vaurioiden tutkiminen elimistössä vaatii useiden tieteen ja tekniikan alojen yhteistyötä. Implantin tuotekehitysprosessi sisältää tarvekartoituksen sekä uuden tuotteen ideoinnin, suunnittelun ja materiaalin valmistamisen. Materiaali on testattava perusteellisesti kudosisyhteensopivuuden selvittämiseksi. Implantin on luonnollisesti oltava myös mekaanisilta ominaisuuksiltaan ja toimivuudeltaan käyttötarkoitukseen sopiva. Implanttien oikeanlainen sterilointi ja pakkaus ovat myös olennainen osa tuotantoprosessia.

Materiaaleja ja implantteja on testattava monivaiheisesti. Prekliiniset kokeet sisältävät toksikologiset testit sekä erilaiset *in vitro*-testit ja implantin testaukset eläimillä. Kliinisiä tutkimuksia ja testauksia sekä pitkäaikaista seurantaä valvovat eri viranomaisstahot. Suomessa Lääkelaitos toimii viranomaiselimenä, joka säätelee ja valvoo implanttien valmistusta sekä markkinoille tuloa ja myöntää myyntiluvat implanttivalmistajille. Laki terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista (1505/94) säätelee tuotetta koskevat olennaiset vaatimukset. Myös asetuksessa terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista (1506/94) sekä Sosiaali- ja terveysministeriön päätöksissä terveydenhuollon laitteista ja tarvikkeista (1994:66) ja aktiivisesti implantoitavista laitteista (1994:67) on säädetty tuotteille asetettavista olennaisista vaatimuksista. Nämä säädökset perustuvat Euroopan yhteisön direktiiveihin aktiivisista implantoitavista lääketieteellisistä laitteista (90/385/ETY) ja lääkinällisistä laitteista (93/42/ETY). Näiden säädösten lisäksi Euroopan komission laatimat ns. yhdenmukaistetut eurooppalaiset standardit sisältävät yksityiskohtaisempia vaatimuksia ja testausmenetelmiä implanteille. Biomateriaalien keskeisimmät standardit kuuluvat EN ISO 10993-sarjaan (Törmälä, 2003).

1.3. Biomateriaalien käyttö implanteissa

Biomateriaalien käyttöä implanttien valmistuksessa lääketieteellisiin tarkoituksiin alettiin soveltaa 1900-luvun alkupuolella. A. Zierold julkaisi vuonna 1924 tutkimuksen, jossa

todettiin koboltti-kromi-molybdeeni-seoksen sopivan luuimplanttien valmistukseen. Vuonna 1926 M. Large havaitsi molybdeeniä sisältävän ruostumattoman terässeoksen käyttökelpoisuuden implanttimateriaalina. Titaania ja sen seosten käyttöä implanteissa tutki J. Cotton vuonna 1947 ja havaitsi niiden olevan myös mahdollisia ja käyttökelpoisia materiaaleja (Ratner, 2004; Spector, 2006). Synteettisistä polymeereistä valmistettuja implantteja otettiin käyttöön 1940-luvun alussa. F.D. Ingrahamin tutkimusryhmä julkaisi ensimmäisenä tutkimuksen polyetyleenin käytöstä synteettisenä implanttimateriaalina. Nykyään biomateriaalit voidaan jaotella kemiallisen koostumuksensa perusteella viiteen pääryhmään: metallit, keraamit, komposiitit, polymeerit ja luonnon materiaalit (Törmälä, 2003; Ratner, 2004).

Implanttien valmistukseen käytettävien biomateriaalien ominaisuudet vaikuttavat merkittävästi implantin kiinnittymiseen sekä implantin ja kudoksen vuorovaikutukseen. Implanttimateriaalin valintaan vaikuttavat materiaalin jäykkyys, korroosio-ominaisuudet, kudossyhteensopivuus sekä kyky kiinnittyä kudokseen. Myös biomateriaalin pinnan ominaisuuksilla, implantin koolla, muodolla ja käyttötarkoituksella sekä koko implantin tuotantoprosessilla on merkitystä implanttimateriaalia valittaessa (Simon ja Fabry, 1991).

1.3.1. Metallit

Metalleilla on usein hyvä taivutus-, puristus-, veto- ja väsymislujuus. Näitä ominaisuuksia voidaan muunnella käyttämällä eri metalliseoksia eli lejeerinkejä implanttien valmistuksessa. Implanttimetallien on oltava kudossytävällistä ja tarjottava hyvä kasvu- ja kiinnitysalusta isäntäsoluille. Eniten käytettyjä metalleja implanttien valmistuksessa ovat ruostumaton teräs, kobolttipohjaiset (Co) seokset sekä titaani (Ti) ja titaanipohjaiset seokset. Ruostumattomasta teräksestä on saatavilla implanttien valmistukseen useita vaihtoehtoja, joista eniten käytetty on 316L(F138, F139). Ruostumattomasta teräksestä valmistettu implantti soveltuu hyvin väliaikaiseen käyttöön, mutta pitkäaikaisessa käytössä tapahtuu metallin väsymistä ja vaarana on sen muotoutuminen uudelleen. Lisäksi ruostumattomasta teräksestä voi liueta elimistöön rautaa (Fe), nikkeliä (Ni), molybdeeniä (Mo), kromia (Cr) sekä muita epäpuhtauksia, jonka vuoksi terästä käytetäänkin lähinnä sellaisissa sovelluksissa, joissa se tehtävänsä täytettyään tarvittaessa poistetaan elimistöstä. Ruostumattoman teräksen käytössä on haittana myös sen

heikko korroosiokestävyys. Sen sijaan se on muita metalleja halvempi, ja sitä käytetään edelleen lyhytkestoista hoitoa vaativien murtumien hoidossa, kuten nauloina, ruuveina ja levyinä (ks. yleiskatsaus Long ja Rack, 1998; Brunski, 2004).

Pitkäaikaiseen implantin käyttöön soveltuvat metalleista kobolttipohjaiset seokset, kuten koboltti-kromi-molybdeeni-seos ja koboltti-kromi-nikkeli-seos. Näitä käytetään muun muassa polven, olkapään sekä lantion nivelproteeseissa. Kobolttipohjaiset seokset muodostavat pinnalleen lujan kromioksidikerroksen, joka suojaa metallia korroosion vaikutuksilta. Lisäksi kobolttipohjaiset metalliseokset kestävät hyvin lämpöä sekä kulumista, ja ne ovat ei-magneettisia (Marti, 2000). Haittapuolena on metalli-ionien hidas diffundoituminen kromioksidikerroksen läpi ja akkumuloituminen kudokseen. Kobolttipohjaisten seosten valmistusprosessi on lisäksi vaikea, mikä osaltaan rajoittaa niiden käyttöä implanteissa (Simon ja Fabry, 1991; Gotman, 1997; Marti 2000).

Titaani soveltuu implanttien valmistukseen joko sellaisenaan tai lejeerinkinä alumiinin ja vanadiinin kanssa. Sen kanssa voidaan sekoittaa myös zirkoniumia ja niobiumia tekemään implanteista lujia ja kimmoisia. Titaanipohjaisilla materiaaleilla on hyvä bioyhteensopivuus ja ne kestävät paremmin korroosiota kuin kobolttipohjaiset seokset niiden pinnalle muodostuvan keraamisen titaanioksidin ansiosta (Simon ja Fabry, 1991; Törmälä, 2003). Titaani ja titaanipohjaiset implantit ovat kevyempiä ja kestävämpiä kuin esimerkiksi ruostumattomasta teräksestä tehdyt implantit. Pehmeytensä vuoksi titaanista voi irrota syklisen kuormituksen, mikroliikkeen, korroosion ja väsymisen seurauksena kulumisjäämää, joka voi aiheuttaa kudoksessa vierasesinereaktion (Törmälä, 2003).

Metallipohjaisen materiaalin käytön haittapuolena on myös se, että joissakin tapauksissa se täytyy poistaa uusintaleikkauksella vaurion parannuttua. Metallit ovat jäykkiä, ja ne eivät hajoa luonnossa. Lisäksi ne saattavat aiheuttaa ärsytystä ympäröivässä kudoksessa ja myös kulkeutua ajan kuluessa eri paikkaan elimistössä. Metallimplantit voivat häiritä myös radiologisia kuvauksia (ks. yleiskatsaus Maurus ja Kaeding, 2004).

1.3.2. Keraamit

Keraamit ovat pysyviä metallien ja epämetallien, erityisesti hapen, yhdisteitä. Keraameja ovat oksidikeraamit, kalsiumfosfaatit ja -sulfaatit, kalsiumkarbonaatit, biolasit sekä lasikeraamit. Keraamit rakentuvat säännöllisesti järjestäytyneistä kiteisistä mineraalimolekyyleistä (Suh, 1998). Oksidikeraameista käytetyimpiä implanttimateriaaleina ovat alumiinioksidi Al_2O_3 ja zirkoniumoksidi ZrO_2 (Törmälä, 2003). Hydroksiapatiitti (HA), kemialliselta rakenteeltaan $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, on geologinen mineraali, joka on läheisesti samankaltainen selkärankaisten luukudoksessa tavattavan mineraalin kanssa. Kalsiumfosfaattikeraameihin kuuluvaa hydroksiapatiittia ja sen eri muotoja käytetään laajasti implanteissa sekä niiden pinnoilla (Wang, 2003). Biokeraamien haittapuolena on niiden halkeileminen ja murtuminen sekä erityisesti niiden heikko taipuisuus ja muokkaaminen verrattuna esimerkiksi metalleihin.

Keraamit voidaan jaotella myös sen mukaan, miten ne reagoivat kudoksen kanssa. Bioinertit keraamit eivät reagoi ollenkaan tai reagoivat hyvin vähän, kun taas bioaktiiviset keraamit muodostavat biokemiallisia sidoksia kudoksen kanssa. Bioabsorpoituvat keraamit hajoavat elimistössä asteittain joko fysiologisesti liueten tai fagosytoosin seurauksena (Dubok, 2000).

1.3.3. Komposiitit

Komposiitit ovat yhdistelmäateriaaleja, jotka koostuvat vähintään kahdesta rakenteeltaan ja/tai ominaisuuksiltaan erilaisesta faasista. Nämä voidaan erotella toisistaan joko makroskooppisesti, mikroskooppisesti tai submikroskooppisesti, jolloin erottelu tapahtuu molekyylylasolla. Komposiitit voivat olla osittain kiteisiä, jolloin ne koostuvat kiteisestä ja amorfisesta materiaalista, tai ne voivat muodostua jatkuvasta matriisista ja epäjatkuvasta faasista. Lujitetuissa komposiiteissa matriisi sitoo pitkiä tai lyhyitä lujitekuituja yhteen. Komposiitit suunnitellaan hyödyntäen niissä käytettävien materiaalien parhaita ominaisuuksia, ja ne voidaan luokitella käytetyn matriisin materiaalin (metalli, keraami, polymeeri) mukaan tai niiden kudostuorovaikutuksen (bioinerti, bioaktiivinen, biohajoava) mukaan (Wang, 2003). Useimmat luonnon biomateriaalit ovat myös komposiitteja kuten luu, rusto, sidekudos ja iho (Törmälä, 2003; Migliaresi ja Alexander, 2004).

1.3.4. Luonnon materiaalit

Luonnosta peräisin olevien biomateriaalien käytöllä implanteissa on etuna niiden makromolekyylinen samankaltaisuus biologisen ympäristön kanssa. Ongelmana on kuitenkin niiden voimakas immunogeenisyys sekä hajoaminen tai uudelleen muokkautuminen valmistusprosessin aikana. Implanteissa käytetyistä luonnon biomateriaaleista suurin osa on sidekudoksen rakenneosia, joista yleisin on kollageeni. Muita luonnon biopolymeerejä ovat esimerkiksi proteoglykaanit sekä elastiini (Yannas, 2004).

1.3.5. Polymeerit

Polymeerit ovat pitkäketjuisia molekyyliä, jotka muodostuvat pienemmistä, yleensä hiilirungollisista toistoyksiköistä, monomeereistä (ks. yleiskatsaus Wuisman ja Smit, 2006). Polymeerit voidaan jaotella niiden alkuperän mukaan synteettisiin polymeereihin ja luonnonpolymeereihin. Jako voidaan tehdä myös polymeerien kudosvuorovaikutuksen perusteella biostabiileihin eli ei-biohajoaviin ja biohajoaviin polymeereihin. Polymeerit ovat koostumukseltaan ja ominaisuuksiltaan hyvin erilaisia. Niitä käytetään eri muodoissa sekä komposiitteina hyvin laajasti lääketieteellisissä sovelluksissa kuten implanteissa. Sopivan polymeerityypin valintaan vaikuttavat käyttötarkoituksen asettamat kliiniset vaatimukset sekä polymeerin rakenteelliset ja kemialliset ominaisuudet huomioiden molekyylipaino, polymeeriketjun haaroittumisen aste, amorfisuus/kiteisyys jne. Biomateriaaleista polymeerit muodostavat suurimman ryhmän (ks. yleiskatsaus Taddei ym., 2001; Wang, 2003; Cooper ym., 2004).

1.3.5.1. Luonnon polymeerit

Biomateriaaleina käytettyjä luonnosta saatavia polymeerejä ovat kasvi- ja eläinperäiset polymeerit, kuten selluloosa, luonnon kumi, kollageeni sekä proteo- ja glykosaminoglykaanit. Vaikka luonnon polymeereillä on edelleenkin lukuisia käyttösovelluksia lääketieteessä, synteettisten biopolymeerien käyttö on lisääntynyt huomattavasti (Cooper ym., 2004).

1.3.5.2. Synteettiset polymeerit

Polymeerit ovat joko vain yhdentyypistä monomeeriä sisältäviä homopolymeerejä tai kopolymeerejä, jolloin ne muodostuvat kahdesta tai useammasta erilaisesta monomeeristä. Homopolymeerejä ovat muun muassa polymetyylimetakrylaatti (PMMA), polyeteeni (PE), polytetrafluoroeteeni (PTFE), polypropeeni (PP), polyvinyylikloridi (PVC) ja polydimetyylisiloksaani (PDMS). Biomateriaaleina käytettäviä kopolymeerejä ovat esimerkiksi polyuretaanit (PU) ja polyglykoli-laktidi (PGL). Hydrogeeleiksi kutsutaan polymeerejä, jotka kykenevät imemään sisäänsä vettä. Tunnetuin hydrogeeli on polyhydroksietyylimetakrylaatti eli HEMA.

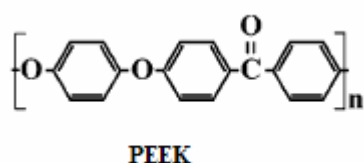
Synteettisten polymeerien valmistuksessa käytetään additiopolymerisaatiota, joka on usein renkaanavausadditio, tai kondensaatiopolymerisaatiota. Additiopolymerisaatiossa monomeerit liitetään toisiinsa avaamalla niiden välissä oleva kaksoissidos. Kondensaatiopolymerisaatiossa kaksi eri monomeeriä liitetään toisiinsa kemiallisen reaktion avulla, jolloin syntyy myös jokin pieni molekyylinen yhdiste kuten vesi, hiilidioksidi tai metanoli (Suh, 1998; Cooper ym., 2004).

1.3.5.3. Biostabiilit polymeerit

Luokittelu voidaan tehdä myös kudosvuorovaikutuksen perusteella. Lääketieteellisissä sovelluksissa käytettäviä synteettisiä polymeerejä, jotka eivät hajoa elimistössä, kutsutaan biostabiileiksi. Biostabiileihin polymeereihin lukeutuu suurin osa lääketieteellisessä käytössä olevista polymeereistä, kuten polyeteeni, polyuretaani, polypropeeni, polyamidit sekä polyeetterieetteriketoni. Implanttimateriaalina käytettynä biostabiilit polymeerit soveltuvat pitkäaikaista implantaatiota vaativiin käyttötarkoituksiin (ks. yleiskatsaus Ikada ja Tsuji, 1999).

1.3.5.4. Polyeteerietteriketoni (PEEK) biomateriaalina

Polyeteerietteriketoni eli PEEK (kuva 1) kuuluu polyaryylieetteriketoni-perheeseen (PAEK). PEEK on stabiili eli hajoamaton biopolymeeri, jonka käyttö on levinnyt ilmailu- ja automaatioteollisuudesta lääketieteellisiin sovellutuksiin (Eschbach, 2000). PEEK on aromaattinen puolikiteinen lineaarinen polymeeri, jonka polymeeriketjun yksikkö muodostuu kahdesta perättäisestä eetteriryhmästä ja yhdestä ketoniryhmästä. PEEK:n lasisiirtymälämpötila on 143 °C ja sulamislämpötila 334 °C (Katzer ym., 2002). Lasisiirtymälämpötilalla tarkoitetaan sitä lämpötilaa, jossa lasimainen kova polymeeri muuttuu kumimaiseksi ja pehmeäksi. PEEK on tunnettu lujuudestaan ja erinomaisesta kudosyhteensopivuudestaan. Se kestää hyvin myös kulumista ja gammasäteilyä. PEEK-materiaalia on helppo myös muovaila lämpimänä, mikä on etu valmistusprosessissa (Ferguson, 2006; Nieminen ym., 2007a). PEEK-polymeerin ensimmäinen käyttösovellus lääketieteessä oli luunmurtumien korjaus. Lääketieteellisissä sovellutuksissa käytetään polymeerituotetta PEEK-OPTIMA[®] (In Vibio Ltd., Lancashire, UK). Siitä voidaan valmistaa implantteja ekstruusiolla, ruiskuvalulla tai koneellisesti työstäen. PEEK-polymeeriä on hyödynnetty esimerkiksi selkärangan vammojen korjausleikkauksissa (Toth ym., 2006), runkona kaularankamien luuduttamisessa yhteen (Cho ym., 2002) sekä lonkkaproteeseissa (Scotchford ym., 2003). PEEK soveltuu käytettäväksi myös komposiiteissa, esimerkiksi β-trikalsiumfosfaatin (βTCP) kanssa (Petrovic ym., 2006).



Kuva 1. Polyeteerietteriketoni (PEEK) kemiallinen rakenne (kuvaa muokattu artikkelin Jagur-Grodzinski, 1999, pohjalta.)

1.3.5.5. Biohajoavat polymeerit

Biohajoavat polymeerit kuuluvat biomateriaaleihin, jotka hajoavat elimistössä asteittain, metaboloituvat ja lopulta poistuvat kehosta. Biohajoavasta materiaalista tehtyä implanttia ei yleensä tarvitse poistaa kirurgisesti (ks. yleiskatsaus Ashammakhi ym., 2004; Ekholm ym.,

2006). Ensimmäiset kokeelliset sovellukset biohajoavien polymeerien käytöstä implanteissa on kuvattu jo 1960- ja 1970-lukujen vaihteessa (Schmitt ja Polistina, 1969, Cutright, ym., 1971 sekä Kulkarni ym., 1971). Tutkimuksissa käytettiin implanteissa ja ommellangan materiaalina maitohapon polymeeriä, polylaktidihappoa eli polylaktidia (PLA) (Tuompo, 2004; Waris ym., 2004). Tutkimuksissa PLA:n ei todettu aiheuttavan kudokselle vahingollista tulehdus- tai vierasesinereaktiota, vaikka se ei ollutkaan täydellisesti hajonnut tutkimuksen päättyessä (ks. yleiskatsaus Ambrose ja Clanton, 2004).

Biohajoavat polymeerit jaetaan luonnosta peräisin oleviin ja synteettisiin polymeereihin. Luonnon biohajoavia polymeerejä ovat polysakkaridit kuten tärkkelys, algiini ja kitiini, sekä proteiinit kuten kollageeni, elastiini ja keratiini. Synteettisiä biohajoavia polymeerejä voidaan valmistaa kontrolloidusti ja näin pitää kemialliset että mekaaniset ominaisuudet – kuten hajoamisnopeus, elastisuus ja vetolujuus – samoina valmistuserästä toiseen (ks. yleiskatsaus Rezwan ym., 2006). Biohajoavia polymeerejä käytetään lääketieteen sovelluksissa lisääntyvästi. Merkittävimpiä etuja ovat niiden soveltuminen lyhyt- ja väliaikaista implantin läsnäoloa vaativiin käyttötarkoituksiin, kudosityhteensopivuus, vähentynyt uusintaleikkausten tarve sekä vähäinen kudosta kuormittava rasite. Implanteissa käytetyimpiä synteettisiä biohajoavia polymeerejä ovat polyglykolidi (PGA) ja PLA sekä niiden kopolymeerit polyglykolidi-polylaktidi (PLGA) ja (P(L/DL)LA) (ks. yleiskatsaus Ambrose ja Clanton, 2004). Muita käytettyjä biohajoavia polymeerejä ovat polyortoesterit, polyglykolidi-ko-trimetyleenikarbonaatti, poly-p-dioxanone, poly-ε-kaprolaktoni ja polyhydroksibutyraatti.

Biohajoavien implanttien haittapuolena on niiden mekaaninen heikkous. Toisinaan tarpeettoman pitkä hajoamisaika voidaan myös kokea ongelmaksi. Myös niiden suhteellisen korkea hinta saattaa rajoittaa niiden käyttöä. Joissakin tapauksissa biohajoavat implantit ovat aiheuttaneet ei-toivottuja biologisia vasteita. Monissa ortopedisissä tutkimuksissa biohajoavat implantit ovat olleet erinomainen vaihtoehto biostabiileille implanteille, sillä lujuuden heikentyminen hajoamisen aikana on ollut riittävän hidasta sallien kudoksen paranemisprosessin (ks. yleiskatsaus Ambrose ja Clanton, 2004).

1.4. Saturoidut alifaattiset polyesterit biomateriaaleina

Poly- α -hydroksihappo on saturoitu alifaattinen polyesteri, joka on kanta-aine tunnetuimmalle biohajoavien biopolymeerien valmistuksessa käytetyistä synteettisistä polymeeriryhmistä. Ryhmään kuuluvat biohajoavissa implanteissa yleisimmin käytetyt biopolymeerit PLA, PGA sekä näiden ko-polymeerit PLGA ja P(L/DL)LA (Celikkaya ym., 1996; ks. yleiskatsaus Rezwan ym., 2006). Laktidi- ja glykolihappo ovat solujen ja organismien biokemiallisen metaboliareitin välituotteita, joten PLA ja PGA hajoavat elimistössä luonnollisiksi metaboliayhdisteiksi (ks. yleiskatsaus Wuisman ja Smit, 2006).

1.4.1. PGA

PGA on yksinkertaisin hajoava polyesteri. Se on hydrofiilinen ja osittain kiteinen polymeeri, jonka kiteisyysaste on 46–52 %, sulamispiste 224–226 °C ja lasisiirtymälämpötila 35–40 °C. Tätä korkeammassa lämpötilassa se muuttuu pehmeäksi ja joustavaksi. Onkin tärkeää, että polymeerin lasisiirtymälämpötila ylittää ruumiin lämpötilan (ks. yleiskatsaus Maurus ja Kaeding, 2004). PGA:n hydrolysoituessa syntyy alkoholi- ja karboksyyli-ryhmiä ja polymeerin moolimassan laskiessa glykolihappoa. Glykolihapon monomeerit hajotetaan glyksylaatiksi ja edelleen glysiinitransaminaasin vaikutuksesta glysiiniksi. Glysiini voidaan hyödyntää proteiinisynteesissä tai se voidaan muuttaa sitruunahappokierrossa poistuvaksi pyruvaatiksi. Osa glykolihaposta eritetään suoraan virtsaan (ks. yleiskatsaus Peltoniemi ym., 2002 ja Törmälä, 2003). PGA:n tiedetään hajoavan osittain entsymaattisesti myös mm. esteraasien avulla (An ym., 2000). Suuren kiteisyytensä vuoksi PGA ei liukene useimpiin orgaanisiin liuottimiin, mutta hajoaa kuitenkin elimistössä nopeasti kiteisyydestään huolimatta. PGA menettää lähes kaiken kestäväytensä kuudessa viikossa ja kaiken massansa 3–12 kuukaudessa (Nieminen ym., 2007b). PGA:a käytettiin kehitettäessä ensimmäistä täysin synteettistä biohajoavaa ommellankaa, jonka kaupallinen tuotenimi on vuodesta 1970 lähtien ollut Dexon® (Kohn ym., 2004). PGA:a käytetään ortopedian implanttisovelluksissa kuten ruuveissa, levyissä, neuloissa sekä ommellangoissa.

1.4.2. PLA ja sen isomeerit PLLA, PDLA, PDLLA ja PLDLLA.

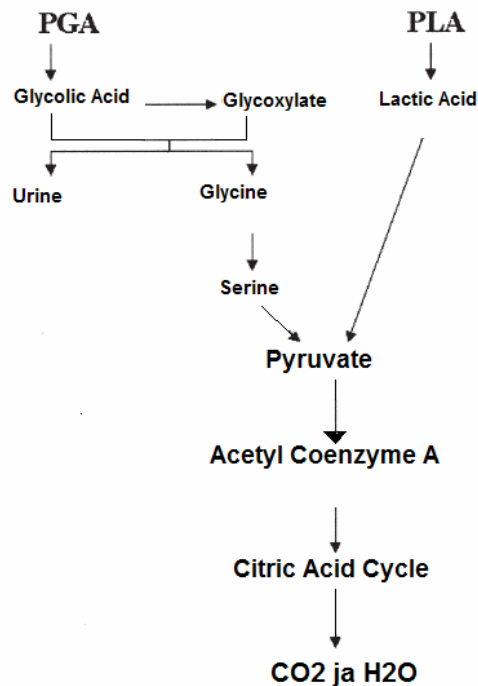
PLA on hydrofobinen ja hajoaa hitaammin kuin PGA. PLA:n sulamispiste on 207 °C ja lasisiirtymälämpötila 60 °C. Se on elimistössä liukeneva polymeeri, jota valmistetaan renkaanavauspolymeraation avulla kahden maitohappomolekyylin muodostamasta dimeeristä eli dilaktidista. PLA:lla on kolme keskeistä isomeeria: L-PLA (PLLA), D-PLA (PDLA) ja raseeminen seos D,L-PLA (PDLLA), joka muodostuu yhtä monesta ketjusta L-laktidi- ja D-laktidi-toistoyksikköjä. PLLA- ja PDLA-isomeerit ovat kemiallisilta ja fysikaalisilta ominaisuuksiltaan samanlaisia, mutta PLLA on yleisimmin käytetty, sillä se esiintyy isomeerinä myös luonnossa. PDLLA-isomeeri on täysin amorfinen. PLDLLA on ei-raseeminen kopolymeeri, joka on L-laktidin ja raseemisen PDLLA:n seos. PLDLLA koostuu siis eri määristä L- ja D-laktidiyksikköjä. PLDLLA on myös amorfisempi kuin yksinkertainen PLLA-isomeeri. PLA hajoaa elimistössä ei-entsymaattisesti hydrolyysillä veden ja lämmön vaikutuksesta maitohapoksi. Maitohappo hapetetaan pyruvaatiksi, joka edelleen hajoaa vedeksi ja hiilidioksiiksi sitruunahappokierrossa (ks. yleiskatsaus Peltoniemi ym., 2002 ja ks. yleiskatsaus Rezwan ym., 2006). PLA:n hajoaminen saattaa olla osittain myös entsymaattista (An ym., 2000). Hajoaminen amorfisissa polymeerin osissa tapahtuu nopeammin kuin polymeerin kiteisissä osissa, sillä polymeerin kiteisten osien ketjujen välillä on lujat kaksoissidokset, jotka vaikeuttavat veden läpäisyä ja näin hidastavat hajoamista (ks. yleiskatsaus Wuisman ja Smit, 2006). Toisaalta isomeereillä on hajotessaan tapana muodostaa kiteitä, mikä hidastaa hajoamisprosessia (Nieminen ym., 2007b). PLA:a ja sen eri isomeerejä käytetään eniten ortopedian sovellusten implanttimateriaalina sekä myös esimerkiksi lääkeaineiden kuljetuksessa ja luovutuksessa.

Synteettisiä biohajoavia biopolymeerejä käytetään implanteissa yleensä sekoituksina tai kopolymeereinä, sillä näin voidaan tarkoin määrittää implantin hajoamisnopeus ja vaikuttaa sen mekaanisiin ominaisuuksiin. Esimerkiksi PGA:n ja PLLA:n mekaanisia ominaisuuksia voidaan parantaa lisäämällä trimetyleenikarbonaattia (TMC) joko polymeeriketjun runkosaan tai sekoittamalla materiaaliin TMC:a sisältävää kopolymeeriä (Nieminen ym., 2006).

1.5. Biopolymeerien hajoaminen elimistössä

Polymeerien hajoaminen ja pilkkoutuminen tapahtuu yleensä pääketjun tai sivuketjujen katkeamisen seurauksena, jonka voi biologisessa ympäristössä aiheuttaa lämpöaktivaatio, hapettuminen, fotolyysi, säteily tai hydrolyysi. Suurin osa implanteissa käytettävistä biopolymeereistä hajoavat hydrolyysin välityksellä joko entsymaattisesti tai ei-entsymaattisesti (ks. yleiskatsaus Ikada ja Tsuji, 1999). Polymeeriketjun pilkkoutumista elimistössä pienemmiksi osiksi kutsutaan biohajoamiseksi tai bioeroosioksi. Biopolymeerin hajoamiseen vaikuttavat monet tekijät kuten materiaali, hajoamismekanismi, molekyylipaino, lasiiritymlämpötila, valmistusprosessi, sterilointimenetelmä, materiaalin sisältämät epäpuhtaudet ja lisäaineet, implantin muoto sekä paikka elimistössä. Implantin amorfiset osat hajoavat nopeammin kuin kiteiset osat, joten hajoamisprosessin aikana implantin suhteellinen kiteisyys kasvaa. Implantin kiteisyys riippuu myös siitä, mitä polymeerimateriaalia käytetään. Kiteisyys vaikuttaa myös implantin kudosityhteensopivuuteen (ks. yleiskatsaus Peltoniemi ym., 2002; ks. yleiskatsaus Ambrose ja Clanton, 2004). Polymeerin molekyylipaino on myös ratkaiseva tekijä implantin hajoamisnopeudessa. Mitä suurempi molekyylipaino on, sitä hitaammin polymeeri hajoaa, koska polymeeriketjujen välillä on enemmän sidoksia (ks. yleiskatsaus Wuisman ja Smit, 2006).

Polymeerien hajoaminen tapahtuu yleensä kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa polymeeriketju katkeaa hydrolyysin seurauksena. Tähän vaikuttaa polymeerin alkuperäinen molekyylipaino, pinta-alan ja painon suhde, geometrinen isomeria, konformaatio ja kiteisyys (Ashammakhi ja Rokkanen, 1997). Tässä vaiheessa amorfisissa polymeereissä vesi läpäisee koko polymeerin rakenteen ja katkoo molekyyliketjuja lyhyemmiksi fragmenteiksi. Tämä laskee vähitellen polymeerin molekyylipainoa. Kun molekyylipaino on laskenut riittävästi polymeeriketjut alkavat liikkua toisiinsa nähden ja implantin mekaaninen kestävyys laskee ja se alkaa vähitellen kadottaa massaansa. Kuitenkin implantin massa laskee vasta, kun polymeeriketjut ovat riittävästi lyhentyneet eli vesi läpäissyt monomeeri- ja oligomeerirakenteet (Nieminen ym., 2007b). Toisessa vaiheessa implantti menettää muotonsa ja hajoaa kappaleiksi. Tämän jälkeen hajoamistuotteet poistuvat elimistöstä tavallisten metaboliareittien kautta (kuva 2). Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että biohajoavan implantin hajotessa pienemmiksi partikkeleiksi, makrofagit ja jättilisolut fagosytoivat kappaleet, ja voivat näin laukaista tulehdusreaktion elimistössä (Gunatillake ja Adhikari, 2003).



Kuva 2. Polyglykolidin ja polylaktidin hajoaminen (kuva muokattu yleiskatsauksen Maurus ja Kaeding, 2004, pohjalta).

1.6. Kudosyhteensopivuus eli biokompatibiliteetti

Kudosyhteensopivuus on välttämätön materiaaleille, joita käytetään lääketieteellisiin tarkoituksiin *in vivo*. Biokompatibiliteetilla tarkoitetaan sitä, että materiaali ei saa olla immunogeeninen, sytotoksinen, mutageeninen, karsinogeeninen ja teratogeeninen (Mikos ja Temenoff, 2000; Rezwani ym., 2006). Monet eläinkokeet ja *in vitro*-tutkimukset ovat osoittaneet synteettisten biohajoavien polymeerien kuten PGA:n, PLA:n ja sen isomeerien omaavan hyvän biokompatibiliteetin (Ignatius ja Claes, 1996). Kuitenkin materiaalien, joilla on yleensä hyvä biokompatibiliteetti, tiedetään aiheuttavan toisinaan myös ei-toivottuja reaktioita kudoksissa (ks. yleiskatsaus Böstman ja Pihlajamäki, 2000).

Implanttimateriaalin biokompatibiliteetin arviointi vaatii tulehdusvasteen ja kudoksen paranemisprosessin ymmärtämistä. Isäntäkudoksen reaktioihin implanttimateriaalia kohtaan kuuluvat akuutin tai kroonisen tulehdusvasteen syntyminen, vierasesinereaktio, fibroosi ja fibroosikapselin muodostuminen. Tutkittaessa biomateriaalien biokompatibiliteettia pehmytkudoksessa keskeisiä huomioonotettavia tapahtumia isäntäkudoksessa ovat proteiinien adsorptio, komplementtijärjestelmän aktivoituminen, makrofagien sekä

leukosyyttien adheesio ja aktivoituminen. Isäntäkudoksen vaste implantoidulle materiaalille alkaa implantoinnin jälkeen ja vaihtelee riippuen kudoksen, elin- ja lajityypistä. Syntyvään reaktiovasteeseen isäntäkudoksessa vaikuttavat myös biomateriaalin mekaaniset ja kemialliset ominaisuudet, implantin paikka, koko ja muoto sekä hajoamisnopeus. Isäntäkudoksessa tulehdusvaste etenee perättäisinä paikallisina tapahtumina, joita yleisesti kutsutaan tulehdusvasteen jatkumoksi (ks. yleiskatsaus Anderson ja Shive, 1997). Tulehdusvaste saa alkunsa implantoinnin aiheuttamasta vauriosta kudoksessa, jota seuraa akuutti tulehdusreaktio, joka kroonistuu muutamassa viikossa. Tämän jälkeen alkaa sidekudoksen uudismuodostus eli granulaatiokudoksen muodostuminen, joka saattaa johtaa vierasesinereaktioon ja edelleen fibroosikapselin syntyyn.

Tässä työssä käsitellään vain niiden biomateriaalien biokompatibiliteettiä, joista tutkimuksessa käytetyt implantit on valmistettu. Nämä biomateriaalit ovat PGA, PLA ja sen isomeerit sekä PEEK.

1.6.1. PGA:n biokompatibiliteetti

Sekä *in vitro*- että *in vivo*-tutkimukset ovat osoittaneet PGA:n melko hyvän kudosityhteensopivuuden. Toisaalta useissa tutkimuksissa on myös dokumentoitu komplikaatioita (Weiler ym., 1996). Korkeasta kiteisyydestään huolimatta hydrofiilinen PGA hajoaa elimistössä hyvin nopeasti ja menettää kestävyytensä noin kuudessa viikossa ja kaiken massansa 3-12 kuukauden kuluessa implantoinnista (Nieminen ym., 2007b). PGA:n nopean hajoamisen aikana vapautuu suuria määriä glykolihappomonomeerejä, jotka voivat paikallisesti laskea kudoksen pH:ta. Kudoksen pH:n laskeminen voi johtaa osteolyysiin, jossa osteoklastit aktivoituvat hävittämään luukudosta implantin ympäriltä aikaansaaden näin kliinisen häiriön (ks. yleiskatsaus Wuisman ja Smit, 2006). PGA:n hajoaminen voidaan histologisesti havaita kudoksessa ilmenevästä vierasesinereaktiosta sekä implanttiontelon osteolyytisistä laajenemisista (Böstman ym., 1992). Vierasesinereaktio on kroonisen tulehdusreaktion muoto, jossa makrofagit ja jättisolut fagosytoivat implantin hajoamispartikkeleita (Anderson, 2004). Kudoksen reaktioita esiintyy noin 40 %:ssa tapauksista, joissa on käytetty pelkästä PGA:sta valmistettua implanttia (Prokop ym., 2004).

1.6.2. PLA:n ja sen isomeerien biokompatibiliteetti

PLA:a on käytetty lääketieteellisissä sovelluksissa, kuten ommelangoissa, haavojensulkuhakasissa sekä kontrolloidussa lääkeaineiden luovutuksessa jo yli neljän vuosikymmenen ajan. Jo PLA:n käytön alkuvaiheissa sen kuitenkin huomattiin aiheuttavan implantointialueella turvotusta ja vierasesinereaktiota (Törmälä, 2003; Laine ym., 2004). Yleisesti on todettu, että PLA ja sen isomeerit eivät ole solutoksisia, joskin vähäistä solujen proliferaation heikkenemistä on havaittu *in vitro*-kokeissa (Ignatius ja Claes, 1996). Vähäistä vierasesinereaktiota on todettu implantin ympärillä (ks. yleiskatsaus Wuisman ja Smit, 2006; Laitinen ym., 1993). Kiteisen PLLA-isomeerin täydellinen hajoaminen voi kestää useita vuosia, ja hajoamisen seurauksena elimistöön vapautuu pieniä partikkeleita, jotka voivat laukaista paikallisen tulehdusreaktion (Gunatillake ja Adhikari, 2003). Nykyisin monet biohajoavat implantit valmistetaan yhdistämällä PDLA:ta tai PGA:ta PLA:n kanssa. Tällä vähennetään materiaalin kiteisyyttä, jonka arvellaan olevan yksi syy kudosreaktioihin, koska kiteinen materiaali hajoaa paljon hitaammin kuin amorfinen (Laine ym., 2004). Vähäisen kiteisyyden ja tasaisen hajoamisen ansiosta PLA-kopolymeerien ja -yhdistelmien biokompatibiliteetti on hyvä ja merkittävät kudoskomplikaatiot ovat erittäin harvinaisia (Suuronen ym., 1999; Laine ym., 2004).

1.6.3. PEEK:n biokompatibiliteetti

PEEK tunnetaan erityisen hyvästä biokompatibiliteetista: tutkimustulokset ovat osoittaneet vain vähäisiä kudosreaktioita (Wenz ym., 1990). Sytotoksisuus- ja mutageenisuustestit *in vitro* ovat myös osoittaneet PEEK:n olevan hyvä ja stabiili biopolymeeri käytettäväksi lääketieteellisissä sovelluksissa, esimerkiksi hammaslääketieteessä sekä pitkäaikaista implantin läsnäoloa vaativissa luun korjauksissa kuten lonkkaproteesissa (Katzner ym., 2002).

1.7. Kudonsvaurio pehmytkudoksessa

Korjausmekanismit käynnistyvät yleensä hyvin nopeasti kudokseen kohdistuneen vaurion jälkeen. Paranemisprosessi pitää sisällään monimutkaisen perättäisten vaiheiden sarjan

alkaen verisolujen purkautumisesta kudokseen (ekstravasaatio), ja johtaen siten leukosyyttien lisääntymiseen ja granulaatiokudoksen muodostumiseen (ks. yleiskatsaus Meneghin ja Hogaboam, 2007; Mutsaers ym., 1997). Ekstravasaatio johtaa hemostaasiin, jossa verihiutaleet ryhmittyvät muodostaen hyytymiä. Vauriokohdan ympärillä olevat verisuonet supistuvat ja vähentävät näin verenvuodon määrää. Hyytymiskaskadin seurauksena trombiini katkaisee fibrinogeenin fibriiniksi ja muodostaa tulpan, joka fibronektiinin kanssa pitää vaurioitunutta kudosta koossa sekä toimii väliaikaisena alustana tulehdussoluille ja myöhemmin myös fibroblasteille ja muille paikallisille soluille (Mutsaers ym., 1997). Kudosreaktion käynnistymisen johdosta valkosolut tarttuvat kiinni verisuonten seinämiin, läpäisevät endoteelin ja vapautuvat kudokseen ja kudosvauriopaikalle. Akuutin reaktion seurauksena makrofagit aktivoituvat ja vapauttavat kudokseen sytokiinejä, kasvutekijöitä, proteolyttisiä entsyymejä sekä reaktiivisia happi- ja typpiyhdisteitä (Babensee ym., 1998; Mutsaers ym., 1997).

Kudosvaurion seurauksena solut yleensä mukautuvat erityyppiseen kasvuun ja erilaistumiseen. Tärkeimpiä solujen mukautumismekanismia ovat atrofia (surkastuminen, jossa solujen koko pienenee), hypertrofia (solukoko kasvaa), hyperplasia (solujen lukumäärä kasvaa) sekä metaplasia (solutyypin vaihtuu). Solujen fenotyyppi voi myös muuttua, esimerkiksi solu saattaa alkaa tuottaa proteiinia, jota se ei normaalisti tee. Solu voi myös aloittaa jonkin proteiinin huomattavan ylituotannon. Kroonisessa tulehduksessa ja fibroosissa solut tuottavat suuria määriä erityyppisiä kollageeneja ja soluväliaineen proteiineja (Anderson, 2004).

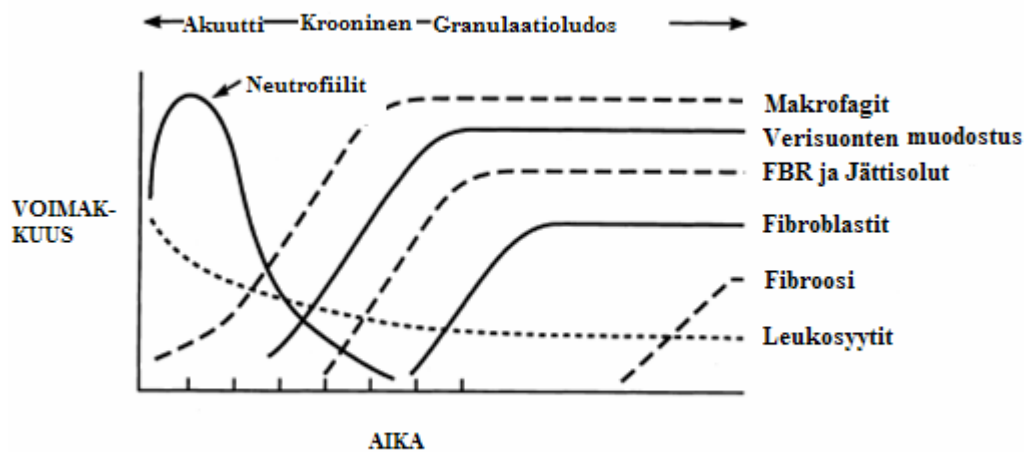
1.7.1. Tulehdusreaktio pehmytkudoksessa

Tulehdus on yleisesti määriteltynä kudoksen reaktio paikallista vauriota vastaan, ja se myös aloittaa kudoksen korjaus- ja paranemisprosessin. Tulehdusvaste on perättäisten tapahtumien jatkumo, joka voidaan jakaa akuuttiin ja krooniseen vaiheeseen sekä arpeutumiseen. Vauriokohtaa hallitseva solutyypin vaihtelee riippuen tulehduksen vaiheesta. Akuutissa tulehduksessa vauriopaikalle kerääntyvät ensimmäisenä neutrofiilit (polymorfonukleaariset neutrofiilit, PMN). Ne kulkeutuvat vaurioalueelle kemotaktisen signaalin ohjaamina, pyrkivät fagosytoimaan ja hajottavat elimistölle vieraan materiaalin muutaman päivän sisällä

vaurion syntymisestä. Seuraavana tulehduspaikalle hakeutuvat monosyytit, jotka erilaistuvat makrofageiksi. Makrofagit fagosytoivat hajonneita neutrofiileja sekä vierasmateriaalia. Pitkäikäiset makrofagit säilyvät elimistössä viikoista kuukausiin. Tulehduksen kroonisessa vaiheessa makrofagit tuottavat ja erittävät neutraaleja proteaaseja, kemotaktisia tekijöitä, arakidonihapon metaboliitteja, reaktiivisia happi- ja typpi metaboliitteja, komplementtijärjestelmän komponentteja, koagulaatiotekijöitä sekä muita kasvutekijöitä ja sytokiinejä.

Tulehduksen kroonistuessa neutrofiilien määrä vähenee ja tulehduspaikalle ilmestyy lymfosyyttejä, plasmasoluja sekä vierasesinereaktion merkinä jättisoluja. Elimistön immuunireaktiossa T- ja B-lymfosyytit ovat keskeisiä soluja. B-solut tuottavat vasta-aineita ja käynnistävät humoraalisen (vasta-ainevälitteisen) immuunipuolustuksen. T-solut huolehtivat soluvälitteisestä immuunipuolustuksesta mm. aktivoimalla muita lymfosyyttejä ja makrofageja (Anderson, 2004).

Paranevasta kudosisauriosta merkinä on yleensä granulaatiokudoksen syntyminen. Granulaatiokudos on uudiskudosta, jota syntyy tulehduksen kroonisessa vaiheessa, kun sidekudossolut, fibroblastit, siirtyvät vaurioalueelle ja alkavat tuottaa soluväliaineen rakenneosia kuten kollageeneja. Granulaatiokudos sisältää runsaasti lymfosyyttejä ja fibroblasteja. Myös verisuonten määrä on yleensä lisääntynyt, koska uudistuva kudos tarvitsee happea ja ravintoa. Jakautuvat fibroblastit tuottavat runsaasti proteoglykaaneja ja kollageeneja, erityisesti tyypin III ja I kollageenia, joka tulehdusreaktion loppuvaiheessa on vallitsevana sidekudosproteiinina paranevassa kudoksessa muodostaessaan fibroottista kudosta eli arpikudosta. Granulaatiokudoksen vanhetessa fibroblastit kypsyvät fibrosyyteiksi, johtaan tiiviin sidekudoksen muodostumiseen eli fibroosiin. Fibroosissa kudokseen kertyy liiallisesti soluväliaineen komponentteja. Tämä johtaa normaalin kudoksen toimintahäiriöön (Mutsaers ym., 1997) (kuva 3).



Kuva 3. Tulehdusvasteen jatkumo kudoksessa implantaation jälkeen. FBR = foreign body reaction (kuvaava muokattu yleiskatsauksen Anderson ja Shive, 1997, pohjalta).

1.7.2 Implantin aiheuttama kudoksetti

Useimmissa lääketieteellisissä sovelluksissa implantit ovat pitkään suorassa kontaktissa solujen ja kudoksen kanssa. Elimistöön laitettu vieras esine aiheuttaa väistämättä jonkin asteisen kudoksetti, joka johtuu yleensä biomateriaalista irtoavista partikkeleista. Implantit aiheuttavat harvoin immuunivasteen heräämisen, mutta joissakin tapauksissa biomateriaalin epäpuhtaudet saattavat immuunireaktionkin laukaista (Törmälä, 2003). Kudoksettiä yritetään minimoida käyttämällä sellaista materiaalia, jonka biokompatibiliteetti on mahdollisimman hyvä.

Elimistöön asetettu implantti aiheuttaa kudokseen paikallisen vaurion, johon elimistö reagoi tulehdusvasteella. Tulehdus laukaistaa prosessin, jonka tarkoituksena on parantaa ja korjata normaalia kudosta. Tämän korjausvaiheen aikana vaurioitunut kudos korvataan alkuperäisillä parenkyymisoluluilla tai fibroblastisella arpikudoksella tai molemmilla. Lopputulos riippuu ensisijaisesti kudostyyppistä sekä vaurion laajuudesta (Schoen ja Mitchell, 2004).

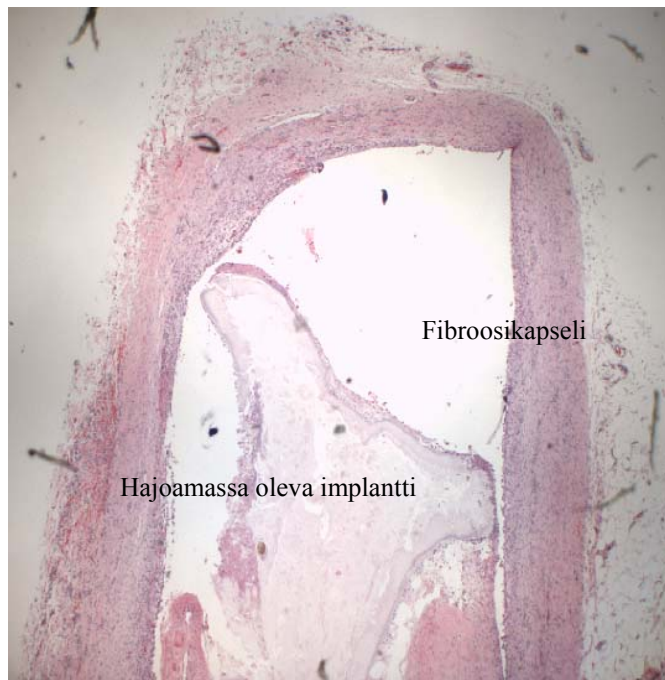
1.7.3. Fibroosikapselin muodostuminen implantin ympärille

Implantoidulle biomateriaalille fibroosi tai fibroottinen kapseloituminen on kudoksen paranemisprosessin viimeinen vaste. Aina ei kuitenkaan tapahdu fibroosikapselin muodostumista, etenkin, jos implanttina on parenkyymisoluja sisältävä huokoinen materiaali tai luuhun implantoitu huokoinen materiaali. Näin ollen implantoidun paikan kudostuokselle on olemassa kaksi erilaista mekanismia: regeneraatio, jossa vaurioitunut kudos korvautuu samantyyppin parenkyymisoluilla, tai korvautuminen sidekudoksella, jolloin fibroosikapseli muodostuu. Näitä mekanismeja säätelee ja niihin vaikuttavat joko implantoidun kudoksen solujen jakautumiskapasiteetti sekä vaurion laajuus tai implanttipaikan ympärillä olevan kudoksen rakennekehikon periksiantamattomuus.

Eri soluilla on erilainen regeneraatiokapasiteetti, joten solut voidaan jakaa tämän perusteella labiileihin, stabiileihin (tai laajeneviin) ja pysyviin (tai muuttumattomiin) soluihin. Labiilit solut jakautuvat läpi elämänsä, stabiilit solut säilyttävät jakautumiskykynsä, mutta normaalisti eivät jakaudu. Pysyvät solut eivät jakaudu syntymänsä jälkeen. Vaurion jälkeen kudoksen normaalirakenne voi palautua teoreettisesti täydellisesti vain labiilien ja stabiilien solujen muodostamissa kudoksissa, kun taas pysyvien solujen muodostamissa kudoksissa (esimerkiksi hermosolut ja sydänlihassolut) vauriopaikka korvautuu sidekudoksella, ja johtaa fibroosiin ja fibroosikapselin muodostumiseen. Labiilien (esimerkiksi epiteelisolut, hematopoieettiset solut ja imukudossolut) ja stabiilien (esimerkiksi maksan, munuaisen ja haiman parenkyymisolut, mesenkymaalisolut kuten fibroblastit) solujen korjausmekanismi voi myös johtaa fibroosiin ja fibroosikapselin muodostukseen, mutta myös regeneraatioon uusilla samantyyppin soluilla palauttaen kudoksen normaalin rakenteen ja toiminnan (Anderson, 2004).

Myös vauriokohdan ympärillä olevan kudoksen rakennekehikon kestävyydellä ja tukikudosverkon kunnolla on merkitystä normaalikudoksen rakenteen palauttamisprosessissa. Jos vauriokohdan ympärillä oleva kudos säilyttää vahvan rakennekehikkonsa, kudoksen normaalin rakenteen palauttaminen on helpompaa. Jos taas kudoksen rakennekehikko tuhoutuu ja antaa periksi, se johtaa yleensä fibroosiin (Anderson, 2004).

Implantin ympärillä fibroosikapseli on suhteellisen soluton, sidekudoksesta muodostunut kerrostuma. Se sisältää sukkulanmuotoisia fibroblasteja, joitakin makrofageja, neutrofiilejä lymfosyyttejä sekä jättisoluja. Implantin ja pehmytkudoksen välissä olevan fibroosikapselin muodostuminen voi johtaa epävakaaseen, mekaaniseen implantin ja kudoksen yhdistämiseen ja voi aiheuttaa paikalliseen stressireaktioon ja implantin vioittumiseen (Sanders ja Rochefort, 2003). Fibroosikapselin tiiviissä järjestäytyneessä sidekudoksessa on vain niukasti verisuonia, sillä isäntäkudos mieltää implantin vieraaksi elimistölle ja yrittää eristää sen muusta kudoksesta heikentämällä sen veren ja ravintoaineiden saantia (Anderson, 2004). Fibroosikapselin paksuus implantin ympärillä riippuu implantista irtoavista partikkeleista, liikkeestä implantin ja kudoksen välillä, implantin muodosta ja koosta sekä implantin pinnan ominaisuuksista (Li ym., 1999; Sanders ja Rochefort, 2003) (kuva 4).



Kuva 4. Fibroosikapseli implantin ympärillä (HE-värjäys).

1.7.4. Angiogeneesi kudovauriossa

Tulehduksen kroonisessa vaiheessa muodostunut granulaatiokudos tarvitsee verisuonia saadakseen riittävästi ravintoaineita. Uusien verisuonten muodostumista kutsutaan neovaskularisaatioksi tai angiogeneesiksi. Kyseessä on monimutkainen prosessi, joka on

riippuvainen soluväliaineesta ja endoteelisolujen vaelluksesta vauriopaikalle sekä niiden mitogeenisistä ärsykeistä (ks. yleiskatsaus Singer ja Clark, 1999). Angiogeneesin käynnistymistä pidettiin alun perin happamen tai emäksisen fibroblasti-kasvutekijän a/bFGF:n (acidic/basic fibroblast growth factor) aiheuttamana. Myöhemmin on todettu myös monilla muilla tekijöillä olevan angiogeenisiä ominaisuuksia, kuten esimerkiksi VEGF-kasvutekijällä (vascular endothelial growth factor), TGF-kasvutekijällä (transforming growth factor), angiogeeniinillä, angiotropiinilla, angiopoietiini 1:llä ja trombospondiinilla. Nämä proteiinit indusoivat angiogeneesiä stimuloimalla makrofageja, endoteelisoluja sekä epidermaalisoluja tuottamaan VEGF- ja bFGF-kasvutekijöitä. Myös matalan happipaineen ja kohonneen maitohappopitoisuuden tiedetään stimuloivan angiogeneesin käynnistymistä (ks. yleiskatsaus Singer ja Clark, 1999).

Välittömästi kudoksen vaurion tapahduttua makrofagit stimuloituvat tuottamaan angiogeneesin kasvutekijöitä, kuten a/b-FGF-kasvutekijää, ja kudoksen happivajeen seurauksena endoteelisolut aktivoituvat tuottamaan VEGF-kasvutekijää. Myös proteolyttisiä entsyymejä vapautetaan hajottamaan sidekudoksen soluväliaineen proteiineja. Proteiinien hajoamiskappaleet houkuttelevat ääreisverenkierron monosyyttejä vauriopaikalle, missä ne aktivoituvat makrofagiksi ja alkavat tuottaa angiogeneesin kasvutekijöitä. Plasminogeenin aktivaattori ja prokollagenaasi ovat myös endoteelisolujen tuottamia proteiineja, jotka muutetaan plasmiiniksi ja kollagenaasiksi. Kollagenaasi hajottaa tyvikalvoa, joka erottaa epiteelin sidekudoksesta (ks. yleiskatsaus Singer ja Clark, 1999). Tyvikalvon hajoamisen seurauksena endoteelisolut pääsevät tunkeutumaan paikalle ja jakautumaan soluväliaineessa. Angiogeneesin viimeisessä vaiheessa lisääntyneet endoteelisolut järjestäytyvät muodostamaan uuden kapillaarin ja lopuksi verisuonten välisen yhdysaukkojen verkoston (Hiromatsu ja Toda, 2003).

Faktori VIII on useiden kudosten endoteelisolujen, mutta erityisesti maksan hepatosyyttien tuottama glykoproteiini, joka sitoutuu verenkierrossa kantajaproteiini von Willebrand tekijään, muodostaen tiiviin kompleksin (ks. yleiskatsaus Lenting ym., 1998). Faktori VIII on tärkeä veren hyytymistekijä ja sen puutos tai vaje johtaa verenvuototaudin eli hemofilia A:n syntymiseen. Faktori VIII:a käytetään laajasti immunohistokemiallisissa värjäyksissä vasta-aineena tunnistamaan endoteelisolut. Tämän vuoksi se sopii käytettäväksi tutkittaessa myös uusien verisuonten muodostumista (Ribatti ym., 1999).

1.7.5. Solujen proliferaatio kudonvauriossa

Kudoksen paranemisprosessi sisältää monimutkaisen sekä paikallisesti että ajallisesti tarkoin säädellyn biokemiallisen ja soluvälitteisen tapahtumasarjan, jonka tarkoituksena on palauttaa kudoksen normaalirakenne ja toiminta ennalleen. Kudonvaurion korjaus etenee normaalisti hyytymän muodostumisesta tulehdusreaktion syntyyn, granulaatiokudoksen ja uusien verisuonten muodostumiseen ja lopulta alkuperäiskudoksen uudelleen muodostumiseen tai fibroosiin. Tämä vaiheikas tapahtumaketju voi vähentää tai useimmiten lisätä solujen toimintaa kuten vaeltamista vauriopaikalle, jakautumista ja lisääntymistä, proteiinituotantoa jne. (Scharffetter-Kochanek ym., 1998). Kudokseen kohdistuneen vaurion seurauksena tapahtuu monien solutyypin proliferaatiota eli solujakautumista. Tulehdusreaktion seurauksena lisääntyvät leukosyytit, makrofagit ja lymfosyytit. Kudonvaurion paikkaamiseksi sekä uuden epiteelikudoksen ja verisuonten muodostamiseksi epiteelisolut jakautuvat voimakkaasti. Granulaatiokudoksen muodostuessa fibroblastit lisääntyvät ja aktivoituvat tuottamaan suuria määriä sidekudoksen soluväliaineen proteiineja. Solujen jakautumisen astetta voidaan tutkia koko solusyklin aikana solujen lisääntymis- eli proliferaatiomarkkerin avulla. Yksi käytetyimmistä solujen jakautumisasteen mittareista on proteiinin Ki-67 ekspresion mittaaminen kudonleikkeistä Ki-67 -vasta-aineen avulla, esimerkiksi immunohistokemiallista menetelmää käyttäen.

Ki-67 on suuri 395 kDa:n kokoinen tumaan eritettävä proteiini, joka on välttämätön proteiini solun jakautumisessa (ks. yleiskatsaus Brown ja Gatter, 2002). Ki-67 proteiinia esiintyy tumassa solusyklin jokaisessa aktiivisessa vaiheessa: G₁-, S-, G₂-vaiheessa ja mitoosissa. Erityisesti mitoosin interfaasivaiheessa, Ki-67-proteiinia lokalisoituu runsaasti kromosomien pinnalle. Solujen levovaiheessa, G₀:ssa, sitä ei ekspresoida (Scholzen ja Gerdes, 2000). Runsasta Ki-67 proteiinin ekspresoitumista solujen jakautumisen aikana on hyödynnetty monien tautitilojen, kuten syöpätautien, tutkimuksissa, diagnostiikassa sekä ennusteen arvioinnissa. Eräs käytetyimmistä ja tunnetuimmista Ki-67-proteiinin vasta-aineista on vasta-ainekloonin MIB-1, jonka käyttö vasta-aineisiin perustuvissa menetelmissä on erittäin runsasta (ks. yleiskatsaus Brown ja Gatter, 2002).

2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Biohajoavia pehmytkudos- ja luuimplantteja koskevat tutkimukset ovat keskittyneet biomateriaalin ja kudoksen yhteensopivuuden tarkasteluun ja implantin hajoamisnopeuden sekä mekaanisten ominaisuuksien testaamiseen. Eri biomateriaalien biokompatibiliteettitutkimus on suuntautunut tulehdusvasteen ja muiden isäntäkudoksen reaktioiden tutkimiseen, ei-tulehduksellisten reaktioiden tutkimisen jäädessä vähemmälle mielenkiinnolle. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli 1) analysoida fibroosikapselin muodostumista eri implanttimateriaaleissa ja -tyypeissä sekä eri implantointipaikoissa. Lisäksi tarkoituksena oli 2) selvittää implantoidussa kudoksessa esiintyviä ei-tulehduksellisia reaktioita, kuten verisuonten uudismuodostusta ja proliferoivien solujen tyyppiä sekä niiden yhteyttä tulehdusreaktioihin. Tutkimuksen tarkoituksena oli myös 3) selvittää, kuinka immunohistokemiallinen menetelmä soveltuu kudoksetutkimiseen.

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1. Tutkimuksessa käytetty materiaali

Tutkimuksessa käytetty aineisto pohjautui Inion Oy:n teettämään tutkimukseen, jossa seurattiin sekä biohajoavien että biostabiilien polymeeripohjaisten kiinnitysvälineiden ominaisuuksia ja kudokset reaktioita lampaissa (Nieminen ym., 2006, 2007a, 2007b). Inion Oy on tampereläinen yritys, joka kehittää, valmistaa, markkinoi ja myy biohajoavia implantteja. Lampaisiin implantoitu materiaali sisälsi Inion CPS[®]-tuoteperheen biohajoavia ruuveja (kuva 5) ja levyjä (kuva 6) 56 kappaletta sekä ei-biohajoavia PEEK-levyjä 24 kappaletta. Inionin CPS[®]-tuoteperhe on elimistössä hajoava, pääosiltaan amorfisten jäykkien ja elastisten polymeerien sekoitus, ja se koostuu eri pitoisuuksista PLLA-, PDLLA-, PGA- sekä TMC-polymeereistä (Nieminen ym., 2006). Jokaisen lampaan selän ihonalaiskudokseen implantoitu Inion CPS[®]-materiaali sisälsi kooltaan 2,8 mm x 18 mm ja 2,5 mm x 8 mm olevat ruuvit. Kunkin lampaan selän ihonalaiskudokseen implantoituista Inion CPS[®]-levyistä toinen oli paksuudeltaan 1,7 mm ja sisälsi 6 reikää ja toinen oli 1,3 mm paksu sisältäen 10 reikää. Kaikien lampaiden kahdesta leukaluuhun implantoituista Inion CPS[®]-levyistä toinen oli 6-reikäinen ja paksuudeltaan 1,7 mm levy ja toinen oli 4-reikäinen ja 1,3 mm paksuinen. Jokaisen lampaan kontrollinäyte oli otettu leukaluussa sijaitsevasta implantin takana olevasta pehmytkudoksesta.



Kuva 5. Inion CPS[®]-tuoteperheen ruuveja.
(Kuva Inion CPS[®]-tuoteperheen esite, sivu 7.)



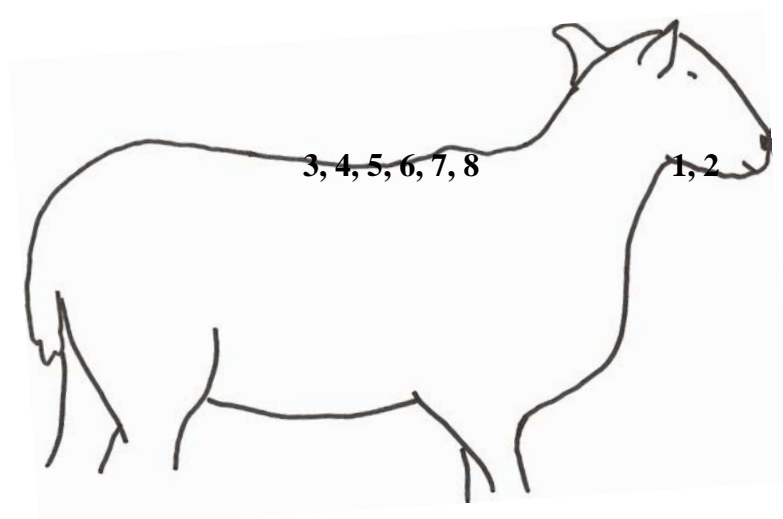
Kuva 6. Inion CPS[®]-tuoteperheen 6-reikäinen levy.
(Kuva Inion CPS[®]-tuoteperheen esite, sivu 5.)

Tutkimuksessa käytetyt PEEK-implantit olivat Inion Oy:n kokeellisia tuotteita, joiden raaka-aineena oli PEEK-OPTIMA[®] LT3 (Invibio Ltd, Lancashire, United Kingdom). Jokaiseen lampaaseen implantoitu materiaali sisälsi yhden amorfisen sekä yhden kiteisen PEEK-levyn, jotka oli otettu näytteiksi lampaiden selän ihonalaiskudoksesta. Molemmat PEEK-levytyypit olivat kooltaan 37 mm x 7 mm x 1,3 mm ja sisälsivät 6 reikää.

Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat formaliinifiksoituja parafiiniin valettuja lampaan kudoksenäytteitä sekä hematoksyliini-eosiini (HE) -värjättyjä kudoksenleikkeitä. Kudoksenäytteiden histologisen prosessoinnin sekä parafiininäytteiden HE-värjäykset suoritti Marja-Leena Koskinen Tampereen yliopiston lääketieteen laitokselta. Näytteet oli otettu ja valmistettu aiemman tutkimuksen yhteydessä (Nieminen ym., 2006, 2007a, 2007b). Kudoksenäytteet olivat kahdentoista täysikasvuisen naaraspuolisen Suomen maatiaislampaan leukaluusta sekä selän puoleisesta ihonalaiskudoksesta (kuva 7). Näytteet olivat kolmen vuoden seurantajakson ajalta, 6 viikkoa, 3, 6, 12, 24 sekä 36 kuukautta implantaation jälkeen. Kullakin seurantahetkellä tutkittiin kaksi lammasta, joista jokaisesta oli otettu implantin sisältävä näyte kahdeksasta eri kohdasta (taulukko 1), sekä kontrollinäyte, joka ei ollut implantointikohdalta. 6 viikon, 3, 6 ja 12 kuukauden jälkeen implantoinnista otetut kahdeksan lampaan näytteet sisälsivät 64 implanttinäytettä ja 8 kontrollinäytettä. Näytteet, jotka oli otettu 24 ja 36 kuukauden jälkeen implantoinnista, sisälsivät neljän lampaan 16 implanttinäytettä ja 4 kontrollinäytettä. Näiden neljän lampaan näytteet oli otettu vain neljästä eri kohdasta, sillä osaa lampaisiin istutetuista implanteista ei ollut enää löydettävissä. Tutkimusmateriaali koostui siis kahdentoista lampaan yhteensä 80 implanttiparafiininäytteestä ja 12 kontrollinäytteestä sekä kaikkien näytteiden HE-värjätystä laseista.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytettyjen implanttien (1.-8.) tyypit, koot ja implantointipaikat/ lammas.

LAMMAS	<u>SELKÄ</u>	<u>LEUKA</u>
<u>RUUVI</u>	7. 1,7 mm x 18 mm	
<u>RUUVI</u>	8. 1,7 mm x 8 mm	
<u>LEVY</u>	5. 1,7 mm, 6 reikää	1. 1,7 mm, 6 reikää
<u>LEVY</u>	6. 1,3 mm, 10 reikää	2. 1,3mm, 4 reikää
<u>PEEK Amorfinen</u> <u>LEVY</u>	4. 37 mm x 7 mm x 1,3 mm, 6 reikää	
<u>PEEK Kiteinen</u> <u>LEVY</u>	3. 37 mm x 7 mm x 1,3 mm, 6 reikää	



Kuva 7. Lampaaseen sijoitettujen implanttien paikat. (Ks. yllä oleva taulukko implanttien numeroinnista).

3.1.1. Aikaisemmin saadut tulokset

Materiaalina tilastoanalyysissä hyödynnettiin tätä työtä edeltäneessä tutkimuksessa saatuja kudosten histologisten reaktioiden analysointituloksia. HE-värjäyksistä tehdyn tulehdusparametrien analysoinnin oli suorittanut patologi Risto Aine Pirkanmaan sairaanhoitopiirin Laboratoriokeskuksen patologian vastuualueelta. HE-värjäyksistä

määritetyt kudokset olivat tulehduksen aste, vierasesinereaktio, makrofagit, jättisolut, polymorfonukleaariset neutrofiilit (PMN) sekä eosinofiilit. Näiden kudokset arviointiin oli käytetty seuraavaa luokitusta: 0 = ei reaktiota, 1 = vähäinen reaktio, 2 = kohtalainen reaktio, 3 = merkittävä reaktio.

3.2. Tutkimuksessa käytetyt menetelmät

3.2.1. Kudokset näytteiden histologinen prosessointi

Lampaiden kudokset näytteiden histologinen prosessointi suoritettiin tätä tutkimusta edeltäneessä biohajoavia implantteja käsittäneessä tutkimuksessa (Nieminen ym., 2006, 2007a, 2007b). Lampaista otetut kudokset näytteet fiksoitiin 4 % fosfaattipuskuroidussa formaliinissa 1-3 vuorokautta (pH 7,4), jonka jälkeen näytteet valettiin parafiiniblokeiksi. Parafiininäytteistä leikattiin 5µm paksuisia leikkeitä, joille tehtiin HE-värijäys.

3.2.2. Fibroosikapselin paksuuden mittaaminen

Implanttien ympärille muodostuneen fibroosikapselin paksuuden mittaamiseen käytettiin HE-värijätyä kudokset näytteitä. Fibroosikapselin paksuus mitattiin käyttäen valomikroskooppia (GWB Olympus BH2) ja okulaarissa olevaa mittajanaa. Mittajanan asteikko kalibroitiin mittaauksessa käytetylle 10x-suurennokselle käyttäen objektimikrometriä, jossa millimetri oli jaettu 0,01 mm osiin. Fibroosikapselin hajoaminen alkoi osassa näytteistä 12 kuukauden kuluttua implantoinnista, ja tämän vuoksi kapselin paksuus voitiin mitata vain 65 näytteestä. Näytteiden fibroosikapselin vahvuus mitattiin kolmesta paksuimmasta sekä kolmesta ohuimmasta kohdasta, joista laskettiin otosten keskiarvot.

3.2.3. Immunohistokemiallinen värjäys

Solujen proliferaatioaktiivisuuden määrittämiseksi sekä verisuonten muodostumisen tutkimiseksi hyödynnettiin immunohistokemiallista värjäysmenetelmää. Värjäykseen otettiin näytteet, jotka oli otettu 6 viikon, 3, 6 ja 12 kuukauden seurantajaksoissa. Yli 12 kuukauden jälkeen implantoinnista otetuista näytteistä ei suoritettu immunohistokemiallisia värjäyksiä, koska fibroosikapseli oli jo ainakin osittain hajonnut. Yhteensä immunohistokemialliset värjäykset tehtiin 64 näytteelle. Parafiininäytteistä leikattiin liukumikrotomilla (Leica Sm 2000R) noin 1 µm paksuiset kudosleikkeet TechMate-objektilaseille, jonka jälkeen leikkeet kiinnitettiin lämpölevyllä noin +56 °C 1,5 tunnin ajan. Tämän jälkeen leikkeille tehtiin parafiinin poisto ksyleenissä ja rehydraatio laskevan etanolisarjan kautta tislattuun veteen. Formaliinifiksoidut leikkeet esikäsiteltiin ennen värjäystä mikroaaltouunissa 2 x 7 minuuttia käyttäen 850 W tehoa ja 200 ml 10 mMol Tris-HCl + 1 mMol EDTA pH 9,0 esikäsitelypuskuria. Leikkeiden immunohistokemiallinen värjäys suoritettiin värjäysautomaatilla TechMate 500plus (DAKOCytomation).

Proliferoivien solujen määrän laskemiseksi käytettiin monoklonaalista vasta-ainetta Ki-67 (Mouse monoclonal anti-human Ki-67 antigen, clone MIB-1, DAKOCytomation), jonka toimivuus lampaan kudoksessa testattiin ensin koevärjäyksellä. Koevärjäyksessä testattiin myös sopiva laimennussuhde. Varsinaisessa värjäyksessä Ki-67 -vasta-ainetta laimennettiin 1:110 DAKOCytomation laimennuspuskuriin.

Näytteiden verisuonituksen tutkimiseksi käytettiin Von Willebrand Factor (Rabbit anti-human Von Willebrand Factor, DAKOCytomation) -vasta-ainetta laimennettuna 1:1000. Tämä vasta-aine testattiin myös ennen varsinaisten näytteiden värjäämistä. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin primäärivasta-aineissa 25 minuuttia. Visualisointimenetelmänä käytettiin Dako REAL™ EnVision™ -visualisointimenetelmää ja reaktion merkkiaineena kromogeeniä diaminobetzidiini (DAB) Dako REAL™ DAB+Cromogen. Hematoksylinväriä (DAKO jne.) käytettiin taustavärinä värjäämään solujen tumat. Ki-67 -värjäyksessä hematoksylin laimennettiin tislattuun veteen suhteessa 1:8. Von Willebrand Factor -värjäyksessä tumaväri oli laimentamaton. Positiivisena kontrollina molemmissa värjäyksissä oli näyte ihmisen umpilisäkkeestä. Värin intensiteettiä vahvistettiin lopuksi kuparisulfaattikäsitelyllä viiden minuutin ajan.

Lisäksi tutkimuksessa testattiin voidaanko implantointialueella lisääntyviä fibroblasteja osoittaa immunohistokemiallisella menetelmällä lampaan kudoksesta. Fibroblastien osoittamiseen testattiin hiiren Anti-Hsp47 -monoklonaalista vasta-ainetta (Stressgen Bioreagents), joka on spesifinen lampaan kudokselle. Hsp47 on lämpöshokkiproteiini (heat shock protein), joka kuuluu kollageenispesifisiin molekulaarisiin kaperoniproteiineihin ja lokalisoituu endoplasmiselle retikulumille. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet Hsp47-proteiineilla olevan merkittävä rooli solun kollageenituotannossa (Nagai ym., 2000; Kuroda ja Tajima, 2004). Tutkimuksissa on osoitettu sekä normaalin ihon että skledoderma-ihosairauden fibroblastien ekspressoivan Hsp47-proteinia (Kuroda ym., 1998; Kuroda ja Tajima, 2004). Tässä tutkimuksessa vasta-ainetta testattiin ihmisen ihonäytteissä sekä lampaan kudoksenäytteissä. Varsinaista näytesarjaa ei Hsp47 -vasta-aineella värjätty, sillä testivärjäystulokset osoittautuivat epäluotettaviksi,

Transformoivan kasvutekijä beetan (TGF-beta) aktiivisuuden tutkimiseksi tulehdusreaktiossa ja sidekudoksen muodostumisessa testattiin vasta-ainetta Mouse anti human TGF beta (AbD Serotec). TGF beeta kuuluu monitoiminnallisiin sytokiineihin, joilla on ratkaiseva osuus solun erilaisissa toiminnoissa, kuten solun jakautumisen säätelyssä, solun ja kudoksen erilaistumisessa sekä kehittämisessä, tulehdusreaktiossa ja kudoksen paranemisprosesseissa (Lee ym., 2006). Vasta-aineen toimivuutta immunohistokemiassa testattiin valmistaja suosituksen mukaisesti ihmisen rintasyöpänäytteellä sekä lampaan kudoksenäytteellä. Tässä tutkimuksessa käytettyä lampaiden kudoksenäytesarjaa ei tällä vasta-aineella värjätty, testivärjäysten osoittauduttua epäluotettaviksi.

3.2.4. Mikroskooppimorfometria

Immunohistokemialliset värjäykset analysoitiin käyttäen morfometristä menetelmää. Valomikroskooppiin (GWB Olympus BH2) laitettiin 10x hilallinen okulaari, joka sisälsi 10 x 10 pisteen neliöruudukon (kokonaispinta-ala 0,0625 mm²). Sekä Ki-67 -vasta-aineella selkeästi positiivisesti värjäytyneet solut että Faktori VIII -positiivisesti värjäytyneet verisuonten lumenet (aukot) laskettiin kymmenen näkökentän (ruudukon) alueelta käyttäen 25x-objektiivia. Ki-67-värjäys voitiin analysoida 51 värjäytystä näytteestä ja Faktori VIII analysoitiin 52 näytteestä. Ki-67 -positiivisten solujen laskemiseen käytettiin puolta

ruudukkoa (50 pistettä), koska proliferoivia soluja oli eniten implantin ja fibroosikapselin rajapinnassa (kuva 8). Faktori VIII -positiivisia verisuonten luumeneita ulottui implantin ja fibroosikapselin rajapinnasta syvemmälle kudokseen ja nämä laskettiin koko ruudukon (100 pistettä) alueelta (kuva 9). Positiivisesti värjäytyneiden tapausten määrä pinta-alayksikköä kohden määriteltiin seuraavalla laskukaavalla (Haapasalo ym., 1989):

$$M/V\text{-index} = k \left[\sum_{i=1}^n MI \right] / \left[\sum_{i=1}^n V_v \right], \text{ jossa}$$

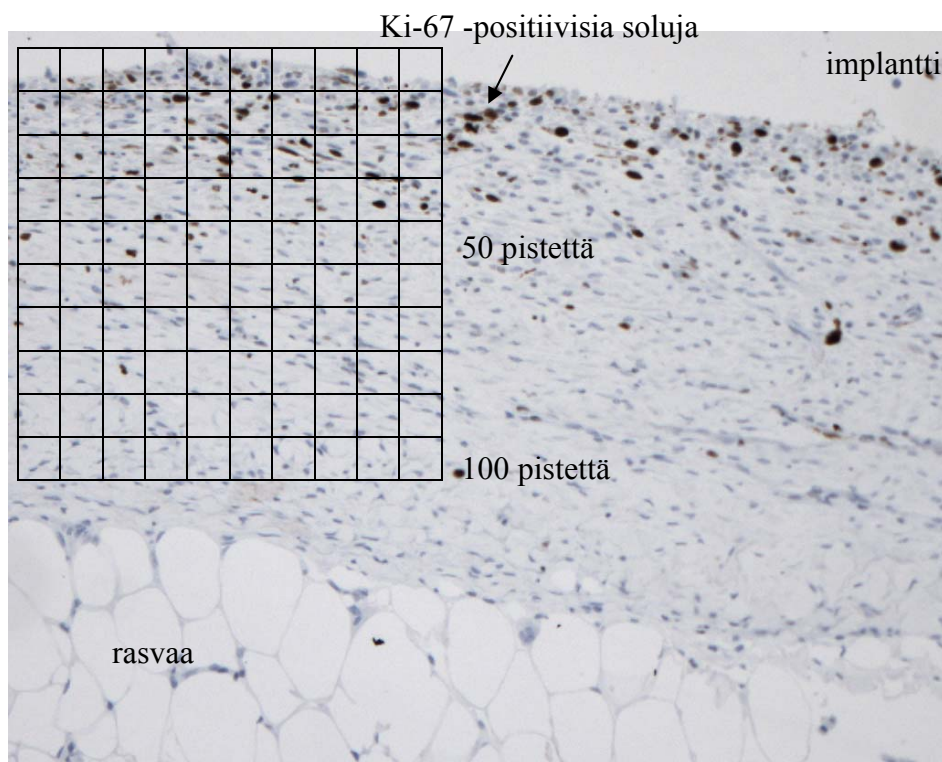
n = mikroskooppikenttien lukumäärä

MI = positiivisten tapausten lukumäärä yhden hilakentän alueella

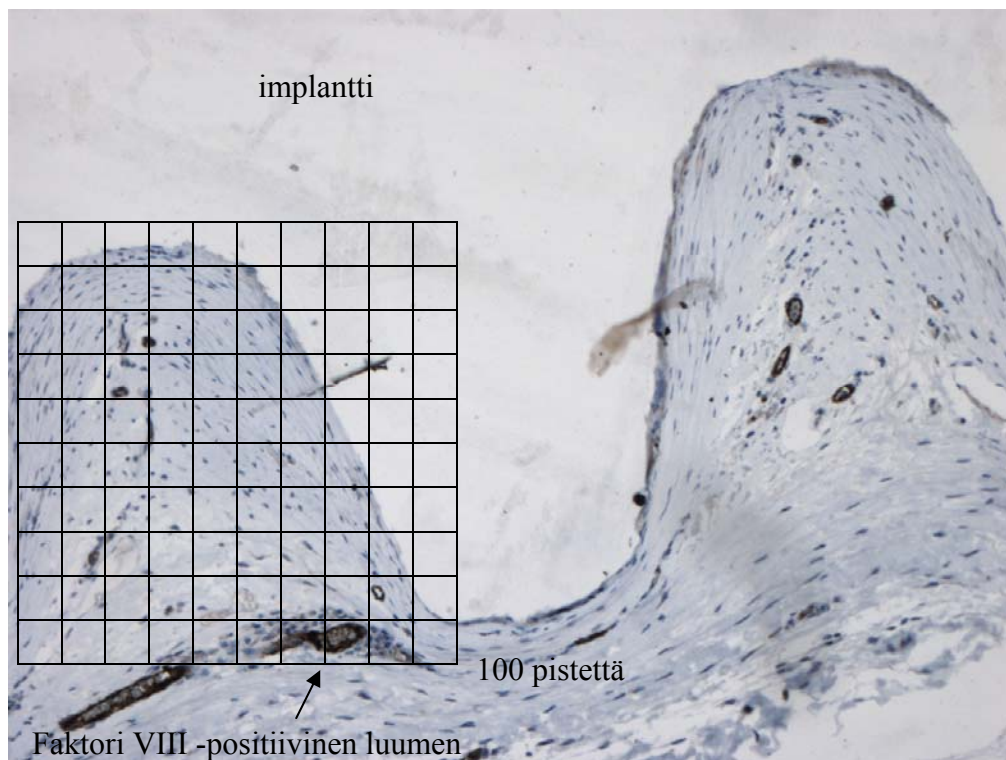
V_v = yhden hilakentän pinta-alaosuus kvantitoitavasta alueesta, joka arvioidaan samalta alueelta, jolta positiiviset tapaukset laskettu. Alueen pinta-ala arvioidaan laskemalla analysoitavalle alueelle osuvat hilan pisteet.

k = mikroskoopin kerroin = $100 / \pi r^2$

r = mikroskooppikentän säde millimetreinä



Kuva 8. Okulaarissa oleva hilakenttä Ki-67 -värjätyin leikkeen päällä.



Kuva 9. Hilakenttä Faktori VIII -värjäyksessä.

3.2.5. Tilastanalyysit

Tulosten analysointi suoritettiin Statistical Package for Social Sciences (SPSS 11.5 for Windows) -ohjelmalla. Korrelaatioanalyysiin käytettiin kahden muuttujan korrelaatiotestiä Spearman's test. Eri implanttimateriaalien ja -tyyppien sekä implantointipaikan suhdetta fibroosikapselin paksuuteen sekä tulehdusparametreihin tarkasteltiin kahden riippumattoman otoksen ei-parametrisen (2 Independent Samples) Mann-Whitney-testin avulla. Tätä testiä käytettiin myös verisuonten muodostumisen ja proliferoivien solujen suhteen arvoinnissa implanttimateriaaleihin, -tyyppihin ja -paikkaan. Useamman riippumattoman otoksen ei-parametristä (K Independent Samples) Kruskal-Wallis varianssianalyysiä hyödynnettiin arvioitaessa eri aikaperiodeissa otettujen näytteiden suhdetta fibroosikapselin paksuuteen. Myös verisuonten muodostuksen ja proliferoivien solujen suhdetta eri aikaperiodeissa otettuihin näytteisiin arvioitiin käyttämällä useamman riippumattoman otoksen ei-parametristä Kruskal-Wallis-testiä.

4. TULOKSET

4.1. *Fibroosikapseli*

Tutkimuksen näytemateriaali sisälsi kahdentoista lampaan kahdeksasta eri paikasta otettujen näytteiden HE-värjäykset ja jokaisen lampaan kontrollinäytteet. Yhteensä implanttinäytteitä oli 80 kpl, ja lisäksi oli jokaisesta lampaasta otetut 12 kontrollinäytettä. Implanttinäytteistä mitattiin fibroosikapselin paksuus kolmesta kapselin paksuimmasta sekä ohuimmasta kohdasta ja laskettiin näiden otosten keskiarvot. Kapselin paksuus voitiin mitata kaikista näytteistä (n=48), jotka oli otettu 6 viikosta 6 kuukauteen implantoinnista. 12 kuukauden jälkeen implantoinnista fibroosikapseli alkoi hävitä osasta näytteitä, ja kapselin paksuus voitiin mitata 17 näytteestä, jotka oli otettu 12 - 36 kuukautta implantoinnista. Yhteensä fibroosikapselin paksuus mitattiin 65 näytteestä. Kontrollinäytteet eivät alun perinkään sisältäneet implantoitua materiaalia, joten niistä ei löytynyt fibroosikapselia eikä kapselin paksuuden mittausta näin ollen tehty.

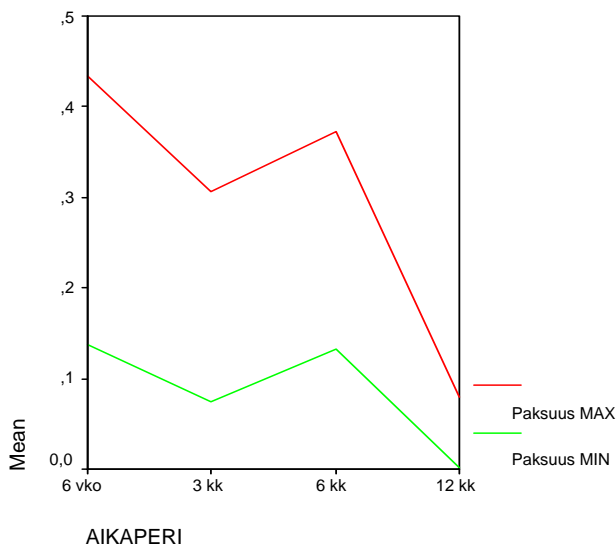
Fibroosikapseli oli paksuimmillaan leuasta otetussa Inion CPS[®]-näytteessä 6 kuukautta implantoinnista, jolloin paksuus oli 0,89 mm. PEEK-näytteissä kapseli oli paksuin 6 viikon kohdalla ollen 0,75 mm. Ohuimmillaan fibroosikapseli oli 0,06 mm selästä otetussa PEEK-näytteessä 24 kuukautta implantoinnin jälkeen. Merkittävää tilastollista eroa Inion CPS[®]- ja PEEK-näytteiden välillä ei havaittu (p= 0,314).

4.1.1. *Fibroosikapseli ajan funktiona*

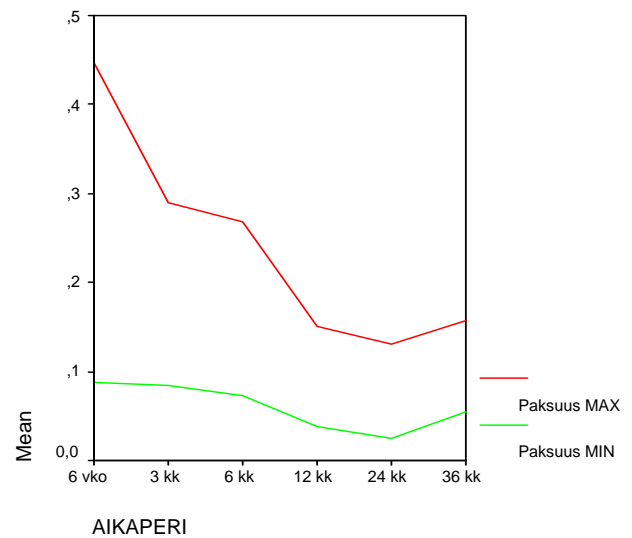
Implanttien ympärille muodostuneen fibroosikapselin paksuuden kasvua implantoinnista kuluneen ajan funktiona tutkittiin kaikista näytteistä, sekä erikseen Inion CPS[®]-näytteistä (n= 41) että PEEK-näytteistä (n=24). Kaikkien näytteiden keskiarvona fibroosikapseli oli paksuimmillaan 6 viikkoa implantoinnista, jolloin Inion CPS[®]-näytteiden keskiarvo 0,43 mm ja PEEK-näytteiden keskiarvo 0,45 mm.

Inion CPS[®]-näytteissä kapseli oli hävinnyt kokonaan 24 kuukauden kuluttua implantoinnista, joten testiin otettiin vain näytteet 6 viikon ja 12 kuukauden väliltä. Inion CPS[®]-näytteissä kapselinpaksuus laski 6 viikon jälkeen, mutta oli kasvanut jälleen 3-6 kuukauden välillä implantoinnista. 12 kuukauden näytteissä fibroosikapselin paksuus oli laskenut voimakkaasti, ja kapseli oli hävinnyt kokonaan 24 kuukaudessa (kuva 10).

PEEK-näytteissä kapseli oheni 6 viikon jälkeen. Kapseli jatkoi ohenemistaan aina 24 kuukauteen asti implantoinnista, jonka jälkeen se jälleen vahveni lievästi 36 kuukauden näytteissä (kuva 11).



Kuva 10. Fibroosikapselin paksuus ajan funktiona Inion CPS[®]-näytteissä.



Kuva 11. Fibroosikapselin paksuus ajan funktiona PEEK-näytteissä.

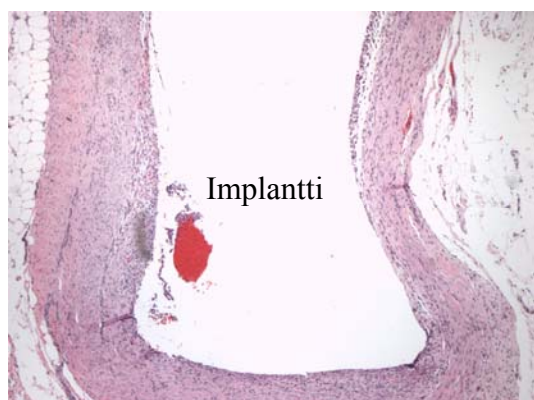
4.1.2. Fibroosikapseli eri implanttityypeissä

Tutkimuksessa vertailtiin implanttien ympärille muodostuneen fibroosikapselin paksuutta eri implanttimateriaaleissa ja -malleissa. Lisäksi tutkittiin, oliko kapselin paksuudella eroja kiteisten ja amorfisten PEEK-näytteiden välillä.

Tutkimuksessa käytetyt implantit olivat malliltaan ruuveja ja levyjä. Fibroosikapselin paksuus mitattiin 15 ruuvi-implantista sekä 50 levyimplantista. Levytyyppin implanteissa kapselin paksuuksien keskiarvo oli 0,35 mm (kuva 12) ja ruuvityyppisissä implanteissa 0,14 mm ($p < 0,001$, Mann-Whitney, kuva 13).

Eroja fibroosikapselin paksuudessa tutkittiin myös Inion CPS[®]- ja PEEK-implanttimateriaalien välillä. Inion CPS[®]-näytteitä oli koko seurantajakson aikana yhteensä 41 ja PEEK-näytteitä 24 kappaletta. Näiden Inion CPS[®]-implanttien ympärillä olevan fibroosikapselin paksuuden keskiarvoksi saatiin 0,35 mm ja PEEK-implanttien 0,24 mm ($p = 0,314$).

Tutkimuksessa käytetyt PEEK-materiaalista valmistetut implantit olivat joko amorfisia tai kiteisiä levyjä, ja fibroosikapselin paksuutta vertailtiin näiden välillä. Amorfisen ja kiteisen PEEK-implanttimateriaalien välillä fibroosikapselin paksuudessa ei havaittu merkittävää eroa. Amorfisen PEEK-implantin fibroosikapselin keskiarvo oli 0,19 mm ja kiteisen PEEK-implantin 0,29 mm ($p = 0,355$).



Kuva 12. Fibroosikapseli Inion CPS[®]-levyimplantin ympärillä.



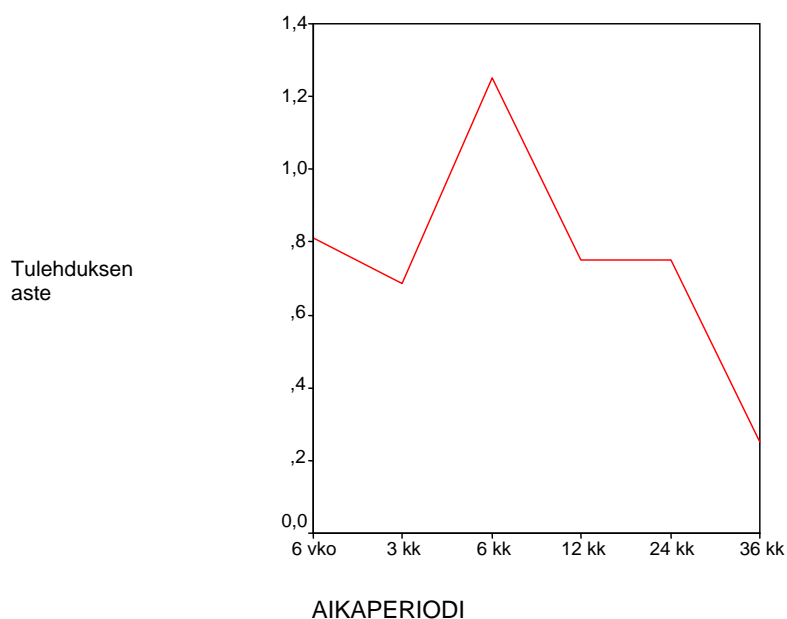
Kuva 13. Fibroosikapseli Inion CPS[®]-ruuvi-implantin ympärillä.

4.1.3. Fibroosikapseli eri implantointipaikoissa

Fibroosikapselin paksuus mitattiin 13 leuassa ja 52 selässä olleesta implanttinäytteestä. Leukaan implantoiduissa näytteissä fibroosikapselin paksuuden keskiarvo oli 0,58 mm ja selkään implantoiduissa näytteissä 0,23 mm ($p < 0,001$, Mann-Whitney).

4.1.4. Fibroosikapselin suhde eri tulehdusparametreihin

Fibroosikapselin paksuutta vertailtiin näytteistä jo aiemmin tutkittuihin tulehdusreaktioihin. Testissä oli mukana kaikki tutkimuksessa olleet näytteet, joista oli mitattu fibroosikapselin paksuus ($n=65$). Tulehdusparametrien (tulehduksen aste, FBR, makrofagit, jättisolut, PMN ja eosinofiilit) ja kapselin paksuuden keskiarvojen välillä ei havaittu tilastollisesti merkittävää korrelaatiota ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis). Kuitenkin tulehduksen asteen arvot pienenevät ajan kuluessa (kuva 14).



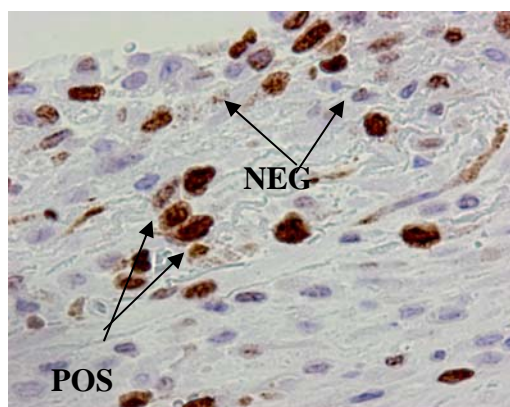
Kuva 14. Kaikkien tutkimuksessa olleiden implanttien tulehdusasteiden arvot suhteessa aikaan.

4.1.4.1. Korrelaatiot implanttityypeittäin ja -paikoittain

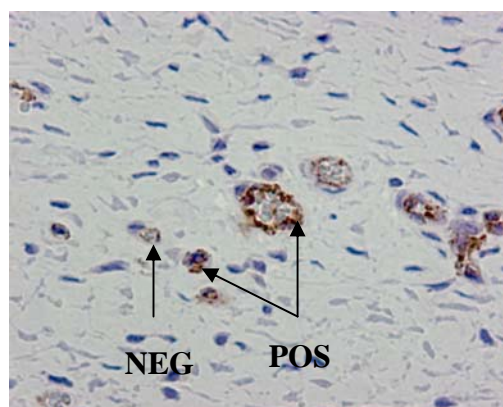
Tutkimuksessa tarkasteltiin tulehdusparametrejä myös implanttityypeittäin ja -paikoittain. Kahdentoista lampaan näytteet jaettiin kahdeksaan ryhmään implantin tyyppin ja paikan perusteella sekä kontrollien ryhmään. Ryhmässä 5 (6-reikäinen Inion CPS®-levy selässä, taulukko 1) sekä ryhmässä 7 (iso ruuvi selässä) fibroosikapselin paksuus korreloi merkitsevästi magrofagien ($p=0,046$) ja polymorfonukleaaristen neutrofiilien ($p=0,042$) kanssa. Ryhmässä 6 (10-reikäinen levy selässä) kapselin paksuus korreloi tilastollisesti merkitsevästi myös PMN:n kanssa ($p= 0,029$).

4.2. Immunohistokemiallinen värjäys

Immunohistokemiallisessa värjäyksessä haluttiin tutkia ja osoittaa hiiressä tuotetulla ihmisen Ki-67 -vasta-aineella proliferoivat solut kudospäätteistä. Ihmisen vasta-aine ristireagoi lampaan Ki-67 -proteiinin kanssa ja värjäsi kudoksen jakautumisvaiheessa olevat solut, jotka pystyttiin hyvin laskemaan (kuva 15). Myös kanissa tuotettu ihmisen Faktori VIII -vasta-aine ristireagoi lampaan endoteelisolujen kanssa, värjäten ne verisuonten seinämissä ja mahdollisesti näin verisuonten lumenten laskemisen (kuva 16). Leikkeiden osittaisesta irtoamisesta aiheutuen Ki-67 -värjäys voitiin analysoida 51 näytteestä ja Faktori VIII 52 näytteestä.



Kuva 15. Ki-67 -positiivisia (POS) ja negatiivisia (NEG) soluja.

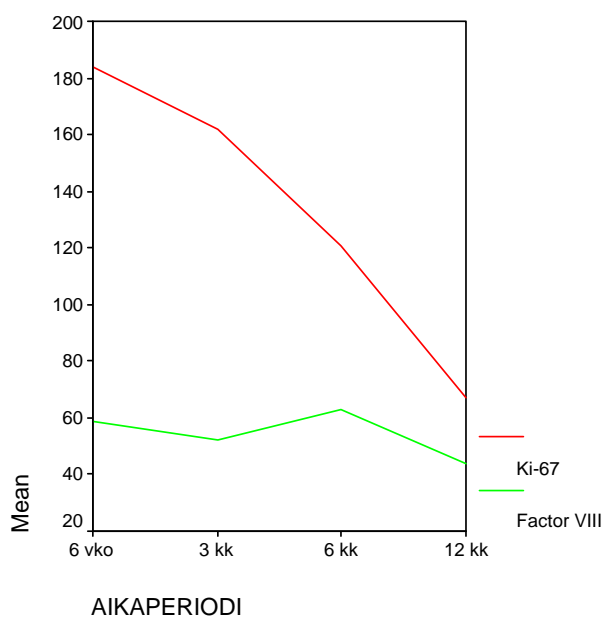


Kuva 16. Faktori VIII -positiivisia (POS) sekä negatiivisia (NEG) endoteelisoluja verisuonten lumenten seinämissä.

Immunohistokemiallisen menetelmän käyttökelpoisuutta kudoksetiloiden analysoinnissa tutkittiin myös Hsp47- ja TGF beeta -vasta-aineilla ihmisen ja lampaan kudoksissa. Hsp47 -vasta-aineella haluttiin värjätä jakautuvat fibroblastit ja TGF beetan aktiivisuutta haluttiin tutkia tulehdusreaktiossa. Hsp47 värjäsi ihmisen ihonäytteissä ja lampaan kudoksetilöissä kaikki epiteelisolut positiivisesti, jolloin fibroblasteja ei pystytty luotettavasti analysoimaan. TGF beeta värjäsi heikosti ihmisen rintasyöpäkudosta, mutta lampaan kudos jäi negatiiviseksi.

4.2.1. Ki-67 ja Faktori VIII ajan funktiona

Näytteiden Ki-67- ja Faktori VIII -positiivisten solujen esiintyvyyttä tutkittiin suhteessa aikaan. Ki-67 -positiivisten solujen määrä laski kuuden viikon keskiarvosta 184 solua/mm² tasolle 67 solua/mm² 12 kuukauden näytteissä (p= 0,062). Faktori VIII pysyi tutkittavan ajan jokseenkin vakiotasolla 44 - 63 verisuonta/mm² (kuva 17).



Kuva 17. Ki-67 ja Faktori VIII positiivisten tapausten määrä ajan funktiona.

4.2.2. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde fibroosikapselin muodostumiseen

Selkeästi Ki-67 -positiivisesti värjäytyneiden solujen sekä Faktori VIII -positiivisten verisuonten määrää tarkasteltiin suhteessa fibroosikapselin muodostumiseen. Faktori VIII korreloi erittäin merkitsevästi fibroosikapselin paksuuden kanssa ($p=0,008$). Korrelaatiota ei havaittu Ki-67 -positiivisten solujen ja fibroosikapselin paksuuden välillä ($p=0,132$).

4.2.3. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde eri implanttityypeissä

Proliferoivien solujen määrää sekä verisuonimuodostusta tarkasteltiin eri implanttityypeissä. Faktori VIII -värjäyksessä todettiin positiivisten verisuonten suhde eri implanttityyppien välillä tilastollisesti erittäin merkitseväksi ($n=52$, $p=0,006$). Levytyypin implanteissa keskiarvoksi saatiin 60 verisuonta/ mm^2 ja ruuvi-implanteissa 47 verisuonta/ mm^2 . Ki-67-värjäyksessä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää suhdetta levy- ja ruuvityypin implanttien välillä ($n=51$, $p=0,123$, Mann-Whitney). Levyimplanttien Ki-67 -positiivisten solujen keskiarvo oli 158 solua/ mm^2 ja ruuvityyppisissä keskiarvo oli 108 solua/ mm^2 .

Immunohistokemiallisia värjäystuloksia vertailtiin myös Inion CPS[®]- ja PEEK-näytteiden välillä. Tilastollisesti merkittävää eroa ei ilmennyt Ki-67 -värjäystuloksissa ($p=0,42$) eikä Faktori VIII -tuloksissa ($p=0,13$). Ki-67 -positiivisten solujen keskiarvo oli Inion CPS[®]-näytteissä 144 solua/ mm^2 ja PEEK-näytteissä 142 solua/ mm^2 . Faktori VIII-positiivisten verisuonten keskiarvo oli Inion CPS[®]-näytteissä 55 verisuonta/ mm^2 ja PEEK-näytteissä 60/ mm^2 .

4.2.4. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde eri implantointipaikkoihin

Ki-67 -positiivisia soluja oli enemmän selästä (keskiarvo 158 solua/ mm^2) kuin leuasta otetuissa näytteissä (87 solua/ mm^2). Faktori VIII -positiivisia tapauksia oli leukanäytteissä noin 64 verisuonta/ mm^2 ja selkänäytteissä noin 55 verisuonta/ mm^2 . Tulosten välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (Ki-67 $p=0,07$; Faktori VIII $p=0,12$, taulukko 2).

Taulukko 2. Ki-67- ja Faktori VIII-väryäysten positiivisten tapausten määrät eri implanttityypeissä ja implantointipaikoissa.

	Ki-67 - positiivisia soluja/mm ²	Faktori VIII - positiivisia verisuonia/mm ²
Levy	158	60
Ruuvi	108	47
<i>p-arvo</i>	0,12	0,006
INION CPS®	144	55
PEEK	142	60
<i>p-arvo</i>	0,422	0,132
LEUKA	87	64
SELKÄ	158	55
<i>p-arvo</i>	0,07	0,167

4.2.5. Ki-67:n ja Faktori VIII:n suhde eri tulehdusparametreihin

Positiivinen ja tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p < 0,001$) Spearman-korrelaatio saatiin Ki-67 -solujen ja tulehduksen aste-parametrin välille. Tilastollisesti merkitsevä tulos oli myös Ki-67:n ja magrofagien ($p=0,047$), jättisolujen ($p=0,038$) sekä PMN:n ($p=0,048$) välillä. Faktori VIII -positiiviset verisuonet ja tulehduksen aste-parametri korreloivat tilastollisesti lähes merkitsevästi keskenään ($p=0,051$). Ki-67- ja Faktori VIII -positiivisten solujen välillä ei ollut merkitsevää korrelaatiota ($p=0,24$).

5. TULOSTEN TARKASTELU

5.1. Fibroosikapselin paksuus implantointialueella

Biologisen vasteen syntyminen vierasta materiaalia kohtaan on elimistössä normaali reaktio. Puolustusvaste voi johtaa akuutista tulehdusreaktiosta kroonisiin tulehduksellisiin muutoksiin, joita saattaa seurata fibroottisen kudoksen muodostuminen. Elimistössä implantit aiheuttavat lähes aina fibroosikapselin muodostumisen niiden ympärille. Siitä ei kuitenkaan ole haittaa, mikäli kapselit eivät aiheuta mitään kliinisiä oireita (Rokkanen ym., 2000). Fibroosikapseli myös suojaa implanttia siihen kohdistuvilta biologisen ympäristön vaikutuksilta hidastaen muun muassa sen hajoamista (Li ym., 1999). Tässä tutkimuksessa analysoitiin biohajoavien ja ei-biohajoavien implanttien ympärille muodostuneen fibroosikapselin paksuutta eri implanttimateriaaleissa, -tyypeissä sekä eri implantointipaikoissa.

Fibroosikapselin paksuutta verrattiin elimistössä hajoavien Inion CPS[®]-näytteiden sekä ei-hajoavien PEEK-näytteiden välillä. Seurannan alkuvaiheen näytteissä ei havaittu merkittävää eroa, eli fibroosikapseli muodostui molempien materiaalien ympärille jokseenkin saman paksuisena. Havaittiin kuitenkin, että seitsemästä Inion CPS[®]-näytteestä fibroosikapseli oli hävinnyt 12 kuukauden jälkeen implantoinnista ja lopuistakin 24 kuukauden jälkeen. PEEK-näytteissä fibroosikapseli säilyi sen sijaan implanttien ympärillä koko tutkimusjakson (3 vuotta). Saadun tuloksen sekä aiempien tutkimusten perusteella voidaan olettaa, että fibroosikapseli häviää varsin pian biohajoavan implanttimateriaalin poistuttua elimistöstä. On myös osoitettu, että fibroosikapseli säilyy ei-biohajoavan materiaalin ympärillä ainakin kahdesta kolmeen vuoteen implantoinnista (Nieminen ym., 2006; Li ym., 1999). Tämä lienee elimistön normaali vaste useimpia pysyviä vierasmateriaaleja kohtaan.

Tutkimuksessa selvitettiin myös, miten fibroosikapselin paksuus vaihtelee eri implanttityypeissä. Paksuuteen voi vaikuttaa esimerkiksi implantoidun materiaalin koko, muoto ja pinnan laatu. Aiemmissä tutkimuksissa on esitetty, että kooltaan pienissä

implanteissa fibroosikapseli on ohuempi kuin suuremman pinta-alan implanteissa. Tämä voi johtua muun muassa implantin ja solujen pienemmästä kontaktipinta-alasta ja implanttimateriaalin pinnan kaarevuusasteesta (Sanders ja Rochefort, 2003; Sanders ym., 2000). On mahdollista, että solut eivät voi suoristua tasaisesti koko solukalvoltaan implanttimateriaalin kaarevalle pinnalle, jolloin ne eivät voi myöskään jatkaa normaaliin vierasesinevasteen ja fibroosikapselin muodostamiskaskadiin (Sanders ym., 2000). Tässä tutkimuksessa ruuvityypin implanteissa fibroosikapseli oli huomattavasti ohuempi kuin levytyypin implanteissa, mikä saattaa johtua ruuvien pinnan suuremmasta kaarevuusasteesta. Syynä saattaa olla myös se, että ruuvi-implantit hajosivat hitaammin kuin levyimplantit (Nieminen ym., 2007b), jolloin hitaamman asteittaisen hajoamisen seurauksena ei polymeerien hajoamiskappaleita vapaudu niin äkisti ja tulehdusvaste voisi pysyä vaimeampana. Nopeasti hajoavista implanteista äkillisesti vapautuva suuri määrä biopolymeerin hajoamistuotteita voi aiheuttaa sen, ettei hajoamistuotteita pystytä kuljettamaan riittävän nopeasti pois implantointialueelta. Tämä monomeerihappojen kertyminen alueelle voi laskea kudoksen pH-arvoa ja alueelle voi kertyä nestettä osmoottisesti; nämä voivat voimistaa tulehdusreaktiota. Kliinisesti tämä ilmenee implantointialueella turvotuksena ja kipuna (Jiang ym., 2007; Böstman ja Pihlajamäki, 2000).

Implantin sijainnilla kehossa tiedetään olevan myös merkitystä fibroosikapselin muodostumiseen. Potilaille tiedetään aiheutuneen kliinisesti merkittäviä kudoksetyypin reaktioita, jos suurikokoinen biohajoava implantti on sijoitettu paikkaan, jossa on huono verenkierto tai vain ohut peittävä pehmytkudoskerros (Böstman ja Pihlajamäki, 2000). Nyt tehdyssä tutkimuksessa tulokseksi saatiin erittäin merkitsevä ero leukaan ja selkään sijoitettujen implanttien ympärille muodostuneen fibroosikapselin paksuuden välillä: leukanäytteissä fibroosikapseli oli huomattavasti paksumpi kuin selkänäytteissä. Koska leukanäytteet sisälsivät ainoastaan levytyypin implantteja, joissa fibroosikapselin paksuus oli suurempi kuin ruuvityypin implanteissa, haluttiin tutkia tulosta vielä vain levytyypin implanttien kesken. Tuolloinkin fibroosikapseli oli tilastollisesti erittäin merkitsevästi paksumpi leuasta kuin selästä otetuissa näytteissä. Nieminen ym. (2007b) ovat todenneet implanttien hajoavan leuassa nopeammin kuin selässä. Edelleen tässä tutkimuksessa saatiin implantoidun kudoksen verisuonitusta tutkittaessa tulokseksi leuassa olevan enemmän verisuonten muodostusta kuin selässä. Yhteenvetona voidaan todeta, että leuassa implantit hajosivat nopeammin, jolloin polymeerien hajoaminen aiheutti kudoksessa mahdollisesti äkillisen pH:n laskun ja näin ollen tulehdusreaktiota seuraava fibroosivaipan muodostus oli suurempi.

Toisaalta runsaasta verisuonituksesta johtuen polymeerien hajoamistuotteet saatiin nopeasti pois kuljetettua kudoksesta, ja reaktio ei näin ollen ollut pitkäaikainen.

Fibroosikapselin paksuutta verrattiin myös aiemmin tutkittuihin tulehdusparametreihin. Merkittävää yhteyttä kapselin paksuuden ja eri tulehdusparametrien välillä ei havaittu, kun koko aineistoa vertailtiin tulehdusparametreihin. Tässä vaiheessa olisi ollut mielenkiintoista tutkia TGF beetan aktiivisuuden suhdetta tulehdusreaktioon ja fibroosikapselin paksuuteen, sillä TGF beetan tiedetään lisäävän kollageenisynteesiä ja fibroottisen kudoksen kehittymistä (Broder ja Nucle, 1994). Vasta-ainetta ei kuitenkaan saatu toimimaan lampaan kudoksessa ja näin ollen TGF beetan osuutta ei saatu selville.

Tutkimuksessa selvitettiin myös löytyykö positiivista korrelaatiota fibroosikapselin paksuuden kanssa eri implanttityypeissä ja -paikoissa. Ryhmässä 5 (6-reikäinen Inion CPS[®]-levy selässä) sekä ryhmässä 7 (iso ruuvi selässä) havaittiin positiivinen korrelaatio fibroosikapselin paksuuden ja magrofagien sekä PMN-solujen välillä. Myös ryhmän 6 (10-reikäinen levy selässä) näytteiden fibroosikapselin paksuus korreloi positiivisesti PMN-solujen kanssa. Tämän perusteella voidaan sanoa, että vaikka leuasta otetuissa näytteissä kapseli oli paksumpi, selästä otetuissa näytteissä oli hieman enemmän tulehdusta ja tulehdusreaktiot korreloivat paremmin fibroosikapselin paksuuden kanssa. Tämän voidaan ajatella selittyvän vähemmällä verisuonten määrällä selässä, mikä johtaa hitaampaan hajonneen vierasmateriaalin kuljetukseen pois implantointipaikalta, jolloin tulehdusreaktio on voimakkaampi (Böstman ja Pihlajamäki, 2000).

5.2. Solujen proliferaatio implantointialueella

Kudokseen kohdistuneen vaurion seurauksena vaurioalueella tapahtuu monien solutyypin lisääntynyttä proliferaatiota eli solujakautumista. Yksi solujakautumisen keskeisimpiä proteiineja on Ki-67 -proteiini, jonka ekspressiota soluissa tässä tutkimuksessa mitattiin Ki-67 -vasta-aineen avulla. Positiiviset Ki-67 -solut merkitsivät jakautuvia soluja, ja solujen jakautumisaktiiviteettia verrattiin fibroosikapselin paksuuteen. Proliferoivien solujen määrä laski lähes merkitsevästi tutkitun aikavälin (6 viikkoa-12 kuukautta implantoinnista) sisällä. Jakautuvien solujen määrää tutkittiin myös suhteessa fibroosikapselin paksuuteen. Näiden

välille ei löydetty positiivista korrelaatiota eli proliferoivat solut eivät todennäköisesti olleet fibroblasteja. Tätä olettamusta tuki positiivinen korrelaatio jakautuvien Ki-67 -solujen ja tulehdusparametrien, magrofagien, jättisolujen sekä PMN-solujen välillä. Fibroblastien osuutta solujen proliferaatiossa yritettiin lisäksi todentaa Hsp47-vasta-aineella. Hsp47 ei värjänyt ainoastaan fibroblasteja vaan myös kaikki muutkin epiteelisolut kudoksessa. Tästä johtuen fibroblastien osuutta ei pystytty erottelemaan muista epiteelisoluista, eikä tällä menetelmällä varmentamaan mikä oli fibroblastien osuus jakautuvista soluista.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin myös vaihteleeiko solujen proliferaatio eri implantointipaikkojen välillä. Selästä otetuista näytteissä oli enemmän soluproliferaatiota kuin leuasta otetuista näytteistä, ei kuitenkaan tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,07$). Tulos tukee kuitenkin saatua positiivista korrelaatiotulosta selkään sijoitettujen implanttien ja tulehdusparametrien välillä. Saatua tulosta tukee myös se, että implantit oli sijoitettu selän alueella vain ohuen pehmytkudoskerroksen alle, joka voi altistaa voimakkaammalle tulehdusreaktiolle (Böstman ja Pihlajamäki, 2000).

Tutkimuksessa pyrittiin myös selvittämään, vaikuttaako implanttityyppi lisääntyvien solujen määrään. Levy- ja ruuvityypin näytteissä kudoksessa ei ollut eroa Ki-67 -positiivisten solujen määrällä, joten tässä tapauksessa implantin tyyppi ei vaikuttanut jakautuvien solujen määrään. Proliferoivien solujen lukumäärää vertailtiin myös Inion CPS[®]- ja PEEK-näytteiden välillä. Myöskään biohajoavan ja ei-biohajoavan implanttityypin välillä ei havaittu solujakautumisessa merkittävää eroa. Saatua tulos kertoo, että proliferaatiota tapahtuu molempien implanttityyppien ympärillä huolimatta siitä, onko implantti elimistössä pysyvä vai ei. Tässä tapauksessa olisi voinut olettaa, että biohajoavan implantin ympärillä solujen proliferaatiota olisi tapahtunut enemmän, mikäli jakaantuneet solut olivat tulehdussoluja.

5.3. Verisuonten muodostus implantointialueella

Faktori VIII:n perusteella määritetty verisuonten määrä ja fibroosikapselin paksuus korreloivat erittäin merkitsevästi keskenään, mikä tukee tässä tutkimuksessa saatuja muita tuloksia. Implantoidun kudoksen verisuonitus lisääntyi samanaikaisesti fibroosivaipan kasvun kanssa: tulehdusreaktion edetessä kudos tarvitsee lisää verisuonia kuljettaakseen biopolymeerien hajoamistuotteet pois elimistöstä, ja toisaalta myös kasvava fibroottinen

kudos tarvitsee tehokkaan verisuonituksen. Kuitenkaan implantointipaikalla ei tässä tapauksessa ollut suurta merkitystä verisuonten määrään. Leukanäytteissä verisuonitusta oli jossain määrin selkänäytteitä enemmän, jolloin leuan alueelta mahdollisesti saatiin polymeerien hajoamistuotteet tehokkaammin pois. Se myös selittäisi, miksi tulehdus leuassa oli vähäisempää kuin selkänahan alla.

Faktori VIII -positiivisten verisuonten määrää vertailtiin myös eri implanttityypeissä. Levyimplanteissa lukumäärä oli huomattavasti suurempi kuin ruuvityyppisissä. Tämä voi selittyä sillä, että levyimplanteissa fibroosikapseli oli huomattavasti paksumpi kuin ruuveissa, jolloin kudokset reagoivat voimakkaammin ja verisuonia tarvittiin lisää ravintoaineiden kuljettamiseen fibroosikudokselle ja hajoamistuotteiden poistamiseen. Biopolymeerien hajotessa saattaa myös kudoksen maitohappopitoisuus nousta, jolloin angiogeneesin stimuloituminen lisää verisuonten muodostumista (ks. yleiskatsaus Singer ja Clark, 1999). Verisuonten muodostusta tutkittiin myös Inion CPS[®]- ja PEEK-näytteiden välillä. Implanttimateriaalilla ei havaittu olevan merkitystä verisuonten uudismuodostukselle.

5.4. Yhteenveto

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää soveltuuko immunohistokemiallinen menetelmä implantoinnista aiheutuneiden pehmytkudosreaktioiden tutkimiseen lampaan kudoksessa. Tarkoituksena oli selvittää mitkä solut proliferoivat eniten implantoidussa kudoksessa ja onko niillä yhteyttä tulehdusreaktioihin. Proliferoivien solujen tyyppiä ei tarkalleen pystytty selvittämään sopivien ja toimivien vasta-aineiden puuttuessa. Tulosten perusteella voidaan päätellä proliferoivien solujen olevan pääosin tulehdussoluja kuten magrofageja, PMN-soluja ja jättisoluja, sillä Ki-67 -positiivisesti värjäytyneet solut korreloivat tulehdusparametrien ja em. solutyypin kanssa, eikä fibroosivaipan paksuuden kasvun ja Ki-67 -positiivisten solujen välillä ollut korrelaatiota. Lisäselvitystä proliferoivien solujen tyypistä olisi mahdollisesti antanut jokin Hsp47-vasta-ainetta spesifisemmin fibroblasteja tunnistanut vasta-aine.

Yksi implantaatioalueella tapahtuva pehmytkudosreaktio on uusien verisuonten muodostuminen, ja tätä haluttiin tutkia myös immunohistokemiallisin menetelmin. Tähän tarkoitukseen Faktori VIII -vasta-aine todettiin hyvin toimivaksi lampaan kudoksessa.

Mielenkiintoista lisäselvitystä tulehdusreaktion ja fibroosikapselin muodostumisen analysointiin olisi tuonut TGF beetan aktiivisuuden tutkiminen, mutta lampaan kudoksessa toimivaa sopivaa vasta-ainetta ei markkinoilta ollut saatavilla.

Tulosten perusteella voidaan todeta immunohistokemiallisen menetelmän soveltuvan implantoinnista aiheutuvien kudoksetutkimiseen, joskin tällä hetkellä vielä tietyin rajoituksin spesifisten vasta-aineiden puuttuessa ainakin harvemmin käytettyjen koe-eläinten kuten lampaiden osalta.

Kokonaisuudessaan biohajoavien ja ei-biohajoavien biopolymeerien aiheuttamat pehmytkudosreaktiot olivat hyvin pieniä, eikä niiden välillä havaitut erot olleet merkittävän suuria. Tämän perusteella voidaan sanoa sekä Inion CPS[®]-implanttien että PEEK-implanttien olevan turvallisia käyttää.

Tutkimuksen yleistettävyyttä rajoittavana tekijänä on suhteellisen pieni aineisto, mikä myös heikentää tutkimuksen voimaa saada tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välille. Pieni koe-eläinten lukumäärä on kuitenkin perusteltua huomioiden suurikokoisten koe-eläinten käytöstä aiheutuvat kustannukset.

6. VIITTEET

- Anderson, J.M. 2004. Host reactions to biomaterials and their evaluation: Inflammation, wound healing and the foreign-body response. In *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 296-304.
- Anderson, J.M. ja M. S. Shive. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28:5-24.
- Ambrose, C.G. ja T.O. Clanton. 2004. Bioabsorbable Implants: Review of Clinical Experience in Orthopedic Surgery. *Ann. Biomed. Eng.* 32:171-177.
- An, Y.H., S. K. Woolf ja R. J. Friedman. 2000. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*. 21:2635-2652.
- Ashammakhi, N., A.M. Gonzalez, P. Törmälä ja I.T. Jackson. 2004. New resorbable bone fixation. Biomaterials in craniomaxillofacial surgery: present and future. *Eur. J. Plast. Surg.* 26:383-390.
- Babensee, J.E., J.M. Anderson, L.V. McIntire ja A.G. Mikos. 1998. Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 33:111-139.
- Bergsma, J.E., F.R. Rozema, R.R.M. Bos ja W.C. De Bruijn. 1993. Foreignbody reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 51:666-70.
- Border, W.A. ja N.A. Noble. 1994. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 331:1286-1292.
- Brown, D.C. ja K.C. Gatter. 2002. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. 40: 2-11.
- Böstman, O., E. Hirvensalo, J. Mäkinen ja P. Rokkanen. 1990. Foreignbody reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J. Bone Joint Surg. Br.* 72:592-596.
- Böstman, O., U. Päiväranta, E. Partio, J. Vasenius, M. Manninen ja P. Rokkanen. 1992. Degradation and tissue replacement of an absorbable polyglycolide screw in the fixation of rabbit femoral osteotomies. *J. Bone Joint Surg. Am.* 74: 1021-1031.
- Böstman, O. ja Pihlajamäki H. 2000. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*. 21:2615-2621.
- Brunski, J.B. 2004. Classes of material used in medicine: metals. In *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 137-153.
- Celikkaya, E., E.B. Denkbaz ja E. Piskin. 1996. Poly(DL-lactide)/Poly(ethylene glycol) Copolymer Particles. I. Preparation and Characterization. *Journal of Applied Polymer Science*. 61:1439-1446.
- Cho D.Y., W.R. Liao, W.Y. Lee, J.T. Liu, C.L. Chiu ja P.C. Sheu. 2002. Preliminary experience using a polyetheretherketone (PEEK) cage in the treatment of cervical disc disease. *Neurosurgery*. 51: 1343-1350.
- Colin A., B. Scotchforda, M. J. Garlea, J. Batchelora, J. Bradleyc ja D. M. Grantb. 2003. Use of a novel carbon fibre composite material for the femoral stem component of a THR system: in vitro biological assessment. *Biomaterials*. 24: 4871-4879.

- Cooper, S.L., S.A. Visser, R.W. Hergenrother ja N.M.K. Lamba. 2004. Classes of material used in medicine: polymers. . In *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 67-79.
- Cutright, DE, E.E. Hunsuck ja J.D. Beasley. 1971. Fracture reduction using biodegradable material, polylactic acid. *J. Oral Surg.* 29: 393–397.
- Dubok, V.A. 2000. Bioceramics – yesterday, today, tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*. 39: 69-87.
- Ekholm, M., P. Helander, J. Hietanen, C. Lindqvist, A. Salo, M. Kellomaki, ja R. Suuronen. 2006. A histological and immunohistochemical study of tissue reactions to solid poly(ortho ester) in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 35:631-5.
- Eschbach, L. 2000. Nonresorbable polymers in bone surgery. *Injury*. 31: 22-27.
- Ferguson, S.J., J.M.A. Visser ja A. Polikeit. 2006. The long-term mechanical integrity of non-reinforced PEEK OPTIMA polymer for demanding spinal applications: experimental and finite-element analysis. *Eur. Spine J.* 15: 149–156.
- Gotman, I. 1997. Characteristics of metals used in implants. *J. Endourol.* 11:383-9.
- Gunatillake, P.A. ja R. Adhikari. 2003. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cell Mater.* 5:1-16.
- Haapasalo, H., E. Pesonen ja Y. Collan. 1989. Volume corrected mitotic index (M/V-INDEX). The standard of mitotic activity in neoplasms. *Path. Res. Pract.* 185:551-554.
- Hiramatsu, Y. ja S. Toda. 2003. Mast Cells and Angiogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 60: 64-69.
- Ignatius, A.A. ja L.X. Claes. 1996. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-coglycolide). *Biomaterials*. 17: 631-639.
- Ikada, Y. ja H. Tsuji. 2000. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.* 21: 117–132.
- Jagur-Grodzinski, J. 1999. Biomedical application of functional polymers. *Reactive & Functional Polymers*. 39:99–138.
- Jiang, W-W, S-H. Su, R.C. Eberhart ja L. Tang. 2007. Phagocyte responses to degradable polymers. *J. Biomed. Mater. Res.* 82A: 492-496.
- Katzer, A., H. Marquardt, J. Westendorf, J.V. Wening, ja G. von Foerster. 2002. Polyetheretherketone-cytotoxicity and mutagenicity in vitro. *Biomaterials*. 23: 1749–1759.
- Kohn, J., S. Abramson ja R. Langer. 2004. Classes of material used in medicine: bioresorbable and bioerodible materials. In *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 115-127.
- Kulkarni, R.K., E.G. Moore, A.F. Hegyeli ja F. Leonard. 1971. Biodegradable polylactic acid polymers. *J. Biomed Mater Res.* 5: 169.
- Kuroda, K., R. Tsukifuji ja H. Shinkai. 1998. Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 111: 1023-1028.
- Kuroda, K ja S. Tajima. 2004. HSP47 is a useful marker for skin fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J. Cutan. Pathol.* 31:241-246.

- Laine, P., R. Kontio, C. Lindqvist ja R. Suuronen. 2004. Are there any complications with bioabsorbable fixation devices? A 10 year review in orthognathic surgery. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33: 240–244.
- Lee, C.G., HR. Kang, R.J. Homer, G. Chupp ja J.A. Elias. 2006. Transgenic modelling of transforming growth factor- β : Role of apoptosis in fibrosis and alveolar remodelling. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3:418-423.
- Lenting, P.J., J.A. van Mourik ja K. Mertens. 1998. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. *Blood.* 92: 3983-3996.
- Li, D.J., K. Ohsaki, K. Ii, P-C. Cui, Q. Ye, K. Baba, Q-C. Wang, S. Tenshin ja T. Takano-Yamamoto. 1999. Thickness of fibrous capsule after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. *J. Biomed. Mater. Res.* 45: 322-326.
- Long, M. ja H.J. Rack. 1998. Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. *Biomaterials.* 19:1621-1639.
- Marti, A. 2000. Cobalt-base alloys used in bone surgery. *Injury.* 31:18-21.
- Maurus, P.B. ja C.C. Kaeding. 2004. Bioabsorbable implant material review. *Oper. Tech. Sports Med.* 12:158-160.
- Meneghin, A. ja C.M. Hogaboam. 2007. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J. Clin. Invest.* 117: 530–538.
- Migliaresi C. ja H. Alexander. 2004. Classes of material used in medicine: composites. In *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine.* 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 181-197.
- Mikos, A.G. ja J.S. Temenoff. 2000. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electron. J. Biotechnol.* doi: 10.2225/vol3-issue2-fulltext-5.
- Mutsaeres, S.E., J. E. Bishop, G. McGrouther ja G. J. Laurent. 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 5-17.
- Nagai, N., M.Hosokawa, S.Itohara, E. Adachi, T.Matsushita, N.Hosokawa ja K.Nagata. 2000. *J. Cell Biol.* 150:1499-1506.
- Niemelä, T. 2005. Effect of b-tricalcium phosphate addition on the in vitro degradation of self-reinforced poly-L,D-lactide. *Polym. Degrad. Stab.* 89:492-500.
- Nieminen, T., I. Kallela, J. Keränen, I. Hiidenheimo, K. Kainulainen, E. Wuolijoki ja I. Rantala. 2006. In vivo and in vitro degradation of a novel bioactive guided tissue regeneration membrane. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 35:727-732.
- Nieminen, T., I. Kallela, E. Wuolijoki, H. Kainulainen, I. Hiidenheimo ja I. Rantala. 2007a. Amorphous and crystalline polyetheretherketone: mechanical properties and tissue reactions during a 3-year follow-up. *J. Biomed. Mater. Res A.* doi: 10.1002/jbm.a.31310.
- Nieminen, T., I. Rantala, I. Hiidenheimo, J. Keränen, H. Kainulainen, E. Wuolijoki ja I. Kallela. 2007b. Degradative and mechanical properties of a novel resorbable plating system during a 3-year follow-up in vivo and in vitro. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* doi:10.1007/s10856-007-3082-x.
- Peltoniemi, H., N. Ashammakhi, R. Kontio, T. Waris, A. Salo, C. Lindqvist, K. Graütz ja R. Suuronen. 2002. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 94: 5-14.
- Petrovic, L., D. Pohle, H. Münstedt, T. Rechtenwald, K. A. Schlegel1 ja S. Rupprecht. 2006. Effect of bTCP filled polyetheretherketone on osteoblast cell proliferation in vitro. *J Biomed Sci.* 13:41–46.

- Prokop, A., A. Jubel, H.J. Helling, T. Eibach, C. Peters, S.E. Baldus ja K.E.Rehm. 2004. Soft tissue reactions of different biodegradable polylactide implants. *Biomaterials*. 25:259-267.
- Ratner, B.D. 2004. A history of biomaterials. In Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 10-19.
- Ratner, B.D., A.S. Hoffman, F.J. Schoen ja J.E. Lemons. 2004. Biomaterials science: a multidisciplinary endeavour. In Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 1-9.
- Rezwan, K., Q.Z. Chena, J.J. Blakera ja A. R. Boccaccinia. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 27:3413-3431.
- Sanders, J.E., C.E. Stiles ja C.L. Hayes. 2000. Tissue response to single-polymer fibers of varying diameters: Evaluation of fibrous encapsulation and macrophage density. *J. Biomed.Mater. Res.* 52: 231–237.
- Sanders, J.E. ja J.R.Rochefort. 2003. Fibrous encapsulation of single polymer microfibers depends on their vertical dimension in subcutaneous tissue. *J. Biomed. Mater. Res.* 67A: 1181-1187.
- Scharffetter-Kochanek, K., P. Klaine ja T. Krieg. 1998. Cellular and molecular mechanisms of tissue repair. *Basic Res. Cardiol.* 93: 1 – 3.
- Schmitt, E.E. ja R.A. Polistina. 1969. Polyglycolic acid prosthetic devices. *U.S. Pat.*3,463,158.
- Scholzen, T. ja J. Gerdes. 2000. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol.* 182: 311-322.
- Scotchford, C.A., M.J.Garle, J. Batchelor, J. Bradley ja D.M. Grant. 2003. Use of a novel carbon fibre composite material for the femoral stem component of a THR system: in vitro biological assessment. *Biomaterials*. 24: 4871-4879.
- Simon, J.P. ja G. Fabry. 1991. An overview of implant materials. *Acta Orthop. Belg.* 57:1-5.
- Singer, A.J. ja R.A.F. Clark. Cutaneous wound healing. 1999. *N. Engl. J.Med.* 341: 738-746.
- Spector, M. 2006. Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss Med. Wkly.* 136:293-301.
- Suh, H. 1998. Recent advances in biomaterials. *Yonsei Med. J.* 39: 87-96.
- Taddei, P., A. Tinti ja G. Fini. 2001. Vibrational spectroscopy of polymeric biomaterials. *J. Raman Spectrosc.*32:619-629.
- Toth, J.M., M. Wang, B.T. Estes, J.L. Scifert, H.B. Seim III ja A.S. Turner. 2006. Polyetheretherketone as a biomaterial for spinal applications. *Biomaterials*. 27: 324-334.
- Tumpo, P. 2004. Bioabsorbable implants in knee surgery: An experimental and clinical study. Tohtorin väitöskirja. Helsingin Yliopisto. Yliopistopaino.
- Törmälä, P. (toim.) 2003. Yleiskatsaus terveydenhuollon laitteissa ja tarvikkeissa käytettyihin biomateriaaleihin. Lääkelaitoksen julkaisusarja. 3, osa 1.
- Yannas, I.V. 2004. . Classes of material used in medicine: natural materials. In Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine. 2. painos. B.D. Ratner, A.S. Hoffmann, F.J. Schoen ja J.E. Lemons, toimittajat. Elsevier Academic Press. 127-137.
- Wang, M. 2003. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 24:2133-51.

- Waris, E., N. Ashammakhi, V. Waris, W., Serlo, R. Suuronen, P. Törmälä, Y.T. Konttinen ja S. Santavirta. 2004. Biohajoavien kiinnittimien käyttö luukirurgiassa. *Duodecim*. 120:673-681.
- Weiler, A., H-J. Helling, U. Kirch, T.K. Zirbes ja K.E. Rehm. 1996. Foreign-body reaction and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation. Experimental study in sheep. *J. Bone Joint Surg. Br.* 78:69-76.
- Wenz, L.M., K. Merritt, S. A. Brown, A. Moet ja A. D. Steffee. 1990. In vitro biocompatibility of polyetheretherketone and polysulfone composites. *J. Biomed. Mater. Res.* 24:207-215.
- Wuisman, P.I.J.M. ja T.H. Smit. 2006. Bioresorbable polymers: heading for a new generation of spinal cages. *Eur. Spine J.* 15: 133-148.