

**Maidon proteiinifraktioiden vaikutus
ihmisen luuydinperäisten mesenkymaalisten kantasolujen
kuntoon ja luusoluerilaistumiseen**



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Elisa Lehtilahti

Pro Gradu

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

14.5.2012

Alkusanat

Tämä *Pro gradu* – tutkielma tehtiin Oulun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan biolääketieteenlaitoksella ja Oulun yliopistollisen sairaalan Kliinisen tutkimuskeskuksen yksikössä. Työ ajoittui syksyyn 2010. Tutkimus oli osa TEKES – rahoitettua Turun yliopiston ja Oulun yliopiston yhteishanketta. "Fysiologisesti aktiivisten maitoproteiinien hyödyntäminen tuotekehityksessä" – hanke, johon osallistui tutkimusosapuolien lisäksi yrityksenä Valio Oy, jota haluamme erityisesti kiittää tässä yhteydessä. Lisäksi on syytä kiittää hedelmällisestä yhteistyöstä Jessica Wallia, Jorma Määttäa sekä Kalervo Väänästä, joilta saimme hyvien ideoiden lisäksi puhdistetut kasvutekijät testattavaksemme.

Suuret kiitokset professori Petri Lehenkarille mahdollisuudesta tehdä lopputyöni ryhmässäsi ja tuesta, jonka annoit lopputyöni tekemiseen ja opintojeni loppuun saattamiseen. Haluaisin kiittää lämpimästi ohjaajaani Siri Lehosta tärkeästä henkisestä tuesta ja hyvästä ohjauksesta projektin aikana. Haluaisin myös kiittää laboratoriohitoijaamme Minna Savilampea antamastasi tuesta ja avusta. Loistava huumorisi ja elämänasenteesi teki pisimmistäkin soluviljelypäivistä rennompia. Lisäksi haluaisin kiittää Mika Pietilää pyyteettömästä avusta kuntotestien parissa.

Haluan kiittää koko sydämestäni avomiestäni, Ollia, tuesta ja rakkaudesta, jonka minulle annat joka ikinen päivä. Hämmästyttävä elämänasenteesi ja loistava huumorisi parantavat jopa kaikista väsyneimmät päivät ja palauttavat minut maan pinnalle, kun sitä kipeimmin tarvitsen. Erityisesti haluan kiittää isosiskoani Elinaa, joka jaksoi olla hämmästyttävän kiinnostunut tästä projektista koko sen ajan. Kiitos korvaamattomasta tuesta, jonka minulle annat elämän pieninä ja suurina hetkinä vuoden jokaisena päivänä. Haluan kiittää koko sydämestäni ihanaa perhettäni, erityisen rakasta Verna-mummoa, ystäviäni ja sukulaisiani tuesta, jonka olette minulle antaneet kaikkien näiden vuosien aikana. Lisäksi haluan kiittää suuresti ystävääni Katria, joka kielipoliisina työnsi lopputyöni putkesta ulos.

Viimeisenä haluan kiittää isääni, joka halusi kouluttaa minut ammattiin. Kiitos elämän eväistä ja ohjeista, jotka minulle annoit. Kuljet aina mukanani minne ikinä menenkin.

Oulussa 14.5.2012

Elisa Lehtilahti

Tekijä:	Elisa Lehtilahti	
Tutkielman nimi:	Maidon proteiini-fraktioiden vaikutus ihmisen luuydinperäisten mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon ja luusoluerilaistumiseen	
English title:	Effect of milk protein fractions on viability and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells	
Päivämäärä:	14.5.2012	Sivumäärä: 65 + 7
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Molekyylibiologia	
Tutkielman ohjaajat:	FT Siri Lehtonen ja Prof. Petri Lehenkari	

Tiivistelmä:

On yleisesti tiedossa, että maito on terveellistä ja parantaa luun kestävyttä. Tutkimusten perusteella osa maidon proteiineista lisää luuta muodostavien osteoblastien määrää ja ehkäisee luun haurastumista estämällä esiosteoklastien erilaistumista luuta hajottaviksi osteoklasteiksi. Osteoblastit erilaistuvat multipotenteista mesenkymaalisisista kantasoluista. Tällöin maidon proteiineilla saattaa olla fysiologinen rooli luun kasvamisessa ja paranemisessa. Maidon proteiineilla voi olla myös terapeuttinen vaikutus osteoporoosin anabolisena tekijänä.

Tutkimus oli osa Valion ja Turun yliopiston yhteistyöprojektia. Tutkimuksen tarkoituksena oli testata maidon seitsemän proteiini-fraktion vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen. Tarkoituksena oli löytää maidon proteiineja, jotka edistävät luun vahvistumista ja luusolujen kasvua. Kuntotestien avulla haluttiin selvittää maidon proteiini-fraktioiden vaikutuksia kantasolujen kuntoon. Kuntotestejä tehtiin 13:lle maidon proteiini-fraktiolle.

P4:n, V30 lämpökäsitellyn ja ei-lämpökäsitellyn (V30 lämpö ja ei-lämpö), V50 lämpökäsitellyn ja ei-lämpökäsitellyn (V50 lämpö ja ei-lämpö), Valion kaseiiniton kaseiini-fraktion (WPC) ja Valion natiivi heraproteiini-fraktion (VNH) vaikutuksia tutkittiin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen. Alkalisen fosfataasin spesifinen aktiivisuus ja muodostuneen kalsiumin määrää mitattiin luusoluerilaistumiskasvatuksista. Maidon proteiinien vaikutuksia mesenkymaalisiin kantasoluihin tutkittiin jo aiemmin ryhmässämme optimoidulla kuntotestillä. Edellä mainittujen proteiini-fraktioiden lisäksi kuntotesteihin otettiin mukaan α -laktalbumiini, β -laktoglobuliini, laktoferrini, heran kasvutekijät (WGF), GMP ja natiivi heraproteiini-fraktio (NWP). Kuntotestissä käytettiin 5,5',6,6'-tetrakloori-1,1',3,3'-tetraetyylibenzenimidazolihiihliisyanidi jodia (JC-1), joka aggregoituu hyväkuntoisten kantasolujen mitokondrioon. Mitokondrion depolarisaation aikana JC-1 vapautuu solulimaan ja muodostaa monomeerejä. JC-1 aggregaatit ja monomeerit emittoivat eri aallonpituuksilla jolloin tulokset mitattiin virtausytometrillä. Tulokset analysoitiin FlowJo – ohjelmalla.

Kuntotestien perusteella maidon α -laktalbumiini ($p=0.01$), β -laktoglobuliini ($p=0.001$), P4- ($p=0.01$), V30 lämpö- ($p=0.05$), V50 lämpö- ($p=0.01$) ja ei-lämpö- ($p=0.001$), VNH- ($p=0.001$), WGF- ($p=0.001$) ja GMP- ($p=0.05$) proteiini-fraktiot paransivat mesenkymaalisten kantasolujen kuntoa. Laktoferrinillä, V30 ei-lämpö-, WPC-, ja NWP- proteiini-fraktioilla ei ollut vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon. Luusoluerilaistumistestien perusteella VNH- proteiini-fraktio näyttäisi lisäävän mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumista suurimmilla pitoisuuksilla ja V50 ei-lämpö- proteiini-fraktio näyttäisi estävän mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumista.

Osa maidon proteiini-fraktioista näyttäisi parantavan mesenkymaalisten kantasolujen kuntoa jo valmiiksi hyväkuntoisilla soluilla. Voi olla mahdollista, että maidon proteiini-fraktiot voivat myös parantaa huonokuntoisten solujen elinkykyisyyttä. Luusoluerilaistumistestien tulokset olivat osittain ristiriitaisia ja lopullisten johtopäätöskien tekemiseen tarvitaan lisää määrittäisiä.

Avainsanat: maidon proteiinit, heraproteiinit, mesenkymaaliset kantasolut, luusoluerilaistuminen, osteoblastit

Author: Elisa Lehtilahti
Title of thesis: Effect of milk protein fractions on viability and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells
Finnish title: Maidon proteiinifraktioiden vaikutus ihmisen luuydinperäisten mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon ja luusoluerilaistumiseen
Date: 14.5.2012 **Pages:** 65 + 7
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular Biology
Supervisors: Ph.D Siri Lehtonen and Prof. Petri Lehenkari

Abstract:

It is generally known that milk is healthy and it improves strength of the bone. Some refined milk proteins are known to improve bone strength and formation by enhancing osteoblast proliferation and to reduce bone resorption by inhibiting osteoclast proliferation. In the body osteoblasts are formed from multipotent mesenchymal stem cells. Thus milk proteins have a physiological role in bone growth and healing and might have a potential therapeutic role as an anabolic factor in osteoporosis.

This project was co-operation work with Valio and university of Turku. Aim of the study was test milks seven proteinfractions potential to enhance osteoblast proliferation. The purpose was to find milk proteins which enhance proliferation of mesenchymal stem cells. Viability of the mesenchymal stem cells were tested 13 milk proteinfractions.

In osteoblast differentiation test P4, V30 heat and not-heat treated (V30 heat and not-heat), V50 heat and not-heat treated (V50 heat and not-heat), Valios native whey (VNH) and Valios caseinfraction without casein (WPC) proteinfractions were tested in cell culture. Alkaline phosphatase specific activity and calcium measurements were used to study milk proteinfractions influence on the osteoblastic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. We used viability test to proteinfractions which were earlier mentioned in osteoblast differentiation test and α -lactalbumin, β -lactoglobulin, lactoferrin, whey growth factor (WGF), GMP and native whey proteinfractions (NWP). Viability test is early optimized in our group. Flow cytometric measurement of 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodine (JC-1) was employed to determine viability of milk proteinfractions treated mesenchymal stem cells. JC-1 accumulates in the mitochondria when mesenchymal stem cells are in good condition. Upon depolarization of mitochondria JC-1 form monomers. Aggregates and monomers emit different wavelength which can be detected with flowcytometry. We analyze results by FlowJo – program.

Based on viability studies, it seems that α -lactalbumin ($p=0.01$), β -lactoglobulin ($p=0.001$), P4 ($p=0.01$), V30 heat ($p=0.05$), V50 heat ($p=0.01$) and not-heat ($p=0.001$), VNH ($p=0.001$), WGF ($p=0.001$) and GMP ($p=0.05$) proteinfractions improve viability of mesenchymal stem cells. Lactoferrin, V30 not-heat, WPC, and NWP proteinfractions did not have influence on mesenchymal stem cells. Osteoblast differentiation tests suggest that VNH proteinfraction might promote osteoblast differentiation whereas V50 not-heat proteinfraction seems to inhibit osteoblast proliferation.

It seems that milk proteinfractions further improve viability of the mesenchymal stem cells that already have in good viability. It is also possible that milk proteinfractions could rescue stressed mesenchymal stem cells having poor viability. Results of differentiation tests were partly conflicting thus requiring more experiments.

Keywords: milk proteins, whey proteins, mesenchymal stem cells, osteoblast differentiation, osteoblasts

Sisällysluettelo

Alkusanat

Tiivistelmä

Sisällysluettelo

Lyhenteet

1. Johdanto	8
1.1 Kantasolut	8
1.2 Luu	10
1.2.1 Osteoblastit ja osteosyytit.....	13
1.2.2 Osteoklastit	15
1.3 Lehmän maito ja ternimaito	16
1.4 Maidon proteiinit.....	18
1.4.1 Kaseiinit.....	19
1.4.2 Heraproteiinit.....	19
1.4.2.1 β -laktoglobuliini.....	19
1.4.2.2 α -laktalbumiini.....	20
1.4.2.3 Laktoferriini	21
1.4.2.4 Naudan seerumin albumiini (BSA).....	21
1.4.2.5 Immunoglobuliinit	22
1.4.2.6 Laktoperoksidaasi	23
1.4.3 Maidon kasvutekijät	23
1.4.4 Maidon sytokiinit.....	25
1.5 Heraproteiinien vaikutukset luuhun	25
2. Tutkielman tarkoitus	28
3. Materiaalit ja menetelmät.....	29
3.1 Mesenkymaalisten kantasolujen eristäminen ja soluviljely	29
3.2 Maidon proteiinifraktiot	30

3.3 Mesenkymaalisten kantasolujen erilaistaminen osteoblasteiksi	34
3.3.1 Alkalisen fosfaatin spesifisen aktiivisuuden määrittäminen	34
3.3.1.1 Aktiivisuusmäärittäminen	35
3.3.1.2 Proteiiniinimäärittäminen	35
3.3.1.3 Alkalisen fosfaatin spesifisen aktiivisuuden laskeminen	35
3.3.2 Kalsiumin pitoisuuden määrittäminen	36
3.4 Kuntotesti	37
3.5 Tulosten tilastollinen käsittely	39
4. Tulokset	40
4.1 Kuntotesti	40
4.2 Alkalisen fosfaatin spesifisen aktiivisuuden ja kalsium pitoisuuden tulokset	41
4.2.1 P4 proteiiniinifraktio	42
4.2.2 Valion 30 lämpökäsitelty proteiiniinifraktio	44
4.2.3 Valion 30 ei-lämpökäsitelty proteiiniinifraktio	46
4.2.4 Valion 50 lämpökäsitelty proteiiniinifraktio	48
4.2.5 Valion 50 ei-lämpökäsitelty proteiiniinifraktio	50
4.2.6 Valion kaseiiniton kaseiiniinifraktio	52
4.2.7 Valion natiivi heraproteiiniinifraktio	54
4.2.8 Yhteenvertausta luusoluerilaistumismäärittämisestä	55
5. Tulosten tarkastelu	58
6. Lähdeluettelo	66

Lyhenteet

AFOS	Alkalinen fosfataasi (<i>engl.</i> alkaline phosphatase)
BSA	Naudan seerumin albumiini (<i>engl.</i> bovine serum albumin)
CCCP	Karboxyylisyaanidi 3-kloorifenyylihydraatsoni (<i>engl.</i> Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone)
FGF	Fibroblastikasvutekijä (<i>engl.</i> fibroblast growth factor)
IGF	Insuliinin kaltainen kasvutekijä (<i>engl.</i> insulin-like growth factor)
JC-1	5,5',6,6'-tetrakloori-1,1',3,3'-tetraetylibenzimidazolihiiisyaanidi jodi (<i>engl.</i> 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbo-cyanine iodine)
NWP	Natiivi heraproteiini-fraktio (<i>engl.</i> Native whey protein)
OS	Luusoluerilaistamiskasvatusliuos
OVX	Munasarjat on poistettu (<i>engl.</i> ovariectomized)
p	Kantasolujen juokseva siirrostusnumero (<i>engl.</i> passage)
PM	Kasvatusliuos (perusmedium)
V30 lämpö	Valion 30 lämpökäsitelty proteiini-fraktio
V30 ei-lämpö	Valion 30 proteiini-fraktio, jolle ei ole tehty lämpökäsittelyä
V50 lämpö	Valion 50 lämpökäsitelty proteiini-fraktio
V50 ei-lämpö	Valion 50 proteiini-fraktio, jolle ei ole tehty lämpökäsittelyä
VNH	Valion natiivi heraproteiini-fraktio
WPC	Valion kaseiiniton kaseini-fraktio
WGF	Heran kasvutekijät (<i>engl.</i> Whey growth factor)

1. Johdanto

1.1 Kantasolut

Alkion kantasolut ovat erilaistumattomia soluja, joilla on kyky jakaantua ja säilyä erilaistumattomina pitkiäkin aikoja. Ne kykenevät erilaistumaan miksi tahansa aikuisen yksilön soluiksi kuten esimerkiksi luun, ihon ja veren soluiksi. Alkion kantasoluista poiketen aikuisten kantasolut kykenevät erilaistumaan vain tietyiksi solutyypeiksi. Kantasolut muuttuvat erilaistuneiksi solutyypeiksi ja siitä edelleen kudoksiksi saadessaan erilaisia ärsykeitä ympäristöstään. Kantasoluja on löydetty varhaisvaiheen alkioista, sikiön eri kudoksista, napaverestä ja aikuisen yksilön useista eri kudoksista. Aikuisen kantasoluja on sekä multipotentteja kantasoluja, jotka voivat muodostaa erilaisia solutyyppejä erilaistumisalueensa sisällä että unipotentteja kantasoluja, jotka kykenevät muodostamaan vain yhdenlaisia soluja. Tyypillisesti aikuisen kantasolut kehittyvät välivaiheen kautta kohdesoluksi. Välivaiheen soluja kutsutaan esiastesoluiksi. Esiastesolut ovat jo osin erilaistuneet ja jatkavat jakautumista ja erilaistumista täysin erilaistuneiksi kypsiksi soluiksi (ks. katsausartikkeli Robey, 2000).

Totipotentteja kantasoluja ovat hedelmöittyneen munasolun (morula) tytärsolut, joilla on kyky erilaistua miksi tahansa elimistön solutyypiksi. Morulan yksi totipotentti kantasolu kykenee muodostamaan uuden täydellisen yksilön, mihin tarvitaan sikiökalvojen ja istukan muodostuminen. Alkion pluripotentti kantasolu on useakykyinen kantasolu, joka kykenee muodostamaan vain varsinaisen alkion kudokset. Blastokystivaiheen alkiossa ja noin viiden päivän ikäisessä alkiossa on pluripotentteja kantasoluja. Ne kykenevät erilaistumaan miksi tahansa aikuisen yksilön solutyypiksi. Aikuisen yksilön kantasolut ovat multipotentteja kantasoluja jotka kykenevät erilaistumaan usean eri kudostyyppin soluiksi. Aikuisen kantasoluja löytyy useista ihmisen kudoksista kuten maksasta, haimasta, lihaksesta, ihosta, aivoista ja luuytimeistä.

Luuytimessä on runsaasti verisolujen kantasolumuotoja eli hematopoieettisia kantasoluja, joista muodostuu mm. punasoluja, valkosoluja ja verihiutaleita. Luuytimessä on lisäksi myös stroomasoluja eli mesenkymaalisia kantasoluja. Luuydinperäiset mesenkymaaliset kantasolut ovat multipotentteja kantasoluja, jotka kykenevät erilaistumaan mm. osteoblasteiksi eli luuta muodostaviksi soluiksi, kondrotyyteiksi eli rustosoluiksi,

adiposyyteiksi eli rasvasoluiksi (Jones ym., 2002), tendosyyteiksi eli jännesoluiksi, myosyyteiksi eli lihassoluiksi, luuytimen sidekudokseksi ja neuroneiksi eli hermosoluiksi (Minguell ym., 2001). Mesenkymaaliset kantasolut ovat harvinaisempia luuytimessä kuin hematopoieettiset kantasolut. Mesenkymaalisia kantasoluja on yksi 100 000:aa luuytimen solua kohden (Baksh ym., 2004). Luuydinnäytteestä pystytään erottamaan mesenkymaaliset kantasolut hematopoieettisista kantasoluista viljelemällä luuytimeä otettua kantasolunäytettä kasvatusliuoksessa. Mesenkymaalisilla kantasoluilla on kyky tarttua soluviljelypullon pohjalle kun taas hematopoieettisilla kantasoluilla ei (Mendelow ym., 1980).

Mesenkymaalisia kantasoluja on monenlaisissa kudoksissa. Alun perin Friedenstein ryhmäläisineen eristivät mesenkymaalisia kantasoluja luuytimeä ja pernan ja kateenkorvan stroomasta (Friedenstein ym., 1966; Friedenstein ym., 1976). Nykyään luuytimen ajatellaan olevan runsain ja parhaiten saatavilla oleva mesenkymaalisten kantasolujen lähde (Tuli ym., 2003). Mesenkymaalisia kantasoluja on löydetty myös sikiön kudoksista, istukasta, napanuoran verestä ja verisuonista (in 't Anker ym., 2003; Hu ym., 2003; Romanov ym., 2003).

Mesenkymaalisten kantasolujen muovautuvuus ja uusiutuvuuskapasiteetti (*engl.* self-renewal) antavat valtavat mahdollisuudet tuhoutuneiden kudosten tai elinten kliiniseen korjaamiseen. Vaikka tietämys mesenkymaalisten kantasolujen jakautumisesta ja erilaistumisesta on vähäistä, mesenkymaalisista kantasoluista on tullut tärkeä apuväline kudosten korjaamisen tutkimukseen ja mesenkymaalisia kantasoluja pidetään potentiaalisena vaihtoehtona useisiin kliinisiin sovelluksiin. Joitakin kliinisiä kokeita mesenkymaalisten kantasolujen käytöstä on jo tehty ja rohkaisevia tuloksia on julkaistu esimerkiksi sääriluun synnynnäisessä pseudoartroosissa (*engl.* congenital pseudarthrosis of the tibia) (Tikkanen ym., 2010), synnynnäisessä luutumisvajauksessa (*engl.* oteogenesis imperfecta) (Horwitz ym., 2002; Le Blanc ym., 2005) ja metakromaattisessa leukodystrofiassa (*engl.* metachromatic leukodystrophy) (Koc ym., 2002). Pseudoartroosi on luunmurtuman jälkitila, jossa murtumapinnat eivät ole luutuneet yhteen, vaan liikkuvat toisiinsa nähden kuin esimerkiksi nivelesessä. Synnynnäinen luutumisvajausta on ryhmä perinnöllisiä sidekudostauteja, joissa kollageenin kypsyminen ja luun muodostuminen ovat hidastuneet. Synnynnäinen luutumisvajausta aiheuttaa mm. luustoepämuodostumia ja jopa pienestä tönäisystä syntyviä murtumia. Metakromaattinen leukodystrofia on harvinainen

peittyvästi periytyvä keskushermostotauti, jossa on ominaista henkinen taantuminen, serebrosidisulfaatin kertyminen kudoksiin, spastiset eli jäykkähalvaukset ja ataksia eli haparointi, hapuilu.

1.2 Luu

Luu ja rusto muodostavat luuston, jonka päätehtävä on tukea ja suojata elintärkeitä sisäelimiä mahdollistaen samalla liikkumisen lihasten avulla. Luusto toimii myös kalsiumin ja fosfaattien varastona, josta tarvittaessa säädellään veriplasman elektrolyyttejä. Luu on huokoinen mineralisoitunut rakenne, joka koostuu soluista, kalsium- ja fosfaattiyhdisteiden kiteistä eli hydroksiapatiitista (*engl.* hydroxyapatites) ja verisuonista. Luun rakenteelliset rakenneosat koostuvat solun ulkoisesta soluväliaineesta (*engl.* extracellular matrix), kollageenista ja soluista. Ihmisen täysin kehittyneessä luustossa on kahdentyyppistä luuta: kortikaalinen luu eli luun kuorikerros ja trabekulaarinen luu eli hohkaluu. Luun kuorikerros muodostaa tiheän ja tiiviin uloimman kerroksen suurimmalla osalla luista. Koko elimistön luustosta 80 % on luun kuorikerrosta ja 20 % hohkaluuta. Hohkaluuta on luun kuorikerroksen sisällä. Hohkaluu on harvempaa, joustavampaa ja uudistuu nopeammin kuin luun kuorikerros ja sillä onkin suurempi aineenvaihdunnallinen tehtävä.

Luu koostuu kolmenlaisista luusoluista: osteoblasteista, osteosyyteistä ja osteoklasteista. Näillä kolmella luusolulla on omat tehtävänsä luun rakentamisessa, ylläpidossa ja hajottamisessa. Luusto on aineenvaihdunnallisesti hyvin aktiivista. Se uudistuu koko eliniän ajan. Luun uudistuessa osteoklastit hajottavat mineralisoituneen luun. Osteoblastit taas muodostavat luun soluväliaineen (*engl.* bone matrix), joka mineralisoituu. Syntyvän luukudoksen keskelle jääviä osteoblasteja kutsutaan osteosyyteiksi. Luun uudistuminen on monimutkainen ja tarkoin säädelty järjestelmä.

Luun muodostuminen on riippuvainen usean eri asian yhteistyöstä. Nämä asiat ovat esimerkiksi spesifiset solut kuten mesenkymaaliset kantasolut ja osteoklastit sekä hydroksiapatiitti ja soluväliaineen molekyylit, liukoisten molekyyliden kuten kasvutekijöiden, hormonien, sytokiiniinien, vitamiinien ja ionien ekspressio ja useat mekaaniset ärsykkeet (ks. katsausartikkeli Deschaseaux ym., 2009)

Eri kasvutekijät vaikuttavat myös luun kasvuun ja paranemiseen. Kasvutekijät ovat solun pinnan reseptoreihin sitoutuvia proteiineja tai polypeptidejä, jotka aktivoivat solujakautumista ja/tai erilaistumista. Monet kasvutekijät ovat monipuolisia ja stimuloivat useiden solutyypin jakautumista kun taas toiset kasvutekijät ovat spesifisiä tietyille soluille. Kasvutekijät sitoutuvat kohdesolun reseptoriin ja aiheuttavat solun sisäisen signaalin siirtymisen tumaan. Tumassa signaali saa aikaan halutun vasteen. Yksi kasvutekijä voi sitoutua useisiin reseptoreihin. Kasvutekijät vaikuttavat autokriinisesti, parakriinisesti ja/tai endokriinisesti. Autokriinisessä viestinnässä solu vapauttaa aineita, jotka vaikuttavat sen omaan toimintaan. Parakriinisessä viestinnässä viestimolekyylit vapautuvat paikallisesti ja voivat siirtyä solusta toiseen. Endokriinisessä viestinnässä umpieritysrauhasten tuottamat hormonit erittyvät verenkiertoon ja jakaantuvat siten joka puolelle kehoa. Tärkeimmät kasvutekijät, jotka vaikuttavat luustoon, ovat luun morfogeneettiset proteiinit (*engl.* bone morphogenetic proteins), verisuonen endoteelin kasvutekijä (*engl.* vascular endothelial growth factor), verihiutalekasvutekijä, transformoiva kasvutekijä- β , fibroblastikasvutekijä (*engl.* fibroblast growth factor, FGF) ja insuliinin kaltainen kasvutekijä (*engl.* insulin-like growth factor, IGF) (Taulukko 1). Näistä kasvutekijöistä verihiutalekasvutekijää, transformoivaa kasvutekijä- β :a, insuliininkaltaista kasvutekijää (Belford ym., 1997) ja FGF:ä (Rogers ym., 1995; Hironaka ym., 1997) on lehmän maidossa. Taulukossa 1 on luuhun vaikuttavat kasvutekijät, niitä tuottavat solut, kasvutekijöiden biologiset vaikutukset ja vaikutukset luussa. Luun paranemisen aikana luun mikroympäristössä sijaitseva solut, kuten tulehdussolut, fibroblastit, endoteelisolut, luuytimen strooman solut ja osteoblastit tuottavat kasvutekijöitä (ks. katsausartikkeli Devescovi ym., 2008). Transformoiva kasvutekijä on muun muassa alkion solujen ja kasvainsolujen tuottama kasvuun ja erilaistumiseen vaikuttava sytokiini. FGF sisältää ryhmän peptidikasvutekijöitä, jotka muun muassa lisäävät verisuonten uudismuodostusta. Verihiutalekasvutekijä edesauttaa esimerkiksi haavassa olevien solujen jakautumista.

Taulukko 1. Luuhun vaikuttavat kasvutekijät, niitä tuottavat solut, biologinen vaikutus ja toiminta luustossa. IGF on insuliinin kaltainen kasvutekijä ja FGF on fibroblastikasvutekijä. Taulukko on muokattu Valentina Devescoviin katsausartikkelista Growth factors in bone repair.

Kasvutekijä	Tuottavat solut	Biologinen vaikutus	Toiminta luussa
Luun morfo- geneettiset proteiinit	Luun esisolut, osteoblastit, rustosolut, endoteelisolut	Rusto-osteogeneesi, osteoinduktio	Luun esisolujen migraatio, jakautumisen ja erilaistumisen induktio ja soluväliaineen synteesi
Verisuonen endoteelin kasvutekijä	Osteoblastit, verihiutaleet	Angiogeneesi	Ruston muuntaminen luuksi, osteoblastien jakautuminen ja erilaistuminen
Verihiutale- kasvutekijä	Verihiutaleet, osteoblastit, endoteelisolut, makrofaagit, monosyytit	Tukikudoksen solujen jakautuminen, monosyyttien/makrofaagien ja sileän lihaskudosten solujen kemotaksis, angiogeneesi	Luun esisolujen migraatio, jakautuminen ja erilaistuminen
Transformoiva kasvutekijä- β	Verihiutaleet, osteoblastit, luuytimen strooman solut, rustosolut, endoteelisolut, fibroblastit, makrofaagit	Immuunisuppressio eli immuunivasteen heikentäminen, angiogeneesi, solujen kasvun, erilaistumisen ja soluväliaineen synteessin stimulointi	Erilaistumattomien mesenkymaalisten kantasolujen jakautuminen, osteoblasti-esisolujen värvääminen; rustosolujen ja osteoblastien erilaistuminen (, mutta terminaalisen erilaistumisen estäminen), luun soluväliaineen tuottaminen, osteoblasti- esisolujen täydentäminen
Fibroblasti- kasvutekijä	Makrofaagit, monosyytit, luuytimen strooman solut, rustosolut, endoteelisolut, osteoblastit	Angiogeneesi, fibroblastien ja sileiden lihaskudoksen suonten solujen jakautuminen	Rustosolujen kypsyminen (FGF-1), osteoblastien jakautuminen ja erilaistuminen, epäkypsien osteoblastien apoptoosin estäminen, kypsien osteosyyttien apoptoosin induktoiminen, luun resorptio (FGF-2)
IGF	Osteoblastit, rustosolut, endoteelisolut, hepatosyytit	Kasvuhormonien vaikutusten säättely	Osteoblastien jakaantuminen ja luun soluväliaineen synteesi, luun resorptio

Ihmisten luun vaurioilla voi olla hyvin haitallinen vaikutus elämälle ja yhteiskunnalle. Monet ihmiset kärsivät luusairauksista ja luun murtumista, joista useat voisivat olla estettävissä. Siksi luun muodostumisen ja paranemisen mekanismien ymmärtäminen on hyvin tärkeää. Osteoporoosi eli luukato on yksi yleisistä varsinkin ikääntyvien ihmisten luun yleissairauksista. Osteoporoosissa luusto haurastuu normaalia enemmän luukudoksen vähentyessä ja luun kestävyuden heiketessä. Pienempää luun haurastumista kutsutaan osteopeniaksi. Luun haurastuminen aiheuttaa luunmurtumia, kuten lonkka- ja rannemurtumia, sekä selkänikamien painumista kokoon. Osteoporoosin hoidon lähtökohtana jokaisella potilaalla on elämäntapojen muutokset, kuten esimerkiksi tupakanpolton lopettaminen, alkoholin käytön vähentäminen ja liikunnan lisääminen ja D – vitamiinin ja kalsiumin käyttäminen lisäravinteena (ks. katsausartikkeli Rachner ym., 2011). Osteoporoosia hoidetaan myös lääkitsemällä. Osteoporoosin lääkehoito jaetaan kahteen luokkaan: anti-resorptiivisiin lääkkeisiin, jotka hidastavan luun hajoamista ja anabolisiin lääkkeisiin, jotka stimuloivat luun muodostumista (ks. katsausartikkeli Rachner ym., 2011).

1.2.1 Osteoblastit ja osteosyytit

Osteoblastit saavat alkunsa multipotenteista mesenkymaalisista kantasoluista, joilla on mahdollisuus erilaistua osteoblastien lisäksi rustosoluiksi, myoblasteiksi (lihassolun alkumuoto), rasvasoluiksi ja fibroblasteiksi (ks. katsausartikkeli Bianco ym., 2001). Osteoblastit sijaitsevat muodostuvan luun pinnalla. Osteoblastit tuottavat tyypin 1 kollageenia ja kalsiumia sitovia proteiineja kuten osteonektiiniä ja osteokalsiinia, jotka muodostavat luun matriksin eli soluväliaineen. Osteoidiksi kutsutaan mineralisoitumatonta soluväliainetta, jonka sisällä kulkee verisuonia. Osteoidien mineralisaation saavat aikaan osteoblastien erittämät vesikkelit, jotka sisältävät alkalista fosfataasi-entsyymiä (*engl.* alkaline phosphatase, AFOS). AFOSin vaikutuksesta kalsium- ja fosfaatti-ionit alkavat kiteytyä muodostaen hydroksiapatiittikiteitä kollageenisäikeiden väliin (ks. katsausartikkeli Hadjidakis ja Androulakis, 2006). Osteoblastit jäävät luutuvan soluväliaineen sisään, jonka jälkeen niitä kutsutaan osteosyyteiksi.

Osteosyytit ovat kypsiä, erilaistuneita luusoluja ja rakenteeltaan haaroittuneita. Osteosyytit vastaavat luukudoksen perusaineenvaihdunnasta eli ravinnon ja hapen saannista. Mineralisoitunut luu estää aineenvaihdunnan soluväliaineen läpi. Osteosyytit ovat

yhteydessä toisiinsa haaroittuneiden ulokkeiden kärjissä olevien aukkoliitosten avulla ja siten muodostavat tällöin koko luun kattavan verkoston.

Osteoblastit voivat tuottaa erilaisia kasvutekijöitä kuten insuliininkaltaista kasvutekijää (Canalis ym., 1993a), FGF:ä (Globus ym., 1989), verihiutalekasvutekijää (*engl.* platelet-derived growth factor) (Rydziel ym., 1994), transformoiva kasvutekijä- β :a (*engl.* transforming growth factor-beta) (ks. katsausartikkeli Canalis ym., 1993b) ja luun morfogeneettistä proteiinia (*engl.* bone morphogenetic proteins; BMP) (ks. katsausartikkeli Chen ym., 2004). Osteoblastien aktiivisuutta säädellään sekä autokriinisesti että parakriinisesti. Osteoblasteista on myös yleisesti tunnettujen hormonien reseptorit kuten lisäkilpirauhashormonin, lisäkilpirauhashormoniin liittyvän proteiinin, kilpirauhashormonin (Krieger ym., 1988), insuliinin (Levy ym., 1986), kasvuhormonin (Barnard ym., 1991), prolaktiinin (Clement-Lacroix ym., 1999) ja progesteronin eli keltarauhashormonin (Wei ym., 1993) reseptorit, joiden kautta osteoblastien toimintaa säädellään. Lisäkilpirauhashormonin tarkka vaikutusmekanismi osteoblasteihin ei ole tiedossa, mutta sen on todettu lisäävän niiden määrää ja edistävän kypsymistä (ks. katsausartikkeli Datta ja Abou-Samra, 2009). Osteoblastien tumassa on steroidihormonireseptoreita kuten mm. reseptorit estrogeenille (Eriksen ym., 1988), vitamiini D3:lle (ks. katsausartikkeli Minghetti ja Norman, 1988), androgeenille (Colvard ym., 1989) ja retinoidille (Kindmark ym., 1993).

Estrogeeni eli naishormoni säätelee naisille ominaisia sukupuoliominaisuuksia ja muun muassa kohdun ja limakalvojen toimintaa. Estrogeenin määrä vähenee naisilla heti synnytyksen jälkeen ja vaihdevuosien aikana. Etenkin vaihdevuosien aikana tapahtuvan estrogeenin vähenemisen ajatellaan olevan tärkeä seikka osteoporoosin kehittymisessä. Estrogeenillä on olennainen tehtävä luuston kasvamisessa ja luun homeostaasissa sekä miehillä että naisilla (ks. katsausartikkeli Weitzmann ja Pacifici, 2006).

Insuliini on elimistössä glukoosiaineenvaihduntaa säätelevä hormoni. Insuliini ja IGF vaikuttavat luustoon. Insuliinin ja/tai IGF:n on todettu stimuloivan osteoblastien jakautumista ja erilaistumista ihmisen osteoblastisolulinjalla (Yang ym., 2010), osteoblastin kaltaisilla soluilla (Kim ym., 2007) ja primaarisissa pargo (*engl.* sea bream) nimisen kalan osteoblastiviljelmissä (Capilla ym., 2011).

1.2.2 Osteoklastit

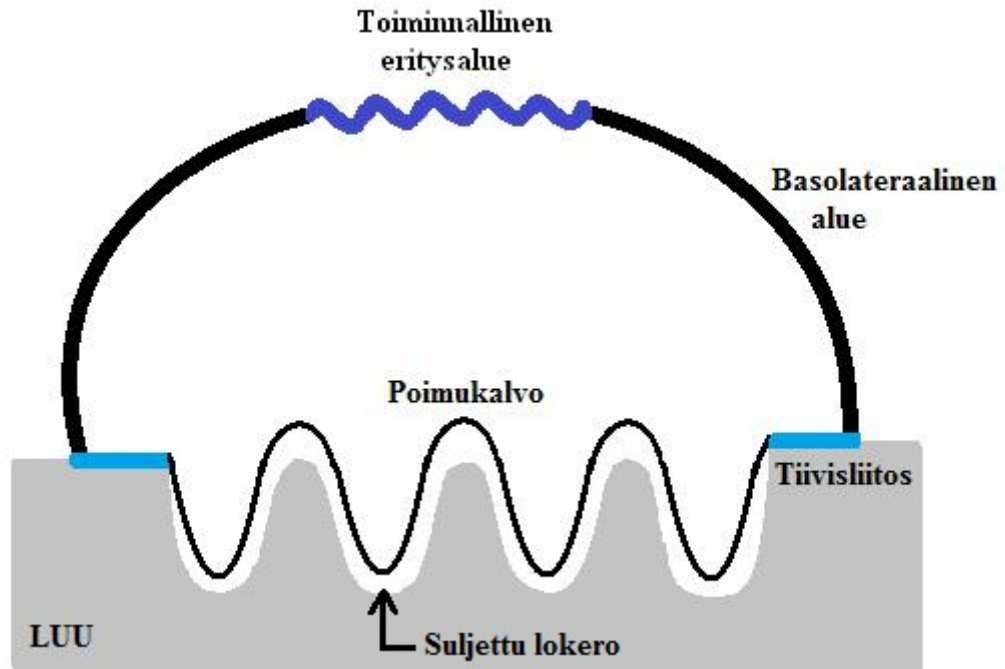
Osteoklastit ovat kudosspesifisiä, jättiläismäisiä, monitumaisia soluja, jotka ovat muodostuneet monosyytti-magrofaagilinjan kantasolujen muuttuessa esiosteoklasteiksi ja niiden yhdistyessä monitumaisiksi osteoklasteiksi. Osteoklastit sijaitsevat hajotettavan luun pinnassa. Osteoklasteista pystytään erottamaan sekä toiminnallisesti että rakenteellisesti erilaisia alueita. Kuvassa 1 näkyvät tiivis liitos (*engl.* sealing zone), poimukalvo (*engl.* ruffled border) ja toiminnallinen eritysalue sekä ns. basolateraalinen alue ja suljettu lokero. Tiiviin liitoksen avulla osteoklasti kiinnittyy luun pintaan. Poimukalvon kautta eritettävät entsyymit pääsevät luuta hajottavalle pinnalle suljettuun lokeroon. Toiminnallisen eritysalueen kautta solun läpi kulkenut hajotettu luumateriaali vapautuu (transsytoosi) solun ulkoiseen tilaan.

Osteoklastien muodostuminen eli osteoklastogeneesi on monimutkainen järjestelmä. Osteoklastogeneesiä säätelevät yhdessä mm. tuumorinekroositekijän (*engl.* tumor necrosis factor) reseptorit, tuumorinekroositekijän kaltaiset proteiinit: osteoprotegeriini (*engl.* osteoprotegerin), tumatekijä- κ B:n (*engl.* nuclear factor; NF) reseptorin aktivoija (*engl.* receptor activator of nuclear factor- κ B; RANK) ja RANK ligandi (RANKL) (ks. katsausartikkeli Boyle ym., 2003).

Osteoklastit erittävät erilaisia luuta hajottavia entsyymejä. Osteoklastit valmistavat aktiivisesti lysosomaalisia entsyymejä kuten tartraatti-kestävää fosfataasi-happoa (*engl.* tartrate-resistant acid phosphatase) ja katepsiini K:ta, jotka eritetään aktivoituneen osteoklastin poimukalvon kautta suljettuun lokeroon, jossa luuta hajotetaan (Vaananen ym., 2000). Katepsiini on eläinkudoksen endopeptidaasi, joka mm. osallistuu kudosten autolyysiin solun kuoleman jälkeen.

Osteoklastien toimintaa säädellään sekä paikallisesti toimivilla sytokiineillä että systemaattisesti toimivilla (koko elimistöä koskevasti) hormoneilla. Osteoklasteista on löydetty kalsitoniiniin (Warshawsky ym., 1980), interleukiini-1:n (Xu ym., 1996), kilpirauhashormonin (Abu ym., 1997), lisäkilpirauhashormonin (Teti ym., 1991), verihiutalekasvutekijän (Zhang ym., 1998), insuliinin (Thomas ym., 1998), IGF-1:n (Hou ym., 1997), androgeenien (Mizuno ym., 1994) ja makrofaagipesäkkeitä stimuloiva tekijän (*engl.* macrophage colony-stimulating factor-1; M-CSF-1) (Hofstetter ym., 1992)

reseptorit. M-CSF on hematopoieettisten kasvutekijöiden perheeseen kuuluva glykoproteiini.



Kuva 1. Luuta hajottava osteoklasti. Kuva on muokattu Kalervo Väänäsen katsausartikkelista The cell biology of osteoclast function.

1.3 Lehmän maito ja ternimaito

Maitoa suositellaan käytettäväksi luuston terveydeksi, koska maito on hyvä kalsiumin lähde ja se sisältää useita hyödyllisiä yhdisteitä kalsiumin imeytymisen kannalta. Maidolla, joka on vastasyntyneen pääsääntöinen ravinnonlähde, on toiminnallinen tehtävä vastasyntyneen kasvuun ja immuunipuolustuksen kehittymiseen ja se on hyvä ravinteiden lähde myös aikuisille ihmisille. Maito sisältää hyvin paljon biologisesti aktiivisia yhdisteitä, joita on tutkittu paljon.

Lehmän maidontuotantokauden eli laktaatiokauden voi jakaa kolmeen eri vaiheeseen: kolme kuukautta kestävään nousevaan tuotannon kauteen, johon ternimaidon tuotto kuuluu, tasaisen tuoton kauteen ja laskevan tuoton kauteen. Poikimisen jälkeen lehmä tuottaa ternimaitoa vajaan viikon ajan, jonka jälkeen lehmän päivittäinen maitomäärä nousee ja on korkeimmillaan noin kuukauden kuluttua poikimisesta. Tätä maitoa kutsutaan Pro Gradussani tavalliseksi maidoksi (*engl.* mature milk). Lehmän maitomäärä vaihtelee

maidon tuotanto kauden aikana 30 kilosta jopa 60 kiloon lehmän tuotanto-ominaisuuksien mukaan. Lehmän suuren maidontuoton vaihe kestää muutamasta kuukaudesta vajaaseen puoleen vuoteen. Tämän jälkeen päivittäinen maidon tuottaminen vähenee vähitellen (Elina Ängeslevä, henkilökohtainen suullinen tieto).

Lehmä siemennetään uudestaan aikaisintaan yhden kuukauden päästä poikimisesta. Lehmän on tarkoitus poikia noin kerran vuodessa. Lehmän tiineysaika on yhdeksän kuukautta. Muutama kuukausi ennen poikimista lehmän maidontuotto alenee huomattavasti, jolloin lehmän lypsäminen lopetetaan eli lehmä laitetaan umpeen. Ummessaoloaika on 1–2 kuukauden lepo ennen seuraavaa poikimista ja maidontuotantokautta (Elina Ängeslevä, henkilökohtainen suullinen tieto).

Lehmän maito sisältää paljon erilaisia ravintoaineita. Maidossa on kaikki tarvittavat ravintoaineet vasikan kasvamiseen ja kehittymiseen ja etenkin ternimaito on tärkeää vasikan kehitymiselle sen ensimmäisten elinkuukausien aikana. Ternimaito sisältää vasikan immuunipuolustuksen kehittymisen kannalta tärkeitä aineita kuten esimerkiksi immunoglobuliineja eli vasta-aineita. Maito sisältää pääasiassa proteiineja, rasvoja, laktoosia, vitamiineja ja mineraaleja kuten kalsiumia, seleeniä, jodia, folaattia, A, E ja B12 vitamiinia, riboflaviinia, magnesiumia ja sinkkiä. Maito sisältää myös erilaisia pienempiä biomolekyylejä kuten hormoneja, erilaisia kasvutekijöitä, nukleotideja, polyamineja, peptidejä, sytokiineja, entsyymejä ja muita bioaktiivisia peptidejä. Maidon koostumus vaihtelee mm. maidon erityksen vaiheen, iän, rodun, ravinnon ja utareen terveyden mukaan (ks. katsausartikkeli Haug ym., 2007).

Poikimisen jälkeen lehmä tuottaa ravinteikasta ja rasvaista ternimaitoa. Ternimaito on vastasyntyneen vasikan ensisijainen ravinnonlähde ja kehittää vasikalle immuunipuolustusjärjestelmän. Ternimaito poikkeaa koostumukseltaan tavallisesta maidosta. Yksi suurimmista eroista tavallisen maidon ja ternimaidon välillä on se, että ternimaito sisältää lähes kaksinkertaisen määrän proteiineja verrattuna tavalliseen maitoon. Ternimaidon suuri proteiinipitoisuus johtuu osittain ternimaidon suuresta Immunoglobuliini G:n (*engl.* immunoglobulin G, IgG) määrästä. IgG:n osuus ternimaidon proteiineista on yli 50 % kun taas tavallisessa maidossa IgG:ta on noin 5 %:a (Ontsouka ym., 2003). Myös muiden maidon proteiinien kuten laktoferrinin ja transferrinin

konsentraatioiden tiedetään olevan suurempi ternimaidossa kuin tavallisessa maidossa (Sanchez ym., 1988).

1.4 Maidon proteiinit

Proteiinien pitoisuus tavallisessa maidossa on noin 32 g/l. Maidon proteiinit koostuvat kaseiineista ja heran proteiineista (ks. katsausartikkeli Haug ym., 2007). Heraa syntyy nestemäisenä sivutuotteena, kun maidosta juoksetetaan juustoa. Maidon proteiineista 20 % on heraproteiineja. Heraproteiinien osuus nestemäisessä sivutuotteessa on noin 65 % (ks. katsausartikkeli Marshall, 2004). Maidon heraproteiinit ovat globulaarisia ja ne ovat vesiliukoisempia kuin kaseiinit. Hera sisältää pääasiassa β -laktoglobuliinia, α -laktalbumiinia, naudan seerumin albumiinia (*engl.* bovine serum albumin, BSA), laktoferriniä ja immunoglobuliineja. Osa maidon heraproteiineista kuten esimerkiksi laktoferrini, α -laktalbumiini ja β -kaseiini voivat olla vastustuskykyisiä ruoansulatusentsyymeille (ks. katsausartikkeli Haug ym., 2007). Heraproteiinit sisältävät erilaisia entsyymejä kuten lyaaseja, transferaaseja, proteaaseja, lipaaseja ja hydrolaaseja (ks. katsausartikkeli Marshall, 2004).

Mahassa ravinnollisten aminohappojen imeytymisnopeus vaihtelee proteiinien laadun mukaan. Kaseiinit muodostavat hyytymiä mahalaukussa, jolloin hydrolyysi lisääntyy ja mahalaukun tyhjeneminen viivästyy. Heraproteiinit ovat taas happamissa olosuhteissa hyytymättömiä liukoisia proteiineja. Tällöin heraproteiinit saavuttavat jejunumin nopeasti jonka jälkeen menevät suolikanavaan (Boirie ym., 1997). Jejunum eli ns. tyhjäsuoli on ohutsuolen keskimäinen osa pohjukaissuolen ja sykkyräsuolen välissä. Heraproteiinien hydrolyysi ohutsuolessa on hitaampaa kuin kaseiinien jolloin suurempi osuus heraproteiineista kykenee imeytymään ohutsuolessa.

Hall ryhmäläisineen (2003) osoitti kylläisyystutkimuksessa, että plasman aminohappojen konsentraatio oli heraproteiinipitoisen aterian jälkeen korkeampi kuin kaseiinipitoisen aterian jälkeen (Hall ym., 2003). Toisessa iäkkäämmillä naisilla tehdyssä tutkimuksessa osoitettiin, että aterian jälkeen heraproteiinien nopea imeytymistapa on parempi proteiinien hyödyntämiselle ja kaiken kaikkiaan typpitasapainolle (Arnal ym., 1999).

Heraproteiinin laktoferrinin selviytymistä ja imeytymistä ruoansulatuskanavassa on tutkittu. Ruoansulatus voi vähentää laktoferrinin bioaktiivisuutta suolistossa. Troost

ryhmäläisineen (2002) tutki suun kautta otettavan ihmisen rekombinantti laktoferriniin selviytymistä ruoansulatuskanavassa kahdeksalla naispotilaalla, joille oli tehty ileostomia (*engl.* ileostomy). Ileostomia on suoliavanneleikkaus, jossa tehdään leikkauksella sykkyräsuolesta, ohutsuolen loppuosasta, ihon pintaan avanne. Tutkimuksessa potilaille annettiin suun kautta 5 g ihmisen rekombinantti laktoferriniä (*engl.* recombinant human lactoferrin, rhLF) ja avanteesta tuleva sisältö kerättiin 24 tunnin ajalta. Laktoferriniä oli erittynyt ainoastaan 4 µg vuorokauden aikana. Tutkimuksen perusteella ravinnosta saatu rhLF ei saavuta paksusuolta (*engl.* colon), koska rhLF hajotetaan mahalaukussa ja ohutsuolessa (Troost ym., 2002). Toisessa saman tutkimusryhmän tutkimuksessa 12 vapaaehtoista saivat 12 tunnin paaston jälkeen nenä-mahaletkun avulla (*engl.* nasogastric intubation) 4,5 g naudan laktoferriniä (*engl.* bovine lactoferrin, bLF). Ennen tutkimuksen lopputulosta paljastui, että bLF selviytyi mahalaukusta ohutsuoleen nopeasti, jolloin vain pieni osa bLF:stä pilkkoutui ja suuremman osan bLF:stä siirtyessä ohutsuoleen koskemattomassa muodossaan (Troost ym., 2001).

1.4.1 Kaseiinit

Kaseiinit kuuluvat fosfoproteiiniperheeseen. Kaseiinit erittyvät maitorauhasista suurikokoisina miselleinä. Misellit koostuvat α_{s1} -, α_{s2} -, β - ja κ - kaseiineista. Kaseiinien tehtävä on lähinnä ravinnollinen aminohappojen ja mineraalien kuten kalsiumin ja fosfaatin kuljettajana (ks. katsausartikkeli Ginger ja Grigor, 1999). Kaseiinien osuus maidon proteiineista on noin 80 % (ks. katsausartikkeli Haug ym., 2007).

1.4.2 Heraproteiinit

1.4.2.1 β -laktoglobuliini

β -laktoglobuliinin osuus lehmän maidon heraproteiineista on noin puolet kokonaismäärästä, kun taas ihmisen maito ei sisällä lainkaan β -laktoglobuliinia. β -laktoglobuliini on pieni, pallonmuotoinen ja liukoinen proteiini. β -laktoglobuliinin monomeerin molekyylimassa on noin 18 kDa, mutta esiintyy liuksissa dimeerinä. β -laktoglobuliini on hyvä välttämättömien ja haarautuneiden aminohappojen lähde (ks. katsausartikkeli Chatterton ym., 2006).

β -laktoglobuliinin varsinainen biologinen tehtävä on vielä epäselvä. β -laktoglobuliinilla näyttäisi kuitenkin olevan jonkinlainen tehtävä passiivisen immunteetin siirtymisellä vastasyntyneelle. β -laktoglobuliini sisältää kysteiniä, joka on tärkeä glutationin (*engl.* glutathione) synteesissä. Glutathionia löytyy luonnostaan kaikista nisäkkäiden soluista, jossa se osallistuu solujen puolustamiseen oksidatiivista stressiä vastaan. Glutathioni on mm. tärkeä syöpien ehkäisijä ja immunteetin säätelijä (ks. katsausartikkeli Madureira ym., 2007).

1.4.2.2 α -laktalbumiini

α -laktalbumiini on yksi heraproteiinien pääproteiineista, jota löytyy sekä ihmisen että lehmän maidosta. Lehmän maidon heraproteiineista α -laktalbumiinin osuus on 20 %. Ihmisen maidossa α -laktalbumiini on heraproteiinien vallitseva proteiini. α -laktalbumiini on vesiliuoksessa pallomaisessa muodossa ja sillä on suuri affiniteetti metalli-ioneja, erityisesti kalsiumia, kohtaan. Kalsiumilla on stabiloiva vaikutus α -laktalbumiinin rakenteeseen; α -laktalbumiinin on todettu olevan lämpöstabiilimpi kalsiumin läsnä ollessa. α -laktalbumiinin sulamislämpötilan on 68 °C kalsiumilla kyllästetyssä ympäristössä kun taas kalsiumin puuttuessa α -laktalbumiinin rakenne on epävakaa, jolloin proteiinin sulamislämpötila laskee 43 °C:een. Kuitenkin tiedetään, että lämpökäsittely muuttaa disulfididisidoksien rakennetta proteiinin sisällä ja/tai aiheuttaa molekyylien välisiä sidoksia ristisidoksia. α -laktalbumiini yksinään tai muiden heraproteiinien kanssa näyttäisi aiheuttavan molekyylien välisien disulfididisidoksien muodostumista joko α -laktalbumiinin itsensä kanssa, α -laktalbumiinin ja β -laktoglobuliinin tai α -laktalbumiinin ja BSA:n välille. Tämä voi estää disulfididisidosten vapautumisen muiden bioaktiivisten peptidien käyttöön (ks. katsausartikkeli Chatterton ym., 2006).

α -laktalbumiini on tärkeä ravinnon lähde. α -laktalbumiini on hyvä välttämättömien aminohappojen kuten kysteinin ja tryptofaanin lähde. Kysteini ja tryptofaani ovat serotoniinin ja glutathionin esiasteita (*engl.* precursor) (ks. katsausartikkeli Chatterton ym., 2006). Serotoniini voi parantaa kykyä selviytyä stressistä.

α -laktalbumiinin tiedetään olevan mukana myös laktoosin biosynteesissä. α -laktalbumiini on osa laktoosin syntaasikompleksia (*engl.* lactose synthase complex). Se katalysoi laktoosin biosynteesin viimeistä välivaihetta ja kontrolloi myöhemmin veden liikkumista maitorauhasista erityyppiin vesirakkuloihin (*engl.* mammary secretory vesicles). Siksi α -

laktalbumiini on tärkeä maidon erityksessä ja maidon erityksen säätelyssä (Brew ym., 1968; Lo ym., 1998).

1.4.2.3 Laktoferrini

Laktoferrini on eksokriinisen rauhasen tuottama rautaa sitova glykoproteiini. Laktoferrini on lisäksi neutrofiilisten leukosyyttien sekundaarisen jyväsen (*engl.* granule) suurin rakenneosana. Laktoferriniä on mm. limakalvojen eritteistä kuten kyynelissä, syljessä, emätin- ja siemennesteissä ja nenä- ja keuhkoputkieritteissä, sappinsteessä, virtsassa, maha-suolinsteissä ja eniten maidossa ja ternimaidossa (ks. katsausartikkeli Gonzalez-Chavez ym., 2009). Laktoferrinin määrä maidossa riippuu lajista ja maidon erityksen vaiheesta. Ihmisen tavallinen maito sisältää laktoferriniä 1–2 mg/ml ja ternimaito 5–7 mg/ml. Lehmän maidon laktoferrinin konsentraatio on merkittävästi pienempi kuin ihmisen maidossa (ks. katsausartikkeli Levay ja Viljoen, 1995).

Laktoferrinin määrää elimistössä on tutkittu tulehduksen aikana. Laktoferrinin määrä terveillä lehmillä on 2–7 µg/ml, mutta tulehduksen aikana konsentraatio on paljon suurempi. Laktoferrinin määrän seerumissa on peräisin lähinnä neutrofiileistä. Tulehduksen aikana laktoferrinin systeeminen konsentraatio voi suurentua jopa 200 µg/ml:aan (ks. katsausartikkeli Naot ym., 2005).

Laktoferriniä on tutkittu paljon. Naudan laktoferrinilla on tutkittu olevan monenlaisia biologisia ominaisuuksia mukaan lukien pieneliöitä tappava ja niiden lisääntymistä estävä vaikutus (antimikrobiaalinen vaikutus). Naudan laktoferrinillä *in vitro* tehdyissä kokeissa on todettu laktoferrinin estävän laajasti erilaisten *Gram*-negatiivisten ja *Gram*-positiivisten bakteerien, sienien ja parasiittien kasvua (Chierici, 2001). Laktoferrinin tiedetään myös omaavan inhibitorisia vaikutuksia vaipattomia viruksia, kuten esimerkiksi rotaviruksia, enteroviruksia ja adenoviruksia vastaan (Seganti ym., 2004). Laktoferrinillä on myös todettu olevan tulehdusta ehkäisevä ja syöpää estävä vaikutus (Conneely, 2001).

1.4.2.4 Naudan seerumin albumiini (BSA)

BSA:n osuus maidon heraproteiineista on noin 5–10 %. BSA on suuri proteiini, joka sisältää välttämättömiä ja haarauneita aminohappoja. BSA:n tehtävä on lähinnä ravinnollinen (ks. katsausartikkeli Marshall, 2004).

1.4.2.5 Immunoglobuliinit

Immunoglobuliinit eli vasta-aineet ovat adaptiiviseen immuunijärjestelmään kuuluvia bakteerien, virusten ja muiden sairautta aiheuttavien eliöiden antigeenejä spesifisesti tunnistavia proteiineja. Näitä vasta-aineita tuottavat immuunijärjestelmän B-lymfosyyteistä eli B-soluista plasmak soluiksi erilaistuneet solut. B-solu erilaistuu plasmak soluksi antigeenin sitoutuessa B-solun reseptoriin. Tuotetut vasta-aineet ovat samanlaisia kuin B-solun reseptorit, mutta eritettävässä muodossa ja vasta-aineilla on samanlainen spesifisyys antigeeniä vastaan kuin aktivoituneen B-solun reseptorilla. Immunoglobuliinit jaetaan viiteen eri immunoglobuliinien luokkaan; IgA-, IgD-, IgE-, IgG- ja IgM-luokkiin. Vasta-aineet ovat Y-kirjaimen muotoisia proteiineja. Vasta-aineet koostuvat neljästä polypeptidiketjusta: kahdesta kevyestä ketjusta ja kahdesta raskaasta ketjusta, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa rikkiatomien välissä olevilla sidoksilla. Antigeenejä sitovaa aluetta kutsutaan vaihtelevaksi alueeksi (*engl.* variable region) ja immunoglobuliinien vasta-aineluokat pystytään erottamaan niiden muuttumattoman alueen (*engl.* constant region) avulla.

Immunoglobuliinien osuus maidon heraproteiineista on noin 10–15 %. Lehmän maidon immunoglobuliinien pääkomponentti on IgG-vasta-aineet kun taas ihmisellä IgA vasta-aineet muodostavat suurimman immunoglobuliiniryhmän. Lehmän ja ihmisen maito sisältää pääosin IgG-, IgA- ja IgM- luokan vasta-aineita. Immunoglobuliinien konsentraatio maidossa vaihtelee maidon laktaation eri vaiheiden mukaan. Vastasyntyneelle ternimaito antaa elintärkeän immunologisen suojan maidon immunoglobuliinien ja muiden immuunikomponenttien ansiosta. Ternimaito sisältääkin immunoglobuliineja paljon suuremman määrän kuin tavallinen maito (ks. katsausartikkeli Stelwagen ym., 2009).

Immunoglobuliinit pääsevät maitoon valikoivan reseptorivälitteisen solunsisäisen reitin kautta. Utareiden epiteelikudos ei valmista immunoglobuliineja. Pieni määrä immunoglobuliineja voi kuitenkin päästä ternimaitoon ja tavalliseen maitoon veren seerumista vuotavien solujen välisten tiiviiden liitosten kautta (ks. katsausartikkeli Stelwagen ym., 2009).

1.4.2.6 Laktoperoksidaasi

Laktoperoksidaasi kuuluu peroksidaasiperheeseen. Naudan laktoperoksidaasi muodostuu 612 aminohappotähteen polypeptidiketjusta. Laktoperoksidaasia esiintyy laajasti luonnossa ja sitä löytyy sekä kasveista että eläimistä ihmisen mukaan lukien. Laktoperoksidaasia on löydetty ihmisen eritteistä kuten kyyneleistä, syljestä ja maidosta. Lehmän maidossa laktoperoksidaasi on yksi tärkeimmistä ja runsaimmin esiintyvistä entsyymeistä. Laktoperoksidaasia on maidossa noin 30 mg/l, jolloin laktoperoksidaasin osuus maidon heraproteiineista on noin 0,5 %. Laktoperoksidaasi sitoo voimakkaasti kalsiumioneja, mikä vakaannuttaa sen rakenteen. Tutkimusten mukaan laktoperoksidaasin denaturoituminen alkaa noin 70 °C:ssa (ks. katsausartikkeli Kussendragar ja van Hooijdonk, 2000).

Laktoperoksidaasilla on bakteerien kasvua estävä vaikutus. Yksi laktoperoksidaasin tehtävistä on katalysoida tiettyjen molekyylien hapettamista. Laktoperoksidaasi esimerkiksi kykenee pelkistämään vetyperoksidaasin, joka taas puolestaan katalysoi tiosyanaatin (*engl.* thiocyanate) ja joidenkin halidien peroksidaatiota. Reaktion viimeinen vaihe tuottaa tuotteita, jotka estävät ja/tai tappavat erilaisia bakteerilajeja (ks. katsausartikkeli Marshall, 2004). Peroksidaasit ovat vetyproksidia hapettimena käyttäviä yhdisteitä hapettavia oksidoreduktaaseihin kuuluvia entsyymejä.

1.4.3 Maidon kasvutekijät

Naudan ternimaidossa ja maidossa on kasvutekijöitä, joita ovat muun muassa epidermaalinen kasvutekijä (*engl.* epidermal growth factor) (Iacopetta ym., 1992), betaselluliini (*engl.* betacellulin) (Dunbar ym., 1999), IGF-I ja -II (Belford ym., 1997; Ginjala ja Pakkanen, 1998; Blum ja Hammon, 2000; Elfstrand ym., 2002), transformoiva kasvutekijä- β 1 ja - β 2 (Belford ym., 1997; Ginjala ja Pakkanen, 1998; Elfstrand ym., 2002), FGF-1 ja -2 (Rogers ym., 1995; Hironaka ym., 1997) ja verihitulekasvutekijä (Belford ym., 1997; Shing ja Klagsbrun, 1987). Edellä mainittuja kasvutekijöitä on myös ihmisen maidossa, mutta pienempinä pitoisuuksina. Epidermaalinen kasvutekijä ja betaselluliini ovat peptidikasvutekijöitä, jotka kuuluvat epidermaalisten kasvutekijöiden perheeseen. Epidermaalisien kasvutekijän perheeseen kuuluu epiteeli- ja mesenkyymisolujen kasvua edistäviä tekijöitä. IGF:t ovat yhdestä polypeptidiketjusta koostuvia proteiineja, jotka ovat rakenteellisesti samanlaisia insuliinin kanssa. IGF-1 eli somatomeidiini C on eräs insuliinin tavoin vaikuttava polypeptidikasvutekijä, kun taas IGF-2 eli somatomeidiini A on lähinnä

sikiöön vaikuttava polypeptidikasvutekijä. Taulukosta 2. nähdään eri solujen ja kudosten tuottamat kasvutekijät ja kasvutekijöiden ensisijainen vaikutus soluihin tai kudoksiin.

Taulukko 2. Kasvutekijät, niitä tuottavat solut ja kudokset sekä niiden ensisijainen vaikutus. IGF on insuliininkaltainen kasvutekijä. Mitogeeni on solujen jakautumista kiihottava tekijä. Taulukko on muokattu Sylvie Gauthierin katsausartikkelista Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities.

Kasvutekijä	Pääasiallinen lähde	Ensisijainen toiminta
Epidermaalinen kasvutekijä	Laajasti eri kudoksista ja kehon nesteistä	Stimuloi epidermaalisten, epiteeli- ja alkion solujen jakaantumista. Inhiboi mahahappojen eritystä
Betaselluliini		Edistää haavojen paranemista ja luun hajotusta
IGF-I	Ensisijaisesti maksa	Stimuloi monien solutyypin lisääntymistä
IGF-II	Vaihtelevasti eri solut	IGF-I on vahvempi mitogeeni kuin IGF-II, joka stimuloi ensisijaisesti sikiölähtöisiä soluja Vaikuttaa joidenkin solujen jakaantumiseen Aiheuttaa hypoglykemiaa, parantaa typen tasapainoa, alentaa kolesterolia ja kaliumia, ja parantaa munuaisten toimintaa
Transformoiva kasvutekijä-β2	Verihiutaleet ja monet muut solut	Stimuloi solujen, erityisesti sidekudoksen kasvua Estää muiden solujen kuten esimerkiksi lymfosyyttien ja epiteelisolujen kasvua Tärkeä tehtävä alkionkehityksessä, haavojen paranemisessa, luun ja ruston muodostumisessa, ja kontrolloi immuunijärjestelmää
Verihiutalekasvutekijä	Verihiutaleet ja monet muut solutyypit	On mukana alkion kehityksessä, mesenkymaalista alkua olevien solujen jakaantumisessa, migraatiossa, angiogeneesissä ja haavojen paranemisessa
Fibroblastikasvutekijä-2	Laaja valikoima soluja	Tärkeä tehtävä monien solutyypin jakaantumisessa, erilaistumisessa ja selviytymisessä On mukana angiogeneesissä, haavojen paranemisessa ja hematopoieesissa eli veren muodostuksessa

1.4.4 Maidon sytokiinit

Sytokiinit ovat monien eri solutyyppeiden tuottamia proteiineja tai glykoproteiineja. Sytokiinit ovat bioaktiivisia proteiineja, jotka vaikuttavat toisiin proteiineihin lähietäisyydeltä tai usein erittävään soluun itseensä. Sytokiinien vaikutukset ovat yleensä paikallisia, jossa ne toimivat joko autokriinisesti tai parakriinisesti. Autokriinisesti ja parakriinisesti toimivat myös immuunipuolustuksessa toimivat molekyylit kuten esimerkiksi interleukiinit, tuumorinekroositekijät ja interferonit (*engl.* interferon).

Naudan ternimaidosta ja maidosta on löydetty joitakin sytokiineja kuten esimerkiksi granulosityttipesäkkeitä stimuloivaa tekijää (Calhoun ym., 1999), interleukiini-1:ä (Kelly, 2003), interleukiini-1 β :aa (Hagiwara ym., 2000), interleukiini-6:ta ja interferoni- γ :aa (Kelly, 2003; Hagiwara ym., 2000), tuumorinekroositekijä- α :aa (Blum ja Hammon, 2000; Kelly, 2003; Hagiwara ym., 2000) ja interleukiini-18:aa (Muneta ym., 2005). Rajanveto kasvutekijöiden ja sytokiinien välillä on häilyvää, koska joitakin kasvutekijöitä kuten esimerkiksi transformoiva kasvutekijä- β :aa pidetään sytokiininä joissakin yhteyksissä. Tuumorinekroositekijä on makrofagien tuottama lymfokiini, joka aktivoi yhdessä interleukiini-1:n kanssa imusoluja ja aiheuttaa solujen tuhoutumista. Interferonit ovat taas solujen tuottamia valkuaisaineita, jotka esimerkiksi estävät virusten ja syöpäsolujen lisääntymistä. Interferoni myös lisää syöjäsolujen fagosytoosikykyä ja T-solujen sytotoksisuutta. Interferoni- γ on T-imusolujen tuottama. Interleukiinit ovat toisiin valkosoluihin vaikuttavia valkosolujen tuottamia peptidejä. Interleukiini-1 on mm. makrofaagien tuottama aine, joka aiheuttaa kuumeen stimuloimalla imusolujen reagoitua vierasantigeeneihin.

1.5 Heraproteiinien vaikutukset luuhun

Maidon heraproteiinien vaikutuksia luun aineenvaihduntaan on tutkittu paljon. Maidon heraproteiinien on todettu lisäävän osteoblastien kasvua ja erilaistumista *in vitro* (Xu, 2009). Takada ryhmäläisineen (1996) eristivät maidon heraproteiineista maidon perusproteiinifraktion (*engl.* milk basic protein), johon osteoblasteja stimuloivat aktiivisen tekijät olivat konsentroituneet. Maidon perusproteiinifraktion aktiivisten osien molekyylipaino on noin 10 ja 14 kDa (Takada ym., 1996). Maidon perusproteiinifraktion, joka on käsitelty maha-suolientsyymeillä ja imeytynyt ohutsuoleen ja entsyymikäsiteltyyn

maidon perusproteiinifraktion on todettu säilyttävän osteoblastien jakautumista ja erilaistumista stimuloivan vaikutuksen (Takada ym., 1996).

Heran proteiinin ja maidon perusproteiinifraktion todettiin lisäävän reisiluun vahvuutta nuorilla rotilla *in vivo* tehdyissä munasarjaton tutkimuksissa (*engl.* ovariectomized, OVX) (Takada ym., 1997c; Takada ym., 1997a; Kato ym., 2000). Munasarjaton tutkimus tarkoittaa, että munasarjat on poistettu. Maidon perusproteiinifraktio sisältää maidon heraproteiineja (Takada ym., 1996). Heraproteiinien ja maidon perusproteiinifraktion on todettu estävän luun hajoamista vähentämällä osteoklastivälitteistä luun resorptiota ja osteoklastien muodostumista osteoporoosin mallintamiseen käytettävillä vanhemmilla OVX-rotilla (Takada ym., 1997b; Toba ym., 2000). Myös kliinisiä kokeita on tehty maidon perusproteiinifraktion vaikutuksista luuhun. Tutkimuksissa lisäravinteena käytettävä maidon perusproteiinifraktio lisäsi luun mineraalitiheyttä ja vähensi virtsan luun resorptiomarkkereiden tasoa terveillä naisilla (Aoe ym., 2001; Uenishi ym., 2007) ja terveillä naisilla, joilla oli vaihdevuodet (Aoe ym., 2005). Maidon perusproteiinifraktiota lisäravinteena käyttäneiden aikuisten miesten luun muodostuminen oli lisääntynyt ja luun resorptio oli vähentynyt (Toba ym., 2001).

Morita ryhmäläisineen (2008) eristivät maidon perusproteiinifraktiosta proteiinin, jonka molekyylipaino oli 15 kDa. Eristetty proteiini tunnistettiin angiogeeniksi. Angiogeenillä tehtyjen *in vivo* ja *in vitro* tehtyjen kokeiden perusteella on estävä vaikutus osteoklastivälitteiseen luun resorptioon (Morita ym., 2008).

Erityisesti laktoferrinin vaikutuksia luuhun, luusoluihin ja luun muodostumiseen on tutkittu paljon. Laktoferrinin vaikutuksia on tutkittu luuta muodostavilla osteoblastisolulla. Laktoferrini edistää tehokkaasti primaaristen osteoblastien ja osteoblasteja muodostavien solujen lisääntymistä ja lisää osteoblastien erilaistumista (Cornish ym., 2004; Takayama ja Mizumachi, 2008; Takayama ja Mizumachi, 2009). Laktoferrinin on huomattu suojelevan vahvasti osteoblastisoluja apoptoosilta (Grey ym., 2006).

Laktoferrinin vaikutuksia on tutkittu myös luuta hajottavilla osteoklastisolulla. Laktoferrini estää tehokkaasti uusien osteoklastien muodostumista eli osteoklastogeneesiä. Laktoferrini ei kuitenkaan vaikuta jo kypsien osteoklastien aktiivisuuteen. Laktoferrinin vaikutuksia osteoklastien kehittymiseen on tutkittu hiiren luuydinviljelyissä (*engl.* mouse

bone marrow cultures), jossa uusien osteoklastien kehittymistä joko merkittävästi hidastettiin tai pysäytettiin laktoferriniä lisäämällä (Cornish ym., 2004). Lorget ym. (2002) havaitsi, että naudan laktoferrini näyttäisi vähentävän luun hajoamista kanin sekaluusoluviljelyissä (*engl.* rabbit mixed bone cell culture). Cornish ym. (2004) havaitsi, että laktoferrinillä ei ollut vaikutusta luun hajoamiseen eristetyillä kypsillä osteoklasteilla eikä elinviljelyissä, joissa havaittiin kypsien osteoklastien aktiivisuutta (*engl.* mature osteoclast activity). Nämä tulokset viittaavat siihen, että laktoferrini ei vaikuta täysin erilaistuneiden osteoklastien aktiivisuuteen hajottaa luuta, mutta laktoferrini estää luun hajoamista vähentämällä osteoklasteja muodostavien esisolujen määrää.

Laktoferrinin vaikutuksista luuhun ja luun hajoamiseen on tutkittu *in vivo*. Cornish ryhmäläisineen (2004) on tehnyt kokeen, jossa terveiden uros rottien kalloon ruiskutettiin paikallisesti laktoferriniä viitenä peräkkäisenä päivänä. Laktoferrini-injektoiduilla eläimillä uuden luun muodostuminen oli lisääntynyt suuresti verrattuna kontrolleihin.

On tutkittu myös ravinnon kautta otettavan laktoferrinin vaikutuksia postmenopausaaliseen luun vähenemiseen. Kahdessa tutkimuksessa käytettiin OVX-eläimiä mallintamaan postmenopausaalista luun vähenemistä (Blais ym., 2009; Guo ym., 2009). Blais ryhmäläisineen (2009) osoitti, että OVX-hiirillä, joita oli ruokittu 27 viikon ajan laktoferrinillä rikastetulla ravinnolla, luun mineraalitiheys oli korkeampi ja luut olivat vahvemmat verrattuna kontrolliryhmään. Toisessa tutkimuksessa OVX-rottia ruokittiin laktoferrinillä kolmen kuukauden ajan. Tulokset osoittivat, että rotilla joita hoidettiin laktoferrinillä, luuta oli muodostunut enemmän ja luun hajoaminen oli vähentynyt (Guo ym., 2009).

Kliinisessä tutkimuksessa 38 terveelle postmenopausaaliselle naiselle annettiin suun kautta satunnaisesti joko lume- tai RNAasi rikastettua laktoferriniä. RNAasi on ribonukleinihappoa pikkova entsyymi. Tutkimukset osoittivat, että luun resorptiomarkkerit olivat merkittävästi vähentyneet ja osteoblastimarkkerit olivat merkittävästi lisääntyneet laktoferrinillä käsitellyssä ryhmässä (Bharadwaj ym., 2009).

2. Tutkielman tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia kuinka maidon eri proteiinit vaikuttavat luuhun ja luun aineenvaihduntaan. Tutkimusprojektini on osa laajempaa tutkimusta, joka liittyy Valion tutkimukseen ja tuotekehitykseen maidon parissa. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia annettujen maidon proteiinifraktioiden vaikutuksia potilaista eristettyihin luuydinperäisiin mesenkymaalisiin kantasoluihin. Tutkimuksessa keskityttiin lähinnä maidon heraproteiineihin.

1. Haluttiin tutkia maidon proteiinien vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon. Onko maidon proteiinifraktioilla edistävä vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon?
2. Tutkittiin maidon proteiinifraktioiden vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen. Edistävätkö annetut maidon proteiinit mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumista?

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Mesenkymaalisten kantasolujen eristäminen ja soluviljely

Työssä käytettiin luuydinperäisiä mesenkymaalisia kantasoluja yhdeksästä eri potilaasta (Taulukko 3.). Ihmisen luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen viljely tehtiin Leskelän työtovereineen (2003) käyttämään menetelmään perustuen. Luuydinnäytteet otettiin pääsääntöisesti aikuisilta potilailta heidän suostumuksellaan lonkkaleikkausten yhteydessä ja lapsipotilailta selkänikamista ja kristasta (Eettisen toimikunnan alkuperäinen lausunto 4/2000; täydennetty lausunto 29/2005, Rusto- ja luusoluviljely luuytimen kantasoluista, E4786). Luuydinnäyte kerättiin leikkaussalissa joko hepariinia sisältävään ruiskuun tai 10 ml kasvatusliuosta sisältävään putkeen. Ruiskuun kerätyille näytteille suoritettiin Ficoll – eristys, jolloin saatiin eristettyä monosyyttifraktio. Monosyyttifraktiosta lähdettiin kasvattamaan kantasoluja. 1–3 vuorokauden kasvatuksen jälkeen kiinnittymättömät solut pestiin pois ja pohjaan tarttuneet mesenkymaaliset kantasolut jäivät pulloon. 10 ml kasvatusliuosta sisältävään putkeen kerätyt solut laitettiin suoraan kasvamaan soluviljelypulloon, jonne lisättiin noin 20 ml kasvatusliuosta. Kantasolulinjan perässä ilmoitettiin siirrostusnumero (*engl. passage, p*), joka kertoo kuinka monta kertaa kantasolut ovat irrotettu kasvatuspullon pohjalta ja jaettu uusiin soluviljelypulloihin kasvamaan. Tuore, juuri kasvamaan laitettu luuydinnäyte saa siirrostusnumeron nolla. Luuydinperäiset mesenkymaaliset kantasoluviljelmät ovat primaariviljelmiä ensimmäiseen jakoon asti ja kasvusto on aina sekaviljelmiä.

Kantasoluja hoidettiin kaksi kertaa viikossa vaihtamalla noin puolet kasvatusliuoksesta uuteen ja siirrostettiin uusiin soluviljelypulloihin viimeistään kantasolujen kasvaessa lähes konfluentiksi. Mesenkymaalisten kantasolujen kasvatusliuos (PM) sisältää Minimum Essential Medium Eagle-peruskasvatusliuosta (SIGMA, Alpha Modification), johon on lisätty 10 % seerumia (FBS; fetal bovine serum, Gibco, Invitrogen), 1 % penisiliini-streptomysiiniä (penisiliini 10 000 U/ml ja streptomysiini 10 mg/ml 0,9 % NaCl, Sigma), 1 % L-glutamiinia (Sigma) ja 2 % HEPES puskuria (Sigma). Kantasoluja kasvatettiin normaaleissa olosuhteissa lämpökaapissa (+ 37 °C, 5 % CO₂).

Mesenkymaalisten kantasolut irrotettiin pullon pohjasta käyttäen yksinkertaista trypsiini-EDTA – liuosta (5 min, + 37 °C), joka inaktivoitiin lisäämällä yhtä suuri tilavuus PM:sta.

Solususpensio sentrifugoitiin pelletiksi (5 min, 200 g) ja solupelletti suspensoitiin PM:n ja jaettiin uusiin soluviljelypulloihin kasvamaan.

Taulukko 3. Tutkimuksessa käytettyjen mesenkymaalisten kantasolulinjojen numerokoodit ja kantasolujen luovuttajan sukupuoli, syntymävuosi sekä ikä näytteenottohetkellä.

Kantasolulinjat	Luovuttajan sukupuoli	Luovuttajan syntymävuosi	Luovuttajan ikä näytteenottohetkellä
447	Nainen	1936	73
443	Mies	1936	73
437	Mies	1994	16
412	Mies	1959	50
405	Nainen	1938	72
404	Mies	1968	41
403	Mies	1955	53
399	Mies	1972	37
386	Nainen	1931	78

3.2 Maidon proteiinifraktiot

Työssä tutkittiin maidon proteiinifraktioiden vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen ja mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon. Valion natiivi heraproteiinifraktio (VNH), Valion kaseiiniton kaseiinifraktio (WPC), Valio 50 lämpökäsitelty fraktio (V50 lämpö), Valio 50 lämpökäsittämätön fraktio (V50 ei-lämpö), Valio 30 lämpökäsitelty fraktio (V30 lämpö), Valio 30 lämpökäsittämätön fraktio (V30 ei-lämpö), natiivi heraproteiinifraktio (NWP), α -laktalbumiini, β -laktoglobuliini, laktoferriini, GMP ja heran kasvutekijä (WGF) fraktiot ovat Valion valmistamia. P4 proteiinifraktio saapui Uudesta Seelannista ja oli Turun yliopiston käsittelemä. Valion maidon proteiinifraktiot olivat jauheita ja P4 fraktio oli nestemäinen.

Maidon proteiinifraktioiden jauheet liuotettiin PM:n. Proteiinifraktioita liuotettiin yön yli + 4 °C sekoituksessa, jonka jälkeen suurin osa proteiinista oli liennut. Jotta proteiinifraktiot saatiin kokonaan liukenemaan, fraktioita inkuboitiin sekoituksessa muutamia tunteja + 37 °C. P4 fraktio laimennettiin PM:n.

MG2785 proteiinifraktio, josta P4 proteiinifraktio on eristetty, on alun perin saatu Turun yliopistolle Uudesta Seelannista. MG2785 fraktion alkuperäisestä raaka-aineesta ei ole varmaa tietoa. Uudessa Seelannissa herafraktiolle on tehty minimaalinen lämpökäsittely ja rasvanpoisto mikrosuodatuksella. Tämän jälkeen fraktio on ajettu sekä kationipylvään että hydrofobisia vaikutuksia käyttävän pylvään läpi. Saadut fraktiot on yhdistetty, jolloin on saatu konsentroituneena maidon heraproteiiniseos, joka sisältää mm. laktoperoksidaasia, kasvutekijöitä kuten esimerkiksi Immunoglobuliini G:tä, transformoiva kasvutekijä – β :aa ja IGF-1:tä, angiogeniiniä ja laktoferriniä. Fraktio kylmäkuivattiin. Tämän jälkeen Turun yliopistossa tästä MG2785 fraktiosta on eristetty P4 proteiinifraktio korkean erotuskyvyn nestekromatografia – laitteistolla (*engl.* high-performance liquid chromatography, HPLC), minkä jälkeen fraktio on konsentroitunut Amicon Ultra ja Microcon Centrifugal Filter Devices (Millipore), sekä Nanosep™ Microconcentrators (PALL) suodattimilla. P4 fraktion proteiinit ovat heikosti kationisia ja ne eluoiutuivat pylväästä niin tiukasti yhdessä ettei niitä saatu erotetuksi toisistaan. P4 fraktio sisältää pieniä määriä noin 80 erilaista, keskenään hyvin erikokoisia proteiineja. Proteiinien massat ovat 77–187 kDa. P4 fraktio sisältää mm. komplementtijärjestelmän eri proteiineja, laktoperoksidaasia, laktoferriniä, angiogeniiniä ja κ -kaseiinia.

Valion 30 proteiinifraktiot (V30 lämpö ja ei-lämpö) on valmistettu käsittelemättömästä tilamaidosta. Maito on ajettu hydrofobisen hartsin läpi ja hartsiin kiinnijääneet proteiinit on eluoitu 30 % asetonitriilillä. V30 lämpö proteiinifraktiolle on tehty lämpökäsittely. V30 proteiinifraktiot sisältävät runsaasti insuliinia. Valion 50 proteiinifraktiot (V50 lämpö ja ei-lämpö) on valmistettu myös käsittelemättömästä tilamaidosta, joka on ajettu hydrofobisen hartsin läpi. Hartsiin kiinnijääneet proteiinit on eluoitu 50 % asetonitriilillä. V50 lämpö proteiinifraktiolle on tehty lämpökäsittely. V50 proteiinifraktiot sisältävät runsaasti α -laktalbumiinia. VNH proteiinifraktio on Valion natiivihera-jae, joka on tuotettu mikrosuodatuksella maidosta. WPC on kaseiiniton kaseiinifraktio. Se on tuotettu mikrosuodatuksella maidosta. Tämän jälkeen jakeesta on poistettu kaseiini.

β -laktoglobuliini, α -laktalbumiini, laktoferrini, WGF-, GMP- ja NWP- fraktioiden valmistuksesta ei ole tietoa. Fraktiot on saatu Oulun yliopistolle jauheina. Edellä mainituista fraktioista löytyy proteiinifraktioiden puhtaus ja proteiinipitoisuustietoja (Taulukko 4.) WGF- proteiinifraktio sisältää laktoperoksidaasia, laktoferriniä, IGF-1:stä ja transformoiva kasvutekijä- β -2:sta (Taulukko 4.).

Taulukko 4. Tutkimuksissa käytettyjen proteiinifraktioiden puhtaus ja proteiinipitoisuudet. NWP on natiivi heraproteiinifraktio, GMP on GMP proteiinifraktio ja WGF on heran kasvutekijä proteiinifraktio. WGF proteiinifraktio sisältää laktoperoksidaasia, laktoferriniä, insuliininkaltaista kasvutekijä – 1:tä (IGF-1) ja transformoiva kasvutekijä beta – 2:ta.

Proteiinifraktio	Proteiinipitoisuus (%)	Puhtausaste (%)
NWP	90,9	
α -laktalbumiini	97,45	92,7
Laktoferrini	98,22	97,78
β -laktoglobuliini	97,8	93,6
GMP	78,0	83,0
WGF	95,0	
– Laktoperoksidaasi		48
– Laktoferrini		15
– IGF-1		2 mg / 100 g
– transformoiva kasvutekijä- β -2		5 mg / 100 g

Alkalisen fosfataasin (AFOS) spesifisen aktiivisuuden ja kalsiumin muodostumisen määrittämissä oli mukana P4, V30 lämpö ja ei-lämpö, V50 lämpö ja ei-lämpö, WPC ja VNH proteiinifraktiot. Proteiinifraktioista testattiin kolme tai neljä eri pitoisuutta (Taulukko 5.). Kuntotesteihin otettiin mukaan edellä mainittujen seitsemän proteiinifraktiot ja niiden vahvimmat pitoisuudet sekä WGF, β -laktoglobuliini, α -laktalbumiini, laktoferrini, GMP ja NWP fraktiot (Taulukko 5.), joista kuudelle viimeisimmälle fraktiolle on aiemmin tehty AFOS -aktiivisuuden ja kalsium -määritykset.

Taulukko 5. Maidon proteiini-fraktiot ja niiden pitoisuudet, joita käytettiin alkalisen fosfataasin aktiivisuuden ja kalsiumin pitoisuuden määrittämisissä ja kuntotesteissä. V30 lämpö on Valion 30 lämpökäsitelty proteiini-fraktio, V30 ei-lämpö on Valion 30 ei-lämpökäsitelty proteiini-fraktio, V50 lämpö on Valion 50 lämpökäsitelty proteiini-fraktio, V50 ei-lämpö on Valion 50 ei-lämpökäsitelty proteiini-fraktio, WPC on Valion kaseiiniton kaseiini-fraktio, VNH on Valion natiivi heraproteiini-fraktio, WGF on heran kasvutekijä-fraktio ja NWP on natiivi heraproteiini-fraktio.

Maidon proteiini-fraktio	C (AFOS ja kalsium)	C (Kuntotesti)
P4	10 µg/ml	10 µg/ml
	1 µg/ml	
	0,1 µg/ml	
V30 lämpö	50 µg/ml	50 µg/ml
	10 µg/ml	
	1 µg/ml	
V30 ei-lämpö	50 µg/ml	50 µg/ml
	10 µg/ml	
	1 µg/ml	
V50 lämpö	50 µg/ml	50 µg/ml
	10 µg/ml	
	1 µg/ml	
V50 ei-lämpö	50 µg/ml	50 µg/ml
	10 µg/ml	
	1 µg/ml	
WPC	1 mg/ml	1 mg/ml
	100 µg/ml	
	10 µg/ml	
	1 µg/ml	
VNH	500 µg/ml	500 µg/ml
	50 µg/ml	
	5 µg/ml	
	1 µg/ml	
WGF	-	1 mg/ml
β-laktoglobuliini	-	10 mg/ml
α-laktalbumiini	-	50 mg/ml
Laktoferriini	-	10 µg/ml
GMP	-	10 mg/ml
NWP	-	1 mg/ml

3.3 Mesenkymaalisten kantasolujen erilaistaminen osteoblasteiksi

Mesenkymaalisia kantasoluja erilaistettiin osteoblasteiksi luusoluerilaistamisliuoksella (OS). OS tehtiin PM:n johon lisättiin 100 nM deksametasonia (Sigma), 10 nM natrium β -glyserolifosfaattia (Sigma) ja 0,05 nM askorbiinihappo-2-fosfaattia (Sigma).

AFOS -aktiivisuuden ja kalsiumin -määrittämiä käytettiin mittaamaan maidon proteiinien vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. AFOS -aktiivisuuden ja kalsium -määrittämissä soluja kasvatetaan PM:ssa, OS:ssa ja näiden proteiinilaimennoksissa.

Jokainen maidon proteiinifraktio testattiin kolmella eri kantasolulinjalla sekä AFOS -aktiivisuuden että kalsium -määrittämissä. Kantasoluja jaettiin 24-kuoppalevyille 10 000 solua/kuoppa, jonka jälkeen niiden annettiin kiinnittyä vähintään yön yli kuoppalevyn pohjalle ennen proteiinilaimennosten lisäämistä. Kasvatustilavuus 24-kuoppalevyllä oli 1 ml. Kontrolleina käytettiin kantasoluja, joita kasvatettiin PM:ssa ja OS:ssa. Kustakin proteiinin pitoisuudesta ja kontrollista tehtiin neljä rinnakkaista näytettä. Kantasoluja kasvatettiin 3–5 viikon ajan. Kantasoluja hoidettiin kaksi kertaa viikossa vaihtamalla noin 0,5 ml kasvatustilavuudesta tuoreeseen kasvatusliuokseen.

3.3.1 Alkalisen fosfataasin spesifisen aktiivisuuden määrittäminen

Kantasoluja kasvatettiin kolme viikkoa PM:ssa, OS:ssa ja proteiinien eri vahvuisissa laimennoksissa (Taulukko 5.). Kolmen viikon kasvatuksen jälkeen kuopat pestiin kaksi kertaa 1xPBS:llä, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin 200 μ l AFOS-lyysipuskuria (Triton x-100 puskuri pH 7.6, 50 mM Tris-HCl, 0,1 % Triton x-100 ja 0,9 % NaCl). Levyt teipattiin, käärittiin folioon ja siirrettiin pakastimeen (-70 °C) säilytykseen myöhempää määrittämistä varten.

Pakastetut levyt sulatettiin, mutta niiden ei annettu olla sulaneena huoneenlämmössä. Näytteet homogenisoitiin puskuttelemalla pipetillä. Näytteet pipetoitiin samanaikaisesti sekä aktiivisuus että proteiinimäärittämistä varten 96-kuoppalevyille. Kaikki kantasolunäytteet sekä standardi- ja nollanäytteet pipetoitiin levyille kahtena rinnakkaisena. Nollanäytteiden avulla tuloksista vähennettiin käytettyjen liuosten aiheuttama tausta.

3.3.1.1 Aktiivisuusmääritys

Kantasolunäytteitä pipetoitiin 10 µl/kuoppa läpinäkyvälle 96-kuoppalevyille. Nollanäytteeksi lisättiin 10 µl AFOS-lyysipuskuria. Sekä kantasolunäytteet että nollanäytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille rinnakkaisina. Näytteiden päälle lisättiin seoksena 85 µl AFOS assay puskuria (0,1 M Tris, 1 mM MgCl₂, pH 10) ja 15 µl 0,1 M 4-nitrofenyyli fosfaattia (*engl.* 4-nitrophenyl phosphate, PNPP, Sigma). PNPP:sta käytettiin 1 M stokkiliuosta, joka laimennettiin veteen. Näytteitä inkuboitiin pimeässä 30 minuuttia. Reaktio lopetettiin lisäämällä kuoppiin 100 µl 1 M natriumhydroksidia (NaOH). Absorbanssi mitattiin kuoppalevylukijalla (Wallac Victor², 1420 MULTILABEL COUNTER) 405 nm:n aallonpituudella.

3.3.1.2 Proteiinimääritys

Kantasolunäytteitä pipetoitiin 10 µl/kuoppa läpinäkyvälle 96-kuoppalevyille. Levyille pipetoitiin proteiinistandardit 10 µl/kuoppa. BSA:sta tehtiin 10 mg/ml käyttöliuos, josta laimennettiin proteiinistandardit veteen. Proteiinistandardien pitoisuudet olivat 2,0, 1,5, 1,0, 0,5, 0,25, 0,2, 0,1 ja 0,05 g/l. Nollanäytteiksi (10 µl/kuoppa/näyte) pipetoitiin vettä, johon proteiinistandardit laimennettiin ja AFOS-lyysipuskuria, johon solunäytteet homogenoitiin. Sekä kantasolunäytteet että nollanäytteet pipetoitiin 96-kuoppalevyille rinnakkaisina.

Kuopille lisättiin erikseen 25 µl Reagenssi A:ta (BioRad DC – proteiinireagenssi) ja 200 µl Reagenssi B:tä (BioRad DC – proteiinireagenssi). Absorbanssit mitattiin kuoppalevylukijalla 650 nm:n aallonpituudella.

3.3.1.3 Alkalisen fosfataasin spesifisen aktiivisuuden laskeminen

Proteiinimäärityksen tuloksista vähennettiin taustat. Proteiinistandardeista vähennettiin veden aiheuttama tausta ja kantasolunäytteistä AFOS-lyysipuskurin aiheuttama tausta. Saaduista proteiinistandardin tuloksista piirrettiin proteiinistandardisuora, laskettiin suoran yhtälön avulla kantasolunäytteiden korjattu absorbanssi ja laskettiin rinnakkaisten kantasolunäytteiden keskiarvot.

Aktiivisuusmäärityksistä saaduista tuloksista vähennettiin AFOS-lyysipuskurin aiheuttama tausta ja laskettiin rinnakkaisten näytteiden keskiarvo. Tämän jälkeen laskettiin spesifinen

AFOS -aktiivisuus/mg proteiinia (aktiivisuus / proteiini * 100). Lisäksi kullekin näytteelle laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat. Lopuksi tulokset muutettiin prosenteiksi kontrollin suhteen (prosenttia kontrollista).

Mesenkymaalisten kantasolujen riittävä luusoluerilaistuminen tarkistettiin vertaamalla PM ja OS kontroleja toisiinsa. Jos riittävää luusoluerilaistumista ei ollut, kyseiset tulokset hylättiin. Riittävän luusoluerilaistumisen rajana oli vähintään kaksinkertainen ero PM ja OS kontrollien arvojen välillä.

3.3.2 Kalsiumin pitoisuuden määrittäminen

Kantasoluja kasvatettiin viisi viikkoa PM- ja OS- liuoksissa sekä niiden proteiinilaimennoksissa (Taulukko 5.). Solut pestiin Ca/Mg vapaalla 1xPBS:llä kaksi kertaa. Pesujen jälkeen kaivot imettiin kuiviksi, levyt teipattiin, käärittiin parafilmiin ja folioon, jonka jälkeen levyt siirrettiin pakastimeen (-70 °C) säilytykseen myöhempää määrittystä varten. Kun levyt otettiin pois pakastimesta, niihin lisättiin 200 µl 0,6 M suolahappoa/kaivo, jonka annettiin inkuboitua yön yli. Vaihtoehtoisesti kaivoihin lisättiin heti pesujen jälkeen 200 µl 0,6 M suolahappoa/kaivo ja annettiin inkuboitua huoneenlämmössä yön yli.

Inkubaation jälkeen näytteet homogenisoitiin pipetillä purskuttelemalla ja kantasolunäytettä pipetoitiin 20 µl 96-kuoppalevyille. Levyille pipetoitiin kalsiumstandardit 20 µl: a/kuoppa, joiden pitoisuudet olivat 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mM (C.f.a.s Calibrator for automated systems, Roche). Kalsiumstandardeissa käytetty 2,64 mM stokkiliuos oli laimennettu veteen. Nollanäytteeksi pipetoitiin sekä kantasolunäytteissä että kalsiumstandardeissa käytettyä 0,6 M suolahappoa 20 µl/kuoppa. Sekä kantasolunäytteet että nollanäyte pipetoitiin 96-kuoppalevyille rinnakkaisina. Näytteiden ja standardien päälle lisättiin seoksena 150 µl puskuria (Roche) ja 50 µl kromogeenia (Roche) per kuoppa. Absorbanssi mitattiin kuoppalevylukijalla 550 nm:n aallonpituudella.

Saaduista kalsiumstandardiarvoista piirrettiin standardisuora, jonka yhtälön avulla laskettiin kalsiumpitoisuudet. Tämän jälkeen laskettiin keskiarvot rinnakkaisille näytteille. Näytteille laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat. Lopuksi tulokset muutettiin prosenteiksi OS -kontrollin suhteen (prosenttia kontrollista). Tulokset laskettiin prosenteiksi OS-kontrollin suhteen, koska saadut PM arvot olivat hyvin lähellä nollaa.

Mesenkymaalisten kantasolujen riittävä luusoluerilaistuminen tarkistettiin vertaamalla PM- ja OS -kontrolleja toisiinsa. Jos riittävää luusoluerilaistumista ei ollut tapahtunut, kyseiset tulokset hylättiin. Riittävän luusoluerilaistumisen rajana oli vähintään kaksinkertainen ero PM- ja OS -kontrollien arvojen välillä.

3.4 Kuntotesti

Kuntotestin tarkoituksena oli testata eri proteiinien vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon. Mesenkymaalisten kantasolujen kuntotesti on ryhmässämme aiemmin kehitetty menetelmä (Pietila ym., 2010). Kuntotestissä tarkastellaan kantasolujen mitokondrion kalvopotentiaalia 5,5',6,6'-tetrakloori-1,1',3,3'-tetraetyyli-benzimidazolihiihiili-syanidi jodi (JC-1, Sigma) vasta-aineen avulla. Kantasolussa JC-1 vasta-aine akkumuloituu mitokondrioon mitokondrion korkean kalvopotentiaalın aikana ja muodostaa aggregaatteja. Kantasolun mitokondrion depolarisaation aikana JC-1 vasta-aine vapautuu mitokondriosta ja muodostaa monomeerejä kantasolun solulimassa. JC-1 monomeerien emissiomaksimi on 530/30 nanometriä ja JC-1 aggregaateilla 590 nanometriä. Kuntotesti tehtiin vähintään kaksi kertaa eri kantasolulinjoilla maidon proteiinifraktiota kohden.

Kantasoluja kasvatettiin T175 kasvatuspulloissa. Kun soluja näytti olevan tarpeeksi (noin 0,5 milj.) tai solujen ollessa lähes konfluentteja, soluille lisättiin maidon proteiinifraktiolaimennokset (Taulukko 5.). Proteiinilaimennokset tehtiin PM:n. Kontrollisoluna käytettiin PM:ssa kasvaneita kantasoluja. Proteiinilaimennosten annettiin olla soluilla 3–4 päivää ennen analysointia.

Solut pestiin kerran 1xPBS:llä, jonka jälkeen solut irrotettiin 1xtrypsiinillä. Soluja inkuboitiin noin 5 minuutin ajan + 37 °C. Trypsiinin vaikutus inaktivoitiin lisäämällä pulloon sama määrä PM:sta jonka jälkeen solut sentrifugoitiin falconin pohjaan pelletiksi (5min, 200 g). Solut pestiin kerran 10 ml:lla 1xPBS:ää, jonka jälkeen solut laskettiin. Solut suspensoitiin 1 miljoona solua/ml.

Kontrollisoluista valmistettiin negatiivinen, positiivinen ja vähintään kolme rinnakkaista näytettä/proteiini (100 000 solua/ml/näyte). Proteiinilaimennoksessa olleista soluista tehtiin vähintään kolme rinnakkaista näytettä. Kaikille näytteille tehtiin samat käsittelyt. JC-1 vasta-aine lämmitettiin + 37 °C:seen ja lisättiin soluille hyvin sekoitettuna. Kaikille muille näytteille paitsi kontrollisolujen negatiiviselle näytteelle lisättiin JC-1 vasta-ainetta.

Kontrollisolujen positiiviselle näytteelle lisättiin JC-1 vasta-aineen lisäksi 1 mM:sta karbonyyli syanidi 3-kloorifenyylidihydrazonea liuotettuna etanoliin (CCCP, Sigma). CCCP:n loppukonsentraatio soluilla oli 1 μ M. CCCP:n tarkoitus on romahduttaa mitokondrion kalvopotentiaali. JC-1 vasta-aineesta käytettiin 1 mM käyttöliuosta. JC-1 vasta-aineen loppukonsentraatio soluilla oli 1 μ M. Vasta-aineen annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 30 minuuttia valolta suojattuna. Inkubaation jälkeen näytteet pestiin 1–2 kertaa 1xPBS:llä, jonka jälkeen solut suspensioitiin ~400 μ l:n 1xPBS:ää. Näytteet siirrettiin jälle odottamaan analysointia.

Kuntotesteihin käytettiin 399 5p, 412 4p, 405 5p, 404 5p ja 403 5p kantasolulinjoja. Jokainen maidon proteiini-fraktio on testattu vähintään kaksi kertaa kahdella eri kantasolulinjalla.

Pestyt valmiit näytteet analysoitiin virtausytometrillä saman päivän aikana (FACSCalibur, BECTON DICKINSON). Virtausytometrille säädettiin asetukset kontrollin negatiivisen näytteen mukaan (Taulukko 6.). Virtausytometrillä saatujen tulosten analysointi ja kompensatio tehtiin myöhemmin FlowJo -ohjelmalla.

Flow Jo -ohjelmalla rajattiin negatiiviset solupopulaatiot pois, jolloin saatiin monomeerien ja aggregaattien intensiteettiarvot. Näitä intensiteettiarvoja toisiinsa vertaamalla (aggregaatit/monomeerit) saadaan intensiteettisuhde, joka kertoo solujen kunnosta. CCCP käsitellyillä kantasoluilla aggregaattien ja monimeerien suhde oli noin 1 ja kontrollilla eli kasvatusliuoksessa kasvatetuilla kantasoluilla noin 3. Lopulliset tulokset laskettiin prosenttia kontrollista. Kontrollina toimi PM:ssa kasvatetut mesenkymaaliset kantasolut.

Taulukko 6. Asetukset, joita käytettiin virtausytometrillä.

Tunnistin	Jännite	Vahvistin	Moodi
FSC	E-1	3.45–4.00	lin
SSC	320–330	1.00	lin
FL1	300–310		log
FL2	300–310		log

3.5 Tulosten tilastollinen käsittely

Sekä luusoluerilaistumisesta että kuntotesteistä saadut tulokset analysoitiin Statistical Package for the Social Sciences -ohjelmalla (SPSS). Ryhmien välisiä tilastollisia eroavaisuuksia tarkasteltiin Kruskal-Wallis testillä. Kruskal-Wallis testiä käytetään varianssianalyysin sijasta järjestysasteikollisten muuttujien ja ei-normaalien jakaumien ryhmien välisiä eroja arvioitaessa. Kruskal-Wallis testissä vertaillaan ryhmien mediaaneja toisiinsa. Nollahypoteesi ($p=1$) on, että järjestyslukujakaumat ovat samat. Ryhmien välisiä eroja analysoitaessa merkitsevän eron alarajana pidettiin $p \leq 0.05$. Tällöin otamme viiden prosentin riskin, että nollahypoteesi pitää paikkansa. Muut p-arvot joita tuloksia analysoitaessa hyväksyttiin, olivat $p \leq 0.01$ ja $p \leq 0.001$.

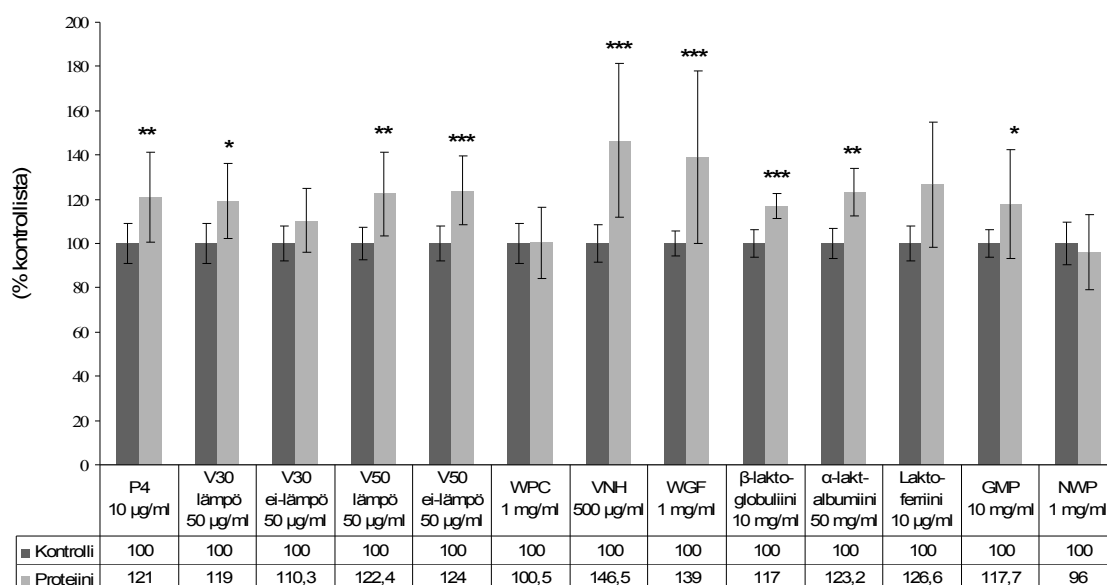
4. Tulokset

4.1 Kuntotesti

Kuntotestin avulla haluttiin tutkia onko maidon proteiinifraktioilla joko heikentäviä tai edistäviä vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon. Kuntotestillä mitattiin mitokondrion kalvojen potentiaalia JC-1 merkkiaineen avulla, joka akkumuloituu hyväkuntoisten kantasolujen mitokondrioon, mikä kertoo solujen elinkelpoisuudesta.

Kuntotestiin otettiin luusoluerilaistumismäärityksissä olleiden maidon proteiinifraktioiden vahvimmat pitoisuudet sekä kuusi muuta maidon proteiinifraktioita, joilta on jo aiemmin määritetty AFOS ja kalsium pitoisuudet (Taulukko 5.).

α -laktalbumiinilla (p 0.004), β -laktoglobuliinilla (p 0.001), P4- (p 0.008), V50 lämpö- (p 0.002), V50 ei-lämpö- (p 0.001), GMP- (p 0.021), WGF- (p < 0.001), VNH- (p 0.001), ja V30 lämpö- (p 0.012) proteiinifraktioilla on tilastollisesti merkitsevästi positiivisia vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon (Kuva 2.). Muilla maidon proteiinifraktioilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon (Kuva 2.). Voidaan päätellä, että maidon proteiinifraktioilla ei näyttäisi olevan heikentävää vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon ja useimmilla maidon proteiinifraktioilla on jopa edistävä vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon (Kuva 2.).



Kuva 2. Maidon eri proteiinifraktioiden vaikutukset mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon. Kontrollina on tavallisella kasvatusliuoksella kasvatetut vastaavat solut. Tulokset ovat laskettu prosentteina kontrollista (% kontrollista). Taulukkoon on merkitty käytetty proteiinifraktio ja sen pitoisuus. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonnat. Laskettiin Kruskal-Wallis testillä ryhmien välisiä eroavaisuuksia (* on $p < 0.05$, ** on $p < 0.01$ ja *** on $p < 0.001$), jotka on merkitty taulukkoon. P4 on P4 proteiinifraktio, V30 lämpö on Valion 30 lämpökäsittely proteiinifraktio, V30 ei-lämpö on Valion 30 ei-lämpökäsittely proteiinifraktio, V50 lämpö on Valion 50 lämpökäsittely proteiinifraktio, V50 ei-lämpö on Valion 50 ei-lämpökäsittely proteiinifraktio, WPC on Valion kaseiiniton kaseiinifraktio, VNH on Valion natiivi heraproteiinifraktio, WGF on heran kasvutekijäfraktio, GMP on GMP proteiinifraktio ja NWP on natiivi heraproteiinifraktio.

4.2 Alkalisen fosfataasin spesifisen aktiivisuuden ja kalsium pitoisuuden tulokset

Maidon proteiinifraktioiden vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa haluttiin selvittää tutkimalla AFOS -aktiivisuutta ja kalsiumin muodostumisen määrää. Maidon proteiineista otettiin luusoluerilaistumismäärityksiin kolme tai neljä eri pitoisuutta 0,1 µg/ml–1 mg/ml.

AFOS -aktiivisuutta ja kalsiumin määrää mittaamalla haluttiin selvittää kuinka aktiivista luusoluerilaistuminen on. AFOS on maksassa toimiva entsyymi, mutta sitä tarvitaan myös luun rakentamiseen. AFOS -aktiivisuus lisääntyy luun muodostumisen alkuvaiheessa. AFOS -aktiivisuuden nousu voi liittyä myös solujen stressitasoon, joka on otettu huomioon kuntotestein. Maidon proteiinifraktioiden vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa haluttiin selvittää mm. kalsiumin määrän tutkimisella. Ihmiselimistössä 99 % kalsiumista on luustossa, jossa kalsium osallistuu luuston

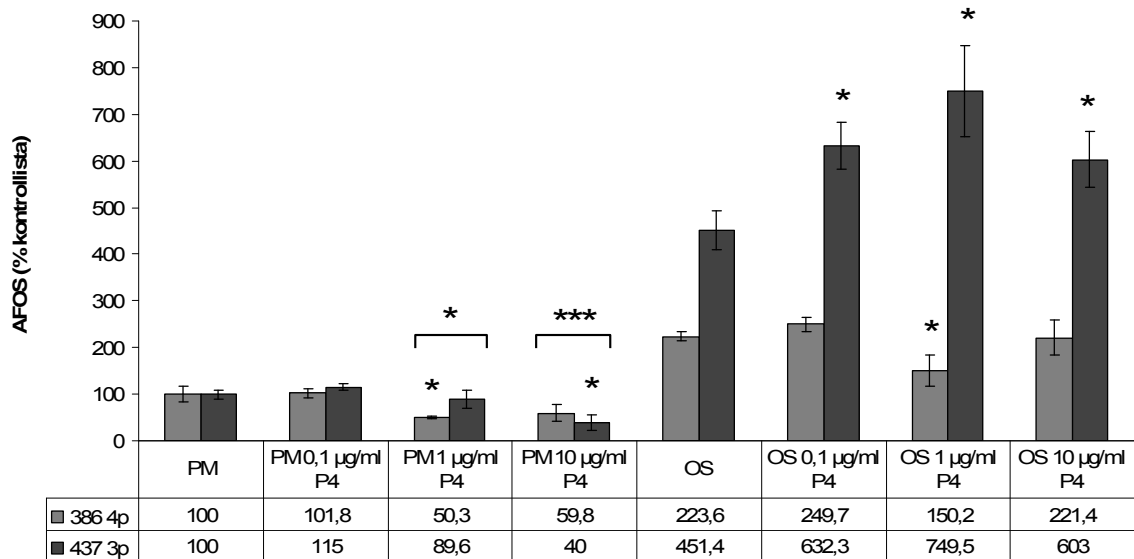
rakentamiseen ja luusto toimii tällöin elimistön kalsiumvarastona. Kalsiumin tärkein tehtävä on toimia luuston rakennusaineena.

4.2.1 P4 proteiinifraktio

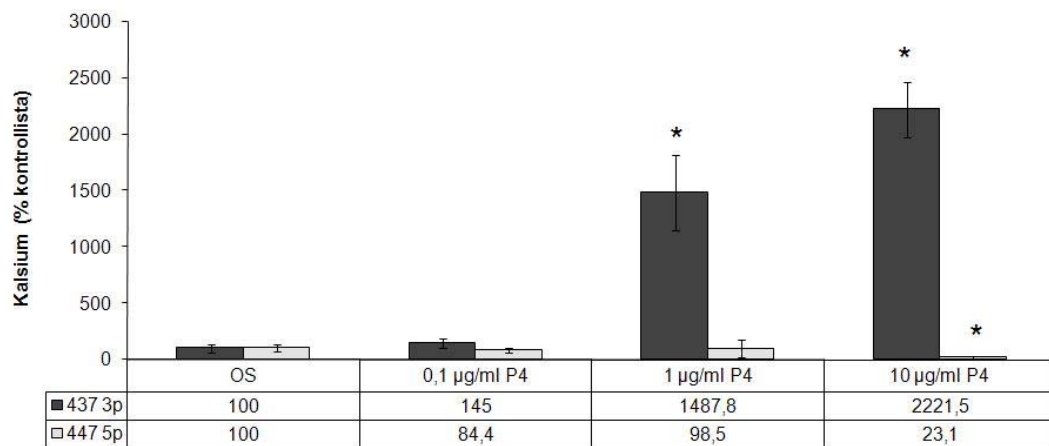
P4 proteiinifraktion vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen tutkittiin kolmella eri P4 proteiinin pitoisuudella (Taulukko 5.). P4 proteiinifraktio testattiin 447 5p, 386 4p ja 447 5p kantasolulinjoilla. AFOS tuloksissa 447 5p kantasolujen ja kalsium tuloksissa 386 4p kantasolujen tulokset hylättiin riittämättömän luusoluerilaistumisen vuoksi.

Kuvasta 3. nähdään, että AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkittävästi heikentynyt erilaistumattomien kantasolujen P4 proteiinin pitoisuuksilla 1 µg/ml (p 0.021) ja 10 µg/ml (p < 0.001). AFOS -aktiivisuus on vähentynyt tilastollisesti merkitsevästi sekä erilaistumattomilla että erilaistetuilla 386 4p kantasoluilla P4 proteiinin pitoisuudella 1 µg/ml (p 0.029) ja 437 3p kantasoluilla 10 µg/ml pitoisuudella (p 0.029) (Kuva 3.). AFOS -aktiivisuus nousee merkittävästi P4 proteiinin pitoisuuksilla 0.1, 1 ja 10 µg/ml erilaistetuilla 437 3p kantasoluilla (p 0.029) (Kuva 3.). Muilla näytteillä ei ole tilastollisesti merkitseviä muutoksia AFOS -aktiivisuudessa (Kuva 3.).

Kuten kuvasta 4. nähdään, P4 proteiinifraktiolla on ollut päinvastaisia vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa kalsiumin muodostumiseen. P4 proteiinin pitoisuuksilla 1 ja 10 µg/ml on ollut tilastollisesti merkitsevästi edistävä vaikutus kalsiumin muodostumisessa 437 3p kantasoluilla (p 0.029) kun taas P4 proteiinin pitoisuudella 10 µg/ml on ollut tilastollisesti merkittävästi heikentävä vaikutus kalsiumin muodostumisessa 447 5p kantasoluilla (p 0.029) (Kuva 4.). Vaikka kalsiumin määrä nousee toisessa testatuista kantasolunäytteistä tilastollisesti merkitsevästi, niin toisella kantasolunäytteellä nähtiin tilastollisesti merkitsevä lasku. Tämän vuoksi ei voida vetää johtopäätöstä, että P4 proteiinilla olisi selkeää vaikutusta AFOS -aktiivisuuden ja kalsiumin määrässä mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa (Kuvat 3–4.).



Kuva 3. P4 proteiinilaimennosten vaikutukset alkalisen fosfataasin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja ja OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja. AFOS on spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p \leq 0.05$ ja *** on $p \leq 0.001$ Kruskal-Wallis testillä. Kruskal-Wallis testissä PM näytteet on verrattu PM – kontrolliin ja OS näytteet on verrattu OS – kontrolliin. P4 on P4 proteiinifraktio.



Kuva 4. P4 proteiinilaimennosten vaikutukset kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ Kruskal-Wallis testillä. P4 on P4 proteiinifraktio.

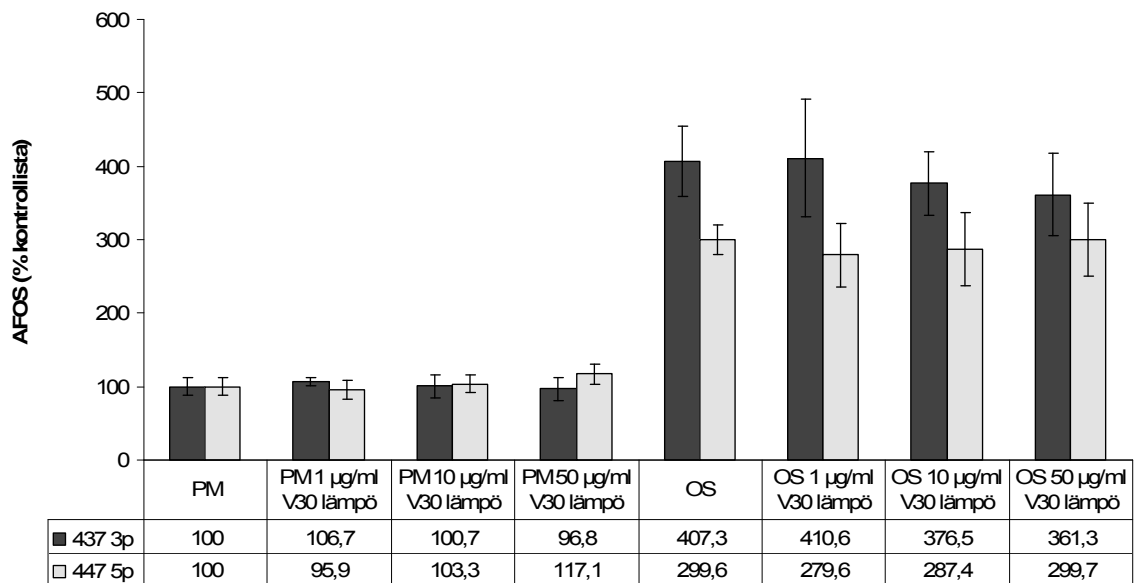
4.2.2 Valion 30 lämpökäsitelty proteiinifraktio

V30 lämpö proteiinin vaikutuksia testattiin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen kolmella eri V30 lämpö proteiinin pitoisuudella (Taulukko 5.). V30 lämpö proteiinifraktio sisältää runsaasti insuliinia. V30 lämpö proteiinifraktio testattiin 437 3p, 403 4p ja 447 5p kantasolulinjoilla. AFOS tuloksissa 403 4p kantasolujen tulokset hylättiin riittämättömän luusoluerilaistumisen vuoksi.

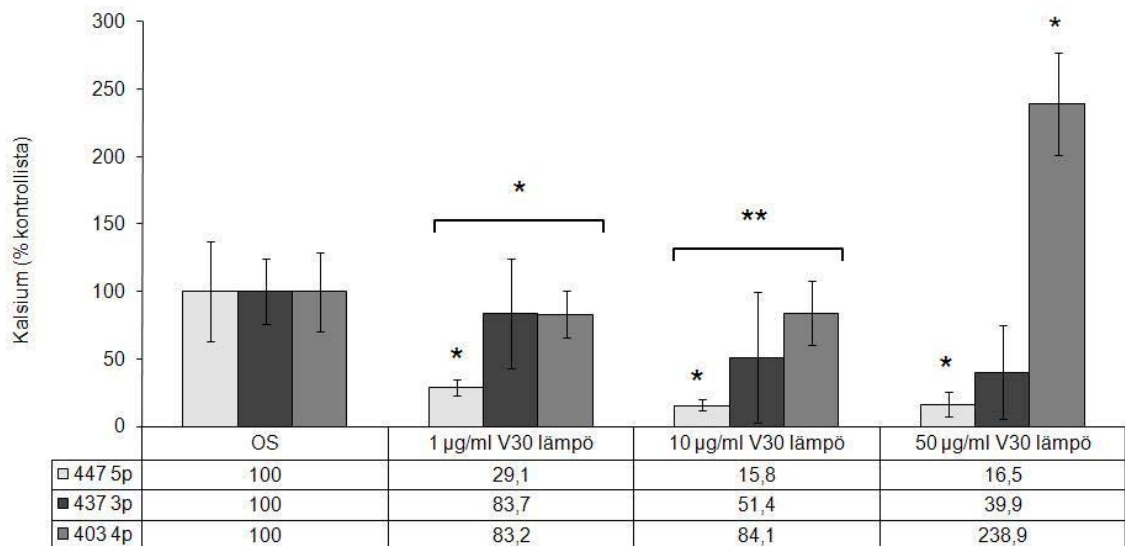
Kuten kuvasta 5. nähdään, V30 lämpö proteiinifraktiolla ei ole ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta AFOS -aktiivisuudessa mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa.

V30 lämpö proteiinin kaikilla pitoisuuksilla on ollut tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen erilaistetuilla 447 5p kantasoluilla (p 0.029), kun taas erilaistetuilla 403 4p kantasoluilla on ollut tilastollisesti merkitsevästi edistävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen V30 lämpö proteiinin pitoisuudella 50 µg/ml (p 0.029) (Kuva 6.).

Pitoisuuksittain verrattuna sekä V30 lämpö proteiinin pitoisuudella 1 µg/ml (p 0.014) että 10 µg/ml (p 0.005) on ollut tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa (Kuva 6.). Kuvasta 6. nähdään, V30 lämpö proteiinilla on ollut enemmän heikentävä kuin edistävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa.



Kuva 5. V30 lämpökäsitellyn proteiini-laimennosten vaikutukset alkalisen fosfaatin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja, OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja ja AFOS on spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. V30 lämpö on Valion 30 lämpökäsitelty proteiini-fraktio.



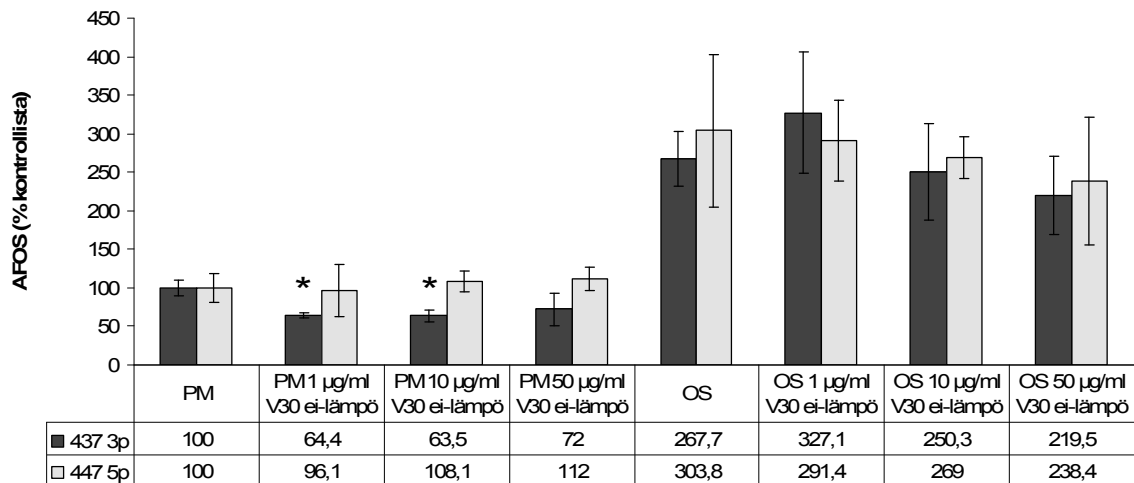
Kuva 6. V30 lämpökäsitellyn proteiini-laimennosten vaikutukset kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ ja ** on $p < 0.01$ Kruskal-Wallis testillä. V30 lämpö on Valion 30 lämpökäsitelty proteiini-fraktio.

4.2.3 Valion 30 ei-lämpökäsitelty proteiinifraktio

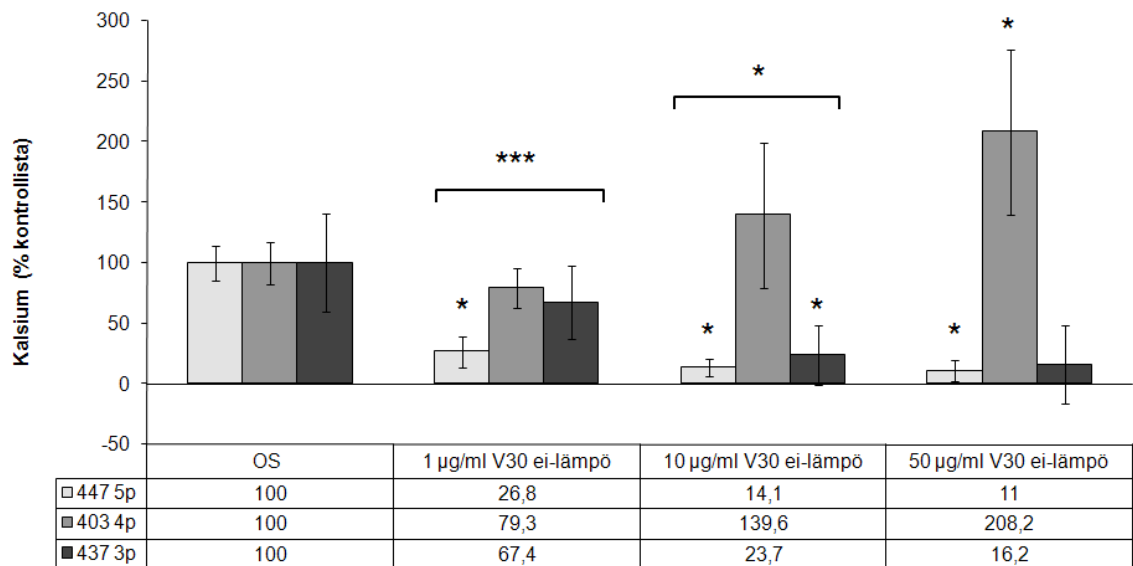
V30 ei-lämpö proteiinin vaikutuksia testattiin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen kolmella eri proteiinin pitoisuudella (Taulukko 5.). V30 ei-lämpö proteiinifraktio sisältää runsaasti insuliinia. V30 ei-lämpö proteiinifraktio testattiin 437 3p, 403 4p ja 447 5p kantasolulinjoilla. V30 ei-lämpö proteiinifraktion AFOS tulokset hylättiin 403 4p kantasoluilla riittämättömän luusoluerilaistumisen vuoksi.

Kuvasta 7. nähdään, ainoastaan erilaistumattomien 437 3p kantasolujen AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi heikentynyt V30 ei-lämpö proteiinin pitoisuuksilla 1 ja 10 µg/ml (p 0.029). Muilla näytteillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja AFOS -aktiivisuudessa mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa (Kuva 7.).

Erilaistetuilla 447 5p kantasoluilla on ollut tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen V30 ei-lämpö proteiinin kaikilla pitoisuuksilla (p 0.029) (Kuva 8.). Myös 437 3p kantasoluilla on ollut tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen V30 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 10 µg/ml (p 0.029) (Kuva 8.). Ainoastaan V30 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 50 µg/ml on ollut edistävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen 403 4p kantasoluilla (p 0.029) (Kuva 8.). Pitoisuuksittain vertailtuna sekä V30 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 1 µg/ml (p 0.001) että 10 µg/ml (p 0.02) on tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa (Kuva 8.). Kuten kuvasta 7. nähdään, V30 ei-lämpö proteiinilla on ollut enemmän heikentävä kuin edistävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa.



Kuva 7. V30 ei-lämpö proteiinilaimennosten vaikutukset alkalisen fosfataasin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja, OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja ja AFOS on spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ Kruskal-Wallis testillä. Kruskal-Wallis testissä PM näytteet on verrattu PM-kontrolliin ja OS näytteet on verrattu OS-kontrolliin. V30 ei-lämpö on Valion 30 ei-lämpökäsitelty proteiinifraktio.



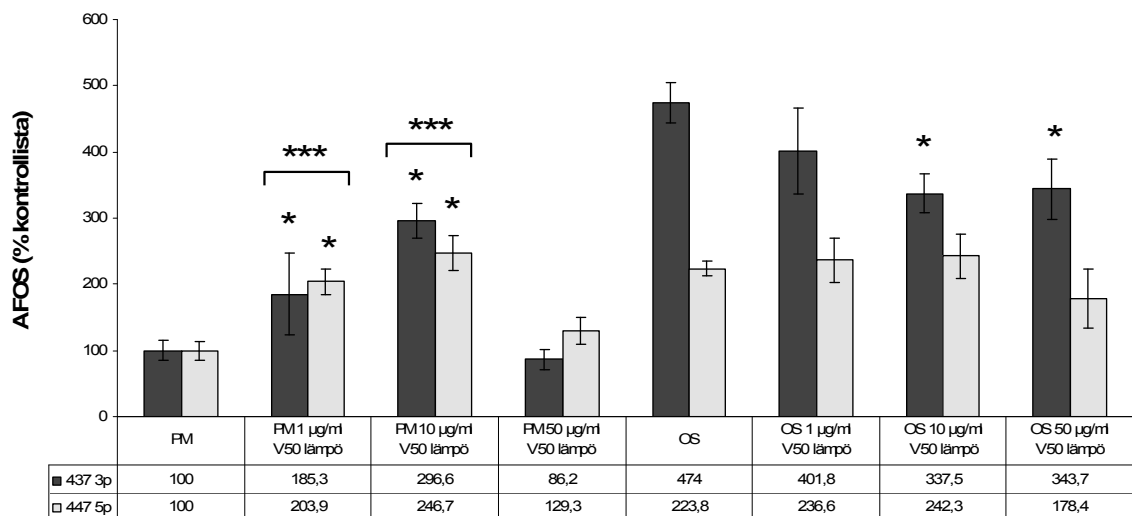
Kuva 8. V30 ei-lämpö proteiinilaimennosten vaikutukset kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ ja *** on $p < 0.001$ Kruskal-Wallis testillä. V30 ei-lämpö on V30 ei-lämpökäsitelty proteiinifraktio. V30 ei-lämpö on Valion 30 ei-lämpökäsitelty proteiinifraktio.

4.2.4 Valion 50 lämpökäsitelty proteiinifraktio

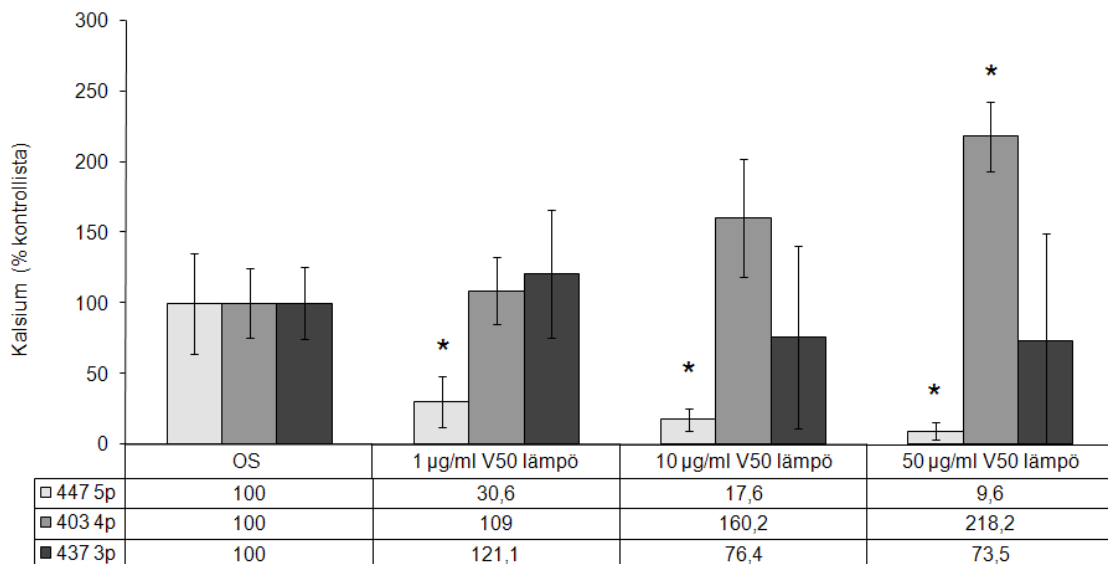
V50 lämpö proteiinin vaikutuksia testattiin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen kolmella eri V50 lämpö proteiinin pitoisuudella (Taulukko 5.). V50 lämpö fraktio sisältää runsaasti α -laktalbumiinia. V50 lämpö proteiinifraktio testattiin 437 3p, 403 4p ja 447 5p kantasolulinjoilla. 403 4p kantasolujen AFOS tulokset hylättiin riittämättömän luusoluerilaistumisen vuoksi.

Pitoisuuksittain verrattuna V50 lämpö proteiinin pitoisuuksilla 1 ja 10 $\mu\text{g/ml}$ AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi lisääntynyt erilaistumattomilla kantasoluilla ($p < 0.001$) (Kuva 9.). AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi lisääntynyt erilaistumattomilla kantasoluilla kaikilla solulinjoilla V50 lämpö proteiinin pitoisuuksilla 1 ja 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p 0.029$) (Kuva 10.). Erilaistetuilla 437 3p kantasoluilla AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi vähentynyt V50 lämpö proteiinin pitoisuuksilla 10 ja 50 $\mu\text{g/ml}$ ($p 0.029$) (Kuva 9.). Muilla näytteillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä muutoksia AFOS -aktiivisuudessa (Kuva 9.).

447 5p kantasoluilla on ollut tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus kalsiumin muodostumisessa V50 lämpö proteiinin kaikilla pitoisuuksilla ($p 0.029$) kun taas V50 lämpö proteiinin pitoisuudella 50 $\mu\text{g/ml}$ on ollut tilastollisesti merkitsevästi edistävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen 403 4p kantasoluilla ($p 0.029$) (Kuva 10.). Kuten kuvista 9. ja 10. nähdään, V50 lämpö proteiinilla ei ole selkeää vaikutusta kalsiumin muodostumiseen mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa vaan eri kantasolulinjat ovat reagoineet V50 lämpö proteiiniin eri tavoilla.



Kuva 9. V50 lämpö proteiinilaimennosten vaikutukset alkalisen fosfaatin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja, OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja ja AFOS on spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ ja *** on $p < 0.001$ Kruskal-Wallis testillä. Kruskal-Wallis testissä PM näytteet on verrattu PM-kontrolliin ja OS näytteet on verrattu OS-kontrolliin. V50 lämpö on Valion 50 lämpökäsittely proteiinifraktio.



Kuva 10. V50 lämpö proteiinilaimennosten vaikutukset kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ Kruskal-Wallis testillä. V50 lämpö on Valion 50 lämpökäsittely proteiinifraktio.

4.2.5 Valion 50 ei-lämpökäsitelty proteiinifraktio

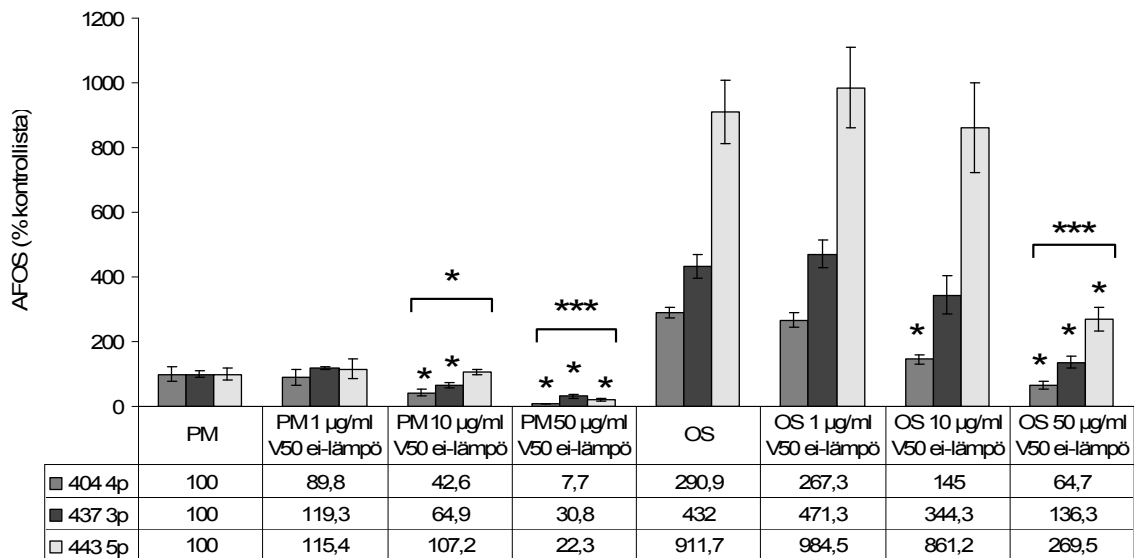
V50 ei-lämpö proteiinin vaikutuksia testattiin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen kolmella eri V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella (Taulukko 5.). V50 ei-lämpö fraktio sisältää runsaasti α -laktalbumiinia. V50 ei-lämpö proteiinifraktio tutkittiin 437 3p, 404 4p ja 443 5p kantasolulinjoilla.

Kuvasta 11. nähdään, V50 ei-lämpö proteiini tilastollisesti merkitsevästi estää AFOS -aktiivisuutta vahvimalla pitoisuudellaan (50 $\mu\text{g/ml}$) sekä erilaistumattomilla että erilaistetuilla näytteillä kaikilla solulinjoilla (p 0.029). V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 10 $\mu\text{g/ml}$ 404 4p solulinjan sekä erilaistumattomilla että erilaistetuilla näytteillä ja 437 3p solulinjan erilaistumattomalla näytteellä AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi heikentynyt (p 0.029) (Kuva 11.).

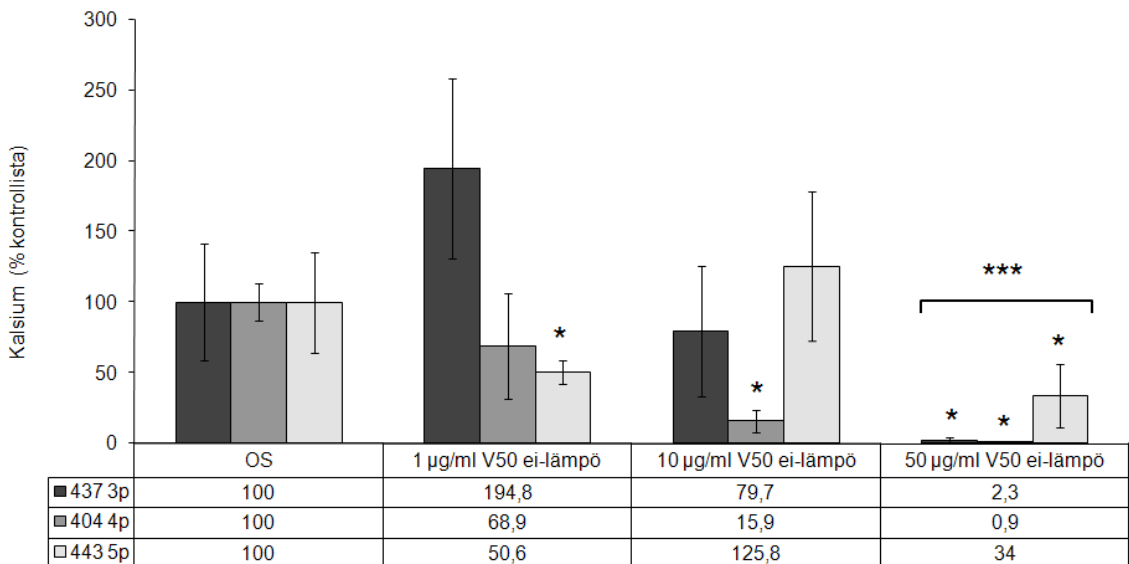
Pitoisuuksittain verrattuna AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi heikentynyt erilaistumattomien näytteiden V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuuksilla 10 $\mu\text{g/ml}$ (p 0.017) ja 50 $\mu\text{g/ml}$ (p < 0.001) sekä erilaistettujen näytteiden V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 50 $\mu\text{g/ml}$ (p < 0.001) (Kuva 11.).

Kuvasta 12. nähdään, kalsiumin muodostuminen mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa on tilastollisesti merkitsevästi heikentynyt V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 50 $\mu\text{g/ml}$ kaikilla solulinjoilla (p 0.029) kuten myös 404 4p solulinjalla V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 10 $\mu\text{g/ml}$ (p 0.029) ja 443 5p kantasolulinjalla V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 1 $\mu\text{g/ml}$ (p 0.029) (Kuva 12.). Muilla näytteillä kalsiumin määrien muutoksissa ei ole tilastollisesti merkitsevää vaikutusta (Kuva 12.). Kuten kuvasta 12. nähdään, mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistuminen estyy V50 ei-lämpö proteiinin pitoisuudella 50 $\mu\text{g/ml}$ (p < 0.001).

V50 ei-lämpö proteiinilla näyttäisi olevan heikentävä vaikutus sekä AFOS -aktiivisuuden että kalsiumin muodostumiseen mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa (Kuvat 11.–12.).



Kuva 11. V50 ei-lämpö proteiini-laimennosten vaikutukset alkalisen fosfataasin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja, OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja ja AFOS on spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ ja *** on $p < 0.001$ Kruskal-Wallis testillä. Kruskal-Wallis testissä PM näytteet on verrattu PM-kontrolliin ja OS näytteet on verrattu OS-kontrolliin. V50 ei-lämpö on Valion 50 ei-lämpökäsitelty proteiini-fraktio.



Kuva 12. V50 ei-lämpö proteiini-laimennosten vaikutukset kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ ja *** on $p < 0.001$ Kruskal-Wallis testillä. V50 ei-lämpö on Valion 50 ei-lämpökäsitelty proteiini-fraktio.

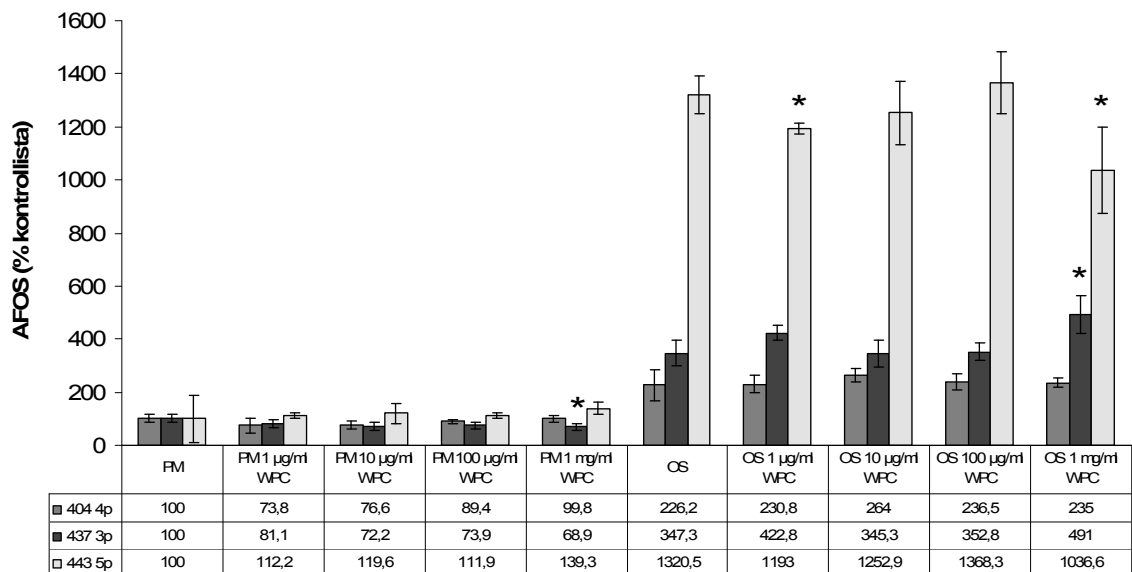
4.2.6 Valion kaseiiniton kaseiinifraktio

WPC proteiinin vaikutuksia testattiin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen neljällä eri WPC proteiinin pitoisuudella (Taulukko 5.). WPC proteiinifraktio testattiin 437 3p, 404 4p ja 443 5p kantasolulinjoilla.

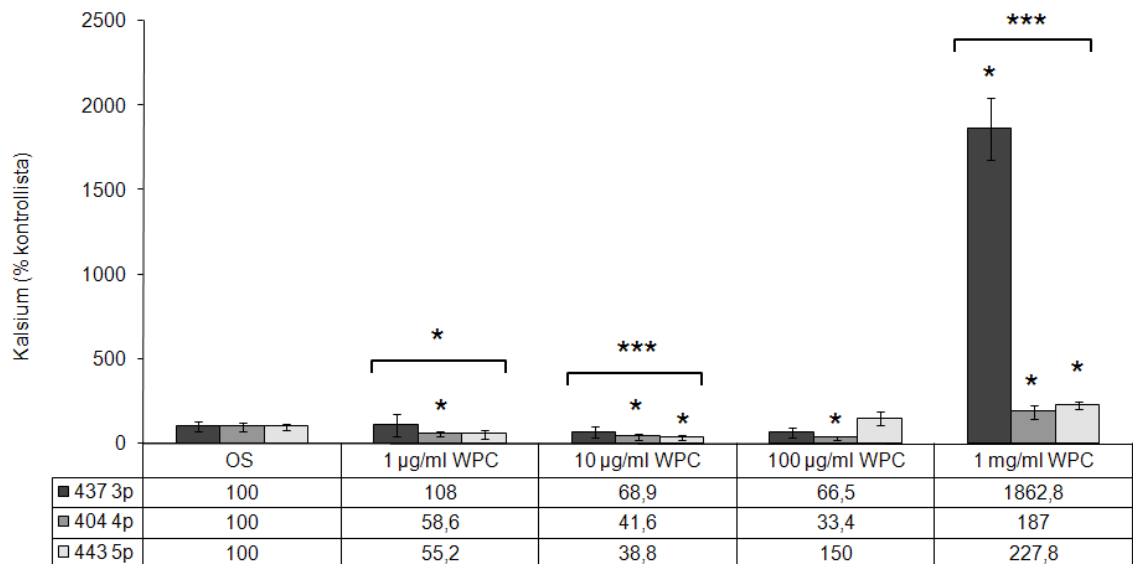
WPC proteiinilla AFOS -aktiivisuudessa 404 4p solulinjalla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta (Kuva 13.). Erilaistumattomien 437 3p kantasolujen AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi vähentynyt WPC proteiinin 1 mg/ml pitoisuudella (p 0.029) kun taas samoilla erilaistetuilla kantasoluilla samalla WPC proteiinin pitoisuudella AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkitsevästi lisääntynyt (p 0.029) (Kuva 13.). Erilaistettujen 443 5p kantasolujen AFOS -aktiivisuus on tilastollisesti merkittävästi vähentynyt WPC proteiinin pitoisuuksilla 1 µg/ml ja 1mg/ml (p 0.029) (Kuva 13.). Kuten kuvasta 13. nähdään, WPC proteiinilla ei näyttäisi olevan kokonaisuudessaan merkitseviä vaikutuksia AFOS -aktiivisuudessa mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa.

443 5p kantasolulinjalla WPC proteiinin pitoisuudella 10 µg/ml sekä 404 4p solulinjalla WPC proteiinin pitoisuudella 1, 10 ja 100 µg/ml on tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus kalsiumin muodostumiseen mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa (Kuva 14., p 0.029). Kalsiumin muodostuminen tilastollisesti merkittävästi lisääntyy mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa kaikilla solulinjoilla WPC proteiinin pitoisuudella 1 mg/ml (p 0.029) (Kuva 14.). Muilla WPC proteiinin pitoisuuksilla ei ole merkittävää vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa (Kuva 14.).

Kuvasta 14. nähdään, että WPC proteiinin pitoisuudet 1 µg/ml (p 0.017) ja 10 µg/ml (p < 0.001) näyttäisivät tilastollisesti merkitsevästi heikentävän ja, että WPC proteiinin pitoisuus 1 mg/ml (p < 0.001) näyttäisi tilastollisesti merkitsevästi edistävän kalsiumin muodostumista mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa.



Kuva 13. WPC proteiini-laimennosten vaikutukset alkalisen fosfaatin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusolu-erilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja, OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja ja AFOS on spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ Kruskal-Wallis testillä. Kruskal-Wallis testissä PM näytteet on verrattu PM-kontrolliin ja OS näytteet on verrattu OS-kontrolliin. WPC on Valion kaseiinin kaseiinifrakto.

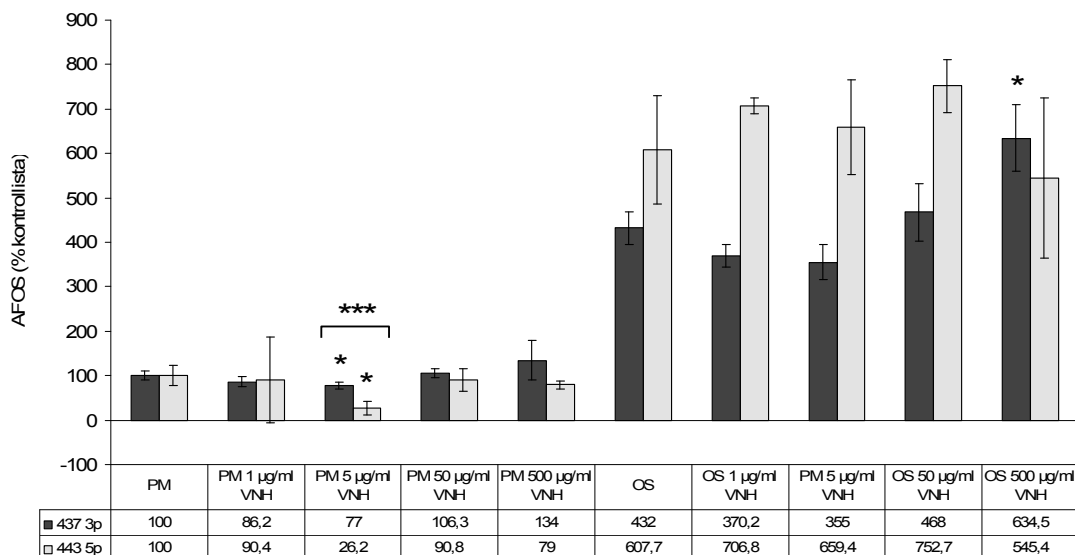


Kuva 14. WPC proteiini-laimennosten vaikutukset kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusolu-erilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ ja *** on $p < 0.001$ Kruskal-Wallis testillä. WPC on Valion kaseiinin kaseiinifrakto.

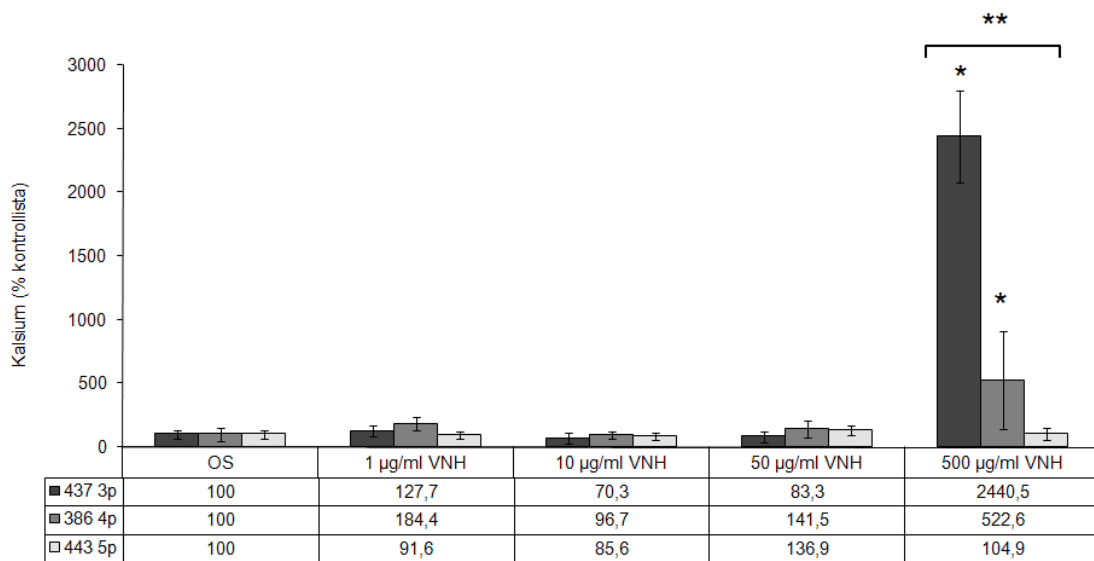
4.2.7 Valion natiivi heraproteiinifraktio

VNH proteiinin vaikutuksia testattiin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen neljällä eri VNH proteiinin pitoisuudella (Taulukko 5.). VNH proteiinifraktio testattiin 437 3p, 386 4p ja 443 5p kantasolulinjoilla. 386 4p kantasolujen AFOS tulokset hylättiin riittämättömän luusoluerilaistumisen vuoksi.

AFOS -aktiivisuus on merkittävästi vähentynyt kaikilla erilaistumattomilla kantasolulinjoilla VNH proteiinin pitoisuudella 5 µg/ml (p 0.029) (Kuva 15.). VNH proteiinin pitoisuudella 5 µg/ml on tilastollisesti merkitsevästi heikentävä vaikutus AFOS -aktiivisuuteen erilaistumattomilla kantasoluilla (p 0.001) (Kuva 15.). VNH proteiinin pitoisuus 500 µg/ml tilastollisesti merkitsevästi edistää sekä AFOS -aktiivisuutta että kalsiumin määrää 437 3p kantasolulinjalla ja kalsiumin muodostumista 386 4p kantasolulinjalla (p 0.029) (Kuvat 15.–16.). Pitoisuuksittain verrattuna VNH proteiinin pitoisuus 500 µg/ml tilastollisesti merkitsevästi edistää kalsiumin muodostumista (p 0.005) (Kuva 16.). Kuten kuvista 15. ja 16. nähdään, VNH proteiini näyttäisi enemmän edistävän kuin heikentävän mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumista.



Kuva 15. VNH proteiinilaimennosten vaikutukset alkalisen fosfaatin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja, OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja ja AFOS on spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia. Pylväisiin on merkitty ± keskihajonta. * on p < 0.05 ja *** on p < 0.001 Kruskal-Wallis testillä. Kruskal-Wallis testissä PM näytteet on verrattu PM-kontrolliin ja OS näytteet on verrattu OS-kontrolliin. VNH on Valion natiivi heraproteiinifraktio.



Kuva 16. VNH proteiini-laimennosten vaikutukset kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamislouksessa kasvatettuja soluja. Pylväisiin on merkitty \pm keskihajonta. * on $p < 0.05$ ja ** on $p < 0.01$ Kruskal-Wallis testillä. VNH on Valion natiivi heraproteiini-fraktio.

4.2.8 Yhteenvetoa luusoluerilaistumismäärityksistä

AFOS -aktiivisuuden ja kalsiumin tulokset laskettiin prosenteiksi sen vuoksi, että proteiini-fraktioiden tulokset saataisiin samaan kuvaajaan helposti vertailtaviksi. Tämän vuoksi tuloksista tehdyissä kuvaajissa ei näy lainkaan alkuperäisiä AFOS- ja kalsium -arvojen lähtötasoja. Taulukkoon 7 merkittiin eri kantasolulinjat tietoisesti, kantasolulinjojen AFOS -aktiivisuus erilaistamattomilla, erilaistetuilla soluilla sekä kantasolujen erilaistumistehokkuus. Kuten taulukosta 7 nähdään, eri kantasolulinjojen välillä on paljon eroavaisuuksia AFOS -arvojen lähtötasoissa ja luusoluerilaistumistehokkuudessa. 443 kantasolulinja näyttäisi olevan hyvä erilaistumaan osteoblasteiksi ja 404 kantasolulinjalla erilaistamattomien kantasolujen AFOS -aktiivisuuden lähtötaso on muita paljon korkeampi (Taulukko 7). Taulukosta 7 nähdään, että eri kantasolulinjojen välillä on suuria eroja. Esimerkiksi erilaistumattomien kantasolulinjojen spesifinen afos aktiivisuus/mg proteiinia arvot on 26–253 ja erilaistumistehokkuus on 145–870 % (Taulukko 7.).

Taulukko 7. Tutkimuksessa käytettyjen kantasolulinjojen luovuttajien sukupuoli ja syntymävuosi, ja spesifisen alkalisen fosfataasin -aktiivisuus tulokset (keskiarvo \pm keksihajonta ja % kontrollista). PM tarkoittaa tavallisessa kasvatusliuoksessa kasvatettuja erilaistumattomia mesenkymaalaisia kantasoluja ja OS luusoluerilaistumisliuoksessa kasvatettuja erilaistettuja mesenkymaalaisia kantasoluja.

Kantasolulinja	Luovuttajan sukupuoli	Luovuttajan syntymävuosi	AFOS (spesifinen afos -aktiivisuus/mg proteiinia)		
			PM	OS	%
447	Nainen	1936	82 \pm 14,1	223 \pm 42	272
443	Mies	1936	69 \pm 34,6	595 \pm 96,3	870
437	Mies	1994	51 \pm 6,5	199 \pm 34,8	393
404	Mies	1968	146 \pm 27,8	375 \pm 67,6	257
403	Mies	1955	253 \pm 367,2	367 \pm 173,1	145
386	Nainen	1931	26 \pm 4,5	58 \pm 2,4	223

Luusoluerilaistumismäärittysten tuloksista on vaikea vetää yhteenvedoa. Taulukosta 8. näkee millä tavalla kukin proteiinifraktio on vaikuttanut eri mesenkymaalisiin kantasolulinjoihin (Taulukko 8.). Taulukosta 8 nähdään, että kalsium -määrittelyksissä 447 5p kantasolulinjalla luusoluerilaistuminen on estynyt kun taas 403 4p kantasolulinjalla luusoluerilaistuminen on lisääntynyt riippumatta siitä mitä proteiinifraktiota kantasolulle on annettu. Muilla kantasolulinjoilla proteiinifraktioilla on ollut vaihteleva vaikutus luusoluerilaistumiseen (Taulukko 8.).

Taulukko 8. Maidon proteiinifraktioiden vaikutukset eri kantasolulinjoihin alkalisen fosfataasin aktiivisuuden ja kalsiumin pitoisuuden määrittämissä. Taulukkoon on merkitty ainoastaan maidon proteiinifraktion positiiviset ja/tai negatiiviset vaikutukset luusoluerilaistumiseen. Jos maidon proteiinifraktiolla ei ole ollut merkitsevää vaikutusta lainkaan, taulukkoon on merkitty \pm . Taulukosta on jätetty pois hylätyt erilaistumistestien tulokset. WPC on Valion kaseiiniton kaseiinifraktio ja VNH on Valion natiivi heraproteiinifraktio.

Proteiini	Kantasolulinjat								
	Alkalisen fosfataasin aktiivisuus				Kalsiumin pitoisuus				
	437 3p	443 5p	404 4p	447 5p	437 3p	443 5p	404 4p	447 5p	403 4p
P4	+				+			-	
V30 lämpö	\pm			\pm	\pm			-	+
V30 ei-lämpö	\pm			\pm	-			-	+
V50 lämpö	-			\pm	\pm			-	+
V50 ei-lämpö	-	-	-		-	-	-		
WPC	+	-	\pm		+	- / +	- / +		
VNH	+	\pm			+	\pm			

5. Tulosten tarkastelu

Pro Gradu tutkielmani oli osa Valion ja Turun yhteistyöprojektia. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää tiettyjen maidon proteiinifraktioiden vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa AFOS -aktiivisuuden ja kalsium -määrytyksien avulla. Lisäksi tutkittiin myös näiden maidon proteiinifraktioiden vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen kuntoon ja täten suljettiin pois AFOSin mahdollisen nousun väärintulkitseminen.

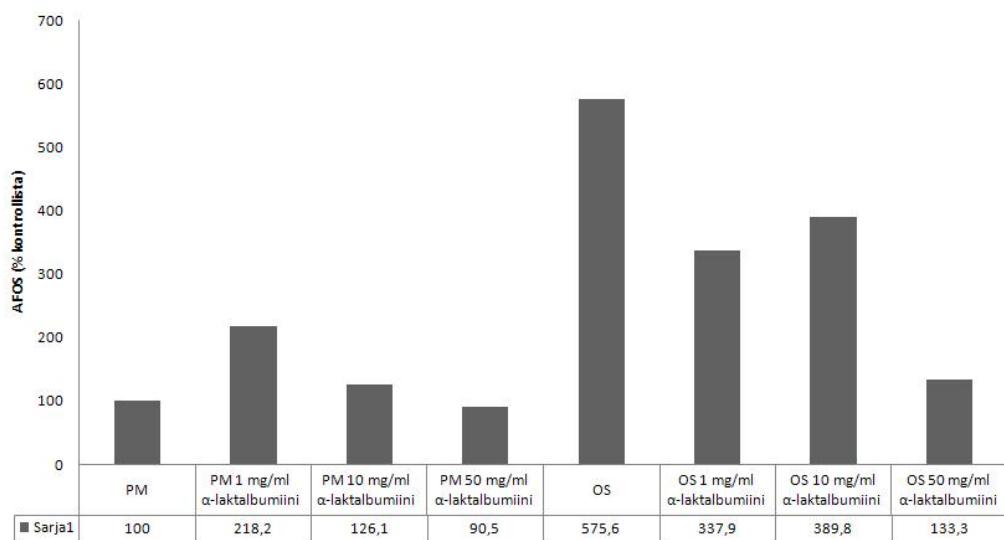
Tutkimukseni selkein tulos saatiin mesenkymaalisten kantasolujen kuntotesteistä (Kuva 2.). Tulosten perusteella tutkitut maidon proteiinifraktiot näyttäisivät pääosin jopa parantavan mesenkymaalisten kantasolujen kuntoa. Ainoastaan V30 ei-lämpö, WPC, laktoferriini ja NWP proteiinifraktioilla ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa verrattuna kontrolliinsa. Kuitenkaan nämä proteiinifraktiot eivät heikentäneet mesenkymaalisten kantasolujen kuntoa. On kuitenkin mahdollista, että kuntotesteissä näkynyt mesenkymaalisten kantasolujen kunnan paraneminen voisi olla mitokondrion toiminnan lisääntynyttä aktiivisuutta. Mitokondrion lisääntynyt aktiivisuus voi tarkoittaa esimerkiksi sitä, että solut aloittavat erilaistumisen luusuuntaan tai ovat alttiimpia eri ärsykeille, jotka johtavat erilaistumiseen. Mesenkymaaliset kantasolut kasvoivat maidon proteiinifraktiolaimennoksissa kolmesta neljään päivää, joka voi olla liian lyhyt aika mittaamaan kunnan paranemista. Lyhyestä seuranta-ajasta huolimatta tuloksista voidaan päätellä, etteivät tutkitut maidon proteiinifraktiot ainakaan huononna mesenkymaalisten kantasolujen kuntoa.

AFOS- ja kalsium-tulokset olivat osittain hankalasti tulkittavia. Kuitenkin selkein ja merkittävin tulos oli V50 ei-lämpö proteiinin estävä vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen (Kuvat 11.–12.). V50 lämpö proteiinifraktion tulokset ovat sen sijaan ristiriitaisia (Kuvat 9.–10.) kuten esimerkiksi V50 lämpöfraktion kalsium tulokset (Kuva 10.). V50 lämpö proteiinifraktion AFOS tuloksissa PM:ssa kasvatettujen kantasolujen AFOS arvot olivat nousseet pienemmällä proteiinifraktion pitoisuuksilla (Kuva 9.), mikä voi viitata joko spontaanin erilaistumisen lisääntymiseen tai solustressiin erilaistumattomilla kantasoluilla. V50 proteiinifraktiot oli tehty käsittelemättömästä tilamaidosta, joka sisälsivät paljon α -laktalbumiinia. Lämpökäsitellyn α -laktalbumiinin on todettu tekevän ristisidoksia joko itsensä ja/tai muiden proteiinien kanssa, mikä vaikuttaa

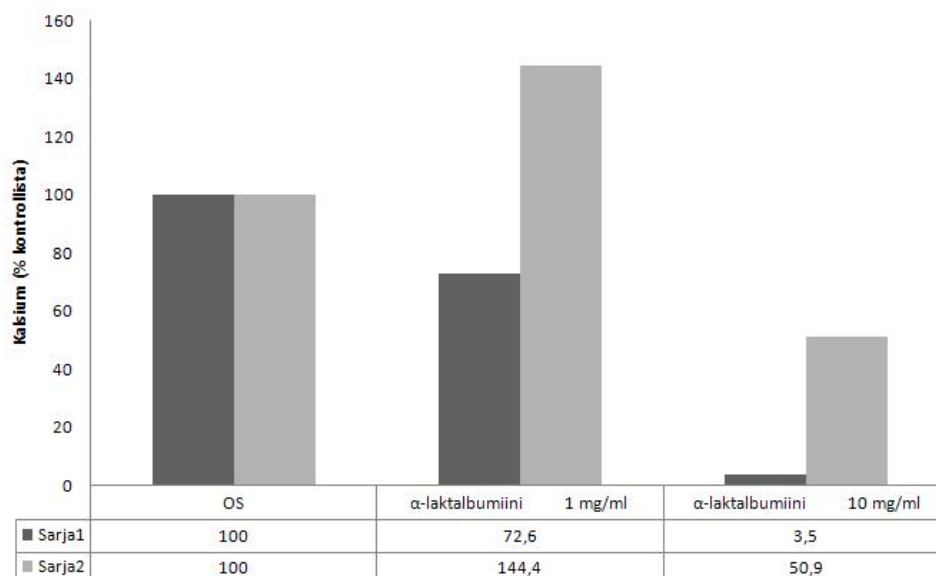
sekä α -laktalbumiinin että muiden proteiinien bioaktiivisuuteen (ks. katsausartikkeli Chatterton ym., 2006). V50 lämpö proteiinifraktiolle on tehty lämpökäsittely. Koska se sisältää runsaasti α -laktalbumiinia, proteiinien välille on oletettavasti muodostunut ristsidoksia, mikä on muuttanut proteiinifraktion bioaktiivisuutta. Vertailtaessa V50 lämpö ja V50 ei-lämpö proteiinifraktioiden tuloksia keskenään, juuri lämpökäsittelyllä V50 ei-lämpö proteiinifraktiolla on ollut negatiivinen vaikutus luusoluerilaistumiseen (Kuvat 9.–12.). Voi olla mahdollista, että tehdyllä lämpökäsittelyllä on ollut vaikutus V50 proteiinifraktioiden vaikutuksiin luusoluerilaistumisessa ja α -laktalbumiinilla voi olla negatiivinen vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen. Toisaalta α -laktalbumiinin pitoisuutta V50 proteiinifraktioissa kuten muissakaan fraktioissa ei tiedetä. Esimerkiksi VNH proteiinifraktio sisältää myös α -laktalbumiinia eikä VNH proteiinifraktiolla ole ollut negatiivista vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen (Kuvat 15.–16.). On otettava kuitenkin huomioon, että fraktioiden puhdistukset on mahdollisesti suoritettu eri tavoilla ja eri liuoksia apuna käyttäen, jolloin on mahdollista, että fraktioissa olevat samat proteiinit saattavat olla hyvin eri muodossa tai toisessa fraktiossa saattaa olla mukana joitakin myötävaikuttajia tai vastavaikuttajia.

Kuntotestejä tehdessä virtaussytometrillä huomattiin, että α -laktalbumiinilla käsiteltyjen kantasolujen granulaarisuudessa oli jotakin poikkeavaa verrattuna muihin näytteisiin. α -laktalbumiinilla käsitellyt mesenkymaaliset kantasolut olivat paljon granulaarisempia kuin muilla proteiinikäsitellyillä mesenkymaalisilla kantasoluilla. Kuntotestejä tehdessä huomasin, että α -laktalbumiinikäsitellyjä soluja oli paljon vähemmän kuin muita proteiinikäsitellyjä kantasoluja. Tämä voi johtua siitä, että α -laktalbumiinilla on voinut olla negatiivinen vaikutus jo huonokuntoisempiin mesenkymaalisiin kantasoluihin. α -laktalbumiini on voinut korjata apoptoottiset ja huonokuntoiset solut pois jolloin kantasolupopulaatiossa on tapahtunut selektio eikä kuntotesti tässä tapauksessa mittaa kantasolujen kuntoa. Koska kuntotestejä tehdessä kasvatusliuoksia ei otettu talteen, α -laktalbumiinin mahdollista selektiivistä vaikutusta apoptoottisiin ja huonokuntoisiin soluihin ei pystytä todistamaan. Aiemmin ryhmässämme on tehty luusoluerilaistamiskokeita α -laktalbumiinille (julkaisematon tulos). Näiden luusoluerilaistumistulosten perusteella mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistuminen näyttäisi heikkenevän α -laktalbumiinin 1 mg/ml ja tätä vahvemmilla pitoisuuksilla (Kuvat 17.–18., Siri Lehtosen luvalla). α -laktalbumiinin pienempien

pitoisuuksien vaikutuksesta mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen ei ole tietoa. Kuitenkaan kuntotestejä tehdessä V50 lämpö ja ei-lämpö fraktioilla ei näkynyt samanlaista granulaarisuutta kuin α -laktalbumiinilla käsitellyillä soluilla. Voi kuitenkin olla mahdollista, että käytetty α -laktalbumiinin pitoisuus 50 mg/ml on ollut toksinen pitoisuus mesenkymaalisille kantasoluille, jolloin pienempää pitoisuutta olisi syytä kokeilla. Yhtenä mahdollisuutena voidaan pitää myös sitä, että α -laktalbumiini näytteessä on ollut joitakin soluille haitallisia jätteitä esimerkiksi puhdistuksessa käytetyistä kemikaaleista.



Kuva 17. α -laktalbumiinin vaikutus alkalisen fosfaatin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja ja OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja.



Kuva 18. α -laktalbumiinin vaikutus kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja.

Osalla proteiinifraktioista saatiin viitteitä siitä millaisia vaikutuksia niillä on ollut mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. VNH proteiinifraktiolla näyttäisi olevan suurempina pitoisuuksina edistävä vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen (Kuvat 15.–16.). VNH proteiinifraktiolla vahvimman pitoisuuden edistävä vaikutus voi johtua tarpeeksi korkeasta laktoferriinin määrästä. VNH proteiinifraktio sisältää oletettavasti kaikkia heraproteiineja kuten esimerkiksi laktoferriiniä. Laktoferriinin on todettu edistävän luusoluerilaistumista ja luun muodostumista (Cornish ym., 2004; Takayama ja Mizumachi, 2008). Laktoferriinin määrää VNH proteiinifraktion vahvimmassa pitoisuudessa (500 $\mu\text{g/ml}$) ei kuitenkaan tiedetä. Laktoferriinin osuus maidon heraproteiineista on noin 1–2 % (ks. katsausartikkeli Marshall, 2004) jolloin VNH proteiinifraktion vahvimalla pitoisuudella laktoferriiniä pitäisi olla tämän mukaan noin 5–10 $\mu\text{g/ml}$. Cornish (2004) ryhmäläisineen tutkivat laktoferriinin 1–100 $\mu\text{g/ml}$ pitoisuuksia ja Takayama (2008) ryhmäläisineen käytti laktoferriinistä 1 μM loppukonsentraatiota, jolla oli saatu positiivisia tuloksia.

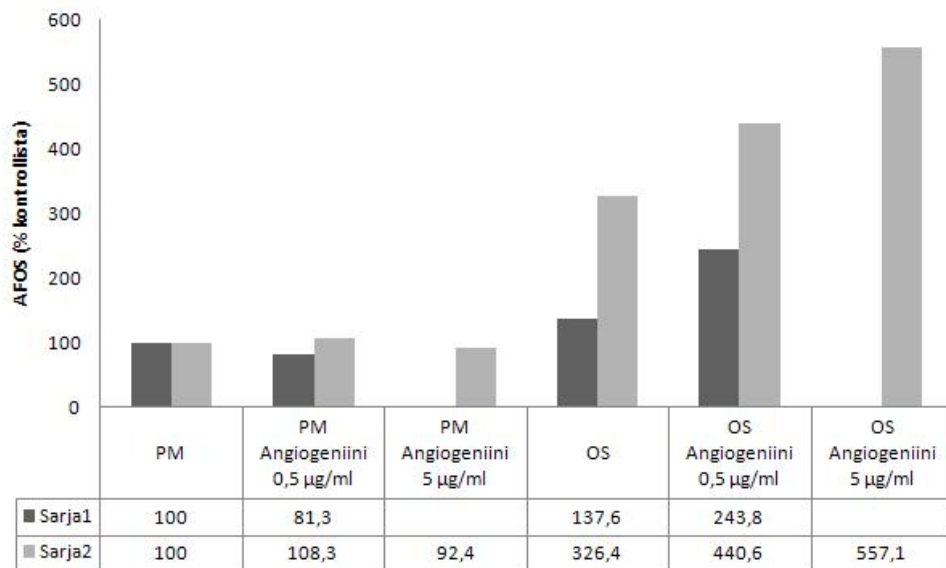
V30 lämpö ja ei-lämpö proteiinifraktioilla näyttäisi olevan enemmän heikentävä kuin edistävä vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen (Kuvat 5.–8.). V30 proteiinifraktiot on tehty käsittelemättömästä tilamaidosta ja ne sisältävät runsaasti insuliinia. Osteoblasteista on todistetusti löydetty reseptori insuliinille (Levy ym., 1986).

Insuliinin on todettu stimuloivan ihmisen osteoblastisolujen jakaantumista ja erilaistumista (Yang ym., 2010). Kuitenkaan insuliinin osteoblasteja stimuloivaa vaikutusta ei havaittu luusoluerilaistamistesteissä V30 lämpö ja ei-lämpö fraktioilla.

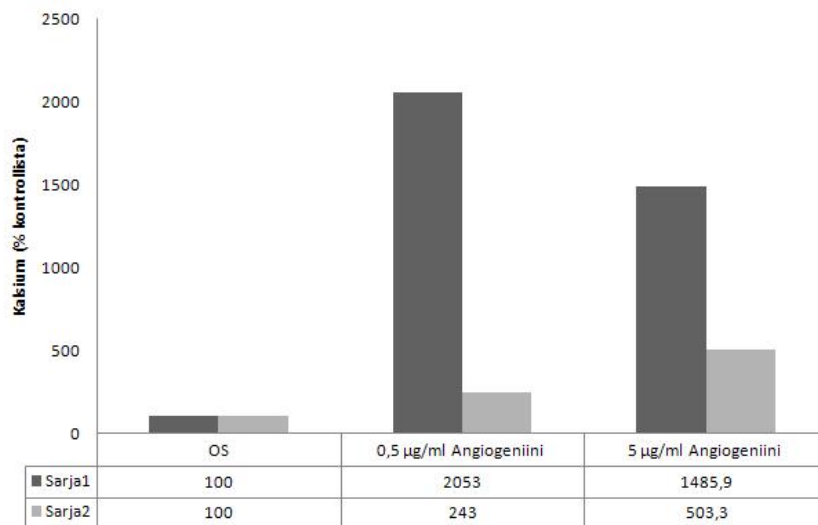
P4, V50 lämpö ja WPC -proteiinifraktioilla eri kantasolulinjojen tulokset ovat keskenään hyvin ristiriitaisia, jolloin yhteenvetoa on hankala vetää (Kuvat 3.–4. ja 9.–10.). WPC proteiinifraktiolla ei ollut selkeää vaikutusta AFOSin määrään (Kuva 13.) kun taas kalsiumin määrään WPC proteiinifraktiolla pienemmillä pitoisuuksilla on heikentävä ja vahvimmalla pitoisuudella on edistävä vaikutus kalsiumin määrään (Kuva 14.). Lisätutkimuksia tarvitaan proteiinifraktioiden vaikutuksista mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa suurimmalle osalle proteiinifraktioista.

AFOS ja kalsium tulokset vaativat lisätutkimuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Saadut tulokset antavat viitteitä eri proteiinifraktioiden vaikutuksista. Yhteenvetona voidaan sanoa, että ainoastaan VNH proteiinifraktiolla saadut tulokset olivat kokonaisuudessaan positiivisia tai neutraaleja ja WPC proteiinifraktiolla pienemmillä pitoisuuksilla negatiivisia ja suurimmalla positiivisia. Muilla proteiinifraktioilla tulokset olivat joko ristiriitaisia tai negatiivisia (V50 ei-lämpö).

Joidenkin proteiinifraktioiden kohdalla saatiin tilastollisesti merkitsevästi eroavia tuloksia AFOS ja kalsium määrityksissä. Kuitenkaan mikään tutkituista maidon proteiinifraktioista eivät merkittävästi lisänneet mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumista. Tutkimusryhmämme on aiemmin tutkinut useiden eri proteiinifraktioiden vaikutuksia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen. Aiempien tutkimusten mukaan angiogeniini on lisännyt mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumista moninkertaisesti verrattuna tutkimiini maidon proteiinifraktioihin (Kuvat 19–20., Siri Lehtosen luvalla). Verrattuna aiemmin tehtyihin angiogeniini määrityksiin, saadut tulokset testaamillani proteiinifraktioilla eivät ole olleet merkittäviä. Ainoastaan VNH proteiinifraktion vahvimmalla pitoisuudella saatiin yhtä merkittäviä tuloksia kalsiumin määrässä (Kuva 16). Tutkimani proteiinifraktiot on eristetty teollisesti helposti saatavista maitotuotteista eikä esimerkiksi ternimaidosta, joka on tutkitusti ravinteikkaampaa ja sisältää enemmän erilaisia kasvutekijöitä.



Kuva 19. Angiogeniinin vaikutus alkalisen fosfataasin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (PM). PM tarkoittaa kasvatusliuoksessa kasvatettuja soluja ja OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja.



Kuva 20. Angiogeniinin vaikutus kalsiumin määrään mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Tulokset on laskettu prosentteina kontrollista (OS). OS tarkoittaa erilaistamisliuoksessa kasvatettuja soluja.

AFOS tuloksia analysoitaessa on hyvä muistaa, että AFOS vaikuttaa luun lisäksi myös muissa kudoksissa. AFOS:ia löytyy luun lisäksi mm. maksasta, suolesta, valkosoluista, istukasta ja joistakin kasvaimista. AFOS on maksassa toimiva entsyymi, joka reagoi pääasiassa sapen erityksen häiriöihin. AFOS -arvot voivat kohota myös joissakin luusairauksissa ja maksan tulehduksissa. AFOS -arvojen nousun väärintulkinnan

estämiseksi soluille suoritettiin kuntotesti. Kuntotesteissä ainoastaan α -laktalbumiinilla havaittiin normaalista poikkeavaa granulaarisuutta ja solumäärän vähenemistä.

AFOS ja kalsium määritykset tehtiin kolmella eri kantasolulinjalla yhtä proteiinifraktiota kohden. Kuitenkin useissa tapauksissa ainakin yksi AFOS ja/tai kalsium tulos jouduttiin hylkäämään huonon luusoluerilaistumisen vuoksi. Riittävän luusoluerilaistumisen rajaa jouduttiin laskemaan huonon luusoluerilaistumisen takia. Yleensä erilaistumisen rajana on pidetty kolmin tai nelinkertaista eroa verrattuna erilaistumattomiin kantasoluihin (kontrolli), mutta tutkimuksessani raja asetettiin kaksinkertaiseksi, koska luusoluerilaistuminen oli huomattavasti heikompaa kuin yleensä. Esimerkiksi AFOS määrityksissä V30 lämpö, V30 ei-lämpö ja V50 lämpö proteiinifraktioilla 403 4p kantasolulinjan tulokset hylättiin huonon luusoluerilaistumisen vuoksi (Kuvat 5., 7. ja 9.) ja esimerkiksi P4 proteiinifraktion suhteen saatiin ainoastaan kaksi tulkittavaa tulosta ja niissäkin tulokset ovat päinvastaisia toisiinsa nähden (Kuvat 3.–4.).

Huono luusoluerilaistuminen saattaa johtua monista eri syistä. Yksi merkittävimmistä vaikuttavista tekijöistä huonoon luusoluerilaistumiseen voi olla mesenkymaalisten kantasolujen kasvatuksessa käytetty seerumi. Tutkimukseni aikana tutkimusryhmässämme testattiin kolmea eri seerumia mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumiseen. Tutkimusten mukaan tutkimuksessani käytetty seerumi oli huonoin mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistaja (julkaisematon tulos). Kahdella muulla tutkitulla seerumilla mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistuminen oli moninkertaisesti parempaa. Kokemuksiemme mukaan tutkimuksessani käytetty seerumi lisää mesenkymaalisten kantasolujen kasvua, mutta pidemmän käytön aikana mesenkymaaliset kantasolut alkavat näyttää silmällä katsottuna huonokuntoisemmilta, eivätkä mesenkymaaliset kantasolut erilaistu luusoluiksi yhtä tehokkaasti. Uskonkin, että käytetyllä seerumilla on ollut suuri vaikutus huonoon luusoluerilaistumiseen.

Tuloksia analysoitaessa tehtiin huomio mesenkymaalisten kantasolujen erilaisuudesta keskenään. Joidenkin kantasolulinjojen luusoluerilaistuminen näytti joko lisääntyvän tai heikenevän huolimatta siitä mitä maidon proteiinifraktiota ja millä laimennoksella sitä kantasolulinjalle annettiin (Taulukko 8). Käytettyjen mesenkymaalisten kantasolujen erilaisuudesta hyvänä esimerkkinä on 437 kantasolulinja. 437 kantasolut olivat erittäin nopeita ja tehokkaita kasvamaan. Kalsium -määritykset jouduttiin lopettamaan 437

kantasolulinjan kohdalla kaksi viikkoa aiemmin kuin oli suunniteltu, koska kantasolut kasvoivat niin huimaa vauhtia, että ne alkoivat irrota lauttana kuopan pohjalta. Tästä syystä tulokset eivät ole täysin luotettavia 437 mesenkymaalisten kantasolujen kohdalla. 437 kantasolujen tulokset päätettiin kuitenkin ottaa mukaan, sillä kantasolut olivat erilaistuneet osteoblasteiksi hyvin ja eri proteiinifraktion proteiinipitoisuuksien välillä pystyttiin näkemään eroja kalsiumin määrässä. Taulukosta 7 nähdään myös mesenkymaalisten kantasolujen erilaisuus keskenään. Erilaistumattomien kantasolujen spesifinen AFOS-aktiivisuus/mg proteiinia on 26–253, erilaistettujen on 58–595 ja erilaistumistehokkuus on 145–870 % (Taulukko 7). Tutkimustulosten ristiriitaisuus voi johtua myös siitä, että käytetyt mesenkymaaliset kantasolulinjat ovat primääriviljelmiä eri potilaista. Kantasolulinjat ovat yksilöllisiä, eivätkä välttämättä ominaisuuksiltaan samanlaisia.

Valion antamat proteiinifraktiot on eristetty teollisesti helposti saatavasta maidosta. Näillä fraktioilla ei ollut kuitenkaan merkittävää vaikutusta mesenkymaalisten kantasolujen luusoluerilaistumisessa. Aiempien tulosten perusteella ternimaidosta eristettyjen proteiinifraktioiden tulokset ovat olleet selkeämmin merkittäviä. Ternimaitoa ei kuitenkaan kerätä maitotiloilta erikseen, vaan tilat käyttävät ternimaidon suurilta osin vasikan ravinnoksi.

Tutkielman yhteenvedona voidaan sanoa, että maidon proteiineilla näyttäisi olevan vaikutuksia soluihin ja erityisesti kantasolujen kuntoon. Tämä voi olla merkittävä asia monella tavalla varsinkin kehittyvän kantasoluterapian saralla. Biologisesti aktiivisten ainesosien lisäksi maidolla on ravitsemusvaikutus, joka saattaa olla kriittinen tekijä terveyden kannalta erityisesti ryhmissä, joilla riittävän ravitsemuksen saanti voi olla ongelma. Eritettyjä maitoproteiineja voitaisiin mahdollisesti käyttää soluviljelyssä kasvutekijöinä tai jopa esimerkiksi kirurgisissa sovelluksissa, joissa halutaan vaikuttaa paikallisesti kantasolujen toimintaan. Kantasolujen aktiivisuutta ja toimintaa säätelemällä voidaan vaikuttaa paitsi luun kasvuun ja rakenteeseen, niin myös immunologisiin toimintoihin kuten hylkimisreaktioon. On mahdollista, että eristetyillä maidon proteiineilla voidaan muokata kantasolujen ominaisuuksia haluttuun suuntaan ja siten vaikuttaa kudosreaktioihin. Tällöin kriittisiksi käytön kannalta tulevat hylkimiseen ja kudosreaktioihin liittyvät asiat.

6. Lähdeluettelo

Abu, E.O., Bord, S., Horner, A., Chatterjee, V.K., ja Compston, J.E. 1997. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*. 21:137-142.

Aoe, S., Koyama, T., Toba, Y., Itabashi, A., ja Takada, Y. 2005. A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal women. *Osteoporos.Int.* 16:2123-2128.

Aoe, S., Toba, Y., Yamamura, J., Kawakami, H., Yahiro, M., Kumegawa, M., Itabashi, A., ja Takada, Y. 2001. Controlled trial of the effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 65:913-918.

Arnal, M.A., Mosoni, L., Boirie, Y., Houlier, M.L., Morin, L., Verdier, E., Ritz, P., Antoine, J.M., Prugnaud, J., Beaufriere, B., ja Mirand, P.P. 1999. Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. *Am.J.Clin.Nutr.* 69:1202-1208.

Baksh, D., Song, L., ja Tuan, R.S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J.Cell.Mol.Med.* 8:301-316.

Barnard, R., Ng, K.W., Martin, T.J., ja Waters, M.J. 1991. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology*. 128:1459-1464.

Belford, D.A., Rogers, M.L., Francis, G.L., Payne, C., Ballard, F.J., ja Goddard, C. 1997. Platelet-derived growth factor, insulin-like growth factors, fibroblast growth factors and transforming growth factor beta do not account for the cell growth activity present in bovine milk. *J.Endocrinol.* 154:45-55.

Bharadwaj, S., Naidu, A.G., Betageri, G.V., Prasadarao, N.V., ja Naidu, A.S. 2009. Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos.Int.* 20:1603-1611.

Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., ja Robey, P.G. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 19:180-192.

Blais, A., Malet, A., Mikogami, T., Martin-Rouas, C., ja Tome, D. 2009. Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 296:E1281-8.

Blum, J.W., ja Hammon, H. 2000. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livest.Prod.Sci.* 66:151-159.

Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L., ja Beaufriere, B. 1997. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:14930-14935.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., ja Lacey, D.L. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423:337-342.

Brew, K., Vanaman, T.C., ja Hill, R.L. 1968. The role of alpha-lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 59:491-497.

Calhoun, D.A., Lunoe, M., Du, Y., Staba, S.L., ja Christensen, R.D. 1999. Concentrations of granulocyte colony-stimulating factor in human milk after in vitro simulations of digestion. *Pediatr.Res.* 46:767-771.

- Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., Rydziel, S., ja Varghese, S. 1993a. Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures. *Endocrinology*. 133:33-38.
- Canalis, E., Pash, J., ja Varghese, S. 1993b. Skeletal growth factors. *Crit.Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 3:155-166.
- Capilla, E., Teles-Garcia, A., Acerete, L., Navarro, I., ja Gutierrez, J. 2011. Insulin and IGF-I effects on the proliferation of an osteoblast primary culture from sea bream (*Sparus aurata*). *Gen.Comp.Endocrinol.* 172:107-114.
- Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., ja Brodtkorb, A. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin—Technological implications for processing. *Int.Dairy J.* 16:1229-1240.
- Chen, D., Zhao, M., ja Mundy, G.R. 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 22:233-241.
- Chierici, R. 2001. Antimicrobial actions of lactoferrin. *Adv.Nutr.Res.* 10:247-269.
- Clement-Lacroix, P., Ormandy, C., Lepescheux, L., Ammann, P., Damotte, D., Goffin, V., Bouchard, B., Amling, M., Gaillard-Kelly, M., Binart, N., Baron, R., ja Kelly, P.A. 1999. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology*. 140:96-105.
- Colvard, D.S., Eriksen, E.F., Keeting, P.E., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., French, F.S., Riggs, B.L., ja Spelsberg, T.C. 1989. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:854-857.
- Conneely, O.M. 2001. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J.Am.Coll.Nutr.* 20:389S-395S; discussion 396S-397S.
- Cornish, J., Callon, K.E., Naot, D., Palmano, K.P., Banovic, T., Bava, U., Watson, M., Lin, J.M., Tong, P.C., Chen, Q., Chan, V.A., Reid, H.E., Fazzalari, N., Baker, H.M., Baker, E.N., Haggarty, N.W., Grey, A.B., ja Reid, I.R. 2004. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology*. 145:4366-4374.
- Datta, N.S., ja Abou-Samra, A.B. 2009. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell.Signal.* 21:1245-1254.
- Deschaseaux, F., Sensebe, L., ja Heymann, D. 2009. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol.Med.* 15:417-429.
- Devescovi, V., Leonardi, E., Ciapetti, G., ja Cenni, E. 2008. Growth factors in bone repair. *Chir.Organi.Mov.* 92:161-168.
- Dunbar, A.J., Priebe, I.K., Belford, D.A., ja Goddard, C. 1999. Identification of betacellulin as a major peptide growth factor in milk: purification, characterization and molecular cloning of bovine betacellulin. *Biochem.J.* 344 Pt 3:713-721.
- Elfstrand, L., Lindmark-Månsson, H., Paulsson, M., Nyberg, L., ja Åkesson, B. 2002. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *Int.Dairy J.* 12:879-887.
- Eriksen, E.F., Colvard, D.S., Berg, N.J., Graham, M.L., Mann, K.G., Spelsberg, T.C., ja Riggs, B.L. 1988. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*. 241:84-86.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., ja Kulagina, N.N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp.Hematol.* 4:267-274.

- Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I., ja Petrakova, K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 16:381-390.
- Ginger, M.R., ja Grigor, M.R. 1999. Comparative aspects of milk caseins. *Comp.Biochem.Physiol.B.Biochem.Mol.Biol.* 124:133-145.
- Ginjala, V., ja Pakkanen, R. 1998. Determination of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and insulin-like growth factor (IGF-1) in bovine colostrum samples. *J.Immunoassay.* 19:195-207.
- Globus, R.K., Plouet, J., ja Gospodarowicz, D. 1989. Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology.* 124:1539-1547.
- Gonzalez-Chavez, S.A., Arevalo-Gallegos, S., ja Rascon-Cruz, Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int.J.Antimicrob.Agents.* 33:301.e1-301.e8.
- Grey, A., Zhu, Q., Watson, M., Callon, K., ja Cornish, J. 2006. Lactoferrin potently inhibits osteoblast apoptosis, via an LRP1-independent pathway. *Mol.Cell.Endocrinol.* 251:96-102.
- Guo, H.Y., Jiang, L., Ibrahim, S.A., Zhang, L., Zhang, H., Zhang, M., ja Ren, F.Z. 2009. Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J.Nutr.* 139:958-964.
- Hadjidakis, D.J., ja Androulakis, I.I. 2006. Bone remodeling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1092:385-396.
- Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanaka, H., Kirisawa, R., ja Iwai, H. 2000. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 76:183-190.
- Hall, W.L., Millward, D.J., Long, S.J., ja Morgan, L.M. 2003. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br.J.Nutr.* 89:239-248.
- Haug, A., Hostmark, A.T., ja Harstad, O.M. 2007. Bovine milk in human nutrition--a review. *Lipids Health.Dis.* 6:25.
- Hironaka, T., Ohishi, H., ja Masaki, T. 1997. Identification and partial purification of a basic fibroblast growth factor-like growth factor derived from bovine colostrum. *J.Dairy Sci.* 80:488-495.
- Hofstetter, W., Wetterwald, A., Cecchini, M.C., Felix, R., Fleisch, H., ja Mueller, C. 1992. Detection of transcripts for the receptor for macrophage colony-stimulating factor, c-fms, in murine osteoclasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:9637-9641.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., ja Hofmann, T. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:8932-8937.
- Hou, P., Sato, T., Hofstetter, W., ja Foged, N.T. 1997. Identification and characterization of the insulin-like growth factor I receptor in mature rabbit osteoclasts. *J.Bone Miner.Res.* 12:534-540.
- Hu, Y., Liao, L., Wang, Q., Ma, L., Ma, G., Jiang, X., ja Zhao, R.C. 2003. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J.Lab.Clin.Med.* 141:342-349.
- Iacopetta, B.J., Grieu, F., Horisberger, M., ja Sunahara, G.I. 1992. Epidermal growth factor in human and bovine milk. *Acta Paediatr.* 81:287-291.
- in 't Anker, P.S., Noort, W.A., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Kruisselbrink, A.B., van Bezooijen, R.L., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H.H., ja Fibbe, W.E. 2003. Mesenchymal stem cells

in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 88:845-852.

Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, R.A., Straszynski, L., Meredith, D.M., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P., ja McGonagle, D. 2002. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 46:3349-3360.

Kato, K., Toba, Y., Matsuyama, H., Yamamura, J., Matsuoka, Y., Kawakami, H., Itabashi, A., Kumegawa, M., Aoe, S., ja Takada, Y. 2000. Milk basic protein enhances the bovine strength in ovariectomized rats. *J.Food Biochem*. 24:467-476.

Kelly, G.S. 2003. Bovine colostrums: a review of clinical uses. *Altern.Med.Rev*. 8:378-394.

Kim, S.K., Kwon, J.Y., ja Nam, T.J. 2007. Involvement of ligand occupancy in Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced cell growth in osteoblast like MC3T3-E1 cells. *Biofactors*. 29:187-202.

Kindmark, A., Torma, H., Johansson, A., Ljunghall, S., ja Melhus, H. 1993. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay demonstrates that the 9-cis retinoic acid receptor alpha is expressed in human osteoblasts. *Biochem.Biophys.Res.Communic*. 192:1367-1372.

Koc, O.N., Day, J., Nieder, M., Gerson, S.L., Lazarus, H.M., ja Krivit, W. 2002. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. 30:215-222.

Krieger, N.S., Stappenbeck, T.S., ja Stern, P.H. 1988. Characterization of specific thyroid hormone receptors in bone. *J.Bone Miner.Res*. 3:473-478.

Kussendrager, K.D., ja van Hooijdonk, A.C. 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br.J.Nutr*. 84 Suppl 1:S19-25.

Le Blanc, K., Gotherstrom, C., Ringden, O., Hassan, M., McMahon, R., Horwitz, E., Anneren, G., Axelsson, O., Nunn, J., Ewald, U., Norden-Lindeberg, S., Jansson, M., Dalton, A., Astrom, E., ja Westgren, M. 2005. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 79:1607-1614.

Leskela, H.V., Risteli, J., Niskanen, S., Koivunen, J., Ivaska, K.K., ja Lehenkari, P. 2003. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem.Biophys.Res.Communic*. 311:1008-1013.

Levy, P.F., ja Viljoen, M. 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*. 80:252-267.

Levy, J.R., Murray, E., Manolagas, S., ja Olefsky, J.M. 1986. Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology*. 119:1786-1792.

Lo, N.W., Shaper, J.H., Pevsner, J., ja Shaper, N.L. 1998. The expanding beta 4-galactosyltransferase gene family: messages from the databanks. *Glycobiology*. 8:517-526.

Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., ja Xavier Malcata, F. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res.Int*. 40:1197-1211.

Marshall, K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Altern.Med.Rev*. 9:136-156.

- Mendelow, B., Grobicki, D., de la Hunt, M., Katz, J., ja Metz, J. 1980. Characterization of bone marrow stromal cells in suspension and monolayer cultures. *Br.J.Haematol.* 46:15-22.
- Minghetti, P.P., ja Norman, A.W. 1988. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ receptors: gene regulation and genetic circuitry. *FASEB J.* 2:3043-3053.
- Minguell, J.J., Erices, A., ja Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp.Biol.Med.(Maywood).* 226:507-520.
- Mizuno, Y., Hosoi, T., Inoue, S., Ikegami, A., Kaneki, M., Akedo, Y., Nakamura, T., Ouchi, Y., Chang, C., ja Orimo, H. 1994. Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif.Tissue Int.* 54:325-326.
- Morita, Y., Matsuyama, H., Serizawa, A., Takeya, T., ja Kawakami, H. 2008. Identification of angiogenin as the osteoclastic bone resorption-inhibitory factor in bovine milk. *Bone.* 42:380-387.
- Muneta, Y., Yoshihara, K., Minagawa, Y., Nagata, R., Yasuyuki, M., Yamaguchi, T., ja Takehara, K. 2005. Bovine IL-18 ELISA: detection of IL-18 in sera of pregnant cow and newborn calf, and in colostrum. *J.Immunoassay Immunochem.* 26:203-213.
- Naot, D., Grey, A., Reid, I.R., ja Cornish, J. 2005. Lactoferrin--a novel bone growth factor. *Clin.Med.Res.* 3:93-101.
- Ontsouka, C.E., Bruckmaier, R.M., ja Blum, J.W. 2003. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *J.Dairy Sci.* 86:2005-2011.
- Pietila, M., Lehtonen, S., Narhi, M., Hassinen, I.E., Leskela, H.V., Aranko, K., Nordstrom, K., Vepsalainen, A., ja Lehenkari, P. 2010. Mitochondrial function determines the viability and osteogenic potency of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.Part C.Methods.* 16:435-445.
- Rachner, T.D., Khosla, S., ja Hofbauer, L.C. 2011. Osteoporosis: now and the future. *The Lancet.* 377:1276-1287.
- Robey, P.G. 2000. Stem cells near the century mark. *J.Clin.Invest.* 105:1489-1491.
- Rogers, M.L., Belford, D.A., Francis, G.L., ja Ballard, F.J. 1995. Identification of fibroblast growth factors in bovine cheese whey. *J.Dairy Res.* 62:501-507.
- Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A., ja Smirnov, V.N. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells.* 21:105-110.
- Rydziel, S., Shaikh, S., ja Canalis, E. 1994. Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhance the synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures. *Endocrinology.* 134:2541-2546.
- Sanchez, L., Aranda, P., Perez, M.D., ja Calvo, M. 1988. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol.Chem.Hoppe Seyler.* 369:1005-1008.
- Seganti, L., Di Biase, A.M., Marchetti, M., Pietrantonio, A., Tinari, A., ja Superti, F. 2004. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *Biometals.* 17:295-299.
- Shing, Y., ja Klagsbrun, M. 1987. Purification and characterization of a bovine colostrum-derived growth factor. *Mol.Endocrinol.* 1:335-338.

- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., ja Wheeler, T.T. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *J.Anim.Sci.* 87:3-9.
- Sylvie F., G., Yves, P., ja Jean-Louis, M. 2006. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Lait* 86: 99-125.
- Takada, Y., Aoe, S., ja Kumegawa, M. 1996. Whey protein stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 223:445-449.
- Takada, Y., Kobayashi, N., Kato, K., Matsuyama, H., Yahiro, M., ja Aoe, S. 1997a. Effects of whey protein on calcium and bone metabolism in ovariectomized rats. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo)*. 43:199-210.
- Takada, Y., Kobayashi, N., Matsuyama, H., Kato, K., Yamamura, J., Yahiro, M., Kumegawa, M., ja Aoe, S. 1997b. Whey protein suppresses the osteoclast-mediated bone resorption and osteoclast cell formation. *Int.Dairy J.* 7:821-825.
- Takada, Y., Matsuyama, H., Kato, K., Kobayashi, N., Yamamura, J., Yahiro, M., ja Ace, S. 1997c. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. *Nutr.Res.* 17:1709-1720.
- Takayama, Y., ja Mizumachi, K. 2009. Effect of lactoferrin-embedded collagen membrane on osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells. *J.Biosci.Bioeng.* 107:191-195.
- Takayama, Y., ja Mizumachi, K. 2008. Effect of bovine lactoferrin on extracellular matrix calcification by human osteoblast-like cells. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72:226-230.
- Teti, A., Rizzoli, R., ja Zamboni Zallone, A. 1991. Parathyroid hormone binding to cultured avian osteoclasts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 174:1217-1222.
- Thomas, D.M., Udagawa, N., Hards, D.K., Quinn, J.M., Moseley, J.M., Findlay, D.M., ja Best, J.D. 1998. Insulin receptor expression in primary and cultured osteoclast-like cells. *Bone.* 23:181-186.
- Tikkanen, J., Leskela, H.V., Lehtonen, S.T., Vahasarja, V., Melkko, J., Ahvenjarvi, L., Paakko, E., Vaananen, K., ja Lehenkari, P. 2010. Attempt to treat congenital pseudarthrosis of the tibia with mesenchymal stromal cell transplantation. *Cytotherapy.* 12:593-604.
- Toba, Y., Takada, Y., Matsuoka, Y., Morita, Y., Motouri, M., Hirai, T., Suguri, T., Aoe, S., Kawakami, H., Kumegawa, M., Takeuchi, A., ja Itabashi, A. 2001. Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 65:1353-1357.
- Toba, Y., Takada, Y., Yamamura, J., Tanaka, M., Matsuoka, Y., Kawakami, H., Itabashi, A., Aoe, S., ja Kumegawa, M. 2000. Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis. *Bone.* 27:403-408.
- Troost, F.J., Saris, W.H., ja Brummer, R.J. 2002. Orally ingested human lactoferrin is digested and secreted in the upper gastrointestinal tract in vivo in women with ileostomies. *J.Nutr.* 132:2597-2600.
- Troost, F.J., Steijns, J., Saris, W.H., ja Brummer, R.J. 2001. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults. *J.Nutr.* 131:2101-2104.
- Tuli, R., Seghatoleslami, M.R., Tuli, S., Wang, M.L., Hozack, W.J., Manner, P.A., Danielson, K.G., ja Tuan, R.S. 2003. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol.Biotechnol.* 23:37-49.

- Uenishi, K., Ishida, H., Toba, Y., Aoe, S., Itabashi, A., ja Takada, Y. 2007. Milk basic protein increases bone mineral density and improves bone metabolism in healthy young women. *Osteoporos.Int.* 18:385-390.
- Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., ja Halleen, J.M. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J.Cell.Sci.* 113 (Pt 3):377-381.
- Warsawsky, H., Goltzman, D., Rouleau, M.F., ja Bergeron, J.J. 1980. Direct in vivo demonstration by radioautography of specific binding sites for calcitonin in skeletal and renal tissues of the rat. *J.Cell Biol.* 85:682-694.
- Wei, L.L., Leach, M.W., Miner, R.S., ja Demers, L.M. 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 195:525-532.
- Weitzmann, M.N., ja Pacifici, R. 2006. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J.Clin.Invest.* 116:1186-1194.
- Xu, L.X., Kukita, T., Nakano, Y., Yu, H., Hotokebuchi, T., Kuratani, T., Iijima, T., ja Koga, T. 1996. Osteoclasts in normal and adjuvant arthritis bone tissues express the mRNA for both type I and II interleukin-1 receptors. *Lab.Invest.* 75:677-687.
- Xu, R. 2009. Effect of whey protein on the proliferation and differentiation of osteoblasts. *J.Dairy Sci.* 92:3014-3018.
- Yang, J., Zhang, X., Wang, W., ja Liu, J. 2010. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochem.Funct.* 28:334-341.
- Zhang, Z., Chen, J., ja Jin, D. 1998. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB stimulates osteoclastic bone resorption directly: the role of receptor beta. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 251:190-194.