

**SEPSISPOTILAIEN LUUYTIMEN TUKIKUDOSSOLUJEN  
ERILAISTUMINEN LUUSOLUIKSI JA KOKEELLISEN  
SEPSISMALLIN VAIKUTUS SOLUJEN KOLLAGEENITUOTANTOON**

Roni Pernu

Syventävien opintojen tutkielma

Lääketieteellinen tiedekunta

Oulun yliopisto

Tammikuu 2015

Prof. Petri Lehenkari

OULUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Lääketieteen koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Pernu, Roni:

Sepsispotilaiden luuytimen tukikudossolujen erilaistuminen luusoluiksi ja kokeellisen sepsismallin vaikutus solujen kollageenituotantoon

Syventävien opintojen tutkielma:

14 sivua

Vaikeassa sepsiksessä kuolleisuus on korkea ja ennustetta on parannettu varhaisella tunnistamisella, aikaisin aloitetulla antibiootilla ja tavoiteohjatulla nestehoidolla. Sepsiksessä sytokiiniin liikatutannolla on nykykäsityksen mukaan suuri rooli. Luuytimen mesenkymaaliset tukikudossolut ovat aiemmissa tutkimuksissa vaimentaneet tulehdusta ja niitä tutkitaan intensiivisesti. Sepsiksen hoidossa soluterapiatutkimus on vielä lapsenkengissä. Tutkimusta tarvitaan solujen vaikutuksesta elimistön paranemisprosessien tukemisessa vaikeassa tulehduksessa ja päinvastoin vaikean tulehduksen vaikutusta solujen elin- ja toimintakykyyn. Tässä tutkielmassa selvitettiin 9 lyhyen aikaa septistä shokkia sairastaneiden potilaiden luuytimen solujen erilaistumiskykyä luusoluiksi määrittämällä kalsiumpitoisuus ja AFOS-aktiivisuus sekä jakautumiskykyä MTT-testin avulla. Vertailuryhmänä toimi elektiivisen lonkkaleikkauksen yhteydessä otetut solut. Lisäksi kokeellisessa sepsismallissa tutkittiin 4 vuorokauden altistuksen jälkeen solujen kykyä tuottaa kollageenia määrittämällä PINP-pitoisuudet elatusnesteestä altistuksen jälkeen. Solujen erilaistumiskyky ja jakautumiskyky eivät ole selkeästi huonontuneet, kun ne pääsevät tulehdusympäristöstä ei-tulehdukselliseen soluviljely-ympäristöön. Kokeellisessa sepsismallissa PINP-tasot laskivat huomattavasti vertailuryhmiin verrattuna.

Avainsanat: sepsis, luuytimen kantasolut, soluterapiat, erilaistuminen, elinkyky, tyypin I kollageeni

# SISÄLLYS

<b>1. Johdanto</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Aineisto ja menetelmät</b> .....	<b>3</b>
2.1. Aineisto .....	3
2.2. Menetelmät.....	4
<b>3. Tulokset</b> .....	<b>7</b>
3.1. MTT-testitulokset.....	7
3.2. Erilaistamiskokeiden tulokset.....	7
3.3. PINP-tasojen muutokset kokeellisessa sepsismallissa <i>in vitro</i> .....	9
<b>4. Tutkimuksen vahvuudet ja heikkoudet</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Pohdinta</b> .....	<b>11</b>
<b>6. Lähdeluettelo</b> .....	<b>13</b>

# 1. JOHDANTO

Sepsiksen patofysiologiassa ja kliinisessä ilmentymässä tärkeässä roolissa on ymmärtää käsitteenä ja ilmiönä elimistön yleistynyt tulehdustila (systemic inflammation response syndrome) eli SIRS. Nykykäsityksen mukaan SIRS johtuu tulehdusta edistävien proteiinirakenteisten soluvälittäjäaineiden eli sytokiinien liiallisesta vapautumisesta (Parsons, 2010). Yleistyneen tulehdusreaktion voivat laukaista useat eri tekijät kuten perioperatiivinen kudosten hapenpuute (alhainen verenpaine, verenvuoto), muista syistä johtuva hapenpuute, vakava vamma, palovamma, haimatulehdus tai muut vakavat aseptiset sisäelintulehdukset tai jopa allergeenit. Yleisimmin tilan aiheuttaa kuitenkin infektio (Koo ym., 2011). Kliinisesti SIRS ilmenee pulssitason nousuna, tihentyneenä hengitystaajuutena, leukosytoosina tai leukopeniana ja kuumeena tai hypotermiana. Lisäksi siihen kliinisinä ilmentyminä saattaa liittyä korkea verensokeri ja ihonalaiskudoksen turvotukset. Infektion laukaisemaa yleistynyttä tulehdusreaktiota nimitetään sepsikseksi. Vaikea sepsis on tilanne, jossa sepsikseen liittyy elintoimintahäiriöitä tai kudoksen hapenpuutteen merkit. Septisestä sokista puhutaan silloin, kun sepsikseen liittyy nestehoidolle reagoimaton alhainen verenpaine. Sepsis, vaikea sepsis ja septinen sokki muodostavat jatkumon. Edetessään tilanne voi johtaa usean eri elinjärjestelmän pettämiseen ja potilaan kuolemaan. (Levy ym., 2003; Sepsiksen Käypä hoito, 2014)

Vaikea sepsis on haaste elimistön korjausprosesseille ja hoitohenkilökunnalle. Huolimatta kehittyneestä tehohoidosta kuolleisuus vaikeaan sepsikseen on pysynyt korkeana. Suomessa vaikean sepsiksen ilmaantuvuus on 0.38/ 1000 ja vuoden kuolleisuus jopa 40,9 % (Karlsson, 2007). Kudusrakenteiden ylläpitäminen ja syntyneiden vaurioiden korjaaminen on yksi keskeinen osa normaalin elimistön toiminnassa, paikallisessa tulehduksessa ja siis myöskin vaikeassa yleistyneessä tulehdusreaktiossa. Tiedämme että sepsiksessä veren hyytyminen ja tulehdusvaste ovat aktivoituneet koko elimistössä (Hotchkiss & Karl, 2003), mutta tutkimuksia vaikutuksista kudoksen uusiutumiseen on vähemmän. Selvästi on kuitenkin kuvattu lisääntynyttä fibroosia ja apoptoottisen kontrollin muutoksia eri elimissä (Meduri ym., 1998; Marshall ym., 2000; Rocco ym., 2009). Kudoksen uusiutumista ja fibroosia sääteleviä sekä rajoittavia tekijöitä tunnetaan kuitenkin vielä huonosti. Kantasolujen osallistumista akuuttien elinvaurioiden paranemiseen tutkitaan intensiivisesti. Oulussa tehdyssä

väitöskirjatutkimuksen osatyössä todettiin vaikeassa sepsiksessä sidekudosaineenvaihdunnan häiriöitä, joihin liittyi lisääntyneet elinvauriot ja potilaiden kuolleisuus (Gäddnäs ym., 2009). Vaikea sepsis voidaan ajatella ikään kuin koko kehon haavana ja monielinvaurion kehittyminen tämän ”haavan” paranemisprosessin säätelyhäiriönä (ylimääräinen sidekudosmuodostus, uudiskudosmuodostus).

Mesenkymaaliset tukikudoksen multipotentit solut (MSC) ovat soluja, joita löytyy mm. rasvakudoksesta ja luuytimeistä. Niillä on kyky erilaistua usean eri kudoksen soluksi kuten luu-, rusto- ja rasvasoluiksi. Tämän lisäksi niillä on havaittu olevan immuunivastetta hillitseviä ominaisuuksia (Newman ym., 2009). Tämä on johtanut voimakkaaseen kiinnostukseen tutkimuskentällä näitä soluja kohtaan, sillä niitä on suhteellisen helppo kasvattaa pienestäkin solumäärästä siten, että ne säilyttävät ominaisuutensa.

Mesenkymaalisten kantasolujen toivoa herättäviin ominaisuuksiin kuuluu myös se, että niillä itsellään on vähän tai ei lainkaan vieraassa elimistössä immuunivastetta laukaisevia ominaisuuksia. Tämän takia ne ovat potentiaalisia terapeuttiseen käyttöön esim. GVHD:ssa, autoimmuunisairauksissa ja allergioissa (Newman ym., 2009). MSC:llä on sekä paikallisia että systeemisiä vaikutuksia tulehdusreaktioon. Kaikkia mekanismeja ei todennäköisesti tunneta, mutta ne ovat tutkimuksen alla.

Paikallisesti MSC:llä on osoitettu olevan tulehdusta hillitseviä mekanismeja hiirimalleissa, mm. makrofagien tulehduksellisten sytokiinien erityksen ja lymfosyyttien jakautumisen estovaikutuksia (Newman ym., 2009; Kerkelä ym., 2013). Tämän lisäksi on osoitettu, että MSC:n ei välttämättä tarvitse edes olla tulehdusalueella lieventääkseen tulehdusta TSG-6 välitteisesti (Lee ym., 2009).

Eläintutkimuksissa yleistyneen tulehdusreaktion on havaittu vaimenevan MSC:n suonensisäisellä annostelulla. Ne ovat lisänneet makrofagien tappokapasiteettia ja vähentäneet tulehduksellisten sytokiinien tason nousua ja näin vähentäneet kuolleisuutta sepsiksessä (Mei ym., 2010). Sen lisäksi, että mesenkymaalisilla kantasoluilla on tulehdusta vähentäviä eli anti-inflammatorisia ja antimikrobisia vaikutuksia, ne myös nimensä mukaisesti ovat mukana kudosten uudismuodostuksessa esimerkiksi systeemitulehduksen aiheuttamissa elinvaurioissa mm. munuaisissa ja keuhkoissa (Humphreys & Bonvente, 2008; Matthay ym., 2010). On ajateltu, että mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat kudoksissa korvaamaan vaurioituneita soluja, mutta tämänhetkisen tiedon valossa vaikutus välittynee kuitenkin lähinnä para-

ja endokriinisesti lisäten kudoksen omien parenkyymisolujen uusiutumista, vähentävät apoptoosia ja lisäävät verisuonien muodostumista (Humphreys & Bonvente, 2008). MSC:llä voisi siis olla käyttöä sepsiksen hoidossa. Tutkimuksia MSC:n vaikutuksesta tulehdukseen on siis tehty runsaasti, vähemmän kuitenkin on julkaisuja itse tulehduksen vaikutuksesta MSC:een. Erityisesti niinkin voimakkaassa tulehdustilanteessa kuin sepsis tulisi hoidollista käyttöä varten arvioida vaikutuksia molempiin suuntiin. MSC:llä on tutkitusti tulehdusta rauhoittavaa vaikutusta eläinmalleissa ja *in vitro*. Entä sellaisessa tilanteessa, kun solujen tulisi sietää tulehduksellista ympäristöä pitkään ja silti säilyttää multipotentit ominaisuutensa, elinkykynsä sekä erityisesti säilyttää tulehdusta hillitsevät ominaisuutensa? Tämän tutkielman tarkoituksena oli selvittää sepsispotilailta kerättyjen luuytimen tukikudossolujen erilaistumiskyky luuta muodostaviksi soluiksi eli osteoblasteiksi ja lisäksi selvittää terveiltä ihmisiltä kerättyjen luuytimen tukikudossolujen kollageenimuodostuskyky pitkittyneessä sepsista mallintavassa *in vitro* -koeasetelmassa.

## **2. AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **2.1. Aineisto**

Tutkimukseen rekrytoitiin kliinisesti septisessä shokissa olevia potilaita Oulun yliopistollisen sairaalan (OYS) teho-osasto 1:lta (diagnostiset kriteerit taulukko 1). Kontrollipotilaina toimivat OYS:iin elektiiviseen lonkan tekonivelleikkaukseen tulevat potilaat. Tutkimukselle hankittiin PPSHP:n eettisen toimikunnan hyväksyntä. Potilaiden suostumus hankittiin kirjallisesti joko suoraan potilailta, tai mikäli potilaiden kunto ei sitä sallinut niin suostumus hankittiin lähiomaiselta. Soluviljelmissä käytetyt luuytimen solut olivat peräisin yhdeksältä septistä shokkia sairastavalta potilaalta, joista seitsemällä kliininen diagnoosi oli asetettu joko samana tai edellisenä päivänä. Kahdella potilaista kliininen diagnoosi oli asetettu 3-4 vuorokautta näytteenottoa edeltävästi. Kontrollipotilaiden luuydinsoluista neljää solulinjaa käytettiin erilaistumiskokeissa kontrollina ja PINP-kokeissa käytettiin yhteensä viidestä eri potilaasta saatuja solulinjoja. Tutkimuksesta poissulkevat tekijät olivat immunosuppressiivinen lääkitys, vaikea maksa- tai munuaissairaus, ikä alle 18 -vuotta, syöpäsairaus ja/tai raskaus. Verinäytteet otettiin samoilta potilailta, mutta kontrolliryhmänä verinäytteiden osalta toimivat perusterveet vapaaehtoiset luovuttajat.

## A) Vakava infektio

### B) SIRS –kriteerit, vähintään 2 seuraavista

- Ydinlämpö  $>38$  tai  $<36$
- Syketaso  $>90/\text{min}$
- Hengitystaajuus  $>20/\text{min}$  tai mekaaninen ventilaatio tai  $\text{pCO}_2 <4,3\text{kPa}$
- Leukosyytit  $>12$  tai  $<4$  tai sauvatumaisia neutrofiilejä  $>10\%$

### C) Infektiosta johtuva elinhäiriö, vähintään 1 seuraavista

- Alhainen verenpaine: systolinen RR  $<90\text{mmHg}$  tai  $>40\text{mmHg}$  lasku perustasosta
- Verenkiertovajaus: laktaatti  $>1,6\text{mM}$  tai vähävirtsaisuus tai nopea tajunnan alenema
- Keuhkojen toiminnan häiriö:  $\text{pO}_2/\text{FiO}_2 <26,6$
- Akuutti munuaisten vajaatoiminta: Tuntidiureesi  $<0,5\text{ml/kg}$  6h ajan
- Akuutti hematologinen vajaatoiminta: Trombosyytit  $< 80 \times 10^9/\text{l}$
- Metabolinen asidoosi:  $\text{pH} <7,3$  tai emäsyylimäärä  $<-5$  ja laktaatti  $>2,4\text{mM}$

### D) Nestehoitoon reagoimaton hypotensio ( $>1\text{h}$ ) eli lääkkeellisen verenkierron tuen tarve

Sepsis = A+B

Vaikea sepsis = A+B+C

Septinen shokki = A+B+C+D

Taulukko 1. Sepsispotilaiden rekrytoinnissa käytetyt diagnostiset kriteerit (Bone ym., 1992; Sepsiksen Käypä hoito -suositus, 2014). A+B+C+D ehtojen tuli täyttyä, että potilas otettiin tutkimukseen mukaan.

## 2.2. Menetelmät

Kontrollipotilaiden luuydinnäyte otettiin elekttiivisen lonkkaleikkauksen aikana reisiluun kaulan ja trokanterin alueelta. Luuydintä otettiin n. 10 ml 50ml Falcon-putkeen ja se kuljetettiin laboratorioon. Laboratoriossa näyte sekoitettiin n. 15ml elatusnesteeseen, jonka koostumus kuvattu Leskelän ym. (2003) työssä. Luuydinnäyte pipetoitiin tämän jälkeen  $175\text{ cm}^2$  soluviljelypulloon, joka asetettiin soluviljelykaappiin. Soluviljelykaapin viljelyolosuhteissa lämpötila  $37^\circ\text{C}$ , ilma oli kostutettua, kaasukoostumus oli 5%  $\text{CO}_2$ , 95% ilmaa. Solujen annettiin kiinnittyä 1 vuorokauden ajan, jonka jälkeen supernatantti imettiin pois ja soluviljelypullo huuhdeltiin fosfaattipuskuroidulla fysiologisella keittosuolaliuoksella

(PBS). Tämän jälkeen tuore elatusneste laitettiin tilalle. Elatusnestettä vaihdettiin kaksi kertaa viikossa kunnes silmämääräisesti arvioituna solujen pinta-ala oli 70-80% soluviljelypullon pohjan pinta-alasta. Tässä vaiheessa solut laskettiin ja jaettiin uusiin pulloihin tai pakastettiin nestemäiseen tyypeen tulevaisuuden käyttöä varten.

Sepsispotilailta luuydinnäyte otettiin suoliluun etuyläkärjestä luuydinneulalla.

Punktiokohdasta puudutettiin lidokaiinilla iho sekä luun pinta. 5 ml ruiskulla, joka oli esitäytetty 0,5ml hepariinia otettiin 4,5-5ml luuydinnäytettä kahteen ruiskuun eli yhteensä n. 10ml. Näytteet kuljetettiin turvalaboratorioon, jossa näytteet pipetoitiin 50ml Falcon-putkiin ja laimennettiin 1:6 PBS:ään. Laimennuksen jälkeen solufraktiot eroteltiin Ficoll-Paquen avulla valmistajan toimittamien ohjeiden mukaisesti. Mononukleaarifraktiokerroksen solut aspiroitiin varovaisesti ja pestiin PBS:llä kolme kertaa. Pesujen jälkeen solut suspensoitiin elatusnesteeseen ja pipetoitiin soluviljelypulloon yllä kuvattun kaltaisesti. Jatkossa soluviljely toteutettiin, kuten yllä on kuvattu.

Sepsispotilailta otettiin verinäytteet arteriakanyylista aseptista tekniikkaa noudattaen.

Verinäytteet otettiin potilailta, joilla oli kliinisesti septinen shokki -diagnoosi, ja joiden diagnoosi oli tehty 3-4 vuorokautta edeltävästi. Neljä 10ml lisäaineetonta verinäytepulloa otettiin täyteen eli yhteensä otettiin 40 ml verta. Verinäytteet kuljetettiin turvalaboratorioon ja verta seisotettiin 45 minuuttia huoneenlämmössä. Seisottamisen jälkeen hyytynyt veri sentrifugoitiin 2000 g:n suhteellisella sentrifugointivoimalla 15 minuutin ajan. Jäljelle jäänyt seerumi aspiroitiin varovaisesti 15 ml Falcon-putkiin ja sentrifugoitiin samoilla asetuksilla vielä kertaalleen ylimääräisistä punasoluista eroon pääsemiseksi. Tämän jälkeen seerumi jaettiin Eppendorf-putkiin siten, että yhteen putkeen tuli 1ml seerumia. Verinäytteiden n oli tässä työssä 6.

Seerumikontrolleiksi kerättiin vapaaehtoisilta perusterveiltä luovuttajilta verta laskimosta aseptista tekniikkaa käyttäen joko yhteensä 20 ml tai 40 ml. Näytteistä eristettiin seerumi yllä kuvattun kaltaisesti ja varastoitettiin Eppendorf-putkiin siten, että yhteen putkeen tuli 1ml seerumia. Kontrolliverinäytteiden n oli tässä työssä 8.

Solujen kykyä erilaistua osteoblasteiksi ja tuottaa mineralisoitua matriksia arvioitiin määrittämällä 5 viikon erilaistamisen jälkeen kalsiumpitoisuutta mittaamalla. Soluja viljeltiin 24-kuoppalevyllä. Solujen lukumäärä alkuvaiheessa oli 10 000 solua/kuoppa. Rinnakkaisia kuoppia oli 4. Kalsiumpitoisuus yhdelle kuopalle määritettiin duplikaattina. Solujen



erilaistaminen toteutettiin Leskelän ym. (2003) kuvaamalla tavalla. Myöskin kalsiumpitoisuuden määrittäminen toteutettiin identtisesti.

Erilaistumiskykyä osteoblasteiksi arvioitiin myös määrittämällä alkalisen fosfataasin (AFOS) aktiivisuus. Soluja viljeltiin 24-kuoppalevyllä. Solujen lukumäärä kuoppaa kohti oli 10 000. Rinnakkaisia kuoppia oli 4. AFOS-aktiivisuus yhdelle kuopalle määritettiin duplikaattina. Soluja viljeltiin 3 viikkoa ja entsyymiaktiivisuus määritettiin jälleen identtisesti Leskelän ym. kuvaamalla tavalla.

Jakautumiskykyä mittaavalla kokeella arvioitiin erilaistumattomien solujen elinkykyä. MTT-yhdiste pelkistyy metabolisesti aktiivisissa soluissa ja tämä mitattiin spektrofotometrisesti 550nm ja 650nm aallonpituuksilla. 550nm tulokselle tehtiin taustakorjaus eli vähennettiin 650nm tulos siitä. Solut pipetoitiin 96-kuoppalevyllä. Solujen lukumäärä alkuvaiheessa oli 500 solua kuoppaa kohti. MTT-testi tehtiin 1 vuorokauden, 3 vuorokauden ja 7 vuorokauden aikapisteissä. Inkubaatioaikana elatusnestettä ei vaihdettu kertaakaan. Mittausajankohtana kuopilta imettiin elatusneste pois ja tilalle pipetoitiin MTT-elatusneste -sekoitus, jossa pitoisuudeltaan 5mg/ml MTT-liuosta oli 10µl ja elatusnestettä 90µl. Soluja inkuboitiin soluviljelykaapissa 1h ajan, jonka jälkeen elatusneste poistettiin kuopilta. Tilalle pipetoitiin 100µl DMSO:a. Kuoppalevyjä varovaisesti ravisteltiin ja tehtiin yllä kuvattu spektrofotometrinen mittaus. Rinnakkaisia kuoppia oli aina vähintään 6.

PINP-kokeet toteutettiin kontrollipotilaiden MSC:llä. Viljely toteutettiin 6-kuoppalevyllä ja altistusaika soluviljelykaapissa oli 4 vuorokautta. Solujen lukumäärä yhdellä kuopalla oli 30 000. Rinnakkaisia kuoppia oli 3 ja PINP -määritykset tehtiin duplikaatteina. Soluviljelyssä käytettiin muuten täsmälleen saman sisältöistä peruselatusnestettä, jonka koostumus on kuvattu Leskelän ym (2003) työssä, mutta naudan vasikan seerumin (FBS) pitoisuus oli tässä koeasetelmassa 20 %. Samoin kuin muidenkin ryhmien seerumipitoisuus oli 20 %. Soluviljelmissä käytetty ihmisseerumi oli kontrolliryhmässä yhdistelmä vapaaehtoisten luovuttajien seerumia tasaisilla suhteilla. Kokeellisessa sepsisasetelmassa käytetty ihmisseerumi oli yhdistelmä potilaiden seerumista tasaisilla suhteilla. Koe-asetelmassa oli neljä ryhmää:

1. Peruselatusneste (FBS 20 %)
2. Peruselatusneste (FBS 20 %) + 3ng/ml tuumorinekroositekijää (tulehdusmalli)
3. Peruselatusneste, jossa vapaaehtoisten ihmiskontrollien seerumia 20 %

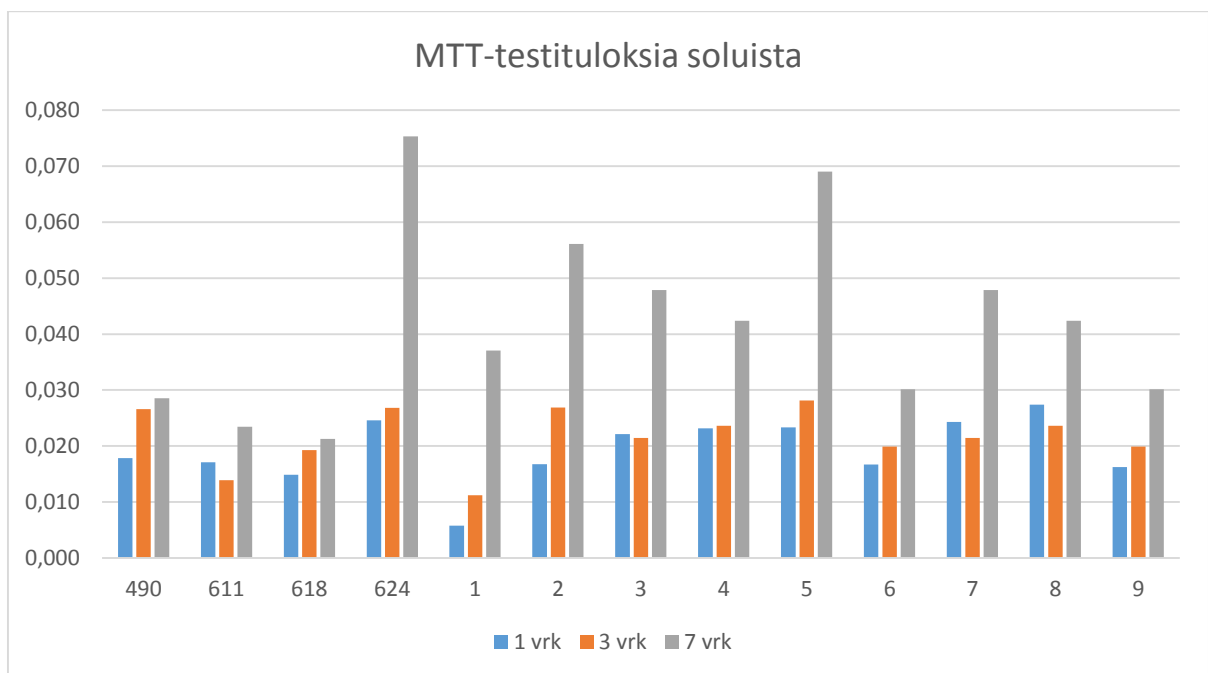
#### 4. Peruselatusneste, jossa sepsispotilaiden seerumia 20 % (tulehdusmalli)

PINP-tasot määritettiin Koivulan ym. (2010) kuvaamalla validoidulla kemiluminesenssi immunoesseellä Oulun yliopistollisen sairaalan kliinisen kemian laboratoriossa.

### 3. TULOKSET

#### 3.1. MTT-testitulokset

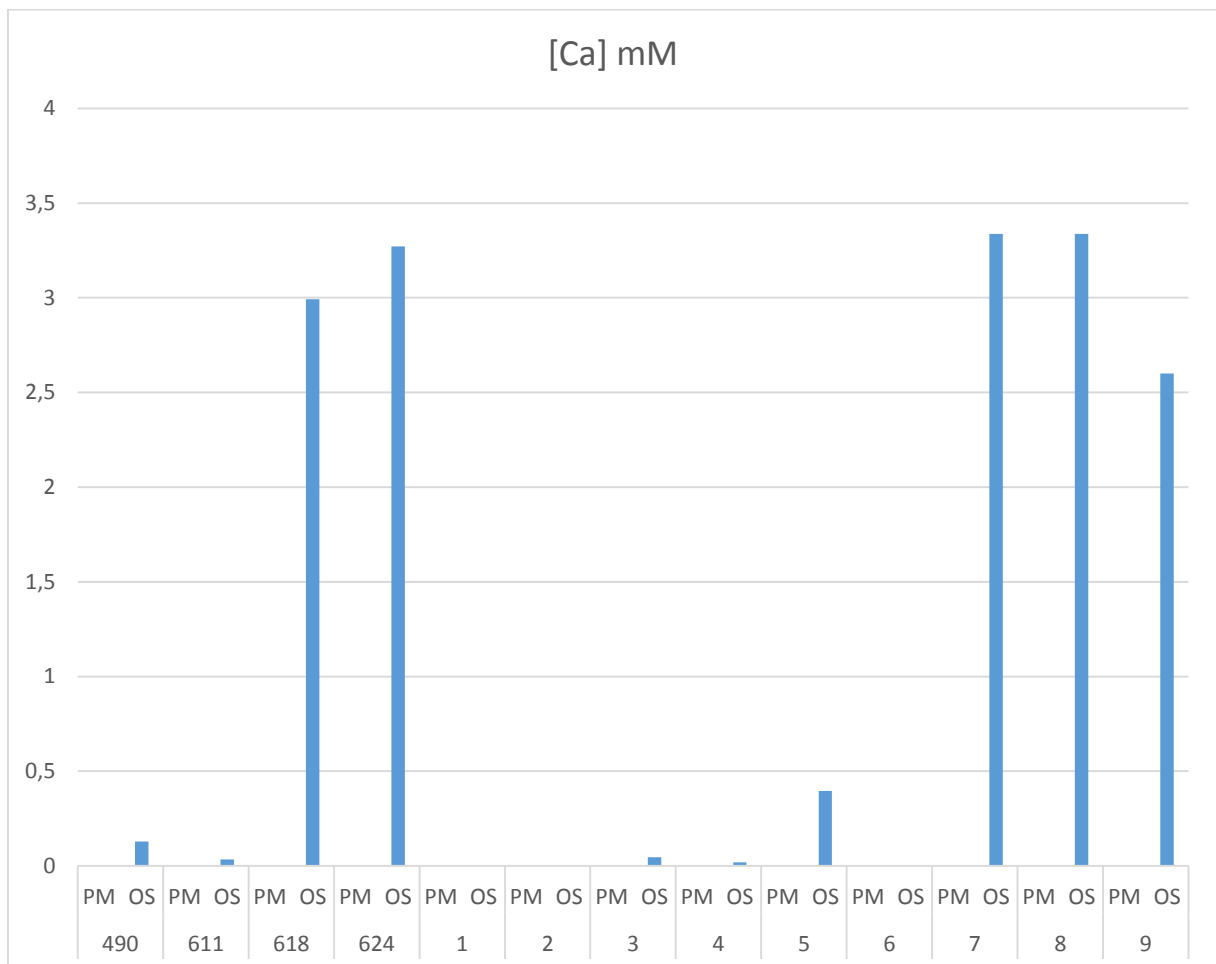
Kokeessa nähtiin suurta vaihtelua eri solulinjojen välillä, mutta kaikilla testatuilla solulinjoilla pystyttiin toteamaan lisääntynyt absorbanssi ja siten siis tulokset ovat tulkittavissa siten, että kaikki solulinjat mitatulla aikavälillä 6 vuorokauden aikana kykenivät lisääntymään *in vitro*. (Kuva 1.)



Kuva 1. 490, 611, 618, 624 ovat kontrollisolulinjoja lonkkaleikkauspotilaista. Solulinjat 1-9 ovat sepsispotilaista. Pylväiden värikoodit ovat selitettynä kuvassa. Vasemmalla sijaitsevat lukuarvot kuvaavat absorbanssia.

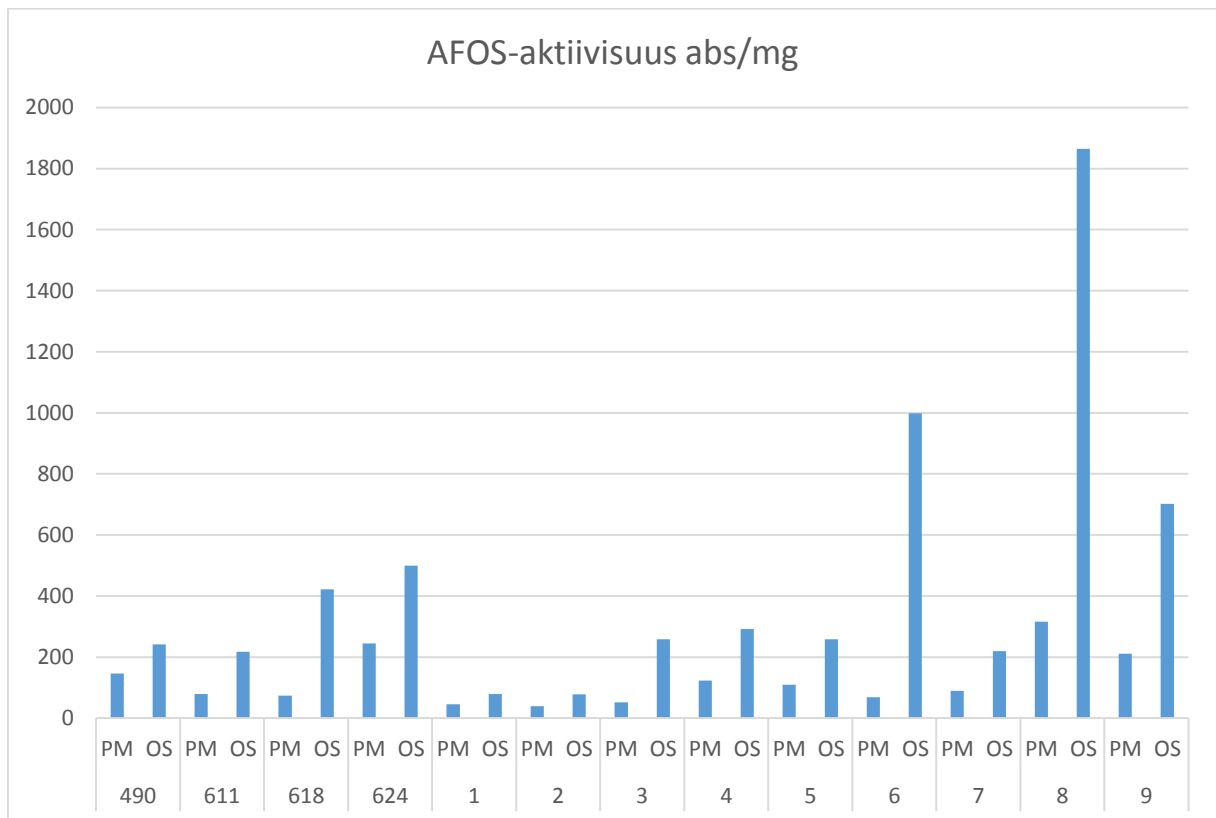
#### 3.2. Erilaistamiskokeiden tulokset

Luunmuodostusta kalsiumtasojen mittauksen perusteella tapahtui kaikissa kontrollisolulinjoissa. Kolmessa sepsissolulinjassa kalsiumtaso pysyi mittaamattoman matalana, muissa linjoissa kalsiumtasot nousivat (Kuva 2).



Kuva 2. Kaikissa kontrollisolulinjoissa todettiin kalsiumtasojen nousu 5 viikon erilaistamisviljelyn jälkeen. Pitoisuuden yksikkönä on mM. Tuloksissa oli suurta vaihtelua solulinjojen välillä. Kolmessa sepsissolulinjassa ei tapahtunut mineralisaatiota kalsiumtasojen perusteella. 490, 611, 618, 624 kontrollisolulinjat. 1-9 ovat sepsissolulinjat. PM = peruselatusneste, OS = lueralistamisen elatusneste. Pitoisuuksien laskemiseen käytetty standardikuvaajan korrelaatiokerroin >0,99 (data ei näkyvillä).

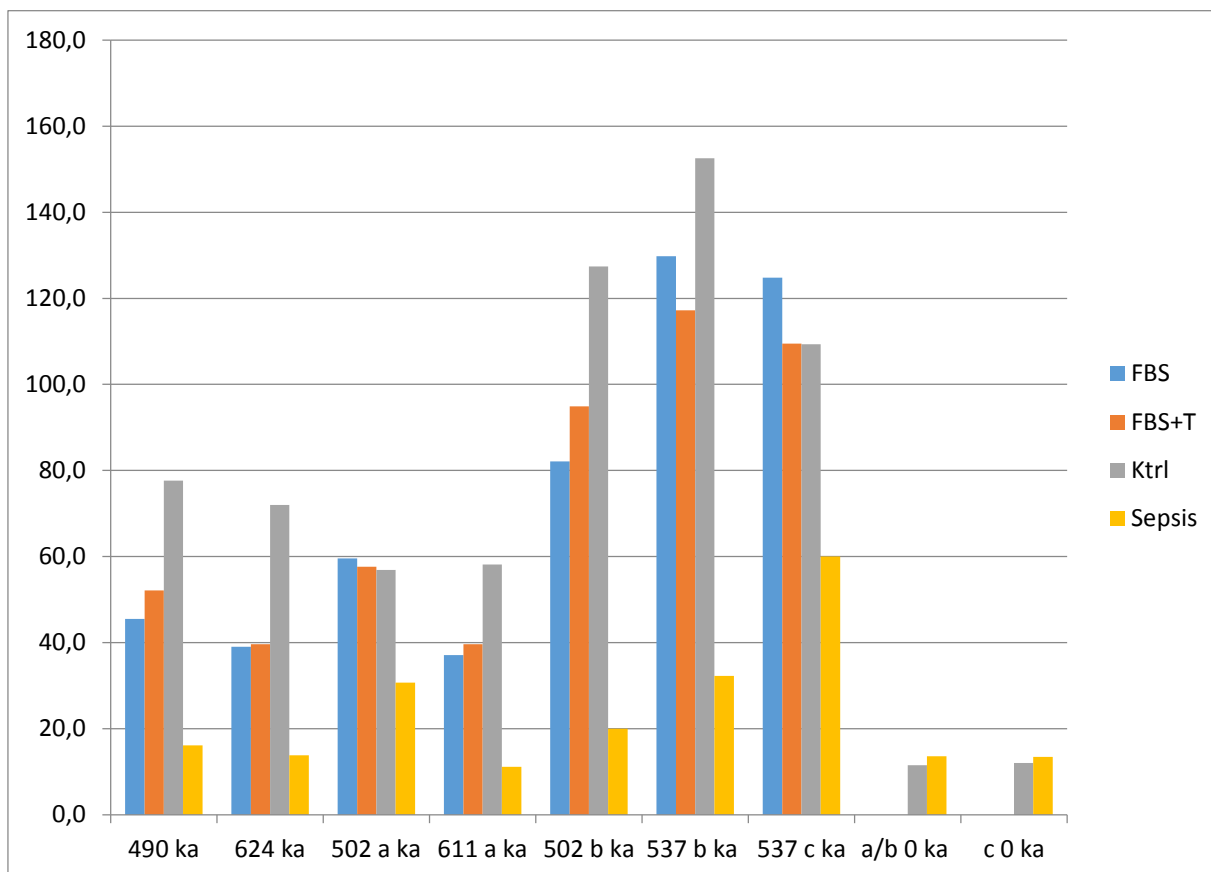
Kolmen viikon lueralistamisen jälkeen kaikilla testatuilla solulinjoilla alkalisen fosfaatin aktiivisuus lisääntyi kontrolliin verrattuna. Kuitenkin selvästi samoilla solulinjoilla, joilta kalsiumarvoja ei saatu määritettyä tai ne jäivät mataliksi, jäi myöskin AFOS-arvo matalaksi. Solulinjojen välillä oli siis myös tässä kokeessa suurta vaihtelua. (Kuva 3.)



Kuva 3. PM = peruselatusneste, OS = luerilaistamisen elatusneste. Pylvään korkeus kuvaa solujen AFOS-aktiivisuutta yhtä milligrammaa kokonaisproteiinimäärää kohden. PM = peruselatusneste, OS = luerilaistamisen elatusneste. Kaikissa solulinjoissa erilaistaminen aiheutti AFOS-aktiivisuuden kasvun.

### 3.3. PINP-tasojen muutokset kokeellisessa sepsismallissa *in vitro*

Jokaisella testatulla solulinjalla ja jokaisella koekerralla sama ilmiö oli toistettavissa: PINP – tasot romahtivat sepsis-seerumiryhmässä muihin ryhmiin verrattuna. Viidessä kokeessa seitsemästä oli havaittavissa, että ihmisseerumille altistetut solut tuottavat tyypin I kollageenia enemmän naudan seerumiin ja naudan seerumin tulehdusta imitoivaan malliin verrattuna. Kahdessa kokeessa tätä ei kuitenkaan tapahtunut. Tuumorinekroositekijällä käytetyllä 3ng/ml pitoisuudella ei tullut selvää vastetta suuntaan eikä toiseen PINP-tasojen perusteella. Mainittakoon, että seerumeissa PINP tasoissa ei ollut juuri eroa kontrollien ja potilaiden välillä. (Kuva 4.)



Kuva 4. FBS+T = FBS pohjainen elatusneste, johon on lisätty 3ng/ml tuumorinekroositekijää. Ktrl = kontrolliryhmä vapaaehtoisten luovuttajien seerumilla. Sepsis = elatusneste, jossa on sepsispotilaiden seerumi pohjana. Numerot viittaavat käytettyyn solulinjaan ja ka lyhenne perässä keskiarvoon. a, b ja c viittaavat eri koesarjoihin, jossa a ja b ovat ensimmäisiä sarjoja ja niissä on molemmissa käytetty 6 potilaan yhdistettyä seerumia. C-sarja on viimeisin, ja jossa on käytetty 5 potilaan yhdistettyä seerumia. Kaksi viimeistä pylvästä oikealla on pelkän mediumin pitoisuus 4 vuorokauden tyhjällä kuopalla inkuboinnin jälkeen.

#### 4. TUTKIMUKSEN VAHVUUDET JA HEIKKOUEDET

Tutkimuksen hyväksi puoleksi nostaisin yllättävän hyvän toistettavuuden erityisesti PINP-määrittelyksissä. Solubiologisissa tutkimuksissa tyypillisesti solulinjojen välillä on suurta vaihtelua, mutta siitäkin huolimatta tulokset olivat hyvin toistettavissa. Hyvää on myös se,

että samat tekijät pääsääntöisesti tekivät määrätyt toimet näytteiden käsittelyssä. Esimerkiksi sepsispotilaiden luuytimen näytteenottaja oli sama ja näytteiden jatkokäsittelijä oli sama. Myöskin jakautumistestejä ja erilaistumistestejä määritettäessä pipetoimassa oli koko ajan samat kaksi henkilöä, mikä vähensi siinäkin virheen ja vaihtelun mahdollisuutta. PINP-määritykset taas tehtiin akkreditoitussa laboratoriossa validoidulla menetelmällä kokeneen laboratoriohoitajan toimesta, joten niiden luotettavuus on hyvä. Ainoat todennäköiset virhelähteet PINP-määrityksissä on siis solulinjat itsessään, soluviljelijä ja näytteiden kerääjä. Tutkimuksen heikkouksina pidän pientä potilasmäärää, joka kuitenkin on ymmärrettävää solubiologisen tutkimuksen ollessa kyseessä. Lisäksi heikkoutena pidän suurta vaihtelua niin potilaiden kuin solujenkin välillä. Diagnooseille on selvät kliiniset määritelmät, mutta silti niidenkin sisällä on suurta vaihtelua potilaiden todellisen kunnan välillä. Solulinjojen välillä taas vaihtelu saattaa olla usean eri tekijän summa, johon ei juurikaan voi vaikuttaa. Vaikka yllä mainitsin saman näytteen käsittelijän olevan vahvuus, niin se saattoi olla myös heikkous erityisesti tutkimuksen alkuvaiheessa, koska tekijällä ei tämän kaltaisesta näytteiden käsittelystä ja tutkimisesta ollut aiempaa kokemusta. Kokemus ja näppituntuma muodostuivat tutkijalle vasta myöhemmin tutkimuksen edetessä.

## **POHDINTA**

Kuten johdannossa jo tuotiin esille, sepsis on yleinen tappaja meillä Suomessa ja maailmalla. Tutkimuksilla on osoitettu, että tunnistamalla sepsis ajoissa jopa liiankin löysien kriteerien avulla ja lisäksi tehokkaasti ajoissa hoitamalla kyetään laskemaan kuolleisuuslukuja, mutta tutkimusta tarvitaan vielä vaikean sepsiksen aiheuttamien elinvaurioiden patogeneesin ymmärtämiseksi. Tällä hetkellä sepsispotilaan hoito perustuu varhaiseen antibioottihoitoon, tavoiteohjattuun nestehoitoon ja elintoimintojen tukemiseen. Lisääntynyt ymmärrys elinvaurioiden synty- ja korjausmekanismeista auttaisi kuitenkin jatkossa kehittämään solutason mekanismeihin puuttuvia täsmähoitoja. MSC:n ominaisuudet tukea kudoksia endo- ja parakriinisesti sekä kyky hillitä ylenpalttista tulehdusvastetta luonnollisesti herättää kiinnostusta, voisiko näissä soluissa olla täsmähoidon potentiaalia? Ennen kliinisiä kokeita on kuitenkin erittäin tärkeää selvittää *in vitro* kantasolujen reaktioita ja elinkykyä voimakkaassa inflammatiiossa. Näin myös voidaan mallintaa alustavasti sitä, miten käy luuytimen sisäisille kantasoluvarastoillemme vaikean yleistyneen tulehdusreaktion hyökkäyksen alaisena.

Tämän tutkielman tulosten valossa ainakaan solujen lyhytaikainen altistuminen septisen shokin tasoiselle tilalle ei vie niiltä kykyä jakautua ja erilaistua, kun ne tulehdustilasta siirtyvät aseptisiin soluviljelyoloihin.

*In vitro* sepsismallissa 4 vuorokauden altistus septistä shokkia sairastavien potilaiden seerumille sai aikaan suhteellisen dramaattisen romahduksen kollageenisynteesissä, ainakin tyypin I prokollageenin aminoterminaalista peptidiä määrittävien tulosten perusteella. Tämän tuloksen merkitys on epäselvä. Kuitenkin kuten johdannossa jo tuotiin esille, niin tulehduksiin ja sepsikseen on pitkään liitetty eri elinten ylimääräisen sidekudosmuodostuksen ilmiö. Gäddnäs ym. osoittivat 2009, että sepsispotilaiden seerumissa lähinnä PIIINP-tasoissa on nousua ja positiivinen korrelaatio kuolleisuuteen. PINP-tasot sen sijaan olivat kutakuinkin samat kontrolleilla ja potilailla. Tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että sepsiksen vaikeusasteella sepsisryhmien sisällä oli vaihtelua PINP-tasoissa myöskin. Gäddnäs ym. havaitsivat toisessa jokseenkin ilkeässä koe-asetelmassa, että sekä PINP- että PIIINP-tasot olivat keinotekoisien haavan eritteessä sepsispotilailla alemmat kuin kontrolleilla alkuvaiheessa. 3 kuukauden kontrollissa prokollageenitasoissa oli ylikompensatoriset arvot ja arvot normalisoituivat 6 kuukauden kontrollissa. Tässä tutkielmassa saadut tulokset kokeellisessa sepsismallissa viittaavat samaan suuntaan, neljän vuorokauden inkubaatiolla PINP-ekspressio romahti verrattuna ei-tulehdukselliseen tilaan. TNF-alfa ei yksin ilmiötä saanut aikaan käytetyllä pitoisuudella. Miksi kuitenkin seerumissa PINP-tasojen selvää romahdusta ei voitu havaita? Olisiko asia niin, että kudoksista lähtökohtaisestikin ”vuotaa” verenkiertoon tyypin I prokollageenia niin vähän, että kudostasolla synteesin alasajoa ei voi systeemisesti havaita? Asia on sen verran mielenkiintoinen, että se vaatisi lisätutkimuksia. Hyvä lähtökohta voisi olla pidentää inkubaatioaikaa huomattavasti jopa kuukausiin ja kattavasti määrittää kollageenimetabolian merkkiaineet syntetoinnista hajotukseen. Lisäksi tällaisen pitkän aikajänteen altistuksen jälkeen olisi vielä hyvä määrittää solujen elinkyky esimerkiksi MTT-testillä ja mitokondrioiden kuntoa mittaavilla testeillä.

Vielä on paljon tutkittavaa, että MSC:t voisi julistaa turvalliseksi soluterapiaksi oikeastaan mihinkään tulehdukselliseen sairauteen. Niinkin alkuvaiheen seikka kuin solujen selviäminen kovassa tulehdusympäristössä on pitkälti selvittämättä. Tulehduksen vaikutuksista erilaistumiseen on kyllä tietoa, mutta soluterapian näkökulmasta ei juurikaan. Jopa solujen

infuusioturvallisuudesta on jäänyt tutkimusta maailmalla tekemättä ja ryhmällämme preliminääristä dataa on, että siihenkin tulisi tulevaisuudessa huomiota kiinnittää.

## LÄHDELUETTELO

Bone,R.C.; Balk,R.A.; Cerra,F.B.; Dellinger,R.P.; Fein,A.M.; Knaus,W.A.; Schein,R.M.; Sibbald,W.J.; ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55.

Gaddnas,Fiia; Koskela,Marjo; Koivukangas,Vesa; Risteli,Juha; Oikarinen,Aarne; Laurila,Jouko; Saarnio,Juha; Ala-Kokko,Tero. Markers of collagen synthesis and degradation are increased in serum in severe sepsis: a longitudinal study of 44 patients. Crit Care. 2009;13(2):R53. doi: 10.1186/cc7780. Epub 2009 Apr 9.

Gaddnas,F.P.; Koskela,M.; Koivukangas,V.; Laurila,J.; Saarnio,J.; Risteli,J.; Oikarinen,A.; Ala-Kokko,T. Skin collagen synthesis is depressed in patients with severe sepsis. Anesth Analg. 2010 Jul;111(1):156-63. doi: 10.1213/ANE.0b013e3181e1db48. Epub 2010 May 19.

Hotchkiss,R.S.; Karl,I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med. 2003 Jan 9;348(2):138-50.

Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. Annu Rev Med. 2008;59:311-25. Review.

Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, Pettilä V, Parviainen I, Ala-Kokko TI, Kolho E, Rintala EM. Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. Intensive Care Med. 2007 Mar;33(3):435-43. Epub 2007 Jan 16.

Kerkela,E.; Hakkarainen,T.; Makela,T.; Raki,M.; Kambur,O.; Kilpinen,L.; Nikkila,J.; Lehtonen,S.; Ritamo,I.; Pernu,R.; Pietila,M.; Takalo,R.; Juvonen,T.; Bergstrom,K.; Kalso,E.; Valmu,L.; Laitinen,S.; Lehenkari,P.; Nystedt,J. Transient proteolytic modification of mesenchymal stromal cells increases lung clearance rate and targeting to injured tissue. Stem Cells Transl Med. 2013 Jul;2(7):510-20. doi: 10.5966/sctm.2012-0187. Epub 2013 Jun 3.

Koivula,M.K.; Richardson,J.; Leino,A.; Valleala,H.; Griffiths,K.; Barnes,A.; Konttinen,Y.T.; Garrity,M.; Risteli,J. Validation of an automated intact N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) assay. Clin Biochem. 2010 Dec;43(18):1453-7. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.09.019. Epub 2010 Oct 12.

Koo EG, Lai LM, Choi GY, Chan MT. Systemic inflammation in the elderly. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2011 Sep;25(3):413-25.



Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009 Jul 2;5(1):54-63.

Leskela,H.V.; Risteli,J.; Niskanen,S.; Koivunen,J.; Ivaska,K.K.; Lehenkari,P. Osteoblast recruitment from stem cells does not decrease by age at late adulthood. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 28;311(4):1008-13.

Marshall,R.P.; Bellingan,G.; Webb,S.; Puddicombe,A.; Goldsack,N.; McAnulty,R.J.; Laurent,G.J. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Nov;162(5):1783-8.

Matthay MA, Thompson BT, Read EJ, McKenna DH Jr, Liu KD, Calfee CS, Lee JW. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest*. 2010 Oct;138(4):965-72.

Meduri,G.U.; Tolley,E.A.; Chinn,A.; Stentz,F.; Postlethwaite,A.. Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1432-41.

Mei SH, Haitzma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Oct 15;182(8):1047-57. Epub 2010 Jun 17.

Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009 Jun;8(2):110-23.

Rocco P.r.m., Dos Santos C et al: Lung Parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome, *Minerva Anestesiologica* Dec 2009:730

Sepsiksen Käypä hoito –suositus. Duodecim.

