

Allograftiluun prosessointi kudospankkituotteeksi

Pro Gradu –tutkielma
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Tampereen yliopisto
Huhtikuu 2006
Suvi Haimi

Kiitokset

Tämä pro gradu –tutkielma suoritettiin Lääketieteellisen teknologian instituutissa, Tampereen yliopistossa. Käytännön tutkimus tehtiin Solu- ja kudosteknologiakeskus Regeassa yhteistyössä Tampereen teknillisen yliopiston kanssa. Haluan lämpimästi kiittää ohjaajiani Annika Vienosta, Martti Hirniä ja Mika Peltoa asiantuntevasta ohjauksesta ja tuesta. Kiitokset kuuluvat myös Mari Mannilalle tärkeästä jäännösrasvanmääritysanalyysin suorittamista. Lisäksi haluan lämpimästi kiittää Jaana Leppäniemeä ja Rami Peurakoskea korvaamattomasta avusta luunäytteiden mekaanisessa työstössä. Lopuksi kiitän saamastani tuesta perhettäni ja ystäviäni ja erityisesti Tuomas Huttusta, joita ilman tämä ei olisi ollut mahdollista.

Tampere, Huhtikuu 2006

Suvi Haimi

PRO GRADU –TUTKIELMA

Paikka: TAMPEREEN YLIOPISTO
Lääketieteellinen tiedekunta
Lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT)
Solu- ja kudosteknologiakeskus Regea

Tekijä: HAIMI, SUVI PÄIVIKKI

Otsikko: Allograftiluun prosessointi kudospankkituotteeksi

Sivumäärä: 59 s. + liite 3 s.

Ohjaajat: FT Annika Vienonen, dos. Martti Hirn, DI Mika Pelto

Tarkastajat: Prof. Markku Kulomaa, DI Mika Pelto

Aika: Huhtikuu 2006

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Optimaalista allograftiluun sterilointimenetelmää ei vielä ole, joten käytössä olevat sovellukset ovat kompromisseja luun turvallisuuden ja mekaanisten ominaisuuksien välillä. Tutkimuksen tavoitteena oli löytää optimaalinen puhdistusmenetelmä, joka puhdistaa allograftiluun tehokkaasti. Lisäksi tutkittiin eri puhdistusmenetelmien, peretikkahappoetanolisteriloinnin ja kylmäkuivauksen yhteisvaikutuksia luun mekaanisiin ominaisuuksiin.

Menetelmät: Tutkittavissa pesumenetelmissä luunäytteitä prosessoitiin ultraäänihauhteella vetyperoksidin, etanolin ja tislattua vettä kanssa eripituisten inkubointien ajan. Puhdistusmenetelmät yhdistettiin peretikkahappoetanolisterilointiin, ja eri inkubointiaikojen vaikutusta prosessointimenetelmien tehokkuuteen puhdistaa luu rasvakudoksesta tutkittiin määrittämällä jäännösrasvaprosentti ultraäänikuivauksen avulla. Kemiallisten käsittelyjen jälkeen osa näytteistä kuivattiin alle 6 % jäännöskosteuspitoisuuteen ja osa täysin kuivaksi. Eri prosessointimenetelmien ja jäännöskosteusprosenttien vaikutuksia luun mekaanisiin ominaisuuksiin tutkittiin tekemällä kortikaaliluunäytteille kolmi- ja nelipistetaivutustestaus ja hohkaluunäytteille puristustestaus.

Tutkimustulokset: Lyhyimmän prosessointimenetelmän B todettiin olevan yhtä tehokas puhdistusmenetelmä kuin kahden muun tutkitun menetelmän (D, E). Sekä kortikaaliluun- että hohkaluunäytteiden kylmäkuivaus täysin kuivaksi heikensi tutkittuja mekaanisia ominaisuuksia merkittävästi, verrattuna prosessoimattomiin kontrolleihin. Kaikki kolme prosessointimenetelmää heikensivät hieman mutta kuitenkin merkittävästi kortikaaliluun kimmomodulin arvoja. Kortikaaliluun taivutuslujuuteen menetelmillä ei ollut merkittävää vaikutusta, mutta näytteiden absorboima energia parani prosessoinnin myötä hieman. Menetelmillä ei ollut vaikutusta hohkaluun puristuslujuuteen, mutta näytteiden absorboitu energia heikkeni merkittävästi kolmessa näyte-erässä neljästä. Eri menetelmien vaikutuksilla kortikaali- ja hohkaluun mekaanisiin ominaisuuksiin ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa.

Johtopäätökset: Kemiallisten pesujen inkubointiaikojen lyhentämisellä ei todettu olevan vaikutuksia puhdistusmenetelmän tehokkuuteen poistaa hohka- ja kortikaaliluusta rasvaa. Puhdistusmenetelmillä B, D ja E yhdistettynä peretikkahappoetanolikäsittelyyn oli vaikutuksia sekä hohkaluun että kortikaaliluun kuormankanto-ominaisuuksiin. Vaikutusten merkitystä kliinisesti on kuitenkin vaikea arvioida ilman *in vivo* jatkotutkimuksia.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE
Faculty of Medicine
Institute of Medical Technology
Regea – Institute for Regenerative Medicine
Author: HAIMI, SUVI PÄIVIKKI
Title: Allograft bone processing to a tissue bank product
Pages: 59 p. + appendix 3 p.
Supervisors: Annika Vienonen PhD, Martti Hirn MD PhD, Mika Pelto MSc (Eng)
Reviewed by: Markku Kulomaa Prof., Mika Pelto MSc (Eng)
Date: April 2006

ABSTRACT

Background and aims: The optimal sterilization method for allograft bone does not exist yet and thus the methods currently used are a trade of between the allograft safety and effects on bone's biological and mechanical properties. The aim of this study was to find an optimal cleaning procedure that cleans allograft bone efficiently. The effect of the cleaning procedure combined with peracetic acid-ethanol sterilization and freeze-drying on bone's mechanical properties were also studied.

Methods: The cleaning methods explored consisted of the processing of bone samples for different incubation times in a sonicator, under the influence of hydrogen peroxide, ethanol and distilled water. The cleaning treatments were combined with peracetic acid-ethanol sterilization and the effects of different incubation times to the efficiency of the processing methods to clean adipose tissue from the bone were determined by measuring the residual fat percentage using ultrasonic elution. After the chemical treatments, a part of the bone samples were freeze dried to a residual moisture content of < 6 % and to 0 %. The effects of different processing methods and residual moisture contents to mechanical properties of bone were studied performing three-point bending tests for cortical bone samples and compression tests for cancellous bone cylinders.

Results: The shortest processing method (B) was found to be as efficient as the two other tested methods (D, E) in cleaning fat from bone. Freeze drying of cortical and cancellous bone samples to 0 % residual moisture content weakened significantly the mechanical properties studied compared to unprocessed controls. All three processing methods reduced slightly, although significantly, Young's modulus of cortical bone samples. There was no significant effect on bending strength, but the energy absorbed of the cortical bone samples was slightly improved by processing. The compression strength of cancellous bone was not affected by processing, but the absorbed energy was weakened significantly in three out of four sample lots. No statistical difference was found between the effects of different processing methods on mechanical properties of cancellous and cortical bone samples.

Conclusions: Reducing the incubation times of chemical processes did not have an effect on the efficiency of the cleaning process to clean adipose tissue from the cancellous and cortical bone. The different processing methods combined to peracetic acid-ethanol had effects on the weight bearing properties of cancellous and cortical bone samples. However, the effect's clinical significance is hard to estimate without *in vivo* future studies.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	7
2. KIRJALLISUUSKATSAUS	9
2.1. Luu allograftina	9
2.2. Luun koostumus ja rakenne	11
2.2.1. Luun matriksin koostumus ja mineralisaatio	11
2.2.2. Pitkien luiden anatomia	12
2.2.3. Luutyypit	13
2.3. Luun mekaaniset ominaisuudet	15
2.3.1. Kortikaaliluun mekaaniset ominaisuudet	15
2.3.2. Hohkaluun mekaaniset ominaisuudet	17
2.4. Luun prosessointimenetelmiä	18
2.4.1. Luun pesumenetelmät	19
2.4.2. Peretikkahappoetanolisterilointi	19
2.4.3. Gammasterilointi	20
2.4.4. Luumatriksin demineralisointi	21
2.5. Luun kylmäkuivaus	22
2.5.1. Kylmäkuivauksen periaate	23
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	26
4. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	27
4.1. Luunäytteiden mekaaninen työstö	27
4.1.1. <i>Distaalisen tibia</i> -parin M309, M301 esimerkkityöstö	28
4.2. Kemiallisen puhdistuksen optimointi	32
4.3. Luunäytteiden kylmäkuivaus	34
4.4. Näytteiden jäännösrasvapitoisuuden määrittäminen	35
4.5. Mekaaninen testaus ja tilastollinen tarkastelu	36
5. TULOKSET	40
5.1. Luunäytteiden kylmäkuivaus	40

5.2. Jäännösrasvamääritys	42
5.3. Mekaaninen testaus ja tilastollinen tarkastelu	45
6. POHDINTA.....	50
6.1. Jäännösrasvamääritys	50
6.2. Mekaaninen testaus	51
7. JOHTOPÄÄTÖKSET	55
LÄHDELUETTELO	56
LIITE 1	60

1. Johdanto

Allografitiluun, eli saman lajin yksilöstä saadun luusiirteen, käyttö ortopedisessä kirurgiassa on osoittautunut monien ortopedisten ongelmien ratkaisuksi (Barbour & King, 2003). Lisäksi allografitiluun edut verrattuna autografitiluuhen, eli potilaalta itseltään otettuihin siirteisiin ovat huomattavat. Allografitiluuta käytetään yleensä parantamaan vaurioituneen luun mekaanista kestävyyttä tai täyttämään esimerkiksi syövän aiheuttamia aukkoja luussa. Ihmisperäisenä materiaalina allografitiluun käyttöön liittyy kuitenkin bakteeri- ja virusinfektoriski, erityisesti HIV:n ja hepatiittivirusten osalta. (Cornu ym., 2000; Vastel ym., 2004.) Nykyään eniten käytettyjä sterilointimenetelmiä ovat erilaiset kemialliset steriloinnit ja säteilytykset, kuten gammasterilointi. Käytössä ei kuitenkaan ole vain yhtä hyväksi havaittua sterilointimenetelmää vaan tämänhetkiset menetelmät ovat kompromisseja allografitiluun turvallisuuden ja mekaanisten ominaisuuksien välillä. Jokaisella luupankilla on siten oma sovelluksensa allografitiluun prosessoimiseksi. (Lomas ym., 2004; Pruss ym., 2001.)

Peretikkahappoetanolisteriloinnin on todettu olevan potentiaalinen sterilointimenetelmä, sillä sen on todettu inaktivoivan tehokkaasti viruksia ja bakteereja vaikuttamatta kuitenkaan heikentävästi pehmytkudossiirteiden, kuten jänteiden mekaanisiin ominaisuuksiin (Scheffler ym., 2005). Peretikkahappoetanolisteriloinnin vaikutukset luun mekaanisiin ominaisuuksiin ovat kuitenkin vielä tutkimatta.

Steriloinnin lisäksi allografitiluu usein puhdistetaan kemiallisesti tai fysikaalisesti parantamaan steriloinnin tehoa (DePaula ym., 2005). Orgaanisia liuottimia, kuten kloroformia käytetään yleensä luun rasvakudoksen poistamiseen (Cornu ym., 2000; Pruss ym., 2001, Pruss ym., 1999). Kloroformilla, kuten muillakin kemiallisilla aineilla on kuitenkin negatiivisia vaikutuksia allografitiluun biologisiin ja mekaanisiin ominaisuuksiin (Vastel ym., 2004).

Kemiallisen puhdistuksen ja steriloinnin jälkeen allografitiluuta lisäksi kylmäkuivataan parantamaan luun kemiallista stabiiliutta. (Franks, 1998; Galea & Kearney 2005). American Association of Tissue Banks Tissue Banks on esittänyt, että kylmäkuivatun luun

jäännöskosteusprosentin ollessa alle 6 %, luuta voidaan säilyttää huoneen lämmössä viisi vuotta prosessoinnin jälkeen (Boyce ym., 1999). Useissa tutkimuksissa on todettu kylmäkuivauksen vaikuttavan luun mekaanisiin ominaisuuksiin heikentävästi, mutta tulokset ovat osin ristiriitaisia (Boyce ym., 1999; Cornu ym., 2000; Nather ym., 2004). Selvää tutkimusta, jossa olisi verrattu eri jäännöskosteusprosenttien vaikutuksia allograftiluun mekaanisiin ominaisuuksiin, ei kuitenkaan ole.

Luun prosessointimenetelmän täytyy puhdistaa luu tehokkaasti verisoluista ja rasvasta ja inaktivoida viruksia ja bakteereja. Lisäksi prosessoidun allograftiluun tulee säilyä mahdollisimman pitkään käyttökelpoisena. Prosessointimenetelmä ei kuitenkaan saa vaikuttaa heikentävästi luusiirteen biologisiin tai mekaanisiin ominaisuuksiin. Transplantoitujen allograftiluiden mekaaninen kestävyys on tärkeää, sillä se vaikuttaa voimakkaasti leikkaustoimenpiteen ja kuntoutumisen onnistumiseen sekä lyhyellä että pitkällä aikavälillä. (Vastel ym., 2004.) Tämän vuoksi uusia prosessointimenetelmiä kehittäessä tulisi tutkia myös prosessoinnin mahdolliset vaikutukset luun mekaanisiin ominaisuuksiin.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1. Luu allograftina

Allogeenisen luun, käyttö suurten luudefektien korjauksessa on edelleen korvaamatonta, riippumatta useista yrityksistä kehittää kudosteknologisia vaihtoehtoja kudossiirteille (Brosig ym., 2005). Historiallisesti luuallografteja on käytetty pääasiallisesti massiiviluusiirteitä vaativissa leikkauksissa, mutta 1980-luvulla siirryttiin allograftien käyttöön useimmissa toimenpiteissä, joihin oli ennen käytetty autografteja. Allograftien kysynnän kasvuun vaikuttivat mm. allograftien helpompi saatavuus, kudoslouvuttajien seulonta sekä prosessointitekniikoiden kehittyminen, mikä paransi allograftien käytön turvallisuutta. (Boyce ym., 1999.) Allograftikudoksen käyttö lisääntyy kaiken aikaa. Esimerkiksi USA:ssa implantoidaan yli 500 000 luuallograftia vuosittain. (Eppley ym., 2005.)

Luuallografteilla hoidetaan erilaisia luurangon vaurioita, jotka johtuvat esim. traumaista, kehityshäiriöistä, onkologisista leikkauksista tai infektioista (Galea & Kearney 2005). Suomessa käytetään tuorepakastettuja luusiirteitä yleisimmin lonkan proteesin uusinta-leikkauksissa sekä hyvin laajalti erilaisissa korjausleikkauksissa. Tuoreeltaan pakastettu luu on peräisin joko lonkkanivelleikkauksista tai vainajalta ja se sisältää jäänteitä pehmytkudoksesta, rasvaa ja verisoluja. (Hirn ym., 2001.) Implantoitavassa luuallograftissa pitäisi olla mahdollisimman vähän soluja jäljellä, sillä periostealiset- ja luuytimen solut ovat erittäin antigeenisia ja voivat aiheuttaa siirteen vastaanottajassa immuunivasteen. Mineraalipitoisen luuallograftin tulee toimia luun muodostusta stimuloivana pintana ja tukea paranevaa kudosta kunnes siirre on täysin integroitunut luun uudelleenmuodostumisen avulla potilaan luukudokseen. Massiiviluuallografteilta vaaditaan lisäksi kykyä kestää mekaanista kuormitusta. (Boyce ym., 1999; Galea & Kearney, 2005.)

Allograftiluun käyttöön liittyy useita etuja verrattuna autologiseen luusiirteeseen. Allograftiluuta voidaan valmistaa useissa eri konfiguraatioissa (hienojakoinen jauhe, kortikaaliluulastut, hohkaluukuutiot jne.) ja sitä on saatavilla lähes rajattomasti. Käytettäessä autogeenistä luuta siirteenottoaika vahingoittuu, milloin suuria määriä tai isokokoisia siirteitä ei ole mahdollista ottaa. (Barbour & King, 2003; Boyce ym., 1999; Eppley ym., 2005; Galea & Kearney, 2005.) Allograftiluu ei ole yhtä osteogeeninen kuin autografti-

luu, mikä johtuu prosessoidun allograftiluun soluttomuudesta. Sillä on lisäksi pidentynyt integroitumisaika kohdekudukseen ja se on vähemmän osteokonduktiivinen ja osteoinduktiivinen kuin autograftiluu. Osteokonduktiivisuudella tarkoitetaan siirteen kykyä ohjata luun muodostumista siirteen pintaan ja huokosiin ja suojata luun esiasteen muodostumista luuksi. Osteoinduktiivisuudella tarkoitetaan puolestaan kykyä synnyttää luuta sellaisessa ympäristössä, jossa sitä ei normaalisti ole. Erityisesti allograftin prosessointimenetelmä vaikuttaa osteoinduktiivisuuskapasiteettiin. Suurin ongelma allograftiluun käytössä on siihen liittyvä virusinfektoriski ja erityisesti bakteeri-infektoriski. (Barbour & King, 2003; Galea & Kearney, 2005.)

Luusiirteiden on todettu välittävän useita patogeenejä kuten tuberkuloosibakteereja, hepatiitti- ja retroviruksia (Pruss ym., 2002). Tällä hetkellä virusinfektion riski kudossiirteiden käytössä on kuitenkin hyvin pieni, johtuen serologisesta luovuttajaseulonnasta ja kudossiirteiden steriloinnista (Barbour & King, 2003; Boyce ym., 1999; Lomas ym., 2004). Esimerkiksi riski saada HIV seulotusta allograftiluusta on arvioitu olevan yksi 1,6 miljoonasta. Vuoden 1980 jälkeen on raportoitu kaksi tapausta, joissa potilas on saanut HIV-infektion allograftiluusta. Ensimmäisessä tapauksessa luovuttajalle ei oltu tehty ohjeiden mukaista serologista testausta, eli tartunta olisi voitu välttää kunnollisella luovuttajaseulonnalla. Toisessa tapauksessa seronegatiivinen luovuttaja osoittautuikin positiiviseksi, joten infektion serokonversion ikkunavaiheen vuoksi serologinen testaus ei yksin riitä varmistamaan kuolleilta luovuttajilta saatujen kudossiirteiden turvallisuutta. (Boyce ym., 1999; Hamer ym., 1996.) Lisäksi vuonna 2002 viisi vastaanottajaa sairastui hepatiitti C:hen saatuaan siirteen luovuttajalta, joka oli todettu seronegatiiviseksi (Grieb ym., 2005). Luun bakteerikontaminoituminen luovutuksen ja käsittelyn aikana tai ennen sen pakastamista onkin todennäköisempää kuin virusinfektoriski. Ennen pakastamista luusta yleensä otetaan bakteeriviljelynäytteet. Nämä testit ovat epätarkkoja, eivätkä ne varmuudella poissulje bakteerikontaminaation riskiä. (Hirn ym., 2001.)

Virukset ja bakteerit voidaan poistaa kudossiirteistä fysikaalisesti tai inaktivoimalla, eli tuhoamalla niiden lisääntymiskyky. Virusten ja bakteerien poistamistehokkuutta tutkitaan yleensä kyllästämällä näyte tietyllä määrällä virusta tai bakteeria, jonka jälkeen suoritetaan tietty prosessointivaihe, ja lopuksi testataan, kuinka paljon viruksia tai bakteereita on poistunut tai inaktivoitunut. (Boyce ym., 1999; Pruss ym., 2003.) Luun sterilointimenetelmiin on perehdytty kappaleessa 2.4.

Massiiviluu- ja osteokondraaliallograftien implantaation onnistumisprosentti arvioituna kliiniseltä, röntgenradiologiselta ja biologiselta kannalta on 60–90 %. Tämä luku osoittaa allograftiluun käytön kannattavuuden ortopediassa, toisaalta se antaa myös tilaa uudelle teknologialle, kuten solu- ja geeniterapioille ja kudosteknologisille sovelluksille, jotka voivat olla perinteistä allograftia parempia tietyissä tapauksissa. (Boyce ym., 1999; Eppley ym., 2005.) Tällä hetkellä allograftiluun avulla tehty leikkaus on kuitenkin huomattavasti halvempaa kuin proteesilla tai kudosteknologisen sovelluksen avulla suoritettu leikkaus. Johtuen allograftiluun erinomaisista biologisista ominaisuuksista, sen kysyntä tulee todennäköisesti silti jatkumaan pitkälle tulevaisuuteen. (Nather ym., 2004.)

2.2. Luun koostumus ja rakenne

Luukudoksen kovuus, elastisuus ja muovautuvuus tekevät luustosta ideaalisen vipuvarren elimistölle ja suojarakenteen sisäelimille. Luun mikrorakenteiden järjestäytyminen antaa luulle optimaalisen massa/lujuus suhteen. Luukudoksella on myös metabolista aktiivisuutta, luusto osallistuu mm. kalsiumtasapainon säätelyyn. Luukudos on lisäksi tärkeä kalsium-, fosfaatti- ja magnesiumvarasto. Luuydin toimii puolestaan verisolujen tuottajana. Luukudos on hyvin heterogeenistä kudosta ja sen koostumus ja rakenne riippuvat useista eri tekijöistä, jotka vaikuttavat myös luun mekaanisiin ominaisuuksiin ks. kohta 2.3. Heterogeenisyydestä huolimatta, luukudoksen peruskomponentit ovat yllättävän yhtenäisiä. (Bonucci, 2000.)

2.2.1. Luun matriksin koostumus ja mineralisaatio

Luun orgaanisesta aineesta yli 90 % on kollageenia, jonka molekylaarinen järjestäytyminen antaa luulle sen lujuuden ja joustavuuden. Suurin osa kollageenista on tyypin I kollageenia, mutta rajatuilla alueilla on myös tyypin III ja VI kollageenia. Loppuosa orgaanisesta matriksista koostuu fosfolipideistä, proteoglykaaneista, ei-kollageenimaisista proteiineista, kuten osteopontiini, osteonektiini ja sialoproteiini, glykoproteiineista ja fosfoproteiineista. Lisäksi kalsifioitunut matriksi sisältää kasvutekijöitä, entsyymejä, kuten alkalista fosfataasia ja metalloproteaaaseja. Fosfolipideillä on todettu olevan tärkeä rooli matriksin mineralisaatiossa, ja proteoglykaanien on puolestaan arveltu toimivan mineralisaation säätelijöinä. Ei-kollageenisten proteiinien toiminnot vaihtelevat, mutta ne vaikut-

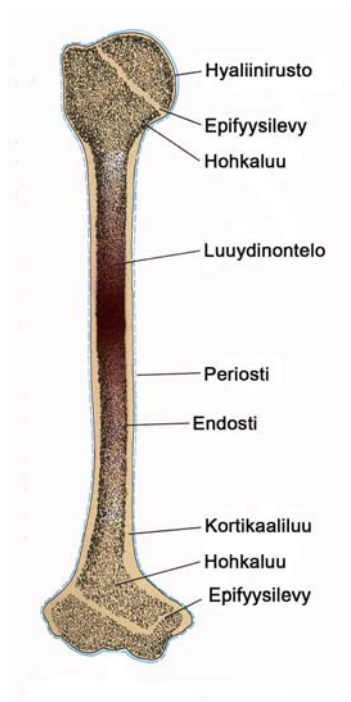
tavat tavalla tai toisella mineralisaatiotapahtumaan. (Bonucci, 2000; Heath & Young, 2000.)

Luumatriksin mineraaliosa eli epäorgaaninen aines on pääasiassa kalsiumfosfaattia, josta valtaosa on kiteisenä hydroksiapatiittina ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), joka tekee luusta kovan. Hydroksiapatiittikiteiden on todettu asettuvan kollageenikuitujen väliin siten, että kiteet eivät häiritse kollageenikuitujen rakennetta, milloin muodostuu erittäin luja ja sitkeä komposiittirakenne. (Bonucci, 2000; Heath & Young, 2000; Hench, 2005.)

Luumatriksin mineralisaatio alkaa eritysrakkuloiden ja kollageenin erityksestä osteoblasteista. Osteoblastit muodostavat ympärilleen osteoidikerroksen, jossa olevat eritysrakkulat toimivat mineralisaatiokeskuksina. Rakkuloissa on runsaasti alkaalista fosfataasia ja muita fosfataaseja, jotka voivat tuottaa fosfaatti-ioneita monista eri molekyyleistä. Kertyvät fosfaatti- ja kalsium-ionit muodostavat hydroksiapatiittikiteitä. (Heath & Young, 2000.)

2.2.2. Pitkien luiden anatomia

Pitkät luut (esim. *femur* ja *tibia*) voidaan jakaa kolmeen alueeseen: *diafyysiin*, jolla tarkoitetaan luun vartta, *epifyyseihin*, jotka sijaitsevat luun kummassakin päässä, ja *metafyysiin*, jotka paikantuvat *diafyysin* ja *epifyysin* väliin (Kuva 1). Kasvuiässä epifyysin ja *metafyysin* erottaa *epifyysilevy*, josta luun pituuskasvu tapahtuu. (Bonucci, 2000; Heath & Young, 2000.) Aikuisilla luuydinontelon täyttää keltainen luuydin, joka koostuu lähinnä rasvakudoksesta. Punainen luuydin, joka tuottaa verisoluja sijaitsee aikuisilla rajallisella alueella hohkaluun onteloissa. Luuydinonteloa ympäröi hauras sisäkalvo, *endosti*. Luun ulkopintaa suojaa puolestaan fibroottinen ja tiheä luukalvo, *periosti*. Luukalvo sisältää paljon hermoja, imusuonia ja kapillaareja, jotka huolehtivat luun ravinteiden saannista. Luukalvo ei kuitenkaan suojaa *epifyysin* päätä, vaan sitä suojaa nivelrusto, joka on yleensä hyaliinirustoa. (Heath & Young, 2000; Ross ym., 1995.)



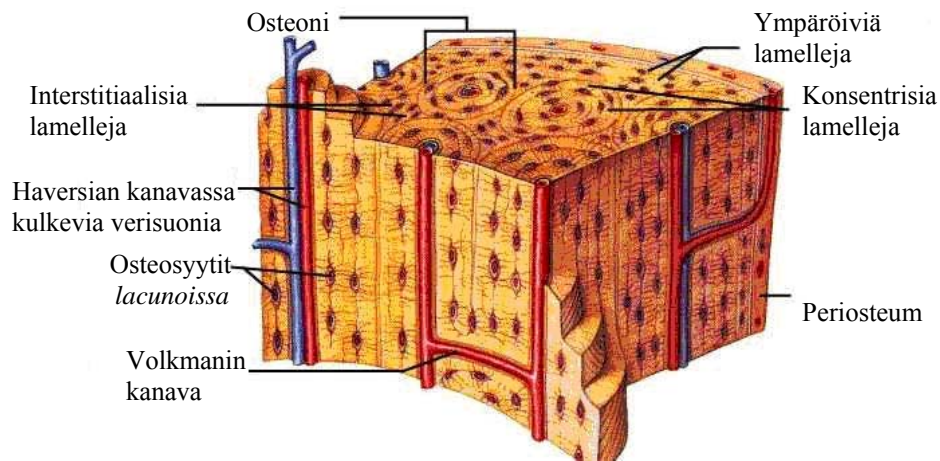
Kuva 1. Pitkän luun rakenne. Kuva on mukailtu Ross ym., 1995 alkuperäisestä kuvasta.

2.2.3. Luutyypit

Histologisesti luukudos jaetaan säie- ja lamellaariseen luuhun. Säieluuta esiintyy lähinnä sikiöaikana ja luuston nopean kasvun aikana. Säieluun mineralisoitumaton osa on rakentunut epäjärjestäytyneistä kollageenikuiduista. Nopeasti muodostuva säieluu muuttuu lopulta uudelleenmuodostumisen kautta lamellaariluuksi. Lamellaariluu on lujempaa ja joustavampaa kuin säieluu ja se on muodostunut säännöllisistä samansuuntaisista kollageenisäikeistä, jotka ovat järjestäytyneet lamelleiksi. Lamellaariluu voidaan edelleen jakaa kahdeksi erilliseksi makroskooppiseksi rakenteeksi: kortikaali- ja hohkaluuksi. (Bonucci, 2000; Heath & Young, 2000.)

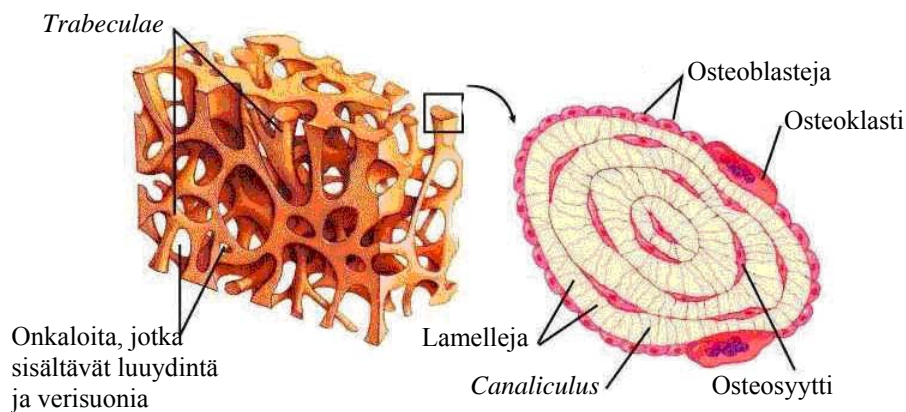
Kortikaaliluuta on luiden pinnassa ja erityisen paksusti pitkien luiden diafyysin seinämissä. Kortikaaliluun perusrakenne muodostuu ohuista lamelleista (Kuva 2). Kerroksittaiset lamellit puolestaan muodostavat rengasmaisia rakenteellisia yksikköjä, osteoneja. Osteonien keskellä kulkee Haversian kanavia, jotka sisältävät verisuonia ja hermoja. Haversian kanavissa on usein haaroja, joita kutsutaan Volkmannin kanaviksi. Osteonit ovat orientuneet samansuuntaisesti luun pitkän akselin suhteen. Lamellien välissä sijaitsee aukkoja (*lacuna*), joissa jokaisessa on yksittäisiä osteosyyttejä eli kypsiä luusoluja. Aukoista

lähtee pieniä kanavia (*canaliculus*), jotka välittävät ravinteita ja kuona-aineita diffuusion avulla verisuoniin ja pois verisuonista. (Heath & Young, 2000; Ross ym., 1995.)



Kuva 2. Kortikaaliluun rakenne. Kuva on mukailtu Todd, 2005 alkuperäisestä kuvasta.

Hohkaluuta on erityisesti pitkien luiden päissä runsaasti, mutta luuydinontelon ympärillä vain ohut kerros. Hohkaluulla on pesusienimäinen rakenne ja sille on tyypillistä suuri pinta-ala (Kuva 3). Tällainen rakenne on kevyt, mutta erittäin luja. Hohkaluu on kortikaaliluuhun verrattuna hieman vähemmän mineralisoitunutta ja sillä on hieman suurempi vesipitoisuus.



Kuva 3. Hohkaluun rakenne. Suurennetussa mikrorakenteesta näkyvät luun eri solutyypit: osteoblastit, jotka ovat luusolujen esiasteita, osteosyytit, jotka ovat kypsiä luusoluja ja ostoklastit, jotka ovat luuta hajottavia soluja. Kuva on mukailtu Todd, 2005 alkuperäisestä kuvasta.

Hohkaluun huokoisuus on 30–90 % välillä kun taas kortikaaliluun huokoisuus vaihtelee 5–30 % välillä. Hohkaluu koostuu pienistä onteloista ja liuskamaisista säikeistä (*trabe-*

culae), jotka ovat kalsifioitunutta luumatriksia. Jos hohkaluusäikeet ovat tarpeeksi paksuja, ne sisältävät osteoneja. Näiden säikeiden lukumäärä, paksuus ja orientaatio riippuvat jännityksistä, joille luu on altistunut. (Bonucci, 2000; Heath & Young, 2000; Ross ym., 1995.)

2.3. Luun mekaaniset ominaisuudet

Koska luu on heterogeeninen ja anisotrooppinen materiaali, sen mekaaniset ominaisuudet riippuvat voimakkaasti anatomisesta kohdasta ja kuormitussuunnasta. Lisäksi kortikaaliluun ja hohkaluun eroavat merkittävästi mekaanisilta ominaisuuksiltaan. Biologiset muuttujat, kuten rotu, ikä, sukupuoli ja aktiivisuustaso yhdessä patologisen hajoamistilan ja säilytysolosuhteiden kanssa johtavat kaikki epätasaiseen luun mekaanisten ominaisuuksien jakautumiseen. Mekaanisessa testauksessa käytettävä kuormitusnopeus vaikuttaa myös saatuihin tuloksiin. Koska luun mekaanisiin ominaisuuksiin vaikuttavat hyvin useat tekijät, on sen mekaanisia ominaisuuksia hyvin monimutkaista analysoida. Tuorepakastetun luun avulla voidaan tutkia erityisen hyvin millaisia vaikutuksia erilaisilla prosessointimenetelmällä on allograftin mekaanisiin ominaisuuksiin. Tuorepakastettu luu on todettu hyväksi vertailukohteeksi, koska luun säilytyksen -20 – (-147) °C:ssa ei ole todettu merkittävästi vaikuttavan luun mekaanisiin ominaisuuksiin. (Boyce ym., 1999; Natali & Meroi 1989.)

2.3.1. Kortikaaliluun mekaaniset ominaisuudet

Kortikaaliluun tiivis rakenne antaa sille lujan ja jäykän rakenteen verrattuna hohkaluuhun. Kortikaaliluun mekaanisia ominaisuuksia voidaan tutkia joko kokonaisen luun tai mekaanisesti koko luusta työstettyjen palkkien tai tikkujen avulla. Mekaanisesti työstetyillä luutikuilla on vakio pinta-ala ja tilavuus, jolloin mekaanisista testeistä saatuja tuloksia voidaan verrata toisiinsa luotettavammin kuin kokonaista luuta käytettäessä. (An, 2000.)

Kortikaaliluun mekaanisiin ominaisuuksiin on todettu vaikuttavan sen tiheys, joka riippuu luun mineralisointi- ja huokoisuusasteesta. Kortikaaliluun näennäinen tiheys on noin $1,9 \text{ g/cm}^3$. Näennäisen tiheyden ja kortikaaliluun mekaanisten ominaisuuksien välillä on todettu olevan positiivista korrelaatiota. Tutkimuksissa on todettu, että pienet muutokset kortikaaliluun mineraalipitoisuudessa vaikuttavat huomattavasti voimak-

kaammin sen elastisiin ominaisuuksiin kuin samanlaiset muutokset hohkaluussa. Huokoisuus- ja mineralisoitumisasteen vaikutuksen on todettu yhdessä selittävän 84 % kimmomodularvojen vaihtelusta. (An, 2000.)

Kortikaaliluun mekaaniset ominaisuudet riippuvat lisäksi siitä, onko käytetty veto-, puristus- vai taivutuskoetta. Esimerkiksi vetolujuus on noin 2/3 puristuslujuudesta. Tämä ero johtuu osteonien ja kollageenisäikeiden anisotrooppisesta orientoitumisesta luun pitkän akselin suuntaan. Tällainen osteonien rakenteellinen järjestäytyminen on vaste jokapäiväiselle kuormitukselle, joka pitkiin luihin kohdistuu kävellessä. Samasta syystä näytteiden, joita kuormitetaan luun pituusakselin suuntaisesti, kimmomoduli on huomattavasti suurempi kuin näytteiden, joita kuormitetaan transversaalisti. (An, 2000; Hench, 2005.)

Kortikaaliluun on anisotrooppisuuden lisäksi heterogeenistä eli mekaaniset ominaisuudet vaihtelevat luun pituusakselin suunnassa sekä poikittain luun eri anatomisissa lohkoissa. Esimerkiksi *femurin* diafyysin keskiosasta on mitattu suurimmat maksimaaliset lujuudet ja kimmomodulit, kun taas *femurin* alemmasta *diafyysi*-osasta on mitattu alhaisimmat lujuudet ja kimmomodulit. Transversaalisesti tarkasteltuna *diafyysin lateraaliosan* on todettu olevan lujinta ja puolestaan *anteriorosan* heikointa. Mekaanisten ominaisuuksien on todettu olevan homogeenisempiä pituusakselin suunnassa kuin poikittain luun eri anatomisissa lohkoissa. Anatomisten lohkojenkaan välillä erot eivät ole kovin suuria, vain noin 10 % eroja on havaittu. (An, 2000.)

Yleisin kortikaaliluulle käytettävä testausmenetelmä on kolmipistetaitvutustestaus. Kolmipistetaitvutustestauksessa saadaan yhdellä testillä tietoa kolmesta eri mekaanisesta ominaisuudesta: taivutuslujuudesta, kimmomodulista ja energian absorbointikyvystä. Kimmomoduli kuvaa materiaalin jäykkyyttä eli sitä, kuinka paljon tietyllä jännityksellä materiaali taipuu kimmoisasti. (An, 2000; Currey ym., 1997.) Luokkappale altistuu taivutuskuormituksen aikana vedon ja puristuksen yhdistelmälle. Voiman vaikuttaessa ylhäältä päin luokkappaleen yläpintaan muodostuu puristusjännitystila ja alapintaan vetojännitystila. (Lopez & Markel, 2000.)

Tutkimuksissa on todettu, että käytettäessä taivutuslujuustestejä lujuusarvot vaihtelevat 142–283 MPa välillä ja kimmomodulin arvot 9,1–15,7 GPa välillä. Lujuusarvojen vaih-

telu selittyy osin edellä kuvattujen tekijöiden avulla ja sillä, että käytetyt näytekoot ovat olleet erilaisia. Tämä puolestaan vaikuttaa voimakkaasti lujuusarvoihin, koska lujuus on taivutuskokeessa kääntäen verrannollinen kappaleen leveyteen ja kääntäen verrannollinen kappaleen paksuuden neliöön. (An, 2000.) Kolmipistetaivutuksessa käytettävistä lujuuden ja kimmomodulin laskukaavoihin on tarkemmin perehdytty menetelmät osiossa 3.4.

2.3.2. Hohkaluun mekaaniset ominaisuudet

Hohkaluun mekaanisiin ominaisuuksiin vaikuttavat melko samat tekijät, jotka vaikuttavat kortikaaliluunkin mekaanisiin ominaisuuksiin. Hohkaluun rakenteellisia ominaisuuksia voidaan mitata eri tavoin: puristus- veto- tai taivutustesteillä. (An, 2000.) Näistä yleisesti käytetyin on puristustesti, koska sen avulla voidaan helposti havaita pienetkin muutokset luumatriksin mekaanisissa ominaisuuksissa ja lisäksi se mimikoi parhaiten luun *in vivo* kuormitusta (An, 2000; DePaula ym., 2005; Vastel ym., 2004). Testausmenetelmän valinnalla on samanlaisia vaikutuksia hohkaluun lujuusominaisuuksiin, kuten kortikaaliluun tapauksessa, esimerkiksi vetolujuusarvon on todettu olevan 60 % puristuslujuusarvosta (An, 2000).

Useissa tutkimuksissa hohkaluusta käytettävänä näytemuotona on ollut kuutio tai sylinteri, sillä tällaisia näytteitä on helppo työstää ja samanlaisia paloja on helppo tuottaa uudelleen (Conrad ym., 1993; DePaula ym., 2005; Vastel ym., 2004). Sylinterin muotoisia näytteitä voidaan kuitenkin valmistaa helpommin ja tarkemmin. Sylinterimäisten näytteiden halkaisija on yleensä 6 tai 8 mm ja useissa tutkimuksissa on todettu, että optimaalinen pituus hohkaluunäytteille on vähintään 10 mm. (Keller & Liebschner, 2000.) Näytepalojen kokoa päätettäessä mekaanista testausta varten on näytteen pituus/halkaisija suhde otettava lisäksi huomioon, koska sen ollessa liian suuri (yli 5), voivat näytteet nurjautaa testauksen aikana. Näytteen pituus/halkaisija suhteen ollessa puolestaan alle 1, syntyy näytteen ja kiinnityskappaleen välille merkittävä kitkavuorovaikutus, joka voi johtaa näytteen jäykkyyden yliarvioimiseen. Suositeltava pituus/halkaisija suhde on 1–2 puristustesteissä. (An & Bensen, 2000.)

Hohkaluun mekaanisilla ominaisuuksilla, kuten lujuudella ja kimmomodulilla on voimakas positiivinen korrelaatio näennäiseen tiheyteen, joka vaihtelee 0,14–1,10 g/cm³

välillä. Yli 80 % mekaanisten ominaisuuksien vaihtelusta voidaan selittää tiheyden ja orientaation vaikutuksilla. Hohkaluu on anisotrooppinen materiaali johtuen sen yksittäisten hohkaluusäikeiden morfologiasta. Sen maksimaaliset lujuus- ja kimmomoduli-arvot riippuvat kuormituksen suunnasta samalla tavalla kuin kortikaaliluussa. (An, 2000.)

Kuten kortikaaliluu, on hohkaluukin heterogeenista. Tutkimuksissa on todettu, että pitkien luiden *metafyysin* alueella hohkaluu on enemmän konsentroitunutta subkondraali-alueella kuin *diafyysin* ja *metafyysin* rajalla. Tämä rakenteen muutos vaikuttaa puolestaan mekaaniseen lujuuteen, joka laskee rustopinnalta mennessä kohti luuydinkanavaa. Myös luun eri anatomisissa lohkoissa hohkaluun mekaaniset ominaisuudet ovat hyvin epähomogeenisia. Hohkaluu on vahvinta alueilla, joissa tapahtuu nivelten kontaktia. Hohkaluun mekaanisten ominaisuuksien erot eri anatomisissa lohkoissa ovat huomattavasti merkittävämpiä kuin kortikaluun kohdalla. (An, 2000.)

Hohkaluun lujuusominaisuuksien on todettu vaihtelevan useiden eri tutkimusten perusteella 1,5–38 MPa välillä ja kimmomodulin 10–1570 MPa välillä. Verrattaessa hohkaluun rakenteellisia ominaisuuksia kortikaaliluuhun voidaan todeta, että hohkaluu on huomattavasti heikompaa. Esimerkiksi hohkaluun kimmomoduli-arvot ovat 10–30 % pienemmät kuin vastaavat kortikaaliluun arvot. Lisäksi lujuusarvojen vaihtelu on suurempaa hohkaluussa kuin kortikaaliluussa. Todennäköisesti pääsyy suurempaan variaatioon on se, että hohkaluun tiheys vaihtelee huomattavasti enemmän riippuen anatomisesta kohdasta ja luovuttajasta kuin kortikaaliluun tiheys. (An, 2000.)

2.4. Luun prosessointimenetelmiä

Allograftiluun käsittelemiseksi on olemassa useita eri prosessointimenetelmiä. Erilaisia kemiallisia liuoksia käytetään luun pesemiseen, steriloimiseen ja demineralisoimiseen. Sterilointimenetelmiä käytetään yleensä joko yksin tai yhdessä luun pesumenetelmien kanssa. (DePaula ym., 2005.) Historiallisesti ionisoivaa säteilytystä tai etyleenioksidia on käytetty terminaalina sterilointimenetelminä. Kumpikin sterilointitekniikka on todettu tehokkaaksi sterilointitavaksi, mutta niillä on todettu olevan myös hyvin vahingollisia vaikutuksia allograftien ominaisuuksiin. (Lomas ym., 2004; Pruss ym., 2003.) Etyleenioksidin on todettu aiheuttavan inflammatorisen vasteen *in vivo*, mikä johtaa siirteen tuhoutumiseen (Lomas ym., 2004). Etyleenioksidilla on myös todettu olevan karsinogeeni-

sia ja mutageenisia vaikutuksia, minkä vuoksi sen käytöstä on luovuttu kokonaan (Pruss ym., 2001).

Tällä hetkellä kudokset käyttävät yleisesti luun sterilointiin erilaisia kemiallisia sterilointimenetelmiä kuten peretikkahappoetanolisterilointia ja edelleen ionisoivaa säteilyä huolimatta sen vahingollisista vaikutuksista. Luun prosessointimenetelmältä vaaditaan kykyä tehokkaasti puhdistaa luu verisoluista ja rasvasta, tunkeutua luun rakenteen läpi verta sisältäviin onkaloihin kuten Haversian ja Volkmannin kanaviin ja kykyä inaktivoida siellä olevia viruksia sekä bakteereja. Menetelmä ei kuitenkaan saisi vaikuttaa luusiirteiden ominaisuuksiin esim. vähentämällä mekaanista kestävyttä. Luupankkien käyttämät sovellukset ovatkin tällä hetkellä kompromisseja luun turvallisuuden ja mekaanisten ominaisuuksien välillä. (Lomas ym., 2004; Pruss ym., 2001.)

2.4.1. Luun pesumenetelmät

Siirteiden turvallisuusaste luovuttajien seulonnan jälkeen paranee vielä huomattavasti, kun ne lisäksi puhdistetaan kemiallisesti. Allograftin kemiallinen tai fysikaalinen puhdistus vähentää merkittävästi antigeenikuormaa allograftista. Yleisesti käytettyjä kemiallisia pesumenetelmiä nekroottisen kudoksen ja rasvan puhdistamiseen luukudoksesta ovat erilaiset vesipohjaiset pintajännitystä alentavat aineet, vetyperoksidi tai muut peroksidit, orgaaniset liuottimet, kuten kloroformi, hapot ja alkoholi. Kemiallisia pesumenetelmiä voidaan yhdistää myös mekaanisiin puhdistusmenetelmiin kuten vakuumiin, ultraääneen, ravisteluun tai sentrifugaatioon, jotka helpottavat kemiallista puhdistusta. (DePaula ym., 2005; Galea ym., 2005.)

Rasvan puhdistaminen luusta ennen sterilointia helpottaa sterilointiliuoksen penetraatiokykyä kudokseen, ja lisäksi sen on todettu edistävän allograftiluun integraatiokykyä potilaan kudokseen. Kemiallisilla pesumenetelmillä on kuitenkin yleensä negatiivisia vaikutuksia allograftiluun biologisiin ja mekaanisiin ominaisuuksiin. (Vastel ym., 2004.)

2.4.2. Peretikkahappoetanolisterilointi

Peretikkahappoa on käytetty laajasti desinfektioaineena lämpöherkille lääketieteellisille välineille ja elintarviketeollisuudessa johtuen sen kyvystä inaktivoida tehokkaasti ja

laajakirjoisesti bakteereita, sieniä ja viruksia. Se on tehokas hapetin, mikä johtuu etikkahapon ja vetyperoksidin välisestä reaktiosta, jossa syntyy happiradikaaleja. Peretikkahapon sterilisointitehokkuus on yhteydessä sen nopeaan mikro-organismien läpäisykykyyn ja erityisesti happiradikaalien tuottokykyyn, mikä on tärkeää mikrobien entsyymien hapettamisessa ja tuhoamisessa. (Lomas ym., 2004; Pruss ym., 1999.) Peretikkahappo [CH₃C(O)OOH] on väritön vesiliukoinen ja räjähtävä yli 110 °C lämpötiloissa. Peretikkahapon akuutti toksisuus on hyvin alhainen ja se ei ole karsinogeeninen. Toksisuus (LD 50) on 1410 mg/kg jänikselle (iho), 1540 mg/kg rotalle (oraalisesti annettuna). (Pruss ym., 2003.) Peretikkahapon hajoamistuotteet ovat hyvin vähän tai ei lainkaan toksisia, mikä on iso etu käytettäessä sitä kudossiirteiden sterilointiin. Lisäksi on todettu, että se ei hajota luun morfologiaa tai rakennetta. (Pruss ym., 1999.)

Etanolin lisäys peretikkahappoon alentaa pintajännitystä, mikä puolestaan lisää sterilointiliuoksen kudospetraatiota. Alipaineessa suoritettu sterilointi puolestaan poistaa kaasuvesikkelit, jotka estävät täydellistä kudospetraatiota. Lisäksi varovainen ravistelu myös edesauttaa sterilointiliuoksen penetraatiota. (Pruss ym., 2003.)

Perietikkahappoetanoli-yhdistelmän käyttö kudosten sterilointimenetelmänä on kasvanut 80-luvulta lähtien (Brosig ym., 2005). Pruss ym., ovat tutkineet peretikkahappoetanolin tehokkuutta inaktivoida viruksia ja bakteereita allogeenisissa luusiirteissä. Tutkimuksessa testattiin kolme vaipallista virusta ja kolme vaipatonta virusta. Lisäksi kahdeksan eri bakteerin ja yhden bakteerin itiöitä käytettiin testaukseen. Peretikkahappoetanoli vähensi virusten pitoisuutta näytteissä yli 4 log₁₀ TCID₅₀ ml:ssa. Vain hepatiitti A-viruksella todettiin jäännös-infektiivisyyttä ja sen pitoisuus todettiin alle 4 log₁₀, mutta rasvanpoistovaiheen validoinnin jälkeen hepatiitti A-virus pitoisuus infektoiduissa soluissa laski yli 7 log₁₀. Bakteerien ja itiöiden pitoisuus laski alle detektiotason (5 log₁₀ cflu/ml) kahden tunnin inkubaation jälkeen. Näin ollen peretikkahappoetanolimenetelmän todettiin olevan luotettava menetelmä luusiirteiden (maksimi paksuudeltaan 15 mm) sterilointiin. (Pruss ym., 2003.)

2.4.3. Gammasterilointi

Gammasterilointi on hyvin yleisesti käytetty sterilointimenetelmä, joka on todettu tehokkaaksi ja luotettavaksi patogeenien inaktivoiaksi ja sillä on lisäksi todettu olevan

erinomainen materiaalin läpäisykyky. Kudospankit käyttävät yleensä standardisoitua 25–35 kGy:n suuruista säteilyannosta, koska suuremman säteilyannoksen on todettu vaikuttavan heikentävästi kudosten biomekaanisiin ominaisuuksiin. (Akkus & Rimnac, 2001; Butler ym., 2005; Currey ym., 1997.) Kuitenkin myös 25 kGy:n säteilyannoksen on todettu heikentävän jopa 42,5 % kylmäkuivatun luun maksimaalista lujuutta (Cornu ym., 2000). Eri säteilyannosten aiheuttamista vaikutuksista luun mekaanisiin ominaisuuksiin on kuitenkin saatu useita erilaisia tutkimustuloksia (Currey ym., 1997; Hamer ym., 1996). Gammasäteilyn on todettu haurastuttavan erityisesti kortikaaliluuta alentaen sen kykyä absorboida energiaa ennen murtumista. Hohkaluu on puolestaan vähemmän alttiimpi gammasäteilyn aiheuttamille negatiivisille muutoksille. (Boyce ym., 1999.) Kudosvauriot johtuvat pääasiassa ionisoivan säteilyn synnyttämistä vapaista radikaaleista (Grieb ym., 2005; Pruss ym., 2001).

Ongelmana alle 35 kGy:n säteilyannoksen käytössä on sen tehottomuus useita viruksia kuten HIV:tä tai poliovirus 1:tä vastaan. Poliovirus 1:n on todettu tarvitsevan vähintään 48 kGy:n annoksen ja HIV:n on todettu tarvitsevan jopa 60 kGy:n säteilyannoksen inaktivoituaakseen. (Currey ym., 1997.) Ratkaisuna suurten gammasäteilyannosten aiheuttamiin mekaanisten ominaisuuksien muutoksiin on alettu kehittää säteilysuoja-aineita. Tarkoituksena on minimoida vapaiden radikaalien ja reaktiivisen hapen syntyminen säteilytyksen aikana. Säteilysuoja-aineilla esikäsitelty kudossiirre voidaan steriloida jopa 50 kGy:ssä, jolloin kudossiirteen käytön turvallisuus paranee huomattavasti ilman, että allograftin mekaaniset ominaisuudet huonontuvat. Säteilysuoja-aineiden vaikutuksia allograftiluun osteokonduktiivisiin ominaisuuksiin ei kuitenkaan ole vielä tutkittu. (Grieb ym., 2005.)

2.4.4. Luumatriksin demineralisointi

Demineralisoitua luumatriksia valmistetaan poistamalla allograftiluusta mineraalit yleensä 0,5 tai 0,6 N vetykloridihapolla, joka kuitenkin jättää orgaanisen matriksin koskemattomaksi. Luu määritellään demineralisoiduksi kun sen kalsiumpitoisuus on maksimissaan 8 % (kuivattu kortikaaliluua sisältää noin 25 % kalsiumia). Mineraalipitoinen allograftiluua, jolla on pääasiassa osteokonduktiivista kapasiteettia, muuntuu vetykloridikäsitteilyn jälkeen siirteeksi, jolla on osteokonduktiivisuuden lisäksi merkittävää osteoinduktiivisuutta. (Boyce ym., 1999; Eppley ym., 2005.)

Demineralisoidun luumatriksin osteoinduktiivisuudesta ovat vastuussa luun morfogeeniset proteiinit (Bone morphogenic proteins). Mineraalipitoisessa luussa luun morfogeeniset proteiinit ovat suurimmaksi osaksi liittyneenä luun orgaaniseen matriksiin ja niitä on lisäksi läsnä vain pieni määrä (noin 1 % orgaanisen matriksin kokonaismassasta). Demineralisaatioprosessi lisää luun morfogeenisten proteiinien hyötyosuutta, jolloin niiden stimulaatiivinen vaikutus mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumisessa luusolujen suuntaan voimistuu. (Boyce ym., 1999; Eppley ym., 2005.)

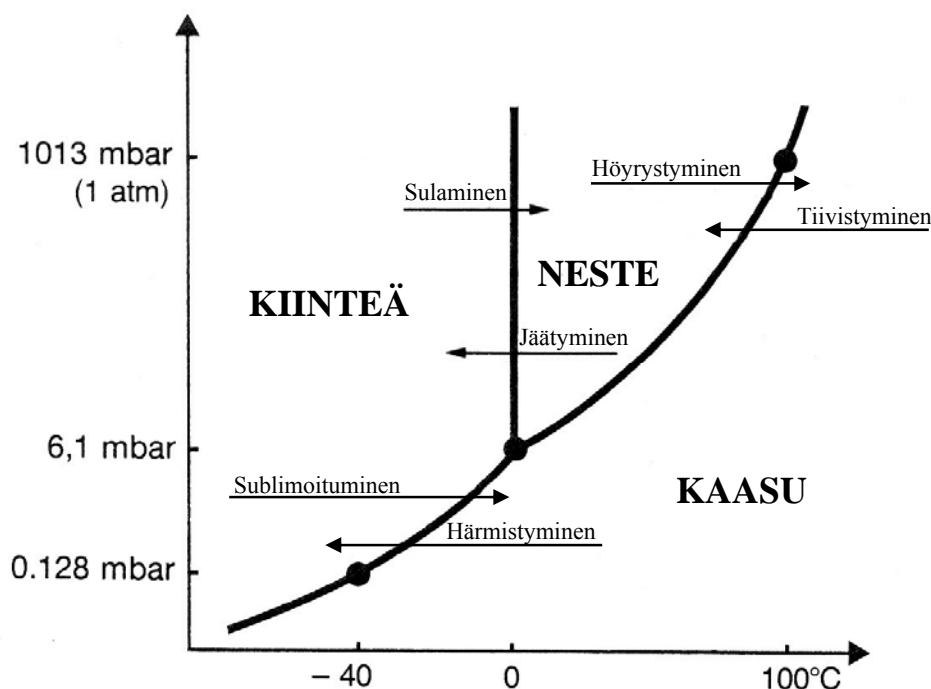
2.5. Luun kylmäkuivaus

Allograftiluuta voidaan säilyttää joko pakastamalla -70–(-80) °C tai kylmäkuivaamalla. Näiden säilytysmenetelmien tarkoituksena on alentaa vapaa vesi kriittiselle tasolle, jolloin pilaantuminen hydrolyyttisten tai hapettavien reaktioiden kautta estyy. Kylmäkuivaus parantaa siten luun kemiallista stabiiliutta, jolloin sitä voidaan säilyttää huoneen lämmössä. (Franks, 1998; Galea & Kearney 2005.) American Association of Tissue Banks on esittänyt, että kylmäkuivatun luun kosteusprosentin ollessa alle 6 %, luuta voidaan säilyttää huoneen lämmössä viisi vuotta asianmukaisen prosessoinnin jälkeen (Boyce ym., 1999). Luun kylmäkuivauksella voidaan lisäksi estää useita hajottavia reaktioita, kuten proteiinien denaturaatiota, jota tapahtuu esim. ilmakehän kuivauksen aikana.

Kylmäkuivauksen vaikutuksista on kirjallisuudessa hieman ristiriitaisia tuloksia. Conrad ym., eivät todenneet kylmäkuivauksen aiheuttavan muutoksia hohkaluun mekaanisiin ominaisuuksiin (Conrad ym., 1993). Toisaalta useissa rottien hohkaluulla tehdyissä tutkimuksissa on todettu, että kylmäkuivaus laskee hohkaluun puristuslujuutta 30 %, mutta vaikutus kimmomoduliin oli vain vähäinen. Pitkien luiden taivutuslujuus laskee 41 % ja vääntölujuus 60 % kylmäkuivauksen seurauksesta. (Boyce ym., 1999.) Lisäksi Nather ym., totesi 5–8 jäännöskostesprosenttiin kylmäkuivattujen, 25 kGy annoksella gamma-steriloitujen kortikaaliluu-allograftien vääntömomentin olevan alle 1/5 tuorepakastettuihin kontrolleihin verrattuna. Mekaanisten ominaisuuksien heikentyminen kylmäkuivauksessa johtuu pääasiassa sen aiheuttamista mikromurtumista luumatriksin kollageenisäikeissä. Kosteuden poisto tekee luusta hauraan, mutta mekaaniset ominaisuudet voidaan palauttaa ainakin osittain luun rehydroinnilla. (Boyce ym., 1999.)

2.5.1. Kylmäkuivauksen periaate

Veden olomuodon muutokset erityisesti veden jäätyminen ja sublimoituminen ovat hyvin tärkeitä kylmäkuivausprosessissa. Puhtaan veden olomuoto riippuu systeemin paineesta ja lämpötilasta (Kuva 4). (Flink & Knudsen, 1983.)

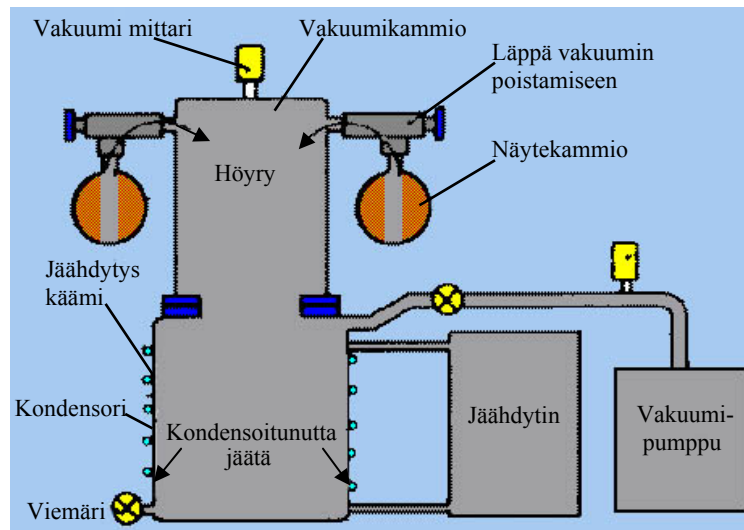


Kuva 4. Veden faasidiagrammi, jossa on esitetty veden eri olomuodot ja tasapainokäyrät. Kuva on mukailtu Flink & Knudsen, 1983 alkuperäisestä kuvasta.

Kylmäkuivaus voidaan jakaa kahteen päävaiheeseen: primaariseen ja sekundaariseen kuivaukseen eli veden desorbttioon. Primaarinen kuivaus voidaan jakaa edelleen jäädyttämiseen ja sublimaatioon. Jäädyttämisen aikana kaikki näyttemateriaalin sisältämä vesi jäätyy lukuun ottamatta erittäin tiukasti kiinteään aineeseen sitoutuneita vesimolekyylejä. Jäädyttämisen aikana materiaalissa tapahtuu osittaista dehydraatiota, rakenteen jäykistymistä ja materiaalin morfologian muokkautumista. Jäädytysnopeus vaikuttaa muodostuvien jääkiteiden kokoon huomattavasti. Hitaan jäädyttämisen tuloksena syntyy vain muutamia yhdensuuntaisesti orientoituneita suuria kiteitä. Nopea jäädytys tuottaa puolestaan paljon pieniä jääkiteitä, jotka ovat orientoituneet satunnaisesti. (Flink & Knudsen, 1983.)

Sublimointivaiheessa kiinteässä olomuodossa olevat vesimolekyylit poistuvat vesihöyryä. Vesihöyryn poistuminen näytekammioista kondensaattoriin perustuu siihen,

että jäällä on erilainen höyrypaine eri lämpötiloissa. Kondensaattorissa vallitsee matalampi lämpötila kuin näytekammiossa. Tällöin myös jään lämpötila kondensaattorissa on matalampi kuin näytekammiossa, mikä aiheuttaa jään höyrypaine-eron näytekammion ja kondensaattorin välille. Paine-ero aiheuttaa näytteen vesimolekyylien liikkumisen näytekammion kohti matalampaa höyrypainetta kondensaattoriin, eli se toimii reaktion ajavana voimana. Kondensaattorissa vesihöyry kondensoituu jääksi uudelleen. Vesimolekyylien liikettä näytekammion kohti hidastaa vesimolekyylien törmäily näytekammion ja vakuumikammion seiniin, ilman molekyyleihin ja muihin vesimolekyyleihin. Tämän vuoksi kylmäkuivaussysteemiin on liitetty vakuumpumppu, joka poistaa ilman molekyylejä ja näin helpottaa vesimolekyylien liikettä (Kuva 5). (Flink & Knudsen, 1983.)



Kuva 5. Kaavakuva kylmäkuivauslaitteesta. Kuva on mukailtu Menyhart, 1995 alkuperäisestä kuvasta.

Sublimaatio alkaa materiaalin pinnalta ja etenee materiaalin sisälle. Kun jään sublimatiota on tapahtunut hieman, näyte voidaan jakaa kahteen alueeseen: kuivaan kerrokseen ja jäätyneeseen kerrokseen. Sublimaatiovaiheessa on tärkeää, että energiaa saadaan kuljetettua jääkiteille ja muodostuva vesihöyry saadaan poistettua näytteestä. Energian kuljetus erityisesti jää- ja kuivakerroksen rajapinnalle on tärkeää. Tämä saavutetaan muodostuvien lämpötila- ja veden höyrypainegradienttien avulla. (Flink & Knudsen, 1983.)

Kun näytteestä on poistettu kaikki jääkiteet, jäljelle jää konsentroitunut kiinteä faasi, jossa on vielä merkittäviä määriä vettä (jäännöskosteuspitoisuus voi olla jopa 7–8 %).

Tämä jäännöskosteus on nestefaasissa olevaa voimakkaasti sitoutunutta vettä, jolla on alhaisempi paine kuin puhtaalla vedellä samassa lämpötilassa. Tämän veden poistamisprosessia näytteestä kutsutaan sekundaariseksi kuivausvaiheeksi. Sekundaarinen kuivaus voidaan suorittaa esimerkiksi nostamalla näytteen lämpötilaa. (Flink & Knudsen, 1983.)

3. Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen ensimmäisenä tavoitteena oli löytää optimaalinen kemiallinen puhdistusmenetelmä, joka puhdistaa allograftiluun tehokkaasti rasvasta ja parantaa sterilointiliuoksen läpäisykykyä kudokseen. Kemiallisen puhdistuksen optimointiin käytettiin pohjana englantilaisen kudospankin (National Blood Service, Tissue Service, Wakefield) kemiallista puhdistusohjelmaa. Alkuperäistä prosessointiohjetta oli tarkoitus muokata puhdistilaan sopivaksi, esim. lyhentämällä inkubointiaikoja. Inkubointiaikojen lyhentäminen ei kuitenkaan saanut vaikuttaa prosessoinnin tehokkuuteen merkittävästi.

Toisena tavoitteena oli tutkia eri kemiallisten pesujen, peretikkahappo-etanolisteriloinnin ja kylmäkuivauksen yhteisvaikutuksia luun mekaanisiin ominaisuuksiin. Lisäksi eri kylmäkuivausaikojen vaikutuksia luun mekaanisiin ominaisuuksiin oli tarkoitus tutkia siten, että osa näytteistä kuivattaisiin täysin kuivaksi ja osa alle kuuden kosteusprosentin.

4. Materiaalit ja menetelmät

4.1. Luunäytteiden mekaaninen työstö

Luunäytteiden työstämiseen käytettiin pora-jyrsintä (merkki: **Scantool 40**, malli: 40BKS, Tanska). Käytettävä terä luun sahaamiseen oli pikateräksestä valmistettu kiekoterä (mitat: halkaisija; 125 mm, paksuus; 1 mm, hammasluku: Z 160) leikkausnopeutena käytettiin 450 kierrosta/min. Hohkaluusylierien poraamiseen käytettiin putkiporaterää, joka on valmistettu ruostumattomasta teräksestä AISI 314; ulkohalkaisija 10 mm, sisähalkaisija 8 mm. Kortikaaliluunäytteiden viimeistelyyn käytettiin tappiterää, leikkausnopeutena käytettiin 800 kierrosta/min. Lisäksi kortikaaliluunäytteiden sahaamiseen käytettiin vannesahaa (merkki: **DeWalt**, malli: DW738, Italia). Luiden ja luunäytteiden mitat tehtiin digitaalisella työntömitalla.

Luumateriaali saatiin TAYS:n kudospankilta nimettömänä. Luovuttajia koskevat yksityiskohdat on kuvattu taulukossa 1. Kaikki luovuttajat oli serologisesti testattu HIV:n, hepatiitti C:n ja B:n osalta ja todettu negatiivisiksi.

Taulukko 1. Luusiirteiden luovuttajataulukko. Yhdeltä luovuttajalta (merkattu tähdellä) saatiin kaksi luuparia.

luupari/luukoodi	luovutuspaikka	ikä	sukupuoli
M299 M307	<i>prox. tibia dextra</i> <i>prox. tibia sinistra</i>	62 v	mies*
M246 M253	<i>prox. tibia dextra</i> <i>prox. tibia sinistra</i>	55 v	mies
M242 M241	<i>prox. tibia dextra</i> <i>prox. tibia sinistra</i>	19 v	mies
M402 M406	<i>prox. tibia dextra</i> <i>prox. tibia sinistra</i>	60 v	mies
M396 M397	<i>dist. tibia dextra</i> <i>dist. tibia sinistra</i>	57 v	mies
M332 M333	<i>dist. tibia sinistra</i> <i>dist. tibia dextra</i>	54 v	mies
M317 M319	<i>dist. tibia dextra</i> <i>dist. tibia sinistra</i>	31 v	nainen
M301 M309	<i>dist. tibia dextra</i> <i>dist. tibia sinistra</i>	62 v	mies*
M339 M348	<i>prox. femur dextra</i> <i>prox. femur sinistra</i>	45 v	nainen

Tutkimukseen saatiin yhteensä neljä *proksimaalista tibia*-paria, neljä *distaalista tibia*-paria ja yksi *proksimaalinen femur*-pari. Allograftiluita oli säilytetty 2–4 vuotta -70(–75) °C pakkasessa. Allograftiluun käyttöön tutkimuksessa on annettu Pirkanmaan sairaanhoitopiirin eettisessä toimikunnassa puoltava lausunto (R05048) ja lisäksi terveydenhuollon oikeusturvakeskuksen puoltava lausunto.

Hohkaluunäytteet työstettiin 8 mm (halkaisija) x 10 mm (pituus) mittoihin Keller & Liebschner suositusten mukaan (Keller & Liebschner, 2000). Pituus/halkaisija suhteeksi saatiin 1,25, joka sopii suositeltaviin pituus/halkaisija kriteereihin (suositeltava pituus/halkaisija puristustesteissä on 1-2) (An & Bensen, 2000). Kortikaaliluunäytteet työstettiin 40 x 4 x 2 mm mittoihin Currey ym., kirjoittamaa artikkelia mukailleen, jossa kortikaaliluunäytteet oli työstetty 40 x 3,6 x 2 mm (Currey ym., 1997). Näytteet työstettiin hieman leveämmiksi kuin artikkelissa on kuvattu, sillä käytetyillä välineillä leveämmät näytteet olivat luotettavammin työstettävissä.

Kaikkien luuparien työstö tehtiin samalla tavalla kuin luupari M309 ja M301 esimerkkityöstössä on kuvattu. *Proksimaalisen tibian* ja *proksimaalisen femurin* kohdalla käytettiin eri anatomisia mittauspisteitä. Eri luupareista saatiin erilaisia määriä näytteitä. Esimerkiksi luuparista M319, M317 saatiin 12 kontrollinäyteparia, kun taas M253, M246 luuparista ei saatu lainkaan kortikaaliluunäytteitä, koska luut olivat liian lyhyitä. Yhteensä kortikaaliluusta saatiin 52 kappaletta näyte-kontrollipareja ja hohkaluusta 71 kappaletta näyte-kontrollipareja. Kortikaaliluunäytteet saatiin työstettyä vähintään 0,2 mm tarkkuudella määrättyihin mittoihinsa ja hohkaluunäytteet vähintään 0,4 mm tarkkuudella.

4.1.1. Distaalisen tibia-parin M309, M301 esimerkkityöstö

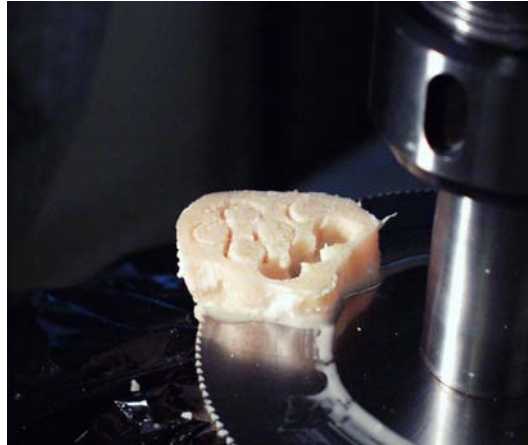
Koska luut eivät olleet katkaistu samasta kohtaa täytyi *tibian* anatomisia rakenteita käyttää mittapisteinä (Kuva 6), jotta näytteet ja kontrollit saataisiin otettua samasta anatomisesta kohdasta. Aluksi mitattiin pituus *malleolus medialiksen* yläpinnasta *diaphyysin* leikkauspintaan (M309 158 mm, M301 140 mm). Seuraavaksi mitattiin pituus *incisura fibulariksesta* leikkauspintaan (M309 141 mm, M301 127 mm). Ennen työstämistä luut sulatettiin kädenlämpöisellä vesijohtovedellä. Työstö tehtiin huoneenlämpötilassa. Luita

kostutettiin tislatusvedellä työstön aikana jatkuvasti, sillä ilman kostuttamista luu voi sahauksen aikana ylikuumentua tai jopa palaa.



Kuva 6. Tibian anatomiset rakenteet (Putz & Pabst, 2001).

M309 luun työstö. Aluksi *epifyysin* päästä sahattiin kiekko-terällä 13 mm pala pois, jotta rustopinta saatiin poistettua ja hohkaluunpinta tasaiseksi. 13 mm mitattiin *incisura fibulariksesta*. Ensimmäisen sylinterin porauspaikka asetettiin *epifyysi*-tason keskipisteeseen. Seitsemän seuraavan sylinterin koordinaatit tallennettiin koneen muistiin sylinterien saamiseksi M301:sta kontralateraalisesti. Sylinterit porattiin *epifyysiin* putkiporalalla. Sylinterien porauspaikoista piirrettiin kartta M301:n sylinterien ottojärjestyksen helpottamiseksi. Kun kaikki 8 reikää oli tehty luuhun, *epifyysistä* leikattiin 10 mm paksuinen taso pois, jolloin sylinterit saatiin 10 mm mittaisiksi (Kuva 7). Valmiit sylinterit laitettiin kuivajäihin kylmälaukkuun ja muutaman tunnin kuluttua ne siirrettiin -75 °C pakkaseen säilytykseen. Kontrollisylinterit säilytettiin pakkasessa mekaanisiin testeihin asti.



Kuva 7. Epifyysitason leikkaus kiekkoterällä.

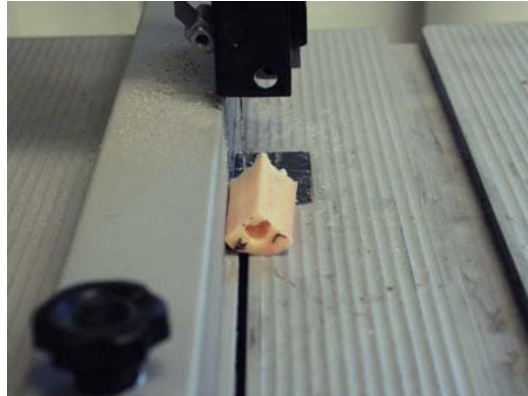
Sylinterien irrotuksen jälkeen leikattiin jäljelle jääneestä luusta 50 mm pitkä *diafyysipala* kiekkoterällä kortikaaliluunäytteiden työstöä varten. Tämä pala leikattiin mahdollisimman keskeltä *diafyysiiä*, sillä kortikaaliluu on paksuinta *diafyysin* keskiosassa. Uusi leikkauspinta tehtiin 115 mm kohdalle *incisura fibulariksesta* mitattuna, tällöin kummankin luun leikkauspintaan jäi hieman tasausvaraa (alkuperäiset leikkauspinnat olivat erittäin vinot). Seuraavaksi *diafyysi*-palaan merkattiin sen päihin anatomiset suunnat: *lateral, medial, posterior, anterior*. Kortikaaliluunäytteiden työstö aloitettiin asettamalla *diafyysipala* työstöleukoihin siten, että *posterolateraalitaso* oli yläpintana.

Luun pinta tasoitettiin tappiterällä. Pintaa tasoitettiin n. 1 mm, milloin taso saatiin riittävän leveäksi, jotta siitä saatiin kolme näytetikkuu. (Pinta tehtiin n. 20 mm levyiseksi.) Pinnan tasoituksen jälkeen 2,5 mm paksu näytelastu leikattiin irti ja siihen merkattiin näytenumerot: K₁, K₂, K₃.

Jäljelle jäänyt *diafyysipala* asetettiin työstöleukoihin 100° asteen kulmaan työstökoneeseen nähden, *anteriorpinnan* asettuessa yläpinnaksi. Kulma mitattiin *mediaalipuolelta*. Luun pintaa tasoitettiin tappiterällä hieman alle 1 mm. Tämän jälkeen 2,75 mm paksu näytelastu leikattiin irti ja siihen merkattiin näytenumero: K₄.

Jäljelle jäänyt *diafyysipala* asetettiin työstöleukoihin nyt 40° asteen kulmaan työstökoneeseen nähden, *anteromediaalipinnan* asettuen yläpinnaksi. Kulma mitattiin *mediaalipuolelta*. Luun pintaa tasoitettiin tappiterällä n. 1,5 mm. Tältä pinnalta otettiin näytenumero K₅. Seuraavaksi luuta käännettiin siten, että *mediaalipinta* asettui yläpinnaksi. Pintaa tasoitettiin tappiterällä sen verran, että siitä saatiin otettua näytenumero K₆.

Näytelastuja pienennettiin, ja näytteet sahattiin erilleen vannesahalla (Kuva 8). Kortikaaliluutikkuja työstettäessä *superiorpinta* pidettiin loppuun asti koskemattomana, ja luun *periosteaalipintaa* hiottiin mahdollisimman vähän, sillä kortikaaliluu on tällä pinnalla homogeenisempää verrattuna *endosteaalipintaan*, jossa kortikaaliluu verkottuu hohkaluun kanssa.



Kuva 8. Kortikaaliluunäytelastun sahaus vannesahalla.

Seuraavaksi tikut tasoitettiin tappiterällä 4 mm leveyteen ja lopuksi 2 mm paksuuteen (Kuva 9). Lopuksi tikut sahattiin rautasahalla lopulliseen pituuteensa eli 40 mm:n. Näytepinta piti työstää mahdollisimman sileäksi, sillä pinnan epätasaisuudet voivat toimia jännityksen keskittäjinä ja toimia siten murtuman aloituskohtana. Valmiit näytteet laitettiin kuivajäihin kylmälaukkuun ja n. tunnin kuluttua ne siirrettiin -75 °C pakkaseen säilytykseen. Kontrollitikut pidettiin pakkasessa säilytyksessä mekaanisiin testeihin asti.



Kuva 9. Kortikaaliluutikun viimeistely tappiterällä.

M301 luun työstö. Aluksi *epifyysin* päästä sahattiin kiekoterällä 13 mm pala, kuten M309 luun työstössä kuvattu. Ensimmäinen sylinterin porauspaikka asetettiin *epifyysitason* keskipisteeseen. Seitsemän seuraavaa sylinteriä otettiin M309 koordinaattien avulla: koordinaatit käännettiin vain peilikuvaksi. Kun kaikki 8 reikää oli tehty luuhun, *epifyysistä* leikattiin 10 mm paksuinen taso pois. Valmiit sylinterit säilöttiin samalla tavalla kuin M309 luuntyöstössä on kuvattu.

Kortikaaliluunäytteiden työstö tehtiin mukaillen M309 luun työstöä. Aluksi *posterolateraalitasolta* otettiin näytelastu, johon merkattiin näytenumerot: K₃, K₂, K₁ (peilikuva). Seuraavaksi *diafyysi*-pala asetettiin työstöleukoihin 100° asteen kulmaan työstökoneeseen nähden (peilikuva M309:n nähden). Kulma mitattiin *mediaalipuolelta*. Tämän jälkeen K₄ näytelastu leikattiin irti.

Jäljelle jäänyt *diafyysipala* asetettiin työstöleukoihin 45° asteen kulmaan. Kulma mitattiin *mediaalipuolelta*. *Diafyysipalaa* ei pystytty laittamaan täysin samaan kulmaan kuin M309-diafyysipala oli laitettu, koska vasemman ja oikean luun rakenteet eivät olleet täysin identtisiä. Seuraavaksi *anteromediaalipintaa* tasoitettiin tappiterällä n. 1,5 mm. Tältä pinnalta otettiin näytenumero K₅. Seuraavaksi luuta käännettiin siten, että *mediaalipinta* asettui yläpinnaksi. Pintaa tasoitettiin tappiterällä sen verran, että siitä saatiin otettua näytenumero K₆. Näytelastut viimeisteltiin ja säilöttiin samalla tavalla kuin M309 luuntyöstössä on kuvattu.

4.2. Kemiällisen puhdistuksen optimointi

Kemiällisissä pesuissa käytettiin ultraäänihaudetta (merkki: **Nickel Electro Ltd**, malli: Clifton Range, DU-14, Englanti), sekoittajavesihaudetta (merkki: **Nickel Electro Ltd**, malli: Clifton Range, NE4-14D, Englanti) ja lämpöravistelijaa (merkki: Edmund **Bühler GmbH**, malli: SM 30 A/B/C, Saksa). Peretikkahappoetanolisteriloinnissa käytettiin vakuumpiosessoria (merkki: **Biometra**, malli: MP86, Saksa) ja samaa lämpöravistelijaa kuin kemiällisissä pesuissa.

Näytemateriaalina kemiällisen pesujen optimointiin käytettiin luunäytteiden työstössä jäljelle jääneitä paloja. Näytemateriaalin rajallisuudesta johtuen näyte-erät olivat epähomogeenisiä, eikä kortikaaliluuta ja hohkaluuta saatu täysin samassa suhteessa jokai-

seen näyte-erään. Kortikaaliluuta ja hohkaluuta arvioitiin silmämääräisesti yhtä suuret osuudet yhteen näyte-erään, mutta yhteen näyte-erään saatiin kortikaaliluuta vain 1/3 hohkaluun määrästä. Jokaista viittä testattavaa menetelmää kohden oli yksi näyte-erä. Yhden näyte-erän massa oli n. 30 g ja jokaista näyte-erää inkuboitiin 400 ml:sa kaikissa työvaiheissa.

Kemiallisen puhdistuksen optimoinnissa käytetyt pesuohjeet sovellettiin englantilaisessa kudospankissa (National Blood Service, Tissue Service, Wakefield) käytettävän kemiallisen puhdistusohjelman pohjalta. Työohje oli seuraava:

1. Luuytimen poistaminen pinseteillä/huuhtelemalla, jonka jälkeen luupala työstetään lopulliseen muotoon.
2. Näytteiden inkubointi ultraäänihauteella 15 min, esilämmitetyssä 58 °C:ssa tislatussa vedessä. Haudevetenä käytetään tislattua esilämmitettyä (54 °C) vettä.
3. Näytteiden vesipesu 58 °C:ssa tislatussa vedessä, ravistelijassa, 200 rpm, 60 °C, 1 h.
4. Näytteiden vesipesut ravistelijassa 58 °C:ssa tislatussa vedessä, 200 rpm, 60 °C, 3 x 10 min.
5. Näytteiden inkubointi ultraäänihauteella 10 min 3 % vetyperoksidi (kantaliuoksena käytettiin 30 w% vetyperoksidiliuosta, Sigma-Aldrich, Saksa) liuoksessa. Haudevetenä käytetään tislattua huoneenlämpöistä vettä.
6. Näytteiden inkubointi ultraäänihauteella 10 min 70 % etanolissa. Haudevetenä käytetään tislattua huoneenlämpöistä vettä.
7. Näytteiden vesipesut 58 °C:ssa tislatussa vedessä, ravistelijassa 200 rpm, 60 °C, 2 x 10 min.
8. Näytteiden vesipesu yön yli 58 °C:ssa tislatussa vedessä, ravistelijassa, 200 rpm, 60 °C, (yli 12 h).
9. Näytteiden vesipesut 58 °C:ssa tislatussa vedessä, ravistelijassa 200 rpm, 25 °C, 2 x 10 min

Menetelmämuunnokset olivat seuraavat:

MENETELMÄ A: Menetelmä muuten samanlainen kuin alkuperäinen ohje, mutta 3., 7. ja 8. kohta on poistettu.

MENETELMÄ B: Menetelmä muuten samanlainen kuin alkuperäinen ohje, mutta 7. ja 8. kohta on poistettu.

MENETELMÄ C: Menetelmä muuten samanlainen kuin alkuperäinen ohje, mutta 7. ja 8. kohta on poistettu. Lisäksi 4. ja 9. vesipesut vain 5 min pituudeltaan.

MENETELMÄ D: Menetelmä muuten samanlainen kuin alkuperäinen ohje, mutta 7. ja 8. kohta on poistettu ja 5 min peroksidi- ja 5 min etanolipesut lisätty. Lisäksi 4. ja 9. vesipesut vain 5 min pituudeltaan.

MENETELMÄ E: Alkuperäinen menetelmäohje.

Kaikki kemialliset käsittelyt liitettiin Pruss ym., kuvaamaan peretikkahappoetanolisterilointiin, seuraavan ohjeen mukaisesti: sterilointi suoritetaan ravistelijassa, alipaineessa (200 mbar), eksikaattorissa 4 h ajan huoneenlämpötilassa (Pruss ym., 2003). Peretikkahappoetanolisterilointiliuos: 2 % peretikkahappoa (kantaliuoksena käytettiin 40 w% peretikkahappoa Merck KgaA, Saksa), 96 % etanolia (96 % etanolin sijasta käytettiin 99,5 % etanolia) ja tislattua vettä, tilavuussuhteissa 2/1/1.

Peretikkahappoetanolisteriloinnin jälkeen näytteet huuhdeltiin tislattulla vedellä ravistelijassa, alipaineessa 4 x 10 min ja peretikkahapottomuus varmistettiin Merckoquant®-Peracetic Acid-testillä (Merck KgaA, Saksa), jonka herkkyysalue oli 5-50 mg.

Jatkotutkimuksiin valittiin jäännösrasvamäärityksen perusteella menetelmät B, D tai E (menetelmien valinnasta tarkemmin kappaleessa 5.2.). Näytemateriaalina jatkotutkimuksissa käytettiin mekaanisesti työstettyjä hohkaluu- ja kortikaaliluunäytteitä. Näytteet jaettiin kuuteen erään, milloin yhdessä näyte-erässä oli 8 kortikaaliluunäytettä ja 10 hohkaluunäytettä. Jokaisen luovuttajan yhdestä luusta osa näytteistä käytettiin kontrolleina ja osa prosessoitiin näytteinä, milloin mahdolliset erot vasemman ja oikean välillä tasoittuisivat. Kuusi näyte-erää jaettiin kolmen pesumenetelmän välille seuraavasti: kolme näyte-erää prosessoitiin menetelmällä E, kaksi näyte-erää menetelmällä D ja yksi menetelmällä B. Kemiallisten pesujen jälkeen kaikki näyte-erät sterilointiin peretikkahappoetanolilla. Jokaista näyte-erää inkuboitiin 800 ml:sa kaikissa työvaiheissa.

4.3. Luunäytteiden kylmäkuivaus

Näytteiden kylmäkuivaukseen käytettiin kylmäkuivauslaitetta (merkki: **Jouan Nordic**, malli: Heto drywinner with CT 110 Cooling Trap, Tanska), vakuumpumppua (merkki:

Rotary Vane Pump, malli: PK 4DP, Saksa). Kylmäkuivauslaitteen käyttölämpötila oli -110 °C.

Prosessoinnin viimeinen vaihe kemiallisten pesujen ja peretikkahappoetanolisteriloinnin jälkeen oli näytteiden kylmäkuivaus. Kemiallisen puhdistuksen optimoinnissa käytettyjä viittä näyte-erää kylmäkuivattiin prosessoinnin jälkeen 18 tuntia.

Jatkotutkimuksiin käytettävistä näytteistä yksi näyte-erä kuivattiin täysin kuivaksi, ja loput näyte-erät alle kuuden prosentin jäännöskosteuteen, sillä eri jäännöskosteusprosenttien vaikutuksia luun mekaanisiin ominaisuuksiin haluttiin tutkia. Jäännöskosteusprosentit määritettiin gravimetrisellä menetelmällä. Täysin kuivaksi kuivattujen näytteiden kuivamassojen avulla laskettiin kuinka monen kylmäkuivaustunnin jälkeen yhden näyte-erän näytteiden kosteusprosentit laskevat alle kuuden.

Näytteen kosteusprosentti = $\frac{\text{näytteen massa ajanhetkellä } t - \text{kuivamassa}}{\text{näytteen massa ajanhetkellä } t} \times 100 \%$

Koska käytetyllä kylmäkuivauslaitteella ei voitu tehdä sekundaarikylmäkuivausta eli poistaa kaikkea jäännöskosteutta näytteistä, näytteet kuivattiin loppuun fosfori(V)oksidilla (Merck KgaA, Saksa) Euroopan farmakopea:ssa kuvatun menetelmän mukaisesti. Tämä kuivausmenetelmän perustuu siihen, että fosfori(V)oksidin veden osapaineen voidaan olettaa olevan 0, jolloin näytteiden ollessa vakuumikytketyssä eksikaattorissa yhdessä fosfori(V)oksidin kanssa, fosfori(V)oksidi imee itseensä näytteissä jäljellä olevaa kosteutta. Näytteet todetaan kuiviksi, kun massa ei enää muutu fosfori(V)oksidin vaikutuksesta. (Isengard, 2001.)

4.4. Näytteiden jäännösrasvapitoisuuden määrittäminen

Luunäytteiden jauhamiseen käytettiin jauhinta (merkki: **Kinematica**, malli: Polymix A10 Analysenmühle Strörung, Sveitsi). Jäännösrasvapitoisuuksien määrittäminen tehtiin Biotekniikan laboratoriossa Oulussa, jossa käytettiin ultraääniuuttoa prosessoitujen ja jauhettujen luunäytteiden jäännösrasvapitoisuuden määrittämiseen. Menetelmä oli seuraava:

1. Kolvien puhdistus, esim. huuhtelu asetonilla ja heksaanilla.

2. Kolvien taaraus kuten soxlet-uutossa (100 °C, 1 h, jäähditys 0,5 h)
3. Kolvien punnitus.
4. Näytteiden punnitus sentrifugiputkiin n. 2 g.
5. Näytteiden inkubointi ultraäänihauteella 10 ml heksaanissa, 10 min.
6. Näytteiden fuugaus 5 min, 3500 rpm.
7. Heksaanikerroksen pipetointi pasteur-pipetillä kolviin.
8. Toista kohdat 5, 6 ja 7 vielä kaksi kertaa ja yhdistä heksaanikerrokset.
9. Liuottimen haihdutus pyöröhaihduttajalla.
10. Kolvien taaraus ja punnitus kuten alussa.
11. Kokonaisrasvan painon laskeminen, painonlisäyksen perusteella

rasvan määrä g

$$\text{Kokonaisrasvaprosentti} = \frac{\text{kolvin massa lopussa} - \text{kolvin massa alussa} \times 100}{\text{näytteen massa}} \%$$

Kemiallisen puhdistuksen optimointiin käytetyistä viidestä näyte-erästä jauhettiin jokaisesta kolme noin 4 g suuruista näytettä, joille tehtiin alustava rasvanmääritys. Jatkokokeisiin käytetyille mekaanisesti työstetyille näytteille tehtiin ennen rasvanmääritystä mekaaniset testit, jonka jälkeen näytteet jauhettiin ja kylmäkuivattiin uudelleen 14 h kolme näyte-erää kerralla. Kylmäkuivaus täytyi tehdä uudelleen, koska ennen mekaanisia testejä näytteet rehydroitiin. Näytteet yhdistettiin ja jauhettiin siten, että jokaiseen näyte-erään tuli yksi 2 g hohkaluunäyte ja yksi 4 g kortikaaliluunäyte.

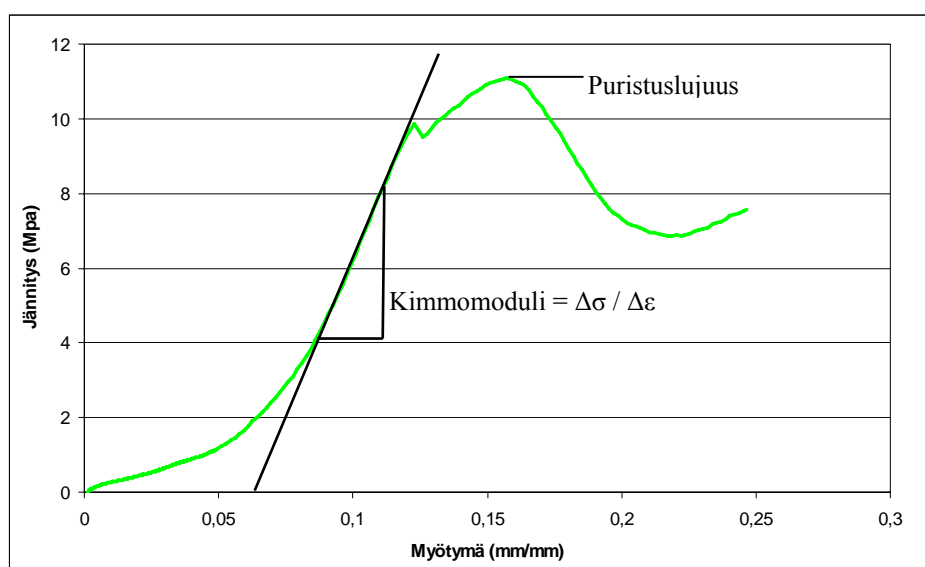
4.5. Mekaaninen testaus ja tilastollinen tarkastelu

Hohkaluu- ja kortikaaliluunäytteille tehtiin mekaaniset testit mekaanisella materiaalin testauskoneella (merkki: **Instron**, malli: 4411, Iso-Britannia) näytteen hajottavalla testausmenetelmällä (Kuva 10). Kylmäkuivattuja kortikaaliluu- ja hohkaluunäytteitä rehydroitiin 30 minuuttia, ja kontrolleja sulatettiin noin 1 h ennen mekaanista testausta. Hohkaluusylintereille tehtiin puristuskoe, sillä se sopii hyvin hauraan materiaalin, kuten luun testaamiseen. Kuormitus suoritettiin 2 mm/min nopeudella uniakksiaalisella puristuksella huoneen lämmössä. Laitteen sensorit mittasivat näytteen siirtymää ja näytteen kohdistuvaa voimaa koko mittauksen ajan.



Kuva 10. Puristuskoeleuat asennettuna mekaaniseen testauslaitteeseen.

Voiman ja siirtymän avulla voitiin laskea näytteen puristusjännitys $\sigma = F / A_0$, (F = koekappaleeseen vaikuttava ulkoinen voima, A_0 = alkuperäinen näytteen poikkipinta-ala) ja myötymä $\epsilon = \Delta l / l_0$, (Δl = näytteen pituuden muutos, l_0 = alkuperäinen pituus). Jokaisen näytteen puristusjännitys- ja myötymäarvoista piirrettiin kuvaajat (Kuva 11).

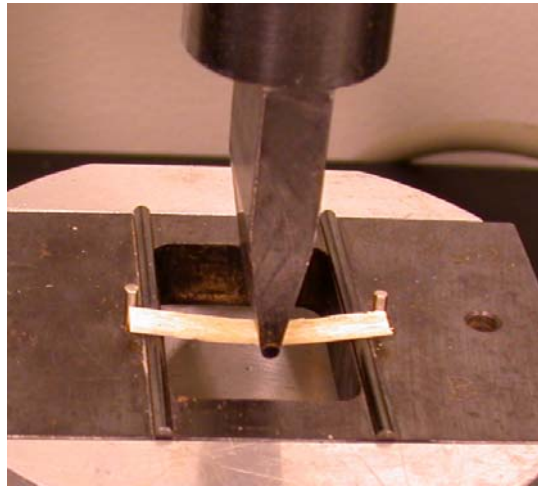


Kuva 11. Esimerkki yhden hohkaluunäytteen jännitys-myötymäkuvaajasta puristustestissä.

Näytteet eivät hajonneet puristuksen aikana vaan niiden rakenne luhistui kasaan. Toisin sanoen kun näyte oli saavuttanut maksimikuormituksen, sen jäykkyys, jota mitataan kimmomodulilla, alkoi laskea. Maksimijännitys eli näytteen puristuslujuus määritettiin jännitys-myötymäkuvaajan korkeimmasta kohtaa juuri ennen luhistumisen alkamista.

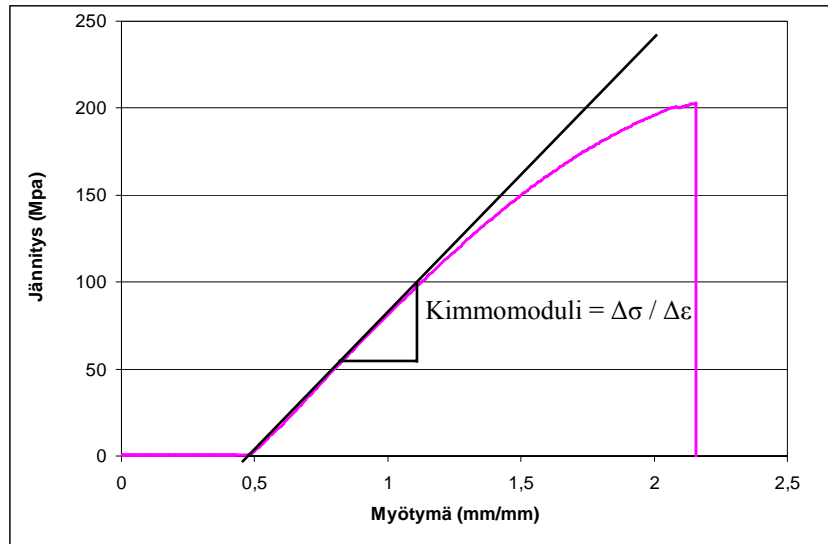
Kimmomoduli $E = \Delta\sigma / \Delta\varepsilon$, eli jännitys-myötymäkäyrän kulmakerroin laskettiin puolestaan kuvaajan jyrkimmästä lineaarisesta alueesta. Näytteen absorboima energia laskettiin puristuskäyrän alle jäävästä pinta-alasta.

Kortikaaliluunäytteille tehtiin kolmipistetaivutustestaus (Kuva 12) Currey ym., kuvaaman menetelmän pohjalta (Currey ym., 1997). Kuormitusnopeus kuitenkin muutettiin arvosta 0,5 mm/min arvoon 1 mm/min, koska se nopeutti mekaanista testausta huomattavasti, vaikuttamatta kuitenkaan tulosten laatuun. Näytteen tukipisteiden välinen etäisyys oli 32 mm. Näytteet asetettiin tukipisteiden väliin siten, että *periosteaalipinta*, jossa kortikaaliluu on homogeenisempää, oli vetojännityksessä (alapintana), ja *endosteaalipinta* oli puristusjännityksessä (yläpintana). Testaus suoritettiin huoneenlämmössä.



Kuva 12. Kolmipistetaivutustestaus kortikaaliluunäytteelle.

Näytteiden puristusjännitys- ja myötymäärvoista piirrettiin kuvaajat, kuten hohkaluunäytteiden kohdalla (Kuva 13). Suurin osa näytteistä murtui äkillisesti maksimikuormituksen saavuttamisen jälkeen, mutta osa näytteistä heikkeni hitaasti maksimikuormituksen saavuttamisen jälkeen. Taivutuslujuus laskettiin seuraavasta kaavasta $\sigma = 3FL / 2bd^2$ (F = koekappaleeseen vaikuttava ulkoinen voima, L = tukipisteiden etäisyys, b = näytteen leveys, d = näytteen paksuus). Kimmomoduli ja näytteen absorboima energia laskettiin samalla tavalla kuin hohkaluunäytteiden kohdalla on kuvattu.



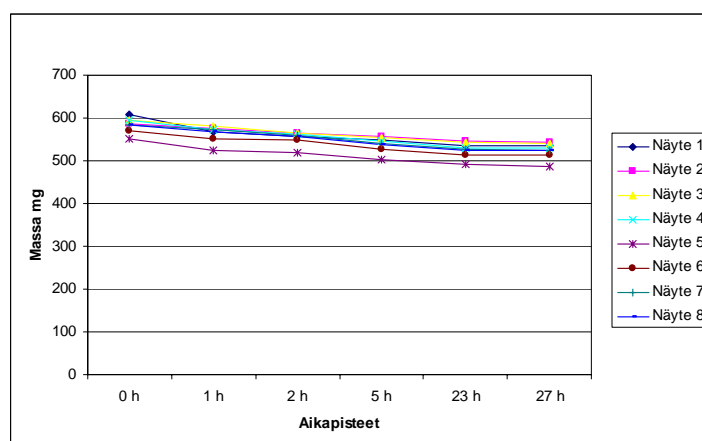
Kuva 13. Esimerkki yhden kortikaaliluunäytteen jännitys-myötymäkuvaajasta kolmipistetaivutustestissä.

Tilastolliset testit tehtiin SPSS-13 versiolla. Näytteiden ja kontrollien mekaanisista testeistä saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa parittaisen t-testin avulla, ja eri menetelmien vaikutuksia hohkaluun ja kortikaaliluun mekaanisiin ominaisuuksiin verrattiin toisiinsa yksisuuntaisella varianssianalyysillä (one-way ANOVA).

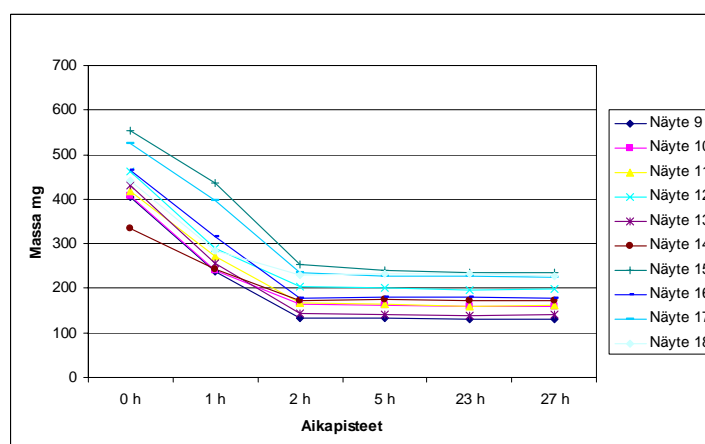
5. Tulokset

5.1. Luunäytteiden kylmäkuivaus

Näytteiden kuivamassan määrittämiseksi yhtä näyte-erää (8 kortikaaliluunäytettä ja 10 hohkaluunäytettä), jota oli prosessoitu menetelmällä E, kuivattiin ensin kylmäkuivauslaitteessa niin kauan kunnes näytteiden massat vakautuivat. Massoja mitattiin ensimmäisen, toisen ja viidennen tunnin kohdalla ja seuraavaksi 23 tunnin kohdalla ja lopuksi 27 tunnin kohdalla. Massa muuttui vain hyvin vähän viiden tunnin ja 23 tunnin mittauspisteen välillä, ja massa oli vakautunut 23 tunnin ja 27 tunnin mittauspisteen välillä (Kuvat 14 A ja B).

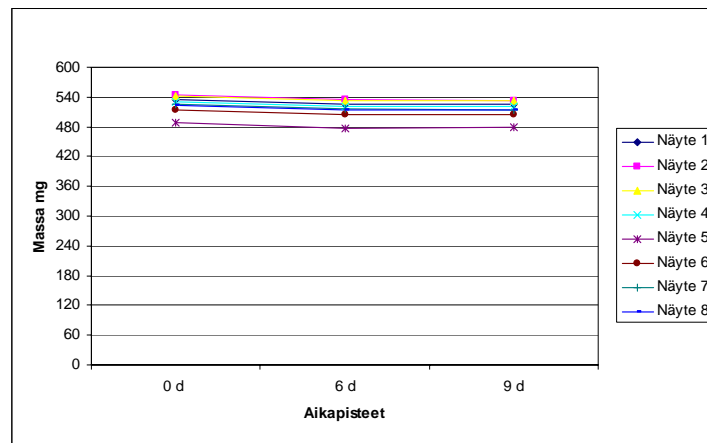


Kuva 14 A. Kortikaaliluunäytteiden massan muutokset kylmäkuivausajan funktiona.

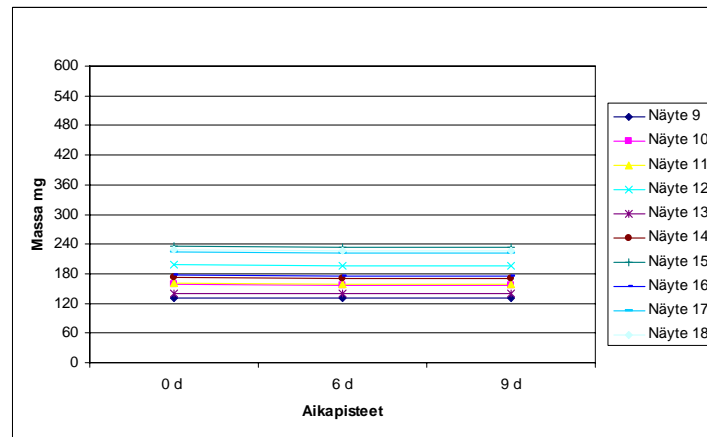


Kuva 14 B. Hohkaluunäytteiden massan muutokset kylmäkuivausajan funktiona.

Aikapistettä 27 h käytettiin alkumassana fosfori(V)oksidilla tehtävässä loppukuivauksessa. Seuraavat aikapistteet fosfori(V)oksidi kuivauksessa olivat 6 ja 9 päivän kohdalla (Kuvat 15 A ja B). Näytteiden massat eivät enää muuttuneet 6. päivän jälkeen, milloin kuivamassa voitiin todeta saavutetuksi. Kuivamassaksi määritettiin 6. päivänä ja 9. päivänä saatujen massojen keskiarvo. Kuvaajista nähdään, että kylmäkuivauslaite kuivasi hohkaluunäytteiden kosteusprosentin lähes täysin nolnaan, kun taas kortikaaaliluunäytteistä lähti selvästi pois n. 10 mg kosteutta fosfori(V)oksidin vaikutuksesta.



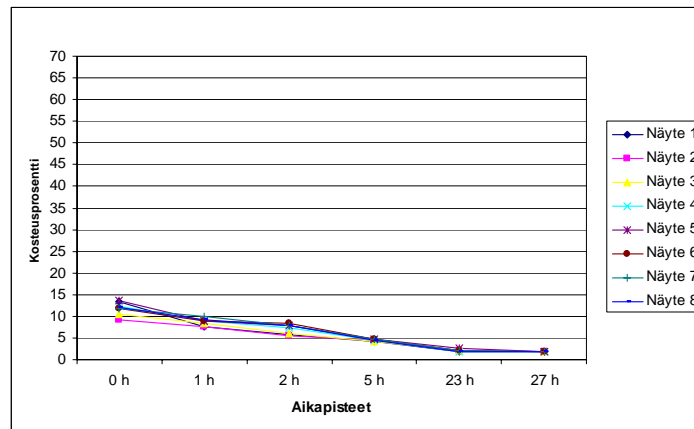
Kuva 15 A. Kortikaaaliluunäytteiden massan muutokset fosfori(V)oksidin vaikutusajan funktiona.



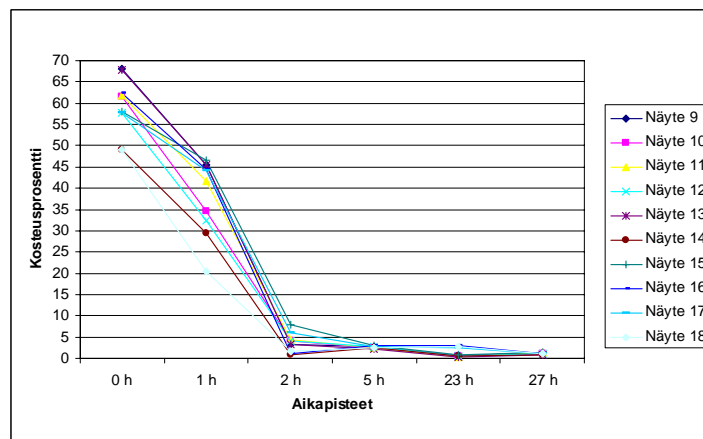
Kuva 15 B. Hohkaluunäytteiden massan muutokset fosfori(V)oksidin vaikutusajan funktiona.

Kuivamassaa käytettiin kosteusprosentin laskemiseen kylmäkuivauksen tiettyinä ajanhetkinä (Kuvat 16 A ja B). Ajanhetkellä 0 määritetyt kosteusprosentit olivat todellista suurempia varsinkin hohkaluunäytteiden kohdalla, sillä näytteet olivat imeneet itseensä paljon vettä prosessoinnin viimeisistä vesipesuista johtuen. Näitä kosteusprosentteja ei

siten voitu verrata kirjallisuudesta saataviin käsittelemättömän hohkaluun ja kortikaali-
luun kosteusprosentteihin.



Kuva 16 A. Kortikaaliluunäytteiden kosteusprosentin muutokset kylmäkuivausajan funktiona.



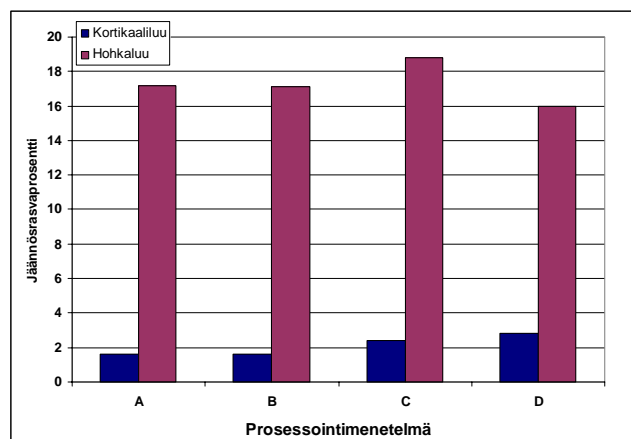
Kuva 16 B. Hohkaluunäytteiden kosteusprosentin muutokset kylmäkuivausajan funktiona.

Lasketuista kosteusprosentista voitiin todeta, että viisi tuntia kylmäkuivausta riittää yhden näyte-erän kosteusprosentin saamiseksi alle kuuden. Tämän perusteella viittä muuta näyte-erää kuivattiin prosessointien jälkeen viisi tuntia.

5.2. Jäännösrasvamääritys

Prosessointimenetelmien tehokkuutta poistaa rasvaa hohka- ja kortikaaliluusta mitattiin jäännösrasvamäärityksen avulla. Tällä tavalla mahdolliset erot eri kemiallisten pesujen vaikutuksista koko prosessin, eli kemialliset pesut yhdistettynä peretikkahappoetanoli-sterilointiin, tehoon selviäisivät. Alustava rasvamääritys tehtiin yhteensä 15 näytteelle.

Jokaisella viidellä prosessointimenetelmällä (A-E) oli puhdistettu yksi näyte-erä, joka oli lopuksi jauhettu kolmeksi näytteeksi. Menetelmillä B-E prosessoiduista näyte-eristä oli jauhettu kaksi kortikaaliluunäytettä ja yksi hohkaluunäyte, mutta menetelmällä A prosessoidusta näyte-erästä oli jauhettu kaksi hohkaluunäytettä ja vain yksi vajaa kortikaaliluunäyte, koska tässä näyte-erässä kortikaaliluuta oli ollut suhteessa vähemmän kuin muissa näyte-erissä. Lisäksi jauhamisen yhteydessä osa tästä kortikaaliluunäytteestä kontaminoitui metallihiutaleista, joita laitteen terästä irtosi, sen vääntyessä ja osuessa laitteen seinämään. Samasta syystä E-menetelmällä prosessoitu hohkaluunäyte kontaminoitui melkein kokonaan. Biotekniikan laboratoriossa näytteet jaettiin kahteen osaan, joten saatu yhden näytteen jäännösrasvaprosentti oli kahden rinnakkaisen mittauksen keskiarvo (Kuva 17). A-menetelmällä prosessoitua kortikaaliluunäytettä ei ollut riittävästi rinnakkaisen mittauksen tekemiseen. Lisäksi E-menetelmällä prosessoitujen näytteiden rasvanmääritys epäonnistui.

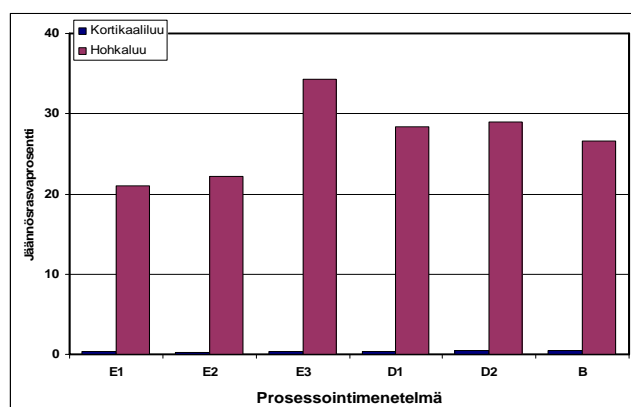


Kuva 17. *Pylväät kuvaavat menetelmillä A-D prosessoitujen kahden kortikaaliluunäytteen ja yhden hohkaluunäytteen jäännösrasvaprosenttien rinnakkaisten tulosten keskiarvoja. A-menetelmällä prosessoidun kortikaaliluunäytteen jäännösrasvaprosentti on yksittäisestä näytteestä.*

Tulokset olivat suuntaa antavia, koska näyte-erät eivät olleet homogeenisiä: kortikaaliluunäyte-erissä oli jäämiä hohkaluusta ja toisin päin. Tästä seurasi, että kortikaaliluunäyte-eriin jäi enemmän rasvaa kuin homogeenisessä kortikaaliluussa normaalisti on ja puolestaan hohkaluunäyte-erissä ei ollut niin paljon rasvaa kuin homogeenisessä hohkaluussa yleensä on.

Jäännösrasvan määrittämisen perusteella viidestä kemiallisen pesumenetelmän variaatiosta valittiin jatkotutkimuksiin kolme potentiaalisinta menetelmää. Näihin jatkotutkimuksiin käytetyille näytteille rasvamääritys tehtiin uudelleen ja lisäksi niiden vaikutuksia luun mekaanisiin ominaisuuksiin tutkittiin. Jatkotutkimuksiin valittiin pesumenetelmä E (alkuperäinen työohje), joka toimii vertailukohteena. Menetelmä E valittiin myös siksi, että ensimmäisestä kokonaisrasvamäärityksestä ei saatu tulosta. Menetelmä B valittiin jatkotutkimuksiin, koska se oli kuvan perusteella tehokkain lyhyt työohje. Lisäksi menetelmä D valittiin, hieman modifioituna: ylimääräinen peroksidipesu ja etanolipesu pidennettiin 10 minuuttiin ja 4. ja 9. kohdan pesut muutettiin alkuperäisen työohjeen mukaiseksi (ks. kappale 4.2). D-menetelmä valittiin sen vuoksi, että haluttiin tutkia, miten kaksinkertainen peroksidi- ja etanolipesu vaikuttaisi koko prosessointimenetelmän tehoon puhdistaa kortikaalilua ja erityisesti hohkalua rasvasta ja toisaalta luun mekaanisiin ominaisuuksiin.

Jatkotutkimuksissa näyttemateriaalina käytettiin mekaanisesti työstettyjä näytteitä, joten näyte-erät tässä määrittäksessä olivat täysin homogeeniset. Kuusi näyte-erää oli jaettu kolmen pesumenetelmän välille seuraavasti: kolme näyte-erää prosessoitiin menetelmällä E, kaksi näyte-erää menetelmällä D ja yksi menetelmällä B. Lopuksi näytteet oli yhdistetty ja jauhettu siten, että jokaisesta näyte-erästä määritettiin yksi hohkaluunäyte ja yksi kortikaaliluunäyte (Kuva 18). Kortikaaliluunäytteiden jäännösrasvaprosentit olivat kahden rinnakkaisen mittauksen keskiarvoja. Hohkaluunäyttemateriaali ei riittänyt rinnakkaisen mittauksen tekemiseen.



Kuva 18. Pylväät kuvaavat prosessoitujen kortikaaliluu- ja hohkaluunäytteiden jäännösrasvaprosentteja. Menetelmät E1-E3 ja D1-D2 rinnakkaisia.

Tuloksista voitiin päätellä, että kolmen eri kemiallisen pesun välillä ei ollut merkittävää eroa koko prosessointimenetelmän tehokkuuteen puhdistaa hohkaluu- ja kortikaaliluunäytteitä, koska rinnakkaisilla puhdistusmenetelmillä E1-E3 prosessoitujen hohkaluunäytteiden jäännösrasvatuloksissa oli enemmän eroja kuin eri menetelmillä prosessoitujen hohkaluunäytteiden tuloksissa. Luuallografitien prosessointiin voidaan kuvan perusteella käyttää lyhintä kemiallista pesumenetelmää B, koska kaksinkertaisella peroksidi- ja etanolipesulla tai yön yli pesulla (menetelmät D ja E) ei näyttänyt olevan suurta vaikutusta koko prosessoinnin tehokkuuteen. Hohkaluunäytteiden jäännösrasvaprosentit olivat suuremmat tässä määrittämisessä verrattuna ensimmäiseen määrittämiseen johtuen näytteiden homogeenisyydestä. Samasta syystä kortikaaliluunäytteiden jäännösrasvaprosentit olivat pienemmät verrattuna ensimmäiseen määrittämiseen.

5.3. Mekaaninen testaus ja tilastollinen tarkastelu

Mekaanisten testien tulokset on tiivistettynä taulukossa 2 A ja B. Näytekohtaiset tulokset on koottu liitteeseen 1.

Taulukko 2 A. Kortikaaliluunäytteiden mekaanisten testien tulokset. Menetelmät E2-E3 ja D1-D2 rinnakkaisia.

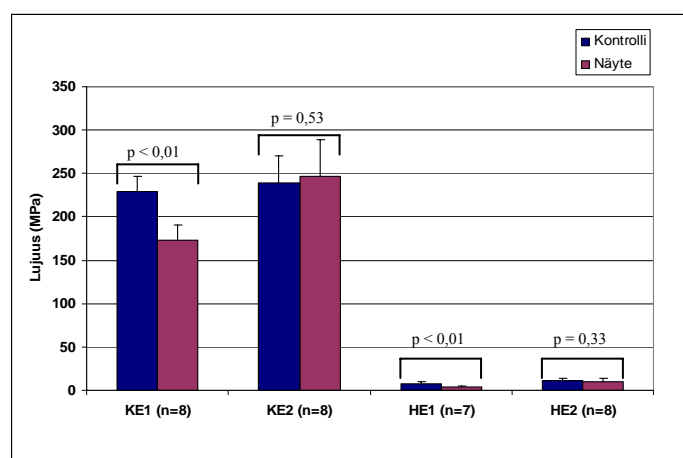
	N	Menetelmä	Jäännöskosteus %	Kontrolli Keskiarvo	Kontrolli SD	Näyte Keskiarvo	Näyte SD	%	P
Kimmomoduli (Gpa)	8	E1	0	15,3	1,5	14,1	1,1	92,7	0,03
	8	E2	<6	16,8	0,7	14,2	1,2	84,3	0,00
	8	E3	<6	17,1	1,4	14,4	1,3	84,5	0,00
	8	D1	<6	15,6	0,6	14,1	0,5	90,8	0,00
	8	D2	<6	15,3	1,9	12,6	1,2	83,0	0,00
	8	B	<6	16,5	0,8	14,0	0,8	84,9	0,00
Taivutuslujuus (MPa)	8	E1	0	229,8	16,8	173,6	17,5	75,8	0,00
	8	E2	<6	239,3	31,1	246,5	42,1	103,0	0,53
	8	E3	<6	216,2	19,2	250,6	33,5	115,8	0,00
	8	D1	<6	214,4	23,8	227,1	30,6	106,0	0,12
	8	D2	<6	188,1	29,7	202,7	23,7	108,9	0,10
	8	B	<6	211,6	9,9	211,4	33,6	100,0	0,99
Absorboitu energia (J)	8	E1	0	0,10	0,03	0,04	0,01	38,5	0,00
	8	E2	<6	0,10	0,03	0,14	0,04	152,4	0,04
	8	E3	<6	0,14	0,06	0,18	0,07	131,7	0,02
	8	D1	<6	0,08	0,04	0,11	0,05	150,1	0,08
	8	D2	<6	0,09	0,03	0,11	0,04	134,7	0,27
	8	B	<6	0,07	0,01	0,09	0,04	127,0	0,12

Taulukko 2 B. Hohkaluunäytteiden mekaanisten testien tulokset. Menetelmät D1-D2 rinnakkaisia.

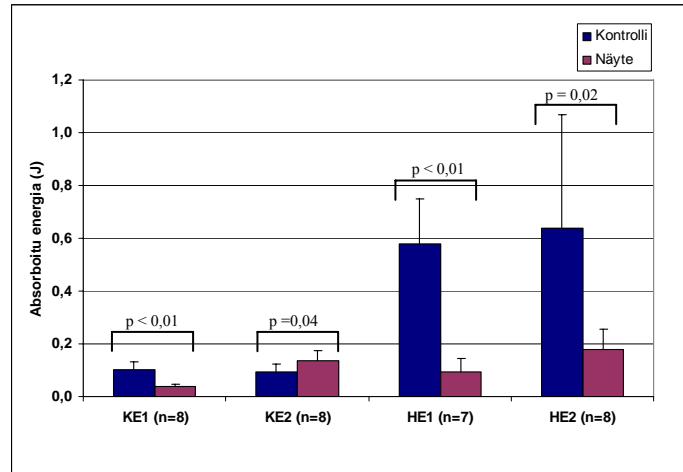
	N	Menetelmä	Jäännöskosteus %	Kontrolli Keskiarvo	Kontrolli SD	Näyte Keskiarvo	Näyte SD	%	P
Kimmomoduli (MPa)	7	E1	0	159,5	41,4	-	-	-	0,55
	7	E2	<6	443,2	85,0	467,4	119,4	-	
	5	D1	<6	210,9	57,5	-	-	-	
	5	D2	<6	367,1	74,9	-	-	-	
	6	B	<6	344,6	58,9	-	-	-	
Puristuslujuus (MPa)	7	E1	0	7,8	2,7	4,1	1,5	53,2	0,00
	8	E2	<6	10,7	3,0	9,8	3,5	91,9	0,33
	6	D1	<6	7,7	2,3	4,6	0,5	64,7	0,02
	6	D2	<6	7,8	3,4	5,3	2,6	73,9	0,10
	9	B	<6	6,1	2,3	4,7	2,2	87,6	0,23
Absorboitu energia (J)	7	E1	0	0,58	0,17	0,10	0,05	16,1	0,00
	8	E2	<6	0,64	0,43	0,18	0,08	36,8	0,02
	6	D1	<6	0,62	0,30	0,09	0,02	16,5	0,01
	6	D2	<6	0,27	0,13	0,12	0,06	64,6	0,05
	9	B	<6	0,23	0,12	0,08	0,04	42,0	0,01

Taulukko 2 A ja B. N = näyteparien lukumäärä, % = prosessoitujen näytteiden keskiarvojen suhde kontrollien keskiarvoihin, P = todennäköisyys, joka on laskettu parittaisen t -testin avulla näyte/kontrolli parin välille. Kun $p < 0,05$ tulos on tilastollisesti merkittävä. Ei merkittävät tulokset merkattu vahvennetulla kirjaintyyllillä.

Verrattaessa menetelmällä E prosessoitujen, mutta eri jäännöskosteusprosentteihin kylmäkuivattujen kortikaaliluu- ja hohkaluunäytteiden mekaanisia ominaisuuksia toisiinsa voitiin todeta, että kylmäkuivaus täysin kuivaksi heikensi näytteiden lujuutta ja energian absorbointikykyä huomattavasti enemmän kuin alle kuuteen jäännöskosteusprosenttiin kuivaaminen (Kuvat 19 A ja B).



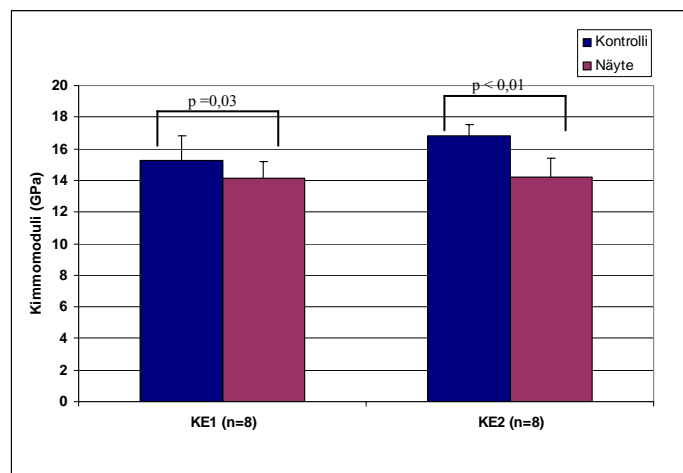
Kuva 19 A.



Kuva 19 B.

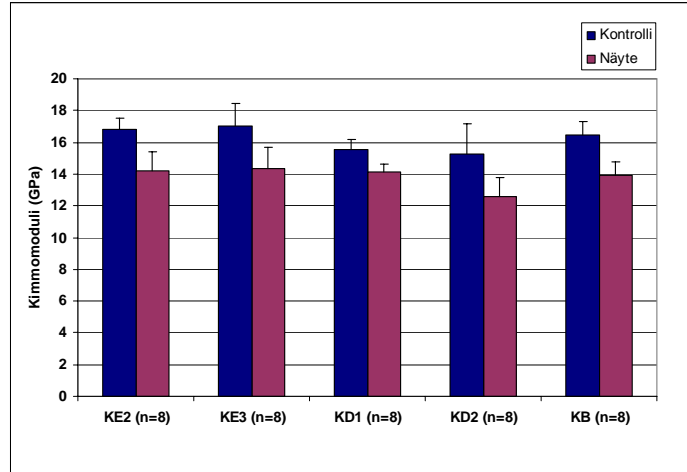
Kuvat 19 A ja B. Kuvissa on esitetty E-menetelmällä prosessoitujen, täysin kuivattujen kortikaaliluu- ja hohkaluunäytteiden lujuuksien ja absorboitujen energioiden keskiarvot ja hajonnat verrattuna prosessoimattomien kontrollien keskiarvoihin ja hajontoihin. KE1 ja HE1 = kortikaaliluu- ja hohkaluunäytteet, jotka kuivattu täysin kuivaksi, KE2 ja HE2 = kortikaaliluu- ja hohkaluunäytteet, jotka kuivattu alle kuuden kosteusprosentin.

Verrattaessa näiden samojen kortikaaliluunäytteiden kimmomoduleita toisiinsa voitiin puolestaan todeta, että kortikaaliluunäytteiden kylmäkuivaaminen täysin kuivaksi heikensi kimmomodulia hieman vähemmän kuin alle kuuteen kosteusprosenttiin kuivaaminen (Kuva 20).



Kuva 20. Kuvassa on esitetty E-menetelmällä prosessoitujen eri jäännöskosteusprosentteihin kuivattujen kortikaaliluunäytteiden kimmomodulien keskiarvot ja hajonnat verrattuna prosessoimattomien kontrollien keskiarvoihin ja hajontoihin. KE1 = kortikaaliluunäytteet, jotka kuivattu täysin kuivaksi, KE2 = kortikaaliluunäytteet, jotka kuivattu alle kuuden kosteusprosentin.

Menetelmillä B, D ja E prosessoitujen alle kuuden kosteusprosenttiin kuivattujen näytteiden kimmomodulit heikkenivät hieman, mutta kuitenkin merkittävästi prosessoinnin vaikutuksesta (Kuva 21).

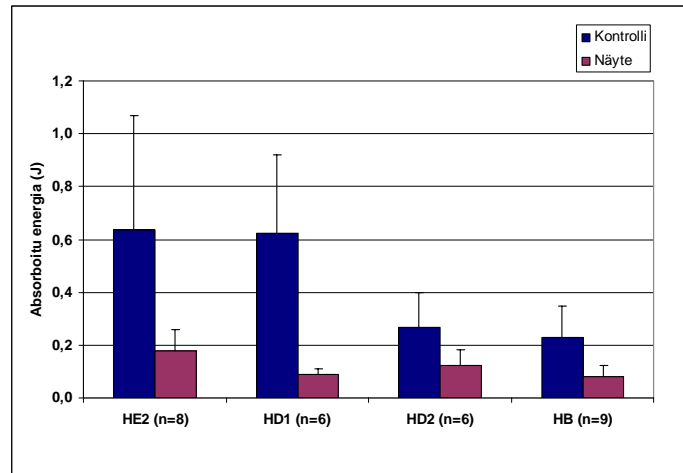


Kuva 21. Kuvassa on menetelmillä E-B prosessoitujen, alle 6 kosteusprosenttiin kylmäkuivattujen, kortikaaliluunäytteiden kimmomodulien keskiarvot ja hajonnat verrattuna prosessoimattomien kontrollien keskiarvoihin ja hajontoihin. Menetelmät E2-E3 ja D1-D2 rinnakkaisia. Jokaisen menetelmän kohdalla prosessoitujen näytteiden ja kontrollien kimmomodulien erot olivat tilastollisesti merkittäviä ($p < 0,01$).

Kortikaaliluun taivutuslujuuteen prosessointimenetelmillä B, D ja E ei ollut merkittävää vaikutusta, mutta näytteiden energian absorbointikyky parani prosessoinnin myötä hieman; kahdessa näyte-erässä viidestä energian absorbointikyky parani merkittävästi.

Prosessointimenetelmissä, joissa näytteet oli kylmäkuivattu alle kuuden kosteusprosenttiin, ei ollut vaikutusta hohkaluun puristuslujuuteen, tosin näytteiden absorboima energia heikkeni vähän, mutta kuitenkin merkittävästi kaikissa näyte-erissä (Kuva 22). Osalle käsittelemättömistä näytteistä eli kontrolleista kimmomodulia ei voitu laskea, sillä niiden jännitys-myötymä kuvaajista ei löytynyt selvää lineaarista aluetta. Lisäksi lähes kaikki prosessoidut hohkaluunäytteet heikkenivät prosessoinnin aikana niin paljon, että niistä oli siten mahdoton laskea kimmomodulia luotettavasti. Poikkeuksena oli kuitenkin E2 menetelmällä prosessoitu näyte-erä, jossa näytteet olivat erityisen lujia, joten kaikille tämän erän prosessoiduille näytteille ja niitä vastaaville kontrolleille saatiin määritettyä kimmomodulit. Osa hohkaluunäytteistä ja -kontrolleista jouduttiin hylkäämään kokonaan, koska niiden puristusjännitys- ja myötymäarvot olivat niin alhaisia, ettei kuvaajaa voitu piirtää lainkaan. Yksi näyte-erä (E3) hylättiin hohkaluun osalta ko-

konaan, sillä sekä kontrollit että prosessoitujen näytteet niin olivat heikkoja, ettei mekaaninen testauslaite pystynyt piirtämään niistä jännitys-myötymä kuvaajia.



Kuva 22. Kuvassa on esitetty eri menetelmillä prosessoitujen, hohkaluunäytteiden absorboitujen energioiden keskiarvot ja hajonnat verrattuna prosessoimattomien kontrollien keskiarvoihin ja hajontoihin. Menetelmät D1-D2 rinnakkaisia. Jokaisen menetelmän kohdalla prosessoitujen näytteiden ja kontrollien absorboitujen energioiden erot olivat tilastollisesti merkittäviä ($p < 0,05$).

Näytteiden ja kontrollien mekaanisista testeistä saatuja tuloksia verrattiin toisiinsa parittaisen t-testin avulla. Eri menetelmien vaikutusten eroja kortikaali- ja hohkaluun mekaanisiin ominaisuuksiin testattiin ANOVA-testillä. Eri menetelmien vaikutuksilla kortikaaliluun taivutuslujuuteen ja absorboituun energiaan sekä hohkaluun absorboituun energiaan ei todettu olevan merkittävää eroa. Koska varianssien homogeenisyys-testin mukaan ANOVA:a ei sopinut kortikaaliluun kimmomodulien ja hohkaluun absorboivien energioiden tarkasteluun, tehtiin näille kahdelle suurelle Mann-Whitney U-testi, joka todisti, ettei myöskään näihin suuriin eri menetelmillä ollut merkittävää vaikutuseroa.

6. Pohdinta

6.1. Jäännösrasvamääritys

Jäännösrasvapitoisuuden jatkok tutkimusmääritysten perusteella lyhimmän pesumenetelmän B todettiin puhdistavan luunäytteitä yhtä tehokkaasti kuin kahden muun testatun menetelmän. Tulos on kuitenkin vain suuntaa antava, sillä hohkaluu- ja kortikaaliluu näytteiden lukumäärä yhtä menetelmää kohden oli hyvin pieni, eikä näytemateriaali riittänyt kaikkien kolmen prosessointimenetelmän toistamiseen. Menetelmällä B ei prosessoitu kuin yksi näyte-erä, sillä hypoteesina oli alustavan jäännösrasvapitoisuuden määrittämisen jälkeen, että B-menetelmä olisi heikoin poistamaan rasvakudosta hohkaluusta D- ja E-menetelmiin verrattuna. Hypoteesi osoittautui kuitenkin vääräksi, johtuen alustavan jäännösrasvapitoisuusmäärittämisen epätarkkuudesta.

Rinnakkaisilla pesumenetelmillä E1-E3 prosessoitujen hohkaluunäytteiden jäännösrasvapitoisuudet vaihtelivat 21–34 % välillä. Jäännösrasvapitoisuuserot rinnakkaisilla menetelmillä prosessoitujen näytteiden välillä olivat suurempia kuin erot kaikkien testattujen kemiallisten pesujen välillä. Nämä erot saattoivat johtua luovuttajien välisistä eroista E1-E3 menetelmissä näytemateriaalina käytettyjen luiden alkuperäisen rasvapitoisuuden ja muun koostumuksen suhteen. Tutkimuksissa on todettu, että luuytimen rasvapitoisuus, joka on osittain verrattavissa hohkaluun rasvapitoisuuteen, vaihtelee saman ikäluokan henkilöillä huomattavasti (Griffith ym., 2005; Shellinger ym., 2004). Esimerkiksi nikamien luuytimen rasvapitoisuuden on todettu vaihtelevan 49–61-vuotiailla terveillä henkilöillä 36–70 % (Shellinger ym., 2004). Lisäksi tulosten variaatiota saattoi lisätä se, että menetelmillä E1-E3 prosessoidut näytteet olivat luovuttajilta, joiden ikähaitari oli 19–62 vuotta. Tämä on oleellista sen vuoksi, että rasvakudoksen määrä luussa lisääntyy vanhetessa, eli ennen E1-E3 prosessointia näytteiden rasvapitoisuudet olivat todennäköisesti hyvin erilaiset. (Kirkland ym., 2001.) Verrattaessa prosessoitujen hohkaluunäytteiden rasvapitoisuuksia nikamien luuytimen rasvapitoisuuteen voidaan todeta, että rasvapitoisuus pienenee huomattavasti prosessoinnin seurauksesta. Tämä vertailu ei ole täysin luotettava, sillä nikaman luuytimen rasvapitoisuus on vain suuntaa antava hohkaluun luuytimen rasvapitoisuudelle.

Eri menetelmillä prosessoitujen kortikaaliluunäytteiden rasvapitoisuudet vaihtelivat 0,2–0,5 % välillä. Pietrzak & Woodell-May tutkivat prosessoidun kortikaaliluun rasvapitoisuutta heksaaniuuton avulla, eli samalla menetelmällä kuin tässäkin tutkimuksessa. Kortikaalilujauhe oli prosessoitu American Association of Tissue Bank- akkreditoiman kudospankin standardimenetelmän mukaisesti. Kortikaaliluu oli ensin pesty käyttäen biologisia pintajännitystä vähentäviä pesuaineita, alkoholia ja peroksidia ja lopuksi kylmäkuivattu ja jauhettu. Prosessoidun kortikaalilujauheen määritetyt jäännösrasvapitoisuudet vaihtelivat 0–6,7 %. (Pietrzak & Woodell-May, 2005.) Verrattaessa tässä tutkimuksessa saatuja kortikaaliluun jäännösrasvarasvapitoisuuksia Pietrzak & Woodell-May saamin tuloksiin, voidaan todeta, että käytetyt kemialliset pesut yhdistettynä peritikkahappoetanolisterilointiin ovat tehokkaita prosessointimenetelmiä kortikaaliluulle.

6.2. Mekaaninen testaus

Prosessoitujen näytteiden ja kontrollien mekaanisten ominaisuuksien luotettava vertailu toisiinsa edellyttää, että näyte ja kontrolli on otettu luusta sellaisista kohdista, jotka vastaavat mekaanisilta ominaisuuksilta toisiaan. Tässä tutkimuksessa toisiaan vastaavat näyte ja kontrolli otettiin kontralateraalisesti luuparista, koska Banse ym., ovat tutkineet vasemman ja oikean reisiluunpään mekaanisten ominaisuuksien eroja ja tullut siihen tulokseen, että luuparin kontralateraaliset kohdat vastaavat mekaanisilta ominaisuuksilta toisiaan. (Banse ym., 1996.) Kontralateraalista kontrollinottotapaa on käytetty lisäksi useissa muissa tutkimuksissa (Conrad ym., 1993; Cornu ym., 2000; Currey ym., 1997).

Käsitlemättömän kortikaaliluun taivutuslujuusarvot vaihtelevat kirjallisuudessa 142–283 MPa välillä ja kimmomodulin arvot 9,1–15,7 GPa välillä (An, 2000). Currey ym., teki 2,0 x 3,4 x 40,0 mm kokoisille kortikaaliluunäytteille kolmipistetaivutustestauksen ja saadut taivutuslujuuksien keskiarvot vaihtelivat 142–170 MPa välillä ja kimmomodulien keskiarvot vaihtelivat 9,1–14,4 GPa välillä (Currey ym., 1997). Tässä tutkimuksessa käsitlemättömien, mitoiltaan 2,0 x 4,0 x 40,0 mm kokoisten kortikaaliluukontrollien taivutuslujuuksien keskiarvot vaihtelivat 188–239 MPa välillä ja kimmomodulien keskiarvot 15,3–17,1 GPa välillä. Tässä tutkimuksessa saadut kortikaaliluun mekaaniset tulokset olivat hieman suurempia kuin Currey ym., vastaavat tulokset. Tämä pieni ero voitiin selittää näytteiden 0,6 mm leveyserolla, joka vaikuttaa voimakkaasti saataviin mekaanisiin arvoihin. Kirjallisuuteen verraten, tässä tutkimuksessa saatuja mekaanisia

tuloksia prosessoituille kortikaaliluunäytteille ja prosessoimattomille kortikaaliluukontrolleille voidaan pitää luotettavina.

Käsitlemättömän hohkaluun lujuusarvot vaihtelevat kirjallisuudessa 1,5–38 MPa välillä ja kimmomodulin 10–1570 MPa välillä (An, 2000). Tässä tutkimuksessa hohkaluusyhtymien puristuslujuuksien keskiarvot vaihtelivat 6,1–10,7 MPa välillä ja kimmomodulien keskiarvot 160–443 MPa välillä. Saatuja mekaanisia tuloksia prosessoituille hohkaluunäytteille ja prosessoimattomille hohkaluukontrolleille voidaan siten pitää myös luotettavina.

Prosessoitujen kortikaaliluun- ja hohkaluunäytteiden kylmäkuivaus täysin kuivaksi heikensi näytteiden lujuutta ja energian absorbointikykyä eniten verrattuna prosessoituihin, alle kuuteen kosteusprosenttiin kuivattuihin näytteisiin. Riippumatta näytteen jäännöskosteusprosentista, kimmomodulit heikkenivät kaikissa näytteryhmissä merkittävästi. Kylmäkuivauksen on todettu heikentävän luun mekaanisia ominaisuuksia useissa tutkimuksissa (Boyce ym., 1999; Cornu ym., 2000; Nather ym., 2004). Esimerkiksi Cornu ym., totesivat tutkimuksessaan, että rasvasta puhdistetun alle yhden kosteusprosentin kylmäkuivatun hohkaluun puristuslujuus ja kimmomoduli heikkenivät merkittävästi verrattuna tuorepakastettuun hohkaluuhun (Cornu ym., 2000). Cornu ym., tutkimuksen tulokset tukevat siten tässä tutkimuksessa saatuja tuloksia prosessoitujen, täysin kuivaksi kylmäkuivattujen hohkaluunäytteiden puristuslujuuksista. Vaikka Cornu ym., mekaanisten testien tulokset ovatkin hohkaluusta saatuja, voitiin niitä ainakin osittain soveltaa kortikaaliluun mekaanisten ominaisuuksien tuloksiin. Siten Cornu ym., tulokset tukevat tässä tutkimuksessa kortikaaliluusta saatuja tuloksia, joissa täysin kuivaksi kuivattujen näytteiden kimmomodulit ja taivutuslujuus heikkenivät merkittävästi. Tämän tutkimuksen tulosten perustella voidaan siten todeta, että prosessoituja luusiirteitä kliiniseen käyttöön ei saa kuivata liian kuivaksi, eli lähelle nollaa, koska tällöin luusiirteen mekaaniset ominaisuudet heikkenevät merkittävästi. Tämä on tärkeää sen vuoksi, että luusiirteen mekaanisten ominaisuuksien heiketessä liikaa allograftin kyky tukea paranevaa luukudosta heikkenee, jolloin potilaalle täytyy tehdä todennäköisesti uusi leikkausoperaatio.

Luunäytteiden kuivaamisessa täysin kuivaksi käytettiin fosfori(V)oksidia. Tämä kuivausmenetelmänä perustuu siihen, että fosfori(V)oksidin veden osapaineen voidaan olettaa

olevan 0, jolloin näytteiden ollessa vakuumikytketyssä eksikaattorissa yhdessä fosfori(V)oksidin kanssa, fosfori(V)oksidi imee itseensä näytteissä jäljellä olevaa kosteutta. Todellisuudessa kosteus fosfori(V)oksidin ja näytteiden välillä menee lopulta tasapainoon, jolloin näytteeseen jää vielä hieman kosteutta. (Isengard, 2001.) Tämä näytteen tasapainotilan jäännöskosteus on yleensä kuitenkin niin pieni, että sillä ei ole merkitystä kosteusprosentteja laskettaessa.

Kortikaaliluunäytteiden kimmomodulin heikkeneminen prosessointimenetelmien vaikutuksesta, riippumatta näytteiden jäännöskosteusprosentista, johtui todennäköisesti peritikkahappo-etanolin heikosta demineralisaatiovaikutuksesta. Demineralisaation on todettu heikentävän luun kimmomodulia eli tekevän luusta sitkeämmän ja vähemmän jäykän poistamalla luumatriksista mineraaleja (Lewandrowski ym., 1998). Demineralisaatiovaikutus saattoikin olla myös syy siihen, miksi alle kuuteen kosteusprosenttiin kylmäkuivattujen kortikaaliluunäytteiden energian absorbointikyky parani prosessoinnin vaikutuksesta, koska energian absorbointikyky kasvaa sitkeyden (Callister, 1999) kasvaessa. On kuitenkin vaikea arvioida miten kortikaaliluun energian absorbointikyvyn lievä paraneminen ja kimmomodulin heikkeneminen yhdessä vaikuttavat allograftiluun kykyyn tukea mekaanisesti paranevaa luukudosta kliinisessä käytössä. Huomion arvoista lisäksi on se, että täysin kuivaksi kuivattujen kortikaaliluunäytteiden kimmomodulit heikkenivät vähiten, koska kylmäkuivaus 0 kosteusprosenttiin jäykisti näytteitä eniten ja tällä tavalla todennäköisesti kompensoi eniten prosessoinnin demineralisaatiovaikutusta.

Prosessointimenetelmillä oli vahingollisin vaikutus hohkaluunäytteiden energian absorbointikykyyn. Prosessointimenetelmien kokonaisvaikutusten arviointia hohkaluun mekaanisiin ominaisuuksiin vaikeutti se, että hohkaluunäytteiden kimmomoduleita ei pystytty määrittämään. Lisätutkimuksia siten tarvitaan, jotta voitaisiin selvittää ovatko prosessointimenetelmien vaikutukset hohkaluun mekaanisiin ominaisuuksiin kliinisesti merkittäviä. Hohkaluunäytteiden mekaanisten ominaisuuksien hajonta oli suurempaa kuin kortikaaliluunäytteillä. Tämä oli oletettavaa, sillä useissa tutkimuksissa on todettu, että hohkaluu on huomattavasti heterogeenisempää ja sen mekaaniset ominaisuudet riippuvat huomattavasti voimakkaammin tiheydestä kuin kortikaaliluun mekaaniset ominaisuudet. Kortikaaliluun vähäisempi heterogeenisyys voi johtua sen hitaammasta uudelleenmuodostumisesta, mikä vähentää muutoksia luun mikrorakenteessa. (An, 2000; Rho ym., 1998.)

Hohkaluun mekaanisten ominaisuuksien mittaaminen luotettavasti on todettu aikaisemmissa tutkimuksissa hankalaksi ja haastavaksi tehtäväksi juuri suuren heterogeenisyyden vuoksi (Guedes ym., 2006). Heterogeenisyys aiheuttaa samasta luusta otettujen näytteiden suuren hajonnan ja osalla näytteistä voi olla jopa niin alhaiset lujuudet, että niitä on hyvin vaikea määrittää luotettavasti (Keaveny ym., 2001). Hyvin alhaiset lujuusarvot ovat verrannollisia hohkaluun alhaiseen tiheyteen ja yksittäisten hohkaluusäikeiden mikromurtumiin (An, 2000). Nämä ovat myös todennäköiset syyt sille, miksi osa hohkaluunäytteistä ja kontrolleista jouduttiin hylkäämään kokonaan, koska niiden puristusjännitys- ja myötymääräarvot olivat niin alhaisia, ettei kuvaajaa voitu piirtää lainkaan.

Koska hohkaluun ja kortikaaliluun näennäisellä tiheydellä on positiivinen korrelaatio sen mekaanisten ominaisuuksien kanssa (An, 2000), olisi tämän tutkimuksen tuloksia voitu arvioida luotettavammin, jos hohkaluu- ja kortikaaliluunäytteiden tiheydet olisi myös laskettu. Tällöin esimerkiksi hohkaluunäytteiden hylkääminen olisi todennäköisesti voitu perustella kvantitatiivisesti alhaisen tiheyden perusteella.

7. Johtopäätökset

Lyhimmän puhdistusmenetelmän B todettiin olevan yhtä tehokas kuin kahden muun testatun menetelmän (D,E). Kemiallisten pesujen inkubointiaikojen lyhentämisellä ei siten todettu olevan vaikutuksia puhdistusmenetelmän tehokkuuteen poistaa hohka- ja kortikaaliluusta rasvaa. Verrattaessa prosessoitujen hohkaluunäytteiden jäännösrasvapitoisuuksia nikamien luuytimen rasvapitoisuuteen todettiin, että prosessoinnin vaikutuksesta rasvapitoisuus selvästi pienenee. Prosessoinnin tehokkuutta puhdistaa hohkaluu oli kuitenkin vaikea arvioida, sillä kirjallisuudesta ei löytynyt kemiallisesti prosessoidun hohkaluun rasvapitoisuuksia. Kortikaaliluulle osalta voidaan kuitenkin sanoa luotettavasti, että tehokas puhdistusmenetelmä löytyi.

Prosessoitujen kortikaali- ja hohkaluunäytteiden kylmäkuivaamisella alle kuuden kosteusprosentin oli huomattavasti vähemmän vaikutuksia näytteiden mekaanisiin ominaisuuksiin verrattuna täysin kuivattuihin näytteisiin. Tämä oli ensimmäinen tutkimus, jossa peretikkahaptoetanolin vaikutuksia luun mekaanisiin ominaisuuksiin tutkittiin. Puhdistusmenetelmillä B, D ja E yhdistettynä peretikkahaptoetanolikäsittelyyn oli vaikutuksia sekä hohkaluun että kortikaaliluun kuormankanto-ominaisuuksiin. Eri kemiallisten pesujen vaikutuksilla kortikaaliluu- ja hohkaluunäytteiden mekaanisiin ominaisuuksiin ei todettu olevan tilastollisesti merkittävää eroa. Vahingolliset vaikutukset sekä kortikaaliluun että hohkaluun osalta olivat kuitenkin suunnilleen samansuuruisia kuin luonnolliset erot eri luovuttajien välillä. Vahingollisten vaikutusten merkitystä kliinisesti on kuitenkin vaikea arvioida ilman lisätutkimuksia, kuten *in vivo* eläinkokeita.

LÄHDELUETTELO

An YH. Mechanical properties of bone. Teoksessa: An YH, Draughn RA (toim.), Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Press, Boca Raton, 2000, s. 41-64.

An YH, Bensen CV. General considerations of mechanical testing. Teoksessa: An YH, Draughn RA (toim.), Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Press, Boca Raton, 2000, s. 119-132.

Akkus O, Rinnac CM. Fracture resistance of gamma radiation sterilized cortical bone allografts. Journal of Orthopaedic Research 2001;19:927-934.

Banse X, Delloye C, Cornu O, Bourgois R. Comparative left-right mechanical testing of cancellous bone from normal femoral heads. Journal of Biomechanics 1996;29:1247-1253.

Barbour SA, King W. The safe and effective use of allograft tissue -an update. The American Journal of Sports Medicine 2003;31:791-797.

Bonucci E. Basic composition and structure of bone. Teoksessa: An YH, Draughn RA (toim.), Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Press, Boca Raton, 2000, s. 3-22.

Brosig H, Jacker HJ, Borchert HH, Kalus U, Dörner T, von Versen R, Pruss A. Sufficient penetration of peracetic acid into drilled human femoral heads. Cell and Tissue Banking, 2005;6:231-237.

Boyce T, Edwards J, Scarborough. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. Orthopedic Clinics of North America 1999;30:571-581.

Butler AM, Morgan DA, Verheul R, Walsh WR. Mechanical properties of gamma irradiated morselized bone during compaction. Biomaterials 2005;26:6009-6013.

Callister WD. Materials Science and Engineering, an Introduction, John Wiley & Sons, Inc, New York, 5. painos, 1999, s.128, 131.

Conrad EU, Ericksen DP, Tencer AF, Strong DM, Mackenzie AP. The effects of freeze-drying and rehydration on cancellous bone. Clinical Orthopaedics and Related Research 1993;290:279-284.

Cornu O, Banse X, Docquier PL, Luyckx S, Delloye C. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. Journal of Orthopedic Research 2000;18:426-431.

Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *Journal of Orthopedic Research* 1997;15:111-117.

DePaula CA, Truncale KG, Gertzman AA, Sunwoo MH, Dunn MG. Effects of hydrogen peroxide cleaning procedures on bone graft osteoinductivity and mechanical properties. *Cell and Tissue Banking* 2005;6:287-298.

Eppley BJ, Pietrzak WS, Blanton MW. Clinical studies: Allograft and alloplastic substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *The Journal of Craniofacial Surgery* 2005;16:981-989.

Flink JM, Knudsen H. *An Introduction to Freeze Drying*, Strandberg Bogtryk, Denmark, 1983, s. 30-44.

Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1998;45:221-229.

Galea G, Kearney JN. Review article: Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. *Transfusion medicine* 2005;15:165-174.

Grieb TA, Fornig RY, Stafford RE, Lin J, Almeida J, Bogdanský S, Ronholdt C, Drohan WN, Burgess WH. Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. *Biomaterials* 2005;26:2033-2042.

Griffith JF, Yeung DK, Antonio GE, Lee FK, Hong AW, Wong SY, Lau EM, Leung PC. Vertebral bone mineral density, marrow perfusion and fat content in healthy men and men with osteoporosis: dynamic contrast-enhanced MR imaging and MR spectroscopy. *Radiology* 2005;236:945-951.

Guedes RM, Simões JA, Morais JL. Viscoelastic behaviour and failure of bovine cancellous bone under constant strain rate. *Journal of Biomechanics* 2006;39:49-60.

Hamer AJ, Strachan JR, Black MM, Ibbotson CJ, Stockley I, Elson RA. Biomechanical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. *The Journal of Bone & Joint Surgery [Br]* 1996;78-B:363-368.

Heath JW, Young B. *Wheater's Functional Histology*, Churchill Livingstone, London, 4. painos, 2000, s. 175-179.

Hench LL. The skeletal system. Teoksessa: Hench LL, Jones JR (toim.), *Biomaterials Artificial Organs and Tissue Engineering*, CRC Press, Boca Raton, 2005, s. 79-89.

Hirn MY, Salmela MP, Vuento RE. High-pressure saline washing of allografts reduces bacterial contamination. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 2001;72:83-85.

Isengard, HD. Water content, one of the most important properties of food. *Food Control* 2001;12:395-400.

Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. Annual Review of Biomedical Engineering 2001;3:307-333.

Keller TS, Liebschner MAK. Tensile and compression testing of bone. Teoksessa: An YH, Draughn RA (toim.), Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Press, U.S.A, 2000, s.175-205.

Kirkland JL, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I. Adipogenesis and aging: does aging make fat go mad? Experimental Gerontology 2002;37:757-767.

Lewandrowski KU, Bonassar L, Uthoff HK. Mechanical properties of perforated and partially demineralized bone grafts. Clinical Orthopaedics and Related Research 1998;353:238-246.

Lomas RJ, Jennings LM, Fisher J, Kearney JN. Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts. Cell and Tissue Banking 2004;5:149-160.

Lopez MJ, Markel MD. Bending tests of bone. Teoksessa: An YH, Draughn RA (toim.), Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, CRC Press, Boca Raton, 2000, s. 207-218.

Menyhart L. 1995. Lyophilization: Freeze-Drying A Downstream Process. Saatavilla [www-muodossa:](http://www.muodossa.com)
<URL:<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/DOWNSTREAM/fig5.htm>>
(luettu 10.3.2006)

Natali AN, Meroi EA. A review of the biomechanical properties of the bone as a material. Journal of Biomedical Engineering 1989;11:266-275.

Nather A, Thambyah A, Goh JCH. Biomechanical strength of deep-frozen versus lyophilized large cortical allografts. Clinical Biomechanics 2004;19:526-533.

Pietrzak WS, Woodell-May J. The composition of human cortical allograft bone derived from FDA/AATB-screened donors. The Journal of Craniofacial surgery 2005;16:579-585.

Pruss A, Göbel UB, Pauli G, Kao M, Seibold M, Möning HJ, Hansen A, von Verse R. Peracetic acid-ethanol treatment of allogenic avital bone tissue transplants –a reliable sterilization method. Annals of Transplantation 2003;8:34-42.

Pruss A, Hansen A, Kao M, Gürtler L, Pauli G, Benedix F, von Versen R. Comparison of the efficiency of virus inactivation methods in allogeneic avital bone transplants. Cell and Tissue Banking 2001;2:201-215.

Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny J, von Versen R, Pauli G. Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. Biologicals 2002;30:125-130.

Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, von Versen R, Pauli G. Virus safety of avital bone tissue transplants: evaluation of sterilization steps of spongiosa cuboids using peracetic acid-methanol mixture. *Biologicals* 1999;27:195-201.

Putz R, Pabst R. Sobotta Atlas of Human Anatomy, Volume 2 Thorax, Abdomen, Pelvis, Lower Limb, Urban & Fischer, Munich, 13. painos, 2001, s. 284.

Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* 1998;20:92-102.

Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histology a Text and Atlas*, Williams & Wilkins, Baltimore, 3. painos, 1995, s. 150-153.

Scheffler SU, Scherler J, Pruss A, von Versen R, Weiler A. Biomechanical comparison of human bone-patellar tendon-bone grafts after sterilization with peracetic acid-ethanol. *Cell and Tissue Banking* 2005;6:109-115.

Shellinger D, Lin CS, Lim J, Hatipoglu HG, Pezzullo JC, Singer AJ. Bone marrow fat and bone mineral density on proton MR Spectroscopy and dual-energy X-ray absorptiometry: their ratio as a new indicator of bone weakening. *American Journal of Roentgenology* 2004;183:1761-1765.

Todd J. 2005. PED 105 Anatomy and Physiology LECTURE OUTLINE Chapter 6: The Skeletal System: Bones and Joints. Saatavilla [www-muodossa: <URL:http://academic.wsc.edu/faculty/jatodd1/351/ch4outline.html>](http://academic.wsc.edu/faculty/jatodd1/351/ch4outline.html) (luettu 1.11.2005)

Vastel L, Meunier A, Siney H, Sedel L, Courpied J-P. Effect of different sterilization processing methods on the mechanical properties of human cancellous bone allografts. *Biomaterials* 2004;25:2105-2110.

LIITE 1

Kortikaaliluunäytteiden mekaanisten testien tulokset. Jokaisesta näytteestä ilmoitettu luovuttaja ja luovutuspaikka (p=*proksimaalinen*, d=*distaalinen*). Tähdellä merkatut näytteet ovat samalta luovuttajalta.

Menetelmä E1	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)	Kontrolli E1	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)
M397 K1 dtibia	168,893	14,397	0,031	M396 K1 dtibia	262,66	17,925	0,096
M397 K2 dtibia	170,599	15,747	0,029	M396 K2 dtibia	237,886	17,047	0,088
M397 K3 dtibia	205,442	15,605	0,049	M396 K3 dtibia	226,607	15,179	0,105
M242 K1 ptibia	176,453	13,409	0,046	M241 K1*ptibia	226,77	14,687	0,098
M242 K2 ptibia	171,782	13,287	0,039	M241 K2*ptibia	229,316	14,048	0,152
M242 K3 ptibia	183,191	12,983	0,047	M241 K3*ptibia	226,346	14,838	0,106
M241 K4 ptibia	170,689	14,501	0,035	M242 K4*ptibia	227,104	15,119	0,091
M241 K5 ptibia	142,124	13,034	0,027	M242 K5*ptibia	201,439	13,475	0,066

Menetelmä E2	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)	Kontrolli E2	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)
M309 K6 dtibia	202,813	13,181	0,084	M301 K6 dtibia	220,485	16,651	0,066
M317 K1*dtibia	272,935	15,553	0,136	M319 K1 dtibia	229,421	16,543	0,102
M317 K2*dtibia	257,28	13,813	0,156	M319 K2 dtibia	244,45	17,804	0,128
M317 K3*dtibia	244,682	14,367	0,119	M319 K3 dtibia	249,992	17,142	0,137
M319 K4*dtibia	300,923	15,574	0,2	M317 K4 dtibia	245,223	16,924	0,072
M319 K5*dtibia	276,31	14,949	0,168	M317 K dtibia	263,168	17,12	0,086
M319 K6*dtibia	246,947	14,174	0,145	M317 K6 dtibia	283,045	17,122	0,122
M332 K1 dtibia	170,208	11,868	0,079	M333 K1 dtibia	178,682	15,234	0,05

Menetelmä E3	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)	Kontrolli E3	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)
M307 K4 ptibia	204,299	13,193	0,092	M299 K4 ptibia	188,676	14,821	0,075
M307 K5 ptibia	216,003	13,9	0,095	M299 K5 ptibia	182,985	15,508	0,052
M319 K7*dtibia	284,79	16,128	0,155	M317 K7*dtibia	230,683	17,606	0,182
M319 K8*dtibia	288,687	16,205	0,199	M317 K8*dtibia	222,709	17,502	0,149
M319 K9*dtibia	249,037	13,913	0,186	M317 K9*dtibia	230,892	18,926	0,138
M317K10*dtibia	269,123	14,409	0,282	M319 K10*dtibia	229,676	18,537	0,234
M317K11*dtibia	274,056	14,74	0,206	M319 K11*dtibia	220,713	16,672	0,178
M317K12*dtibia	218,861	12,488	0,236	M319 K12*dtibia	223,383	16,901	0,149

Menetelmä D1	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)	Kontrolli D1	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)
M402 K1 ptibia	251,372	14,763	0,111	M406 K1 ptibia	208,504	15,812	0,151
M402 K2 ptibia	249,956	14,701	0,131	M406 K2 ptibia	229,965	16,486	0,108
M396 K4 dtibia	268,296	14,535	0,182	M397 K4 dtibia	262,67	16,064	0,129
M396 K5 dtibia	226,981	13,771	0,102	M397 K5 dtibia	212,282	14,832	0,061
M396 K6 dtibia	241,612	13,476	0,159	M397 K6 dtibia	211,315	14,872	0,06
M348 K1 femur	192,742	13,467	0,068	M339 K1 femur	204,256	15,096	0,05
M348 K2 femur	187,918	14,351	0,054	M339 K2 femur	205,953	15,771	0,047
M348 K3 femur	198,168	13,888	0,071	M339 K3 femur	180,166	15,535	0,039

Menetelmä D2	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)	Kontrolli D2	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)
M332 K2* dtibia	210,603	13,619	0,089	M333 K2* dtibia	182,537	14,881	0,069
M332 K3* dtibia	235,069	14,118	0,087	M333 K3* dtibia	232,374	18,497	0,112
M333 K4* dtibia	195,820	11,720	0,180	M332 K4* dtibia	215,233	15,739	0,095
M333 K5* dtibia	189,980	12,593	0,166	M332 K5* dtibia	202,797	15,159	0,074
M333 K6* dtibia	203,469	12,697	0,094	M332 K6* dtibia	174,752	13,764	0,058
M299 K1 ptibia	231,939	13,844	0,096	M307 K1 ptibia	196,902	17,215	0,067
M299 K2 ptibia	192,705	11,619	0,085	M307 K2 ptibia	157,744	14,374	0,142
M299 K3 ptibia	161,793	10,629	0,078	M307 K3 ptibia	142,829	12,467	0,085

Menetelmä B	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)	Kontrolli B	Taivutus- lujuus (Mpa)	Kimmo- moduli (Gpa)	Absorboitu energia (J)
M339 K4 femur	223,400	14,610	0,088	M348 K4 femur	193,480	15,606	0,063
M339 K5 femur	207,924	14,080	0,075	M348 K5 femur	214,498	16,563	0,074
M339 K6 femur	227,280	14,830	0,090	M348 K6 femur	213,032	16,960	0,053
M301 K1* dtibia	198,408	14,062	0,061	M309 K1* dtibia	204,469	17,661	0,061
M301 K2* dtibia	149,225	12,615	0,032	M309 K2* dtibia	207,032	17,027	0,049
M301 K3* dtibia	189,298	13,046	0,065	M309 K3* dtibia	225,887	16,691	0,073
M309 K4* dtibia	259,979	14,807	0,170	M301 K4* dtibia	216,748	15,715	0,085
M309 K5* dtibia	236,048	13,598	0,136	M301 K5* dtibia	217,906	15,632	0,090

Hohkaluunäytteiden mekaanisten testien tulokset.

Menetelmä E1	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)	Kontrolli E1	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)
M242 H2* ptibia	2,349	-	0,047	M241 H2* ptibia	3,839	102,697	0,353
M242 H4* ptibia	2,993	-	0,059	M241 H4* ptibia	7,531	151,287	0,546
M241 H6* ptibia	2,47	-	0,045	M242 H6* ptibia	5,007	102,969	0,342
M241 H7* ptibia	5,935	278,069	0,169	M242 H7* ptibia	11,669	195,172	0,704
M241 H9* ptibia	4,511	-	0,074	M242 H9* ptibia	9,775	193,531	0,7
M241 H10*ptibia	4,448	-	0,108	M242 H10*ptibia	9,442	187,66	0,764
M241 H11*ptibia	5,786	310,331	0,167	M242 H11*ptibia	7,406	183,433	0,63

HYLÄTTY

M242 H1* ptibia
M242 H3* ptibia
M242 H5* ptibia

HYLÄTTY

M241 H1* ptibia
M241 H3* ptibia
M241 H5* ptibia

Menetelmä E2	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)	Kontrolli E2	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)
M396 H1* dtibia	7,096	376,269	0,094	M397 H1* dtibia	12,015	510,49	0,405
M396 H2* dtibia	8,082	368,539	0,219	M397 H2* dtibia	7,46	355,292	0,237
M396 H3* dtibia	9,832	479,149	0,105	M397 H3* dtibia	13,55	531,396	1,037
M396 H4* dtibia	13,677	564,946	0,257	M397 H4* dtibia	10,909	405,139	1,507
M397 H5* dtibia	13,564	503,704	0,265	M396 H5* dtibia	13,661	448,579	0,719
M397 H6* dtibia	6,317	323,058	0,12	M396 H6* dtibia	7,464	322,79	0,322
M397 H7* dtibia	13,914	656,208	0,251	M396 H7* dtibia	13,602	528,987	0,557
M397 H8* dtibia	5,838	301,158	0,104	M396 H8* dtibia	6,973		0,32

HYLÄTTY

M246 H1 ptibia
M246 H2 ptibia

HYLÄTTY

M253 H1 ptibia
M253 H2 ptibia

Menetelmä D1	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)	Kontrolli D1	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)
M301 H1* dtibia	5,311	-	0,076	M309 H1* dtibia	11,286	255,142	0,976
M301 H3* dtibia	3,845	-	0,061	M309 H3* dtibia	6,593		0,398
M301 H4* dtibia	4,337	-	0,07	M309 H4* dtibia	9,153	260,616	0,407
M309 H5* dtibia	4,517	-	0,118	M301 H5* dtibia	6,038	187,981	1,067
M309 H7* dtibia	5,004	-	0,094	M301 H7* dtibia	8,411	229,006	0,364
M309 H8* dtibia	4,798	-	0,113	M301 H8* dtibia	4,757	121,766	0,52

HYLÄTTY

M348 H2 femur
M348 H3 femur
M301 H2* dtibia
M309 H6* dtibia

HYLÄTTY

M339 H2 femur
M339 H3 femur
M309 H2* dtibia
M309 H6* dtibia

Menetelmä D2	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)	Kontrolli D2	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)
M246 H5* ptibia	2,601	-	0,118	M253 H5* ptibia	2,878		0,068
M246 H7* ptibia	3,729	-	0,079	M253 H7* ptibia	5,168	266,185	0,179
M253 H9* ptibia	9,44	434,868	0,182	M246 H9* ptibia	11,196	425,318	0,425
M253 H10* ptibia	3,597	-	0,062	M246 H10* ptibia	9,241	412,839	0,351
M253 H11* ptibia	7,593	394,669	0,201	M246 H11* ptibia	6,717	307,619	0,245
M253 H12* ptibia	5,069	-	0,093	M246 H12* ptibia	11,337	423,771	0,336

HYLÄTTY

M246 H3* ptibia
M246 H4* ptibia
M246 H6* ptibia
M253 H8* ptibia

HYLÄTTY

M253 H3* ptibia
M253 H4* ptibia
M253 H6* ptibia
M246 H8* ptibia

Menetelmä B	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)	Kontrolli B	Puristus- lujuus(Mpa)	Kimmo- moduli (Mpa)	Absorboitu energia(J)
M332 H1* dtibia	3,406	-	0,050	M333 H1* dtibia	4,827	303,268	0,143
M332 H2* dtibia	4,856	-	0,087	M333 H2* dtibia	6,853	361,111	0,172
M332 H3* dtibia	5,173	-	0,073	M333 H3* dtibia	5,336	317,419	0,206
M332 H4* dtibia	3,235	-	0,044	M333 H4* dtibia	8,308	325,056	0,394
M333 H5* dtibia	9,619	425,198	0,154	M332 H5* dtibia	4,721	-	0,158
M333 H6* dtibia	3,505	-	0,069	M332 H6* dtibia	4,744	-	0,200
M333 H7* dtibia	6,587	392,113	0,109	M332 H7* dtibia	10,417	456,726	0,474
M333 H8* dtibia	5,266	-	0,117	M332 H8* dtibia	7,288	303,763	0,213
M307 H9 ptibia	2,517	-	0,035	M299 H9 ptibia	2,558	-	0,098

Menetelmä E3

HYLÄTTY

Kontrolli (E3)

HYLÄTTY