

BEREIDING EN HOUDBAARHEID VAN DE MATRIX

K. DE GROOT

1. Inleiding

Sinds enkele jaren is bekend dat allogene bot, mits ontkalkt op de juiste wijze, de unieke eigenschap bezit om na een allogene implantatie ongedifferentieerde cellen te transformeren tot osteoblasten. Ontkalkt bot (de matrix) wordt in bijna elk lichaamsweefsel geïnfiltrerd door bindweefselcellen, die na vermenigvuldiging de matrix inwendig resorberen. In de zo ontstane holten verschijnen omstreeks 15 dagen na de operatie de eerste osteoblasten en daarmee ook nieuw bot en osteocyten. Na 4 weken is er volledige botvorming met beenmerg (Urist et al., 1965).

Er zijn sterke aanwijzingen, dat deze differentiatie veroorzaakt wordt door een eiwit, dat weliswaar opgesloten zit in de collageenmatrix, maar er niet een deel van is. In het bot bevindt zich, behalve dit „bone morphogenetic protein” (BMP), tevens een enzym (BMPase), dat onder bepaalde omstandigheden in staat is het BMP te vernietigen, of op andere wijze te inactiveren.

Niet-ontkalkt bot is niet of nauwelijks in staat mesenchyma te differentiëren tot osteoblasten, hoogstwaarschijnlijk omdat het mineraal een zuiver fysieke barrière is voor binnenkomende ongedifferentieerde cellen.

Het behoeft nauwelijks een verder betoog dat de aanwezigheid van BMP ontkalkt bot tot een biomateriaal maakt van groot belang voor zowel klinische toepassingen als verder fundamenteel onderzoek in de tandheelkunde en in ruimere zin elke tak van de medische wetenschap die geïnteresseerd is in harde weefsels. Nu al worden (sporadisch nog) klinische toepassingen vermeld. De genezing van gecompliceerde beenbreuken wordt versneld en soms zelfs mogelijk gemaakt in gevallen waarin dat voordien niet kon.

Kaakfracturen helen sneller en vollediger, terwijl alveolaire defecten (ontstaan door bijvoorbeeld totale extracties of door degeneratie) klinisch al behandeld worden met ontkalkt bot.

Recente onderzoeken hebben duidelijk gemaakt dat niet alleen bot, maar ook dentine een dergelijk BMP-BMPase-systeem bevat (Yeomans et al., 1967; De Groot et al., 1972). Ontkalkt dentine leidt na implantatie dus tot de differentiatie van ongedifferentieerde cellen tot osteoblasten – niet tot odontoblasten. Hieruit volgt dat zowel bot als dentine, na ontkalking, hetzelfde BMP bezitten, althans wat betreft het botinductieve vermogen. Doordat tevens dentine deze eigenschap bezit, is een potentieel grote bron van botinducerend materiaal aanwezig: elk praktizerend tandarts kan op eenvoudige wijze matrices bereiden met bovengenoemde eigenschappen.

De bedoeling van dit artikel is dan ook onderzoeken, speciaal gericht op de stabiliteit en de houdbaarheid van botinducerende matrices, bereid uit dentine, te vermelden.

2. Materialen en methoden

Proefdieren

Als proefdieren werden gebruikt volwassen mannelijke ratten.

Bereiding van botinducerende matrices

Binnen 1 uur na extractie werden de snijtanden van ratten geïncubeerd in een 0.6 N HCl-oplossing, die afgekoeld is tot 2°C.

De volumeverhouding tussen de te ontkalken tanden en de HCl-oplossing was omstreeks 1:100. De incubatie geschiedde tot de ontkalking volledig was, wat aangetoond kan worden door de calciumtoename in de

*) Research verricht in: Bone Research Laboratory of the University of California, Los Angeles (hoofd: Dr. M. R. Urist).

oplossing te meten met behulp van standaard-analysetechnieken, of door de calciumafname in de elementen te bepalen met röntgenfoto's. Na volledige ontkalking werden de resterende matrices ontdaan van de pulpa's, gewassen met gedestilleerd water, gevriesdroogd en tenslotte steriel bewaard. Er werd niet naar gestreefd eventuele resten van het cement te verwijderen.

Behandeling van botinducerende matrices voor implantatie

De matrices ondergingen een van de volgende behandelingen:

- de incubatie in 0.6 N HCl van pas geëxtraheerde elementen werd voortgezet tot 1 week na volledige ontkalking;
- de bewaartijd na vriesdroging tot de implantatie werd gevarieerd van 0 dagen tot 1 jaar bij kamertemperatuur;
- na de ontkalking in HCl werden de matrices geïncubeerd in buffers met verschillende pH's (pH 3.5: citraatbuffer en pH 7.0: fosfaatbuffer), gedurende verschillende tijden (1, 4, 7 en 12 dagen) en bij de temperaturen 2° en 37°C;
- na de ontkalking in HCl werden de matrices geïncubeerd in fosfaatbuffer pH 7.0, aangevuld met 0.003 M joodazijnzuur (een enzym-remmer), gedurende 1, 4, 7 en 12 dagen bij een temperatuur van 37°C.

Implantaties

Implantaties werden verricht in het weefsel van de rectus abdominalis.

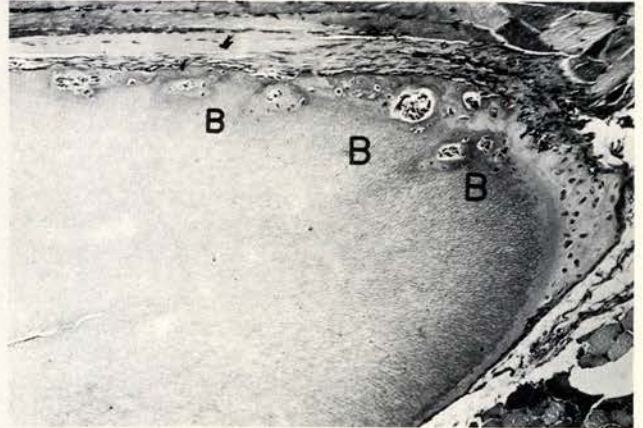
Karakterisering van de implantaties

Na 4 weken geïmplant te zijn, werden de matrices histologisch onderzocht op botinductie door te schatten welk percentage van de oppervlakte van een coupe nieuw bot voorstelde (zie afbeelding 1).

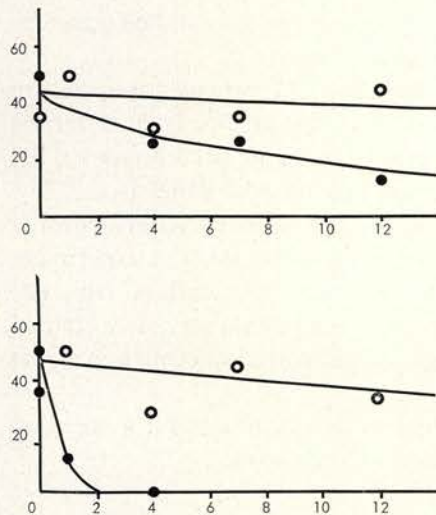
3. Resultaten

Variatie van de incubatietijd in 0.6 N HCl toonde aan dat incubatie voortgezet kan worden tot 3 dagen nadat volledige ontkalking was bereikt, zonder dat het BMP werd aangetast. Langere tijden gelatineerden de matrix met een daarmee gepaard gaand verlies aan activiteit.

Na vriesdroging kon de bewaartijd tot minstens 1 jaar uitlopen, zonder dat de botinductie noemenswaard veranderde. Dit houdt praktisch gezien in, dat in droge toestand de houdbaarheid nagenoeg onbeperkt is.

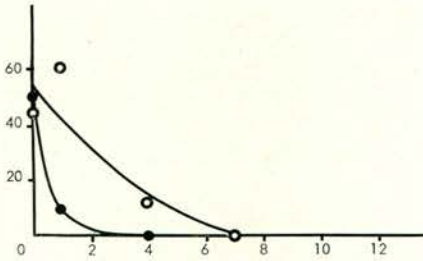


Afb. 1. Coupe (HEA-gekleurd) van een vier weken oude implant van ontkalkt dentine, die van te voren een dag geïncubeerd was in een buffer van pH 7 en temperatuur van 37 graden. Botinductie is kenbaar aan de osteoblastische activiteit (B).



Afb. 2. Deze figuur geeft weer de botinductie van ontkalkt dentine na incubatie onder verschillende condities. In beide grafieken is het gemiddelde percentage van het transplantaat-oppervlak dat osteoblastische activiteit vertoont, uitgezet tegen de incubatietijd (in dagen) in buffers met pH 3.5 (—○—○—○) en pH 7.0 (—●—●—●). Bovenste grafiek: temperatuur van de buffers 37 graden; onderste grafiek: 2 graden.

De incubaties in de diverse buffers onder variabele condities beïnvloeden de botinductie zoals weergegeven in afbeelding 2. We zien daaruit dat bij 37° en pH 7.0 reeds na 1 dag het BMP sterk in activiteit vermindert, terwijl bij een pH 3.5 de activiteit tot na 12 dagen nagenoeg onveranderd blijft. Dit is in overeenstemming met eerdere experimenten, waaruit de



Afb. 3. Deze figuur laat zien wat het effect is van incubatie in een oplossing die enzymremmer bevat. De botinductie, als in afb. 2, uitgezet tegen de incubatietijd in dagen.

—○—○—○— : buffer pH 7.0, 37 graden, 3 mM joodazijnzuur.
—●—●—●— : buffer pH 7.0, 37 graden.

aanwezigheid volgde van het enzym BMPase met een pH optimum van 7.0 (De Groot et al., 1972). Uit afbeelding 2 volgt dus, dat de activiteit van het enzym volledig onderdrukt wordt in een zuur milieu gedurende minstens 12 dagen.

Bij lagere temperaturen, 2°C, zien we tot op zekere hoogte hetzelfde resultaat: bij pH 7.0 is de stabiliteit van BMP minder groot dan die bij pH 3.5, hoewel het enzym bij die temperaturen minder actief is.

Afbeelding 3 laat zien hoe de hoeveelheid nieuw bot is nadat enzymremmer is toegepast. Dit experiment bewijst dat naast een zwak zuur milieu, ook een voorbehandeling met enzymremmer stabiliserend werkt op het „bone morphogenetic protein” van dentine.

Cementresten bleken geen aantoonbare invloed op het osteogene effect uit te oefenen.

4. Discussie

De resultaten laten duidelijk zien dat op relatief eenvoudige wijze een biomateriaal te verkrijgen is dat de potentie heeft bot te induceren. Door er zorg voor te dragen dat het enzym BMPase niet in staat is het BMP te inactiveren, kan men de houdbaarheid van het actieve materiaal, dat overblijft na ontkalking, sterk verlengen.

De resultaten leiden tot de volgende standaardprocedure voor het produceren van een botinducerend biomateriaal.

Zo snel mogelijk, zeker binnen een uur, na extractie dient het element geïncubeerd te worden in een oplossing van 0.6 N HCl, die een temperatuur heeft van omstreeks 2°C. Na de ontkalking (compleet na ongeveer 6 uur voor rattetanden en 48 uur voor menselijke tanden) worden de matrices gewassen in gedestilleerd

water en gevriesdroogd, waarna de houdbaarheid nagenoeg onbeperkt is.

De incubatie in het zuur kan tot 3 dagen langer duren dan strikt noodzakelijk is voor de ontkalking, terwijl het vriesdrogen circa 14 dagen uitgesteld mag worden, mits de ontkalkte matrices bewaard worden in een zwakzure oplossing, die koud (2°C) gehouden wordt. Als deze temperatuur (2°C) niet gehandhaafd kan worden, kan men de houdbaarheid van de matrix verlengen door toevoeging van een enzymremmer aan de zwakzure oplossing. Deze laatste gegevens verlenen de procedure een flexibiliteit die het ook voor geïnteresseerde tandartsen, niet verbonden aan een instelling met geavanceerde wetenschappelijke apparatuur, mogelijk maakt grotendeels zelf het materiaal te bereiden.

Zoals reeds vermeld, heeft men dan een materiaal dat in staat is om op elke gewenste plaats (het periodontium bijvoorbeeld, of ter plaatse van fracturen) botgroei te induceren.

Omdat klinische toepassingen slechts van zeer recente datum zijn, is er nog geen sprake van vaststaande technieken.

Een nauwe samenwerking tussen materiaalkundigen, tandartsen en orthopeden lijkt gewenst om zo spoedig mogelijk de potentiële mogelijkheden van botinductie om te zetten in reële toepassingen.

Samenvatting:

1. Recente onderzoeken hebben het bestaan aangetoond van een eiwit in dentine dat botgroei kan induceren, het BMP en een enzym dat dit eiwit kan inactiveren, het BMPase.
2. In dit artikel wordt ingegaan op de houdbaarheid van dit BMP-complex.
3. Een voorschrift is gegeven, dat elke tandarts in staat stelt zelf een botinducerend biomateriaal te bereiden uit dentine.

Summary:

Title: Bone induction by teeth.

1. Recent investigations have shown that dentin contains a bone morphogenetic protein (BMP) and a neutral protease, BMP-ase, capable of rendering inactive the BMP.
2. In this article investigations are reported, concerning the stability of the BMP complex of dentin.
3. Guidelines are given for the preparation of a biomaterial, capable of inducing new bone, and prepared of dentin.

Literatuur:

1. Urist M. R. (1965): Bone: Formation by autoinduction. Science Vol. 150: 893-899.
2. Yeomans, J. D., M. R. Urist (1967): Bone induction by decalcified dentin implanted into oral, osseous and muscle tissues. Archs. Oral Biol. Vol. 21: 999-1008.

3. Huggins C., S. Wiseman, A. H. Reddi (1970): Transformation of fibroblasts by allogenic and xenogenic transplants of demineralized tooth and bone. J. Exp. Med. Vol. 132: 1250-1258.
4. Urist M. R., H. Iwata (1972): Preservation and biodegradation of the morphogenetic property of bone matrix. J. Theoret. Biol., in druk.

5. Groot, K. de, M. R. Urist (1972): Bone induction by and recalcification of alloigenous dentin. Artikel ingestuurd naar Archs. Oral Biol.
6. Groot, K. de, A. Deshmukh (1972): The subcutaneous implantation of xenogeneic decalcified teeth. Artikel aangenomen in J. of Periodontology.

Adres: Dr. K. de Groot,
De Boelelaan 1115,
Amsterdam.

WORTELRESORPTIES AAN TWEEDE MOLAREN ONDER INVLOED VAN OPDRINGENDE DERDE MOLAREN

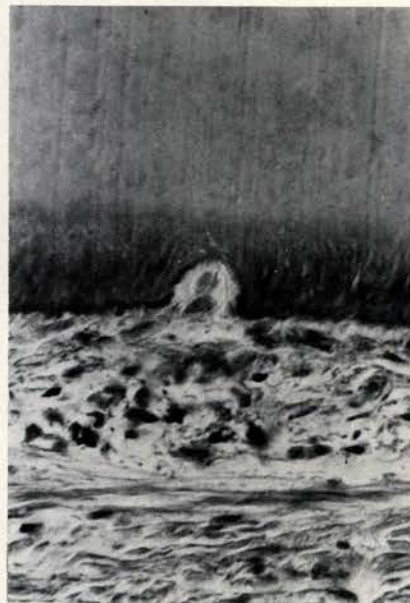
P. CH. MAKKES

Over de achtergronden van het mechanisme van resorptie van harde tandweefsels is weinig met zekerheid bekend. Niettemin, of juist daardoor, zijn er vele hypothesen ontwikkeld. De meeste onderzoekers zijn het er tegenwoordig wel over eens, dat resorptie van bot en van harde tandweefsels is gekenmerkt door de aanwezigheid van reuzencellen, veelal osteoclasten genoemd. Sommigen noemen de osteoclasten in geval van dentineresorptie dentinoclasten en odontoclasten en bij resorptie van wortelcement spreken zij van cementoclasten. Anderen vinden dit onderscheid onnodig en verwarrend, gezien ook het feit, dat het proces waarschijnlijk in wezen niet verschilt van botresorptie. Het gebruik van het woord osteoclast bij resorptie van harde tandweefsels is evenwel ook niet helemaal gelukkig te noemen.

Duursma (1971) beschrijft de osteoclasten als volgt:

„De grote veelkernige osteoclasten met een borstelzooam aan de zijde van het botoppervlak en liggende in een oppervlakkige holte, die Howshipse lacune wordt genoemd (zie afb. 1 en 2 - M.) zijn reeds in 1873 door Kölliker beschreven. Vorm en inhoud van de cellen kunnen sterk variëren. Het gemiddelde aantal kernen wordt geschat op 50 à 100 (Hancox, 1956). De borstelzooam ontstaat door plooiing van de celmembran (Cameron e.a., 1964; Knese, 1970). Blijkens cinemikrografische waarnemingen kunnen osteoclasten zich snel in verschillende richtingen langs het botoppervlak verplaatsen. Er zijn cellen, die amoëboïde

bewegingen maken, andere voeren waggelende bewegingen uit. Deze laatste cellen kunnen lange tijd bij het botoppervlak verblijven zonder dat er tekenen van resorptie te zien zijn. Plotseling begint dan de afbraak van het bot. Dit duurt slechts een beperkte periode, waarna in de aanwezigheid van de cellen enige



Afb. 1. Resorptie van het wortelcement: een osteoclast in zijn Howshipse lacune. Boven dentine en onder vezels en cellen van het parodontium. Vergroting 500 x. Patiënt nr. 1.

Uit de afdeling
Conserverende tandheelkunde
van de Universiteit van
Amsterdam.
Hoofd: Prof. Dr. J. B. Visser.