

VERHOOGDE BOTANMAAK EN VERLAAGDE BOTRESORPTIE IN MUIZECALVARIA

Een *in vitro* onderzoek bij mechanische belasting

Oorspronkelijke bron: Increased bone formation and decreased bone resorption in fetal mouse calvaria as a result of intermittent compressive force *in vitro*. *Bone and Mineral* 1987; 2: 441-8.

Bekroond met jubileumprijs

J. Klein-Nulend, celbiologe
J. P. Veldhuijzen, celbioloog
E. H. Burger, celbiologe

Uit de afdeling Orale Celbiologie van het Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA).

Adres: J. P. Veldhuijzen, postbus 7161, 1007 MC Amsterdam.

1. INLEIDING

Mechanische stress heeft invloed op botweefsel. Zware lichamelijke inspanning gedurende enige tijd gaf bij recruta een verhoogde botmassa in de benen te zien. Aan de andere kant blijkt dat bij een ontbreken van mechanische stress de botmassa vrij snel afneemt. Ook binnen de tandheelkunde is bekend dat afwijkingen in het normale belastingspatroon van het tandkaakstelsel leiden tot veranderingen in het botweefsel.

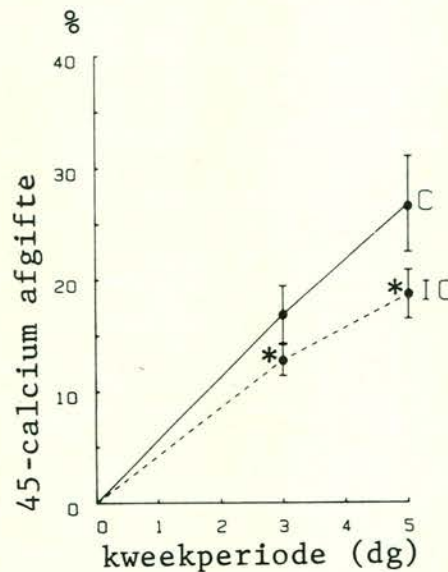
Omdat *in vivo* onderzoek naar de cellulaire reacties van het botweefsel moeilijk is, is een model ontwikkeld waarmee *in vitro* de cellulaire reacties van botweefsel op mechanische belasting kunnen worden bestudeerd.

2. MATERIAAL EN METHODE

2.1. Onderzoekmodel

Voor onderzoek naar de invloed van mechanische krachten op de aanmaak en de afbraak van botweefsel wordt van eenzelfde modelsysteem gebruik gemaakt. Hierdoor worden halve schedeldakjes (calvaria) van 17 dagen oude muizefoetussen gebruikt. Deze calvaria werden gekweekt in plastic multiwell weefselkweekplaten in een geschikt vloeibaar weefselkweekmedium (300 μ l/well), waarin deze orgaan-tjes, goed functionerend, gedurende vijf dagen in leven worden gehouden.

De experimentele groep calvaria werd blootgesteld aan mechanische kracht, een andere groep fungeert als controle. Uit eerder onderzoek is een opstelling ontwikkeld om botweefsel (calvaria en pijpbeentjes) in weefselkweekplaten bloot te stellen aan een intermitterende mechanische kracht (IC = intermitterende compressie). Hiervoor werden de experimentele weefselkweekplaten geplaatst in een groot gesloten kweekvat waarin de gasfase intermitterend kon worden gecompriëerd (130 mbar boven de normale luchtdruk met een frequentie van 0,3 Hz). Berekend kon worden dat de zo ontstane samendrukking



Afb. 1. Effect van intermitterende compressie (IC) op de percentuele cumulatieve afgifte van ⁴⁵calcium uit geprelabelde halve foetale muizecalvaria *in vitro*. (Gemiddelde \pm standaarddeviatie; n=12; * p<0,001)

in dezelfde orde van grootte lag als de maximale physiologische kracht, die spieren *in vivo* op foetale pijpbeentjes uitoefenen.

Voor de bestudering van de botaanmaak, waarvoor osteoblasten verantwoordelijk zijn, werden de calvaria gekweekt in een medium waaraan radioactief calcium (⁴⁵Ca) is toegevoegd. Tijdens de kweekperiode ging de botaanmaak en dus ook de verkalking door. Het tijdens de kweekperiode aangelegde bot zal dus voor een groot deel bestaan uit radioactief gelabeld mineraal. Door na afloop van het experiment de totale hoeveelheid radioactief calcium in de calvaria te meten, kan de botaanmaak door osteoblasten worden bepaald. Daarnaast is ook de activiteit van het enzym alkalische fosfatase (AP) bepaald, dat als maat kan worden gebruikt voor de activiteit van osteoblasten.

Voor de bestudering van de botafbraak door osteoclasten werden de zwangere muizen een dag tevoren ingespoten met

⁴⁵Ca. Gedurende de dag voorafgaande aan het *in vitro* experiment wordt dan in utero een deel van het gelabelde calcium ingebouwd in de foetale calvaria. Deze geprelabelde calvaria werden na het uitprepareren gekweekt in een kweekmedium dat geen radioactief label bevatte. Tijdens de kweekperiode werd door de activiteit van de botafbrekende osteoclasten botmineraal geresorbeerd dat vervolgens in het medium terecht kwam. Een belangrijk deel van dit geresorbeerde botmineraal is geprelabeld met ⁴⁵Ca. Door nu regelmatig in het medium de hoeveelheid ⁴⁵Ca te bepalen en na afloop van het experiment ook de in de calvaria resterende hoeveelheid ⁴⁵Ca te bepalen, kon een maat verkregen worden van de activiteit van de botafbrekende cellen.

Tenslotte is, om een indruk te krijgen van de absolute hoeveelheid mineraal, de totale hoeveelheid calcium en fosfor in de calvaria bepaald met behulp van atoomabsorptie en colorimetrische technieken.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1. Botaanmaak

Uit de metingen van de inbouw van ⁴⁵Ca in calvaria (tabel I) bleek, dat als gevolg van de intermitterende mechanische belasting (IC) de mineralisatie duidelijk verhoogd is (toename van 21% en van 49% resp. voor twee experimenten). Een experiment met dode calvaria (door de calvaria drie maal in te vriezen en te ontdooien) liet wel een opname van ⁴⁵Ca zien, maar geen enkel effect van IC.

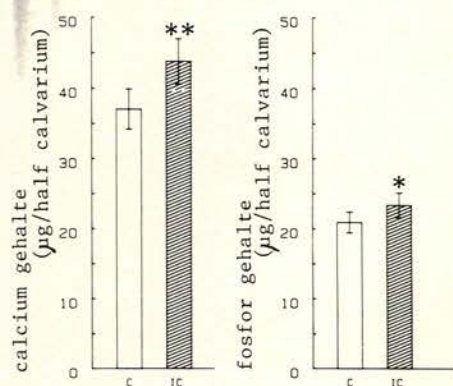
De opname van ⁴⁵Ca moet in deze dode calvaria worden toegeschreven aan fysisch-chemische (uitwisselings)processen. Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat IC een cellulaire reactie van osteoblasten veroorzaakt, resulterende in een toegenomen mineralisatie van het bot. Deze conclusie wordt ondersteund door de bepalingen van de activiteit van het enzym alkalische fosfatase (AP). In calvaria die gedurende vijf dagen waren blootgesteld aan IC werd een significante verho-

ging van de AP-activiteit ten opzichte van de controlegroep gevonden (tabel II). Verschillen in absolute waarden tussen de drie experimenten zijn waarschijnlijk gerelateerd aan de tijd dat de calvaria voorafgaand aan de bepaling bij lage temperatuur zijn bewaard, hetgeen tot enig verlies van enzymactiviteit heeft geleid. De IC/controlewaarden van ieder experiment duiden echter op een toegenomen AP-activiteit ten gevolge van IC.

3.2. Botresorptie

In afbeelding 1 wordt het effect van IC op de resorptie van botmineraal getoond. In tegenstelling tot de effecten op de botaanmaak, is de botafbraak duidelijk geremd door IC (-24% na drie dagen en -30% na vijf dagen). De cellen die voornamelijk verantwoordelijk zijn voor botresorptie zijn de osteoclasten. Bekend is dat systemische factoren, zoals hormonen die betrokken zijn bij de regulatie van het serumcalciumgehalte, ook de activiteit van de osteoclasten (mogelijk indirect) beïnvloeden. In deze studie is voor het eerst aangevoond dat de botresorptie door osteoclasten ook gereguleerd kan worden door een stimulus die het effect van mechanische belasting min of meer nabootst.

Het ontbreken van een mechanische stimulus (zoals in onze controlesituatie) leidt tot een verhoogde osteoclastische activiteit (botresorptie) en tot een verminderde activiteit van osteoblasten (botaanmaak).



Afb. 2. Effecten van intermitterende compressie (IC) op het calcium- en fosforgehalte van foetale muizecalvaria *in vitro*. Calcium- en fosforgehalten uitgedrukt per half schedeldak, per vijf dagen kweek onder controlecondities (c) en onder intermitterende compressie (IC). (Gemiddelde en standaardfout; n=25; * p<0,05, ** p<0.001).

Tabel I. Effect van intermitterende compressie (IC) op de alkalische phosphatase-activiteit in foetale muizecalvaria *in vitro*. (Gemiddelde \pm standaard deviatie.)

| Experiment | Alkalische phosphatase-activiteit ($\mu\text{mol/l}$)/ μg drooggewicht/uur. | | | | |
|------------|---|--------------|---------|----|------|
| | controle (C) | IC | p | n | IC/C |
| 1 | 9 \pm 3 | 22 \pm 5 | < 0,001 | 10 | 2,87 |
| 2 | 55 \pm 28 | 76 \pm 24 | < 0,05 | 8 | 1,68 |
| 3 | 68 \pm 21 | 116 \pm 16 | < 0,001 | 6 | 1,79 |

Tabel II. Effect van intermitterende compressie (IC) op de incorporatie van ^{45}Ca in foetale muizecalvaria. (Gemiddelde \pm standaard deviatie.)

| Experiment | ^{45}Ca incorporatie ($\times 10^3$ dpm/half schedeldak) | | | | |
|------------|---|---------------|--------|---|------|
| | Controle (C) | IC | p | n | IC/C |
| 1 (levend) | 358 \pm 41 | 432 \pm 62 | < 0,05 | 6 | 1,21 |
| 2 (levend) | 278 \pm 80 | 399 \pm 114 | < 0,05 | 6 | 1,49 |
| 3 (dood) | 206 \pm 58 | 233 \pm 21 | NS | 5 | - |

Dit resulteerde, zoals in afbeelding 2 wordt getoond, in een absoluut lagere hoeveelheid calcium en fosfaat (dus botmineraal) in de controlekweken (zonder mechanische stimulus in de vorm van IC) vergeleken met de onder IC gekweekte calvaria. Deze gegevens komen overeen met de gegevens over proefdieren tijdens ruimtevluchten, gesimuleerde gewichtloosheid en immobilisatie, waarin door het ontbreken van mechanische belasting de botmassa afneemt (disuse osteoporose). Deze controlegroep, zonder IC, lijkt sterk op een dergelijke disuse situatie en het is aannemelijk dat ons modelsysteem gebruikt kan worden voor het onderzoek naar de cellulaire aspecten van botaanmaak en botafbraak als gevolg van (langdurige) verandering in het normale belastingspatroon van botweefsel.

3.3 Mechanismen

In de *in vitro* opstelling is de intermitterende compressie (IC) van hydrostatische aard en heeft geen bepaalde richting. Daarentegen is de kracht, uitgeoefend op botweefsel, bijna altijd vectorieel. Echter de opbouw van de botmatrix, die naast het calciumfosfaat bestaat uit collageen en proteoglycanen, heeft een aanzienlijke

anisotropie. Dat betekent dat, ook al wordt het weefsel onderworpen aan een niet-vectoriële compressie, er toch in de diverse richtingen in het weefsel verschillende stress-strain relaties zullen ontstaan. Dit zal vooral in het niet-verkalkte osteoïd, leiden tot minimale vormveranderingen van het weefsel, evenals van de in het osteoïd aanwezige cellen (vnl. osteoblasten). Deze minimale verandering van de celvorm kan de biologische reactie van de cellen op IC initiëren en resulteren in een verhoogde botaanmaak. Als deze onderstelling juist is, dan bootst IC *in vitro*, de *in vivo* situatie na waarin bot blootgesteld is aan mechanische belasting.

Omdat osteoclasten, in tegenstelling tot de osteoblasten, maar een zeer beperkt contact hebben met de botmatrix, gaat de bovenstaande redenering niet op voor de beïnvloeding van osteoclasten door IC. Echter, uit *in vivo* experimenten is bekend dat bepaalde hormonen, zoals PTH, en vitamine D hun effect op de osteoclastische botafbraak indirect uitoefenen via osteoblasten en/of osteocyten. Hierbij spelen waarschijnlijk door osteoblasten/osteocyten geproduceerde lokaal werkende factoren een regulerende rol. Of deze indirecte beïnvloeding van osteoclasten door IC in de *in vitro* opstelling ook het geval is moet nog nader onderzocht worden.