In-vitro-Degradation von Biokeramiken

durch humane Osteoklasten*

Die durch Osteoklasten bewirkte Degradation von Keramiken wurde untersucht, um Wechselwirkungen zwischen Osteoklasten und Keramiken zu bestimmen, um somit die Qualität der Keramiken als günstiger Knochenersatz zu erstellen. Untersucht wird die Resorptionsaktivität der Osteoklasten auf Keramiken mit verschiedenen Lösungseigenschaften. Humane Osteoklasten wurden von einem Riesenzellentumor isoliert und auf Biokeramiken kultiviert: Hydroxylapatit (HA), β -Tricalcium Phosphat (β -TCP) und Kalzium Karbonat (Kalzit). Aktinmarkierung lässt das Zytoskelett erscheinen, und Keramikoberflächen wurden im Rasterelektronen-Mikroskop (REM) beobachtet. Auf allen Materialien erschien Aktin in seiner für Osteoklasten typischen Ringlokalisierung. REM-Aufnahmen zeigen einen deutlichen Unterschied in Form und Tiefe der Resorptionslagunen auf verschiedenen Keramiken. Auf reinem HA sind Degradationsflächen deutlich, jedoch nur oberflächlich sichtbar. Viele tiefe und gut begrenzte Resorptionslagunen erscheinen auf reinem β -TCP. Resorptionszonen auf reinem Kalzit sind ausgedehnt und wenig tief; Mikrorauheit wurde ebenfalls entdeckt.

F. Monchau^{1,2}, A. Lefevre¹, M. Descamps², P. Laffargue³, P. Linez-Bataillon¹, H.F. Hildebrand¹

Schlagworte: Kalzium-Carbonat – β -Trikalzium-Carbonat – humane Osteoklasten – Hydroxyapatite

Einleitung

Zahlreiche Faktoren, wie z. B. die Oberflächenchemie, die Größe, die Form, der Implantations-Ort, und die Implantations-Zeit, können die biologische Antwort auf einen implantierten Werkstoff beeinflussen. Die vielfachen, seit einigen Jahren durchgeführten Untersuchungen dienten vor allem zum besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Werkstoffen, Zellen und Gewebe, insbesondere solche, die Zellaktivierung und Zellkommunikation betreffen. [1]. Diese Aspekte der Material-Zellverhältnisse können mit In-vitro-Methoden wie Zellkulturen vom Menschen oder von der Ratte objektiviert werden [2].

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, welches ständig von Osteoklasten und Osteoblasten resorbiert und neu modelliert wird. Die klassische Definition von Osteoklasten ist eine vielkernige Riesenzelle mit Monozyten- und Makrophagen-Charakteristika. Osteoklasten sind für die hormonabhängige Knochenresorption verantwortlich. Sie überwachen und erhalten die Skelett-Integrität und den Kalzium-Phosphor-Haushalt [1]. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass Knochenresorption in besonderen Kompartimenten, den sog. Resorptions-Lagunen, abläuft, welche sich durch starkes Anhaften der Zellmembran rund um die Resorptionszone unter den Osteoklasten bilden [3].

Knochenersatz wird häufig nach Knochenbrüchen und Tumorsektion eingesetzt oder als Füllmaterial bei starker Osteoporose angewandt. Natürliche Ersatzwerkstoffe wie au-

tologer Knochen oder Koralle erscheinen als quasi ideale Materialien. Synthetische Werkstoffe, insbesondere Phosphor-Kalzium Keramiken, lösen immer mehr die natürlichen Ersatzwerkstoffe ab auf Grund ihrer hohen Biokompatibilität und auch, um Kontaminationsrisiken zu vermeiden [4-6].

Untersuchungen an den von Osteoklasten eingeleiteten Wirkungen sind ein neuer Weg, das biologische und auch biomechanische Verhalten von Keramiken zu untersuchen und damit die Wahl des Werkstoffs für den Knochenersatz zu steuern. Verschiedene Arbeiten haben die Rolle der chemischen Eigenschaften, der Kristallstruktur und der Korngröße des Biomaterials auf seine Löslichkeit geprüft [7], jedoch ist wenig über den Einfluss des physikalisch-chemischen Resorptionsverhalten bekannt. Das Ziel dieser Arbeit ist nun die Osteoklasten-Aktivität auf drei verschiedenen Keramiken zu bestimmen: Hydroxyapatit (HA), β -Trikalzium-Phosphat (TCP) und reines Kalzium-Carbonat. Dieses soll mit Mitteln der Zell-Morphologie und der Zytoskelett-Organisation und dem Auftreten der Resorptions-Lagunen erreicht werden.

Material und Methoden

Herstellung dichter Keramiken

Dichte Materialien werden durch die „slip casting“-Methode erhalten. Dazu wurden folgende käufliche Pulver angewandt: HA von Transtech (USA), β -TCP von Tomita (Japan) und Kalzium-Carbonat von Scora (Frankreich). Die Korngröße lag zwischen 0,5 und 2 μ m. Die Oberfläche wurde mit der BET-Methode bestimmt (Flow Sorb II 2300). Die erste Herstellungsphase war für alle Pulver ein Brei. Dieser bestand aus einer Keramik-Suspension in Wasser mit einer Dispersionssubstanz, wobei die Trockensubstanz mehr als 70 %

¹ Laboratoire de Recherches sur les Biomateriaux, Departement de Biophysique, UPRES EA 1049, Faculte de Medecine, 59045 Lille Cedex, France

² Laboratoire des Materiaux Avances Ceramiques, Universite de Valenciennes et du Hainaut Cambresis, 59600 Maubeuge, France

³ Service de Chirurgie Orthopedique C, CHRU, Hôpital Roger Salengro, 59037 Lille Cedex, France

* Zum 80. Geburtstag von Prof. Zwicker

war. Alle Breie wurden in Gipsformen zu Zylindern gegossen und getrocknet und dann bei hoher Temperatur gesintert. Die Dichte wurde mit dem Quecksilber-Porosimeter bestimmt (Pore Sizer 9310, Micrometrics).

Für die biologischen Tests wurden 2 mm dicke Prüfkörper (15 mm Ø) mit einer Diamantsäge geschnitten und mit SiC (Körnung) Papier geschliffen. Die Prüfkörper wurden dann den internationalen Normen entsprechend mehrfach in Alkohol und ultrareinem Wasser gewaschen. Die Keramik-scheiben wurden im Autoklaven bei 130° C sterilisiert.

Zur Beschleunigung der Zelladhäsion wurden die Prüfkörper in 24-well-Platten 2 Stunden vor der Zellinokulation in α -MEM-Kulturmedium (Gibco) gebracht, welches mit 10 % fötalem Kalbsserum (Eurobio) angereichert wurde. Die Anwesenheit von spezifischen extrazellulären Adhäsionsproteinen wie Fibronektin oder Vitronektin im Kalbsserum kann somit die Zelladhäsion fördern [8]. Zur Kontrolle wurden Prüfkörper ins Kulturmedium gelegt, aber ohne weitere Zellokulation.

Röntgen-Analyse

Die Reinheit der Prüfkörper wurde nach dem Sintern mit Röntgenmessungen für jeden Keramiktyp kontrolliert und nachgewiesen. Die Röntgendiffraktogramme wurden mit einem Siemens-Diffractometer aufgezeichnet ($\theta/2\theta$).

Humane Osteoklasten

Adulte humane Osteoklasten wurden aus einer Biopsie eines „Giant Cell Tumours“ isoliert [12, 12]. Dieser Tumor befand sich in der oberen Epiphyse der linken Tibia einer 30-jährigen Frau. Die histologische Analyse belegte einen gutartigen „Giant Cell Tumour“ oder Osteoklastom Grad 2 und Status B, d. h. die aktive Form. Dies Art von Tumoren ist sehr selten und stellt 5 bis 10 % primitiver Knochentumoren dar. Sie treten normalerweise in der Epiphyse von Langknochen auf.

Der Knochen wurde sofort nach dem operativen Eingriff in α -MEM von 37° C überführt. Die Gewebestücke wurden dann sofort in HEPES-gepuffertem Medium 199 (Gibco) zerkleinert. Die Osteoklasten wurden durch Pipetieren gesammelt. Sie wurden dann in folgende Kulturmischung gebracht: 45% α -MEM (Gibco), 45 % Dulbecco modified Eagle Medium mit Glutamax (Gibco), 5 % fötales Kalbsserum (FCS, Eurobio), 5 % neugeborenes Kalbsserum (NBCS, Eurobio) und Antibiotika (Gentamycin 50 µg/ml; Fungizone 250 µg/ml). Diese Suspension wurde gerührt und dann davon 500 µl/well auf jeden Prüfkörper in 24-well Platten gebracht. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37° C im CO₂ Brutschrank wurden nicht haftende Zellen sorgfältig entfernt, und jeder Well wurde dann mit 1 ml Kulturmedium neu gefüllt und bei 37° C in CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Inkubationsdauer auf den Keramik-Prüfkörpern war 48 Stunden.

Aktin-Markierung

Nach der 48-stündigen Kulturperiode wurden die Prüfkörper in PBS gewaschen und in 2 % Paraformaldehyd 20 min lang fixiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Zellen mit 2 % Triton X-100 20 min lang permeabilisiert und wieder in PBS gewaschen. Die Aktin-Markierung der Zellen erfolgte dann in mit Phalloidin konjugiertem 1,25 µg/ml FITC.

Nach weiterem Waschen in PBS wurden die Zellen in Glycerin montiert. Die Versuchsplättchen wurden dann unter dem LASER-Confocal-Raster-Mikroskop beobachtet (Leica TCS-NT).

Zell-Morphologie

Nach der 48-stündigen Kulturperiode wurden die Prüfkörper in PBS gewaschen und in mit 0,1 M Natrium Phosphat gepuffertem 2,5 % Glutaraldehyd 30 min lang fixiert. Dann wurden sie mit 1 % OsO₄ nachfixiert, in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit der „critical point“-Methode in CO₂ getrocknet, und schließlich mit Palladium besputtert. Die Zellmorphologie wurde unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) (Hitachi) bei 20 kV und 80 µA untersucht.

Analyse der Resorptions-Lagunen

Die von den Osteoklasten an der Keramikoberfläche hinterlassenen Resorptions-Lagunen wurden ebenfalls unter dem Rasterelektronenmikroskop (Hitachi) untersucht.

Diese Lagunen werden durch Trypsinisierung der Zellen freigelegt. Die Keramikplättchen werden dann getrocknet und mit Palladium besputtert. Die so freigelegten Lagunen werden aufgezeichnet und mit dem Bildanalyse-Software Sigma Scan Pro® ausgewertet. Von jeder Experimentgruppe werden drei Prüfkörper untersucht.

Ergebnisse

Physikalisch-chemische Charakteristika

Die physikalisch-chemischen Charakteristika jedes Keramikmaterials sind in Tabelle 1 angegeben. Zusätzliche Röntgen-Diffraktionsanalysen bestätigen die Reinheit der Keramiken. Nach dem Sintern wurden keine Fremdphasen entdeckt:

- im HA sind keine β -TCP Spuren zu entdecken,
- eine Degradation von β -TCP zu α -TCP ist nicht zu erkennen,
- die Spektren bestätigen den Calcit-Typ als einzige kristallographische Form des Kalzium-Carbonats.

Tab. 1: Physikalisch-chemische Charakteristika der verschiedenen Keramiken

Keramik	K _{sp}	Ca/P	Spezifische Oberfläche (m ² /g)	Mittlere Korngröße (µm)	Sinter-Temperatur (°C)	Relative Dichte (%)
HA	5.5 · 10 ⁻¹⁸	1.67	4.20	1.5	1275	98.7
β -TCP	2.07 · 10 ⁻³³	1.50	3.30	1.0	1110	98.5
CaCO ₃	4.96 · 10 ⁻⁹	--	2.71	1.5	890*	95.3
* Unter CO ₂ -Atmosphäre						

Biologische Charakteristika

Die Fluoreszenz-Lokalisierung zeigt deutlich die typische Ringstruktur der Aktinverteilung in den humanen Osteoklasten auf allen drei Keramiken (Abb. 1). Nach einer 48-stündigen Kulturdauer erscheint dieser Ring leicht unterbrochen auf dem HA, und deutlich fragmentiert auf dem β -TCP und dem Calcit.

Was die Zellmorphologie anbelangt, so erscheinen die Osteoklasten als ausgebreitete flache Zellen mit sphärischen Strukturen an ihrer Oberseite. Die Zellen erscheinen an einer Seite mehr auf dem Substrat haftend, wobei sie öfters gut entwickelte Lamellipodien zeigen. Auf der Gegenseite erscheinen zahlreiche Mikrovilli und Filopodien (Abb. 2a). Auf β -TCP kultivierte Osteoklasten haben einen etwas eingezo-

Abb. 1: Aktin-Markierung mit FITC-Phalloidin in humanen Osteoklasten nach Kultur auf (a) Hydroxylapatit, (b) β -Trikalzium Phosphat und (c) Kalziumcarbonat. Man beachte den unterbrochenen Aktinring in den Zellen die auf den verschiedenen Keramiken kultiviert wurden. Confocal LASER Mikrographien (x 800).

genen Aspekt, und die Resorptionszone unter den Zellen wird sichtbar. Die Zelloberseite ist rau und periphere Filopodien sind nicht erkennbar. Eine Zellseite oder ein Teil des Zellrandes haften jedoch immer am Substrat (Abb. 2b). Eine ähnliche Adhäsionspolarität wurde ebenfalls bei den auf Calcit gewachsenen Zellen beobachtet. Lamellepodien erscheinen auf der anhaftenden Seite, vielfache Filopodien am nicht-haftenden Zellrand (Abb. 2c).

Keramik-Resorption

REM-Aufnahmen zeigen, dass die humanen Osteoklasten unterschiedliche ausgehöhlte Resorptions-Lagunen produzieren, deren Form, Tiefe und Ausdehnung vom Werkstoff abhängen. Die Kontrollen von HA-, β -TCP- und Calcit-Prüfkörpern zeigen granuläre Strukturen mit glatter Oberfläche, an der man öfters Polierstreifen erkennen kann (Abb. 3a, b, c). Definierte Resorptions- oder Degradationszonen konnten auf den Kontrollplättchen nicht festgestellt werden. Klare Zerstörungszonen wurden auf dem HA festgestellt. Diese Zonen sind mit mehr als 80 μ m im Durchmesser sehr ausgedehnt. Sie sind mit nur geringer Tiefe sehr oberflächlich (Abb. 4a). β -TCP hingegen wird von den Osteoklasten gut ausgehöhlt. Die Resorptions-Lagunen sind klar abgegrenzt und tief, d. h. tiefer als die auf HA. Sie zeigen zahlreiche gut definierte Rundungen (Abb. 4b). Der Grund der Lagunen zeigt raue Strukturen, die aus zahlreichen Körnern (Mikrokugeln) mit einer Stärke von 0,1 bis 1 μ m zusammengesetzt sind. Im Gegensatz zu β -TCP sind die Degradations-

zonen auf den Calcit-Plättchen sehr ausgedehnt und oberflächlich. Zusätzlich ist der Grund der Resorptions-Lagunen durch kristalline Strukturen charakterisiert, die aus feinen parallelen Spitzen mit einer Dicke von 0,3 bis 0,5 μ m zusammengesetzt sind, d. h. also entschieden kleiner als die ursprüngliche Korngröße des Ausgangspulvers (Abb. 4c). Die angegriffenen Zonen zeigen somit eine Mikrorauigkeit.

Resorptions-Lagunen

In allen Fällen findet eine eindeutige Resorption aller drei Keramiken statt. Die Ergebnisse zeigen jedoch starke Variationen zwischen den einzelnen Keramiken (Tab. 2, Abb. 5).

Tab. 2: Resorptionsoberfläche nach Osteoklastenkultur

Keramik	Oberfläche (μ m ²)	Zahl der analysierten Zonen
HA	5834 $\pm$ 1842	21
β -TCP	2939 $\pm$ 1180	42
CaCO ₃	7521 $\pm$ 2782	24

Auf dem HA sind die Resorptionszonen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 86 μ m weit ausgedehnt. Wie oben schon erwähnt sind die Resorptionszonen auf β -TCP entschieden tiefer und weniger ausgedehnt mit einem mittleren Durchmesser von 61 μ m. Diese „Howship“-Lagunen

Abb. 2: Repräsentative REM-Aufnahmen humaner Osteoklasten nach 48-stündiger Kultur auf (a) Hydroxylapatit, (b) β -Trikalzium-Phosphat und (c) Kalzium-Carbonat. Die meisten Zellen sind auf einer Seite vom Substrat abgelöst, so dass die Resorptionszonen unter den Zellen sichtbar werden.

Abb. 3: REM-Aufnahmen von Keramik-Prüfkörpern nach 24-stündigem Verweilen im Kulturmedium: (a) Hydroxyapatit, (b) β -Trikalzium-Phosphat und (c) Kalzium-Carbonat. Keine Degradationszonen können festgestellt werden.

Abb. 4: REM Aufnahmen repräsentativer Degradationszonen nach 48stündiger Kultur auf (a) Hydroxylapatit, (b) β -TriKalzium Phosphat und (c) Kalzi-umcarbonat. Die tiefsten Resorptions-Lagunen wurden auf β -TCP beobachtet.

sind zahlreich und sehr gut abgegrenzt. Die Messungen der Resorptionszonen konnten auch auf dem Calcit durchgeführt werden, wobei sich ein mittlerer Durchmesser von 97 μm ergab.

Analysen des Kulturmediums

Nach der 48-stündigen Kultur der Osteoklasten auf den verschiedenen Keramikplättchen sind die Kulturmedien der mit und ohne Zellen inkubierten Prüfkörper auf ihren Phosphor- und Kalziumgehalt analysiert worden. Die Ergebnisse zeigen

Abb. 5: Mittlere Degradationsoberfläche nach 48-stündiger Kultur humaner Osteoklasten

P- und Ca-Konzentrationen, die von dem geprüften Keramik-Typ abhängen (Tab. 3, Abb. 5). Zum besseren Verständnis sind ebenso die Analysewerte des normalen Kulturmediums angegeben. Die P- und Ca-Konzentrationen des Kulturmediums ohne Zellen (Kontrollen) sind einheitlich und unabhängig vom Keramik-Typ. Im Gegensatz dazu sind sig-

nifikante Erhöhungen der Ca-Konzentrationen in den Kulturmedien festgestellt worden in denen gleichzeitig die Osteoklasten kultiviert wurden. Dieser Ca-Anstieg ist besonders auffallend für die Calcitplättchen.

Diskussion

Osteoklasten sind die grundlegend verantwortlichen Zellen für Knochenresorption, und ihre Aktivität ist insbesondere durch In-vitro-Versuche mit Nagetier-Osteoklasten an Knochen und Dentin bewertet [9, 13, 15]. Kanehisa und Heersche [15] haben an devitalisierten Knochenscheibchen gezeigt, dass die Osteoklasten-Aktivität durch Migration- und Resorptionsphasen charakterisiert ist und dass die Zellen während der Migration nicht resorbieren. Tatsächlich haben diese Zellen große Migrationkapazitäten, und die Migrationsgeschwindigkeit von Kaninchenosteoklasten auf devitalisierten Knochenscheiben wurde von diesen Autoren zwischen 248 $\mu\text{m}/\text{h}$ bestimmt.

In dieser Arbeit haben wir die Osteoklasten-Resorption in Kulturbedingungen auf verschiedenen Keramiken untersucht, um die Resorptionsaktivität dieser Zellen mit der Löslichkeitsrate der ausgewählten Keramiken zu vergleichen. Humane Zellen wurden gewählt, da sie die wahren Zielzellen für Knochenersatz darstellen. Die humanen Riesenzellen aus Knochentumoren besitzen die Osteoklasten-Charakteristika: Sie haben eine Zellmembran mit zahlreichen Mikrovilli, die den Bürstensaum darstellen. Sie weisen hohe saure Phosphatase und nicht-spezifische Esterase-Aktivitäten auf, positiven TRAP und besitzen außerdem den Calcitonin-Rezeptor [11].

Um den Zellen optimale Kulturbedingungen anzubieten, haben wir die Keramik Prüfkörper vor der Zellinokulation in fötales Kalbsserum getaucht. Damit haben wir einen Vorreinigungsfilm geschaffen, der die Zelladhäsion beschleunigen

Tab. 3: Ca- und P-Konzentrationen in den Kulturmedien nach 48-stündiger Kultur humaner Osteoklasten auf verschiedenen Keramiken

Analysen	Kalzium (mg/l)	Phosphor (mg/l)
Ausgangskulturmedien	77,0 ± 1,5	36,0 ± 1,0
Hydroxyapatit	71 ± 0,7	34 ± 1,3
Hydroxyapatit + Osteoklasten	85,5 ± 2,0	45,0 ± 2,0
β-TriKalzium Phosphat	75,0 ± 4,0	37,0 ± 2,0
β-TriKalzium-Phosphat + Osteoklasten	89,5 ± 1,5	46,5 ± 2,5
Kalziumcarbonat	72,0 ± 4,0	34,0 ± 1,0
Kalziumcarbonat + Osteoklasten	91,5 ± 3,5	29,5 ± 2,5

soll. Dieser Film besteht hauptsächlich aus Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Fibronectin und Vitronectin. Jede Keramik wurde simultan dem Kulturmedium ohne Zellen ausgesetzt, um den Nachweis zu bringen, dass die Keramikresorption in der Anwesenheit von Osteoklasten verschieden abläuft und um die erscheinenden Resorptions-Lagen und andere Ereignisse oder eventuell erscheinende Präzipitate besser bewerten zu können.

Es sollte dabei unterstrichen werden, dass die von der humanen Biopsie erhaltene Zellpopulation nicht nur Osteoklasten enthält, sondern eine Mischung von verschiedenen Zelltypen, u. a. Fibroblasten und Monozyten. Somit mussten die REM-Beobachtungen zur Morphologie-Bestimmung sehr sorgfältig durchgeführt werden: Nur Zellen, die eine Resorptionszone bedeckten wurden für diese Arbeit in Betracht gezogen. Dabei ist die Aktin-Markierung die den für Osteoklasten typischen Adhäsionsring belegt, eine der besten Methoden, den Osteoklasten-Phänotypen zu betätigen.

Die Zelladhäsion geschieht mit dem Auftreten primärer Podosomen, welche durch intramembranäre Integrine (wie $\alpha_v\beta_3$) gebildet werden, den Verbindungsmolekülen zwischen extrazellulärer Matrix und den intrazellulären Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Diese letzteren binden an die Integrine über z. B. Vinculin und Talin und einigen Enzymen, um den sog. „fokalen Adhäsionskontakt“-Komplex zu bilden. Die Besonderheit von Osteoklasten ist, dass alle fokalen Adhäsionskontakte der Zelle zu einem Ring angeordnet sind, der an der Peripherie der Zelle seinen Platz findet. Diese intime Haftung ist notwendig zum Aufbau eines engen Kontakts mit der mineralisierten Oberfläche und zum Entstehen einer hermetisch abgeschlossenen Resorptionszone [3, 16, 17]. Auf diese Weise erlaubt die Integrität des Aktinringes Rückschlüsse auf die Qualität der Osteoklasten-Adhäsion und somit der Resorption zu schließen.

Unter diesen Adhäsionsbedingungen kann nun die Knochenresorption unter dem sog. Bürstensaum in den Resorptions-Lagen stattfinden, in denen der Osteoklast ein extrazelluläres saures Kompartiment erzeugt. Diese Ansäuerung ist wohl der wesentliche Vorgang, der die Zersetzung der Knochenkristalle oder der Keramiken steuert, wie in dieser In-vitro-Untersuchung [3, 16, 17]. Diese Ringkonfiguration ist in den humanen Zellen auf allen Keramiken anwesend: leicht unterbrochen auf HA und deutlich

fragmentiert auf β-TCP und auf Calcit.

Die verminderte Integrität dieses Aktinringes kann verschieden erklärt werden: entweder sind die Zellen in eine Migrationphase getreten und haben demzufolge eine verminderte Adhäsion, oder die Zellaktivität hat deutlich nachgelassen. In Anbetracht dessen, dass nicht eine Zelle mit gänzlich geschlossenem Aktinring beobachtet wurde, scheint uns die letztere Hypothese mehr begründet zu sein. Die Verminderung der Zelladhäsion kann möglicherweise durch eine Anreicherung der Resorptionsmetaboliten entstehen, die zwar im lebendem Organismus vor Ort gebracht werden können, nicht aber in einem geschlossenen Kulturgefäß. REM-Beobachtungen zeigten mehrfach Zellen in einem abgelösten

Status, welcher wieder die fehlende Integrität des Aktinringes bestätigt. Kürzere Kulturzeiten könnten eventuell andere und präzisere Auskünfte über die Aktinverteilung geben.

Redey et al. haben an Osteoklasten von neugeborenen Ratten gezeigt, dass der Aktinring seine beste Konfiguration bereits nach einer vierstündigen Kulturperiode hat [18]. Jedoch ist das Vorhaben dieser Arbeit keine Untersuchung der Kinetik oder Dynamik der Osteoklastenadhäsion, sondern der Resorptionsunterschiede von Osteoklasten bei drei verschiedenen Keramiktypen. Hierzu waren längere Kultur- und Resorptionszeiten notwendig.

REM-Untersuchungen haben ebenso gezeigt, dass die Substratfläche unter den Zellen resorbiert wurde. Verschiedene Parameter sind für die unterschiedlichen Degradationsformen verantwortlich: die Oberflächenreaktivität der Keramiken, ihre chemische Zusammensetzung, ihre kristalline Struktur und der Säuregrad in dem von den Osteoklasten gebildeten Kompartiment.

Die Osteoklastenaktivität ist hier durch das Ausmessen der Projektionsflächen der Lagunen Resorptionszonen ausgewertet. Aus technischen Gründen konnte die Tiefe und somit das Volumen nicht in Betracht gezogen werden, was natürlich präzisere Aussagen erlaubt hätte. Bei der Volumenbestimmung wären dann auch sicher die großen Unterschiede zwischen den Keramiken, die wir bei den Lagunenmessungen erstellt haben, zusammengeschrumpft. Andererseits können die sehr ausgedehnten Resorptionszonen auf HA und Calcit auch auf Grund einer erhöhten Zellmobilität auf

Abb. 6: Ca- und P-Konzentrationen in den Kulturmedien

diesen Substraten zurückzuführen sein, da eine schnellere Fortbewegung ein tieferes Ausätzen nicht zulässt.

Die Zellen erzeugten eine erosionsähnliche Degradation auf HA, die Zonen sind oberflächlich und weit ausgedehnt. Die Bildung von Ausläufern wurde nicht festgestellt. Dazu sind gegensätzliche Ergebnisse bekannt: Doi et al. [19] haben berichtet, dass Osteoklasten-Knochen von Kaninchen und gesintertes Carbonatapatite resorbieren, nicht aber gesintertes HA. Andere Autoren [20] belegen, dass HA in vitro resorbiert wird. Wie vorher schon angedeutet, können der Oberflächenzustand und die Korngröße bedeutende Faktoren sein, die die Resorption beeinflussen [21]. Auch die Reinheit der für die In-vitro-Versuche gebrauchten Zellpopulation kann einen Einfluss haben, und verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die Ausbreitung der Resorptionszonen proportional zur Menge der anwesenden Osteoblasten in der Osteoklastenkultur waren [22].

Tiefe Resorptions-Lagunen mit mehreren gut abgegrenzten Ausläufern wurden auf β -TCP beobachtet. Diese Formen wurden auch von anderen Autoren beschrieben [22]. Dazu wurden auch längere Lagunenzüge mit kontinuierlicher Resorption und gleicher Tiefe auf β -TCP beobachtet.

Die Oberflächen von reinem Calcit zeigten diskontinuierliche Resorption mit vielfachen regelmäßigen kristallinen Spitzen. Diese Erosionszonen sind sehr weit ausgedehnt und sehr oberflächlich. Dieses In-vitro-Modell zeigt eine starke Mikrorauigkeit, deren Ähnlichkeit mit in vivo degradiertem Calcit unterstrichen werden muss. Fujita et al. [23] haben eine ähnliche Mikrorauigkeit auf Calcitstücken nach achtwöchiger intramuskulärer Implantation in Kaninchen nachgewiesen. Diese ähnlichen Ergebnisse von In-vivo-Experimenten bringen eine gute Validation unserer In-vitro-Untersuchungen, welche leichter als laufende Degradationsversuche an Keramiken durchzuführen sind.

Die extrazellulären Kalziumkonzentrationen können einer der wichtigsten Faktoren sein, die die Osteoklastenaktivität beeinflussen. Diese bewirkt gleichzeitig ein Ansteigen der intrazellulären Kalziumkonzentration, was eine Inhibition des Resorptionsvermögens einleitet und damit das Ablösen der Osteoklasten von der Knochenoberfläche.

Die Analysen der Kulturmedien haben signifikante Unterschiede ergeben. In Abwesenheit der Zellen sind die Kalziumkonzentrationen auf den Prüfkörpern geringer als im Ausgangskulturmedium selbst. Diese Unterschiede sind eventuell auf ein Gleichgewicht Lösung - Präzipitat auf der Keramikoberfläche zurückzuführen [24].

Was den Phosphor anbelangt, sind seine Konzentrationen im Kulturmedium höher für das HA und β -TCP als für das Calcit. Dies liegt sicher an der Degradation der Phosphor-Kalzium-Keramiken durch die Osteoklasten. Beim Calcit kann die Phosphorkonzentration nicht ansteigen, da dieses Element nicht in der Keramik enthalten ist. Man stellt allerdings hier einen leichten Abfall der Phosphorkonzentration fest, welcher durch eine Phosphoraufnahme von den Zellen oder einen Niederschlag auf der Calcitoberfläche bedingt sein kann.

Der Anstieg der Kalzium- und Phosphorkonzentrationen in den Kulturmedien bestätigen das Auflösen der Keramiken durch die Osteoklastenaktivität und nicht durch das biologische Medium allein. Allerdings ist es schwierig, die Keramikdegradation quantitativ durch die globalen Kalziumkonzentrationen in den Kulturmedien richtig einzuschätzen, da verschiedene Faktoren gemeinsam dazu beitragen können:

* die Keramiken besitzen unterschiedliche Kalziumkonzentrationen;

* bei gleicher inokulierter Zellzahl kann die Osteoklastenzahl

verschieden sein;

* die gemessenen Kalziumkonzentrationen tragen den eventuellen Niederschlägen keine Rechnung.

Außerdem kann die lokale Kalziumkonzentration in dem hermetisch abgeschlossenen Kompartiment zwischen der Zelle und dem Substrat eine entscheidende Rolle auf das Osteoklastenverhalten spielen. Die Vorgänge der Osteoklastenaktivität sind sehr komplex und bleiben zur Zeit noch größten Teils unverstanden.

Zusammenfassend bringt diese Arbeit den Nachweis für ein verschiedenes Resorptionsverhalten humaner Osteoklasten auf Biokeramiken. Dies ist auf die physikalisch-chemischen Unterschiede der Keramiken zurückzuführen. Die unterschiedlichen Ergebnisse erscheinen unter allen angewandten analytischen Methoden, d. h. Form, Ausdehnung und Tiefe der Resorptionszonen, Morphologie der Zellen und Integrität des Aktinringes.

Abstract

Investigations on the ceramic degradation caused by osteoclasts are designed to assess osteoclast/ceramic interactions and to determine which ceramics are more suitable for use as bone substitute. This study investigated the resorption activity of osteoclasts on ceramics presenting different solubility rates. Osteoclasts isolated from human giant cell tumour were cultured on different bioceramics: hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate and Calcium carbonate (calcite). Actin labelling revealed cytoskeleton and ceramic surfaces were observed by scanning electron microscopy. On all materials, the distribution of actin in typical ring was revealed. SEM examinations showed a clear difference in the shape and the depth of resorption lacunae on different ceramics. On pure HA, an attack is clearly visible but remains superficial. Numerous deep and well delimited resorption lacunae were observed on pure β -TCP. On pure calcite, a very widespread but superficial attack was revealed and the presence of microroughness is detected.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Frau Dr. G. Counot (INRA, Jouy-en-Josas, Frankr.) für ihre hilfreichen Diskussionen und Ratschläge und bei Frau G. Moreau und Herrn M. Flacit für die ausgezeichnete technische Hilfe. Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Langelin (Scora Industrie, Frankr.) für die freundliche Bereitstellung des Calcitpulvers. Ein Teil dieser Arbeiten wurde auf der technischen Plattform des IFR 22 in Lille durchgeführt. Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt vom Centre Hospitalier Universitaire de Lille und vom Conseil Régional Nord/Pas-de-Calais.

Literatur

- [1] NG K.W., Romans E., Donnan L., Findlay D.M.: Bone biology, Baillieres Clin. Endocrinol. Metab., 105 (1), (1997) 1.
- [2] Hiraga T., Nakajima T., Ozawa H.: Bone resorption induced by a metastatic human melanoma cell line, Bone, 16 (3), (1995), 349
- [3] Chambers T.J.: The regulation of osteoclastic development and function, Ciba Found Symp, 136, (1988), 92-107

[4] Fricain J.C., Bareille R., Ulysse F., Dupuy B., Amedee J.: Evaluation of proliferation and protein expression of human bone marrow cells cultured on coral crystallized in the aragonite or calcite form. *J. Biomed. Mater. Res.*, 42, (1998), 96.

[5] Flautre B., Descamps M., Delecourt C., Lu J.X., Blary M.C., Hardouin P.: Porous HA ceramic for bone replacement. The influence of the role of pore interconnections. Experimental study in the rabbit. *J. Biomed. Mater. Res.*, 49, (2000), 200.

[6] William D.F., Black J., Doherty P.J.: Biomaterial-tissue interfaces: Advances in biomaterials, In: Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials, London, edited by P.J. Doherty & D.F. Williams: (Elsevier Applied Science); (1993), vol. 107 p 525

[7] Benahmed M., Heymann D., Pilet P., Bienvenu J., Dalcusi G.: LPS increases biomaterial degradation by human monocytes in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.*, 34 (1997), 115.

[8] Fraser J.H.E., Helfrich M.H., Wallace H.M., Ralston S.H.: Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone*, 19 (3), (1996), 223.

[9] Chambers T.J., Thomson B.M., Fuller K.: Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. *J. Cell. Sci.*, 70 (1984), 61.

[10] Shibutani T., Iwanaga H., Imai K., Kitago M., Doi Y., Iwayama Y.: Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J. Biomed. Mater. Res.*, 50 (2), (2000), 153.

[11] Tomeno B., Forest M.: Tumeurs à cellules géantes. *Cahiers d'enseignement de la SOFCOT. Conférences d'enseignement* (1990) p 31.

[12] Wang W., Ferguson D.J., Quinn J.M., Simpson A.H., Athanasou N.A.: Osteoclasts are capable of particulate phagocytosis and bone resorption. *J. Pathol.*, 182 (1), (1997) 92.

[13] Matsuoka H., Nakamura T., Takadama H., Yamahada S., Tumura J., Okada Y., Oka M., Kokubo T.: Osteoclastic resorption of bone-like apatite formed on a plastic disk as an in vitro assay system. *J. Biomed. Mater. Res.*, 42 (1998) 278.

[14] Zamboni Zallone, Teti A., Primavera M.V.: Resorption of vital or devitalized bone by isolated osteoclasts in vitro. *Cell. Tiss. Res.* 235 (1984) 561.

[15] Kanehisa J., Heersche J.N.: Osteoclastic bone resorption in vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. *Bone*, 9(2) (1988) 73.

[16] Lakkakorpi P., Tukkanen J., Hentunen T., Järvelin K., Väänänen K.: Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro. *J. of Bone and Mineral Research*, 4 (6) (1989) 817.

[17] Scotchford C.A., Cooper E., Leggett G.J., Downes S.: Growth of human osteoblast-like cells on alkanethiol on gold self-assembled monolayers: the effect of surface chemistry. *J. Biomed. Mater. Res.*, 41 (1998) 431.

Francine Monchau

Korrespondenzanschrift:
Francine Monchau
Laboratoire de Recherche sur
les Biomateriaux
Departement de Biophysique
Faculté de Médecine 1, place
de Verdun,
59045 LILLE Cedex, France
Tel: + 33 (0)320 62 69 75
Fax: + 33 (0)320 62 68 54
E-mail grb@univ-lille2.fr

Akademischer Lebenslauf

staatlich geprüfte Krankenschwester
Zusätzliches Studium der Materialwis-
senschaft auf dem Gebiet der Kerami-
ken an der Universität Valenciennes
(Nordfrankreich)
Diplom „Biotechnologie/Biomaterialien“
auf der Universität Paris-13
Forschungsarbeiten zur Doktorarbeit an
der Medizinischen Fakultät der Univer-
sität Lille-2 im Laboratorium für
Biomaterialforschung
Promotion an der Universität Lille-2
„Entwicklung und physikalisch chemische
und biologische Charakterisierungen
von Biokeramiken als Knochenersatz“

9/2001

[18] Redey S.A., Razzouk S., Rey C., Bernache-Assolant D., Leroy G., Nardin M., Cournot G.: Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural Kalzium carbonate: Relationship to surface energies. *J. Biomed. Mater. Res.*, 45 (1999) 140.

[19] Doi Y., Shibutani T., Moriaki Y., Kkajimoto T., Iwayama Y.: Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.*, 105 (4), (1998) 603.

[20] Gomi K., Lowenberg B., Shapiro G., Davies J.E.: Resorption of synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials*, 14 (1993) 91.

[21] De Bruijn J.D., Bovell Y.P., Davies J.E., van Blitterswijk: Osteoclastic resorption of Kalzium phosphates is potentiated in postosteogenic culture conditions. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, (1994), 105

[22] Yamada S., Heymann D., Bouler J.M., Daculsi G.: Osteoclastic resorption of Kalzium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -triKalzium-Phosphate ratios. *Biomaterials*, 18 (15), (1997) 1037.

[23] Fujita Y., Yamamuro T., Nakamura T., Kotani S.: The bonding behavior of calcite to bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, 25, (1991), 991

[24] De Groot K.: Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption, and strength of Kalzium phosphate ceramics. *Bioceramics: Material characteristics versus in vivo behaviour*, (1988), 523, 227-233.