

Effekten af mekanisk belastning evalueret på osteogene cellekulturer (autoreferat)

Afhandlingens formål var at karakterisere humane parodontalligamentfibroblasters osteogene potentiale samt at udvikle en in vitro-model der genererer en kendt mekanisk belastning

Lene Boldrup-Nielsen

Vævsreaktioner i forbindelse med tandregulering har været genstand for utallige studier siden begyndelsen af dette århundrede. En række forhold er dog fortsat uafklarede, bl.a. baggrunden for variation i tandbevægelsens hastighed og det forhold at en igangværende tandforskydning undertiden pludselig standser uden kendt grund. Vævsreaktioner i forbindelse med ortodonti afhænger af interaktioner mellem faktorer der relaterer sig til den påførte ortodontiske kraft og biologisk variation i knogle og parodontium. Mange in vitro-systemer er udviklet mhp. at generere en veldefineret, konstant eller intermitterende kraft til cellekulturer. Det mest udbredte system er Flexcell-systemet (USA). Dette er et computerkontrolleret system der genererer tøjning (kraft) til celler i et *multi-well set-up*. Denne model indebærer dog flere ulemper. Den applicerede tøjning følger et ubiologisk belastningsmønster. Gentagen belastning vil fremkalde en plastisk deformation af membranerne over tid og give en ukontrolleret tøjningsapplikation. Ud over ulemper af teknisk art er der imidlertid også uløste problemer i relation til karakterisering af cellekulturer fra parodontalligamentet (PDL). En beskrivelse af humane PDL-fibroblasters osteogene potentiale eksisterer kun delvis. Dette er en forudsætning for at forstå humane PDL-fibroblasters reaktion på mekanisk stimulering (MS), med hensyn til cellernes differentiering og proliferering.

Formål

Formålet med dette ph.d.-studium var på denne baggrund:

- 1) at karakterisere humane PDL-fibroblasters osteogene potentiale,
- 2) at udvikle en modifikation af Flexcell-systemet der indebærer en mere homogen og biologisk relevant belastning,

- 3) at undersøge effekten af MS på humane PDL-fibroblaster, og
- 4) at udvikle en ny prototype til MS af cellekulturer som er i stand til at generere et uniformt stræk.

Ekperimentelle studier

Osteogen potentiale

Humane PDL-fibroblaster blev karakteriseret mht. proliferation og differentieringsmarkører \pm vitamin D(1,25(OH)₂D₃). Ligeledes undersøgte PDL-fibroblasternes mineraliseringspotentiale. Resultatet af disse undersøgelser viste at PDL-fibroblastkulturer er karakteriseret ved en høj AP-aktivitet, er sensitive for stimulering med vitamin D, kan syntetisere matriksproteiner og danne mineraliseret matriks med noduli. Humane PDL-fibroblaster udviser dermed en osteoblastlignende fænotype.

Flexcell-systemet

Der udvikledes en modifikation af det eksisterende system, Flexcell-systemet. For at forbedre tøjningsdeformation udvikledes forskellige typer af kugleskaller. Kugleskallerne placeredes under de elastiske membraner for dermed at undgå 1) at variation i vakuum påvirker membranernes deformation, samt 2) en plastisk deformation af membranmaterialet.

Resultater: – Matematiske udregninger viste at den anvendte kugleskal under membranen forbedrede tøjningsfordelingen i centrum af membranen, men at der dog fortsat var non-uniform strækfordeling med højere tøjning ved membranens kant. Dvs. at systemet blev ikke forbedret væsentlig mht. tøjningfordeling. Når systemet med kugleskallerne blev testet vha. PDL-fibroblaster og humane alveolære osteoblaster responderede førstnævnte med accelereret celleproliferation.

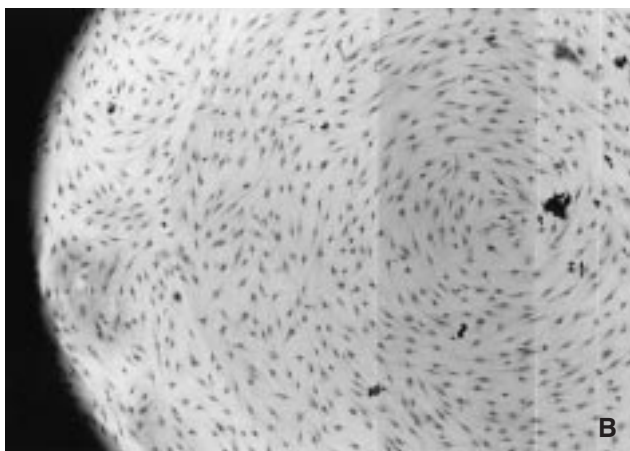
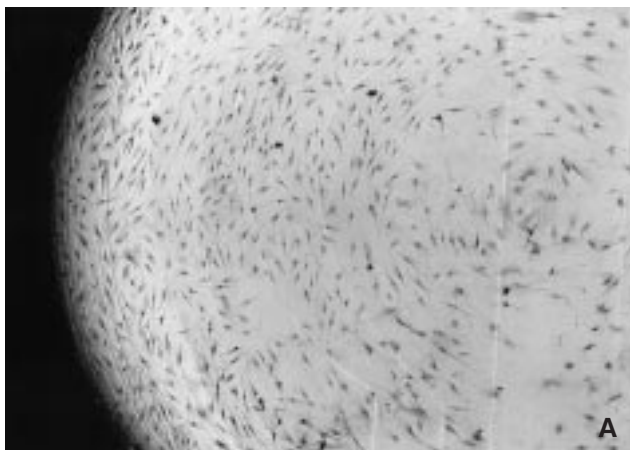


Fig. 1 Humane PDL-fibroblaster i henholdsvis kontrol- (A) og eksperimentel-skålen (B) efter 72 timer ved intermitterende stræk 0,5%. En tydeligt større celleproliferation ses efter stræk.

Effekt af MS

Humane PDL-fibroblaster blev mekanisk stimuleret vha. systemet uden brug af kugleskaller. Størrelsen af det applicerede stræk varierede fra 4 % i centrum til 22% elongation ved kanten. Cellerne blev stimuleret i 10 min.s intervaller efterfulgt af 10 min.s pause. Effekten af fire dages MS af humane PDL-fibroblaster blev undersøgt mht. proliferation, alkalisk fosfatase- (AP-) aktivitet samt cellernes evne til at syntetisere matriksproteiner, osteocalcin og collagen type I.

Resultater: – MS accelererede humane PDL-fibroblasters celleproliferation og hæmmede AP-aktivitet. Desuden påvirkede MS i nogen grad syntesen af matriksproteiner. Vitamin D og MS aktiverede cellerne i to forskellige retninger. I kombination sås dog en dominerende effekt af MS. Sammenfattende gælder at humane PDL-fibroblaster er sensitive over for store kraftpåvirkninger, vitamin D og at dette indvirker på cellernes evne til at syntetisere matriks.

Ny prototype til MS

Det modificerede Flexcell-system viste sig imidlertid fortsat at have ulemper, herunder væsentligst at der genereres et non-uniformt stræk. En ny prototype til MS blev derfor udviklet med det formål at 1) forbedre den non-uniforme tøjningsfordeling, 2) kunne applicere tøjningsværdier af en veldefineret, kendt størrelse, 3) kunne strække celler med en lille tøjning på 0-2%, og 4) kunne applicere tøjningsværdier med en meget høj reproducérbarhed. Humane PDL-fibroblaster blev brugt til at teste systemet.

Resultater: – Prototypen er i stand til at levere et veldefineret stræk med en meget høj reproducérbarhed. Resultaterne af matematisk beregning viste at den genererede tøjning er uniform i 95% af membranen. Humane PDL-fibroblaster adhærerede til silikonematerialet. Cellerne var lokaliseret ensartet fra centrum til kanten af membranen med en tendens til dannelse af et cirkulært mønster. MS af humane PDL-fibroblaster (0,5%) med den nye prototype førte til signifikant øget proliferation efter 24 og 72 timer (Fig. 1).

Konklusion

Der er med arbejderne i denne ph.d.-afhandling skabt grundlag for at løse nogle af de ubesvarede spørgsmål mht. at kunne definere stræk og analysere cellernes respons. Der har ikke tidligere været udviklet et in vitro-system, der kan etablere et veldefineret stræk af celler med ensartet tøjning i alle retninger i tøjningsområdet 0-2 %. Systemet blev afprøvet vha. PDL-fibroblaster. Det viste sig at PDL-fibroblaster er meget sensitive for stræk både for små og store tøjningsbelastninger. ■

Boldrup-Nielsen L. *Mechanical stimulation of osteogenic cells in culture.* (Ph.d.-afhandling). Århus: Fællestrykkeriet for Sundhedsvidenskab, 1996.

Afhandlingen, en monografi, kan rekvireres hos forfatteren. Adresse: Afdeling for Ortodonti, Tandlægeskolen, Vennelyst Boulevard, 8000 Århus C.

Ph.d.-afhandlingen blev forsvaret på Tandlægeskolen, Aarhus Universitet, den 22. november 1996. Medlemmer af bedømmelsesudvalget: Professor *Lance Lanyon*, BVSc, D.Sc, Ph.D., MRCVS, og overlæge, dr.med. *Erik Fink Eriksen*.

Forfatter

Lene Boldrup-Nielsen, tandlæge, ph.d.
Afdeling for Ortodonti, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet

Referatet bringes som parallelpublikation i Tandlægenes Nye Tidsskrift.