

Tandorgankulturer og in vitro-mineralisering (autoreferat)

Afhandlingens formål var at udvikle og etablere en model til dyrkning af tandorganer, som ville kunne anvendes til at undersøge fx fluors indvirkning på tændernes mineraliseringsproces

Mette Kjølby

Ph.d.-afhandlingen beskriver anvendelsen af tandorganet i organkultur som en eksperimentel biologisk model. Undersøgelserne blev udført på Afdeling for Tandsygdomslære, Tandlægeskolen i Århus, og på Institute of Dentistry, University of Helsinki, Finland, i perioden 1991-94.

Afdeling for Tandsygdomslære har en lang tradition for forskning i tandudvikling in vivo med fokus på mineraliseringsprocesser. Mere specifikt bør nævnes studier i fluorids indvirkning på mineraliseringen af tændernes emalje. Hvorledes dental fluorose udvikler sig er stadig uvist. Det er således nødvendigt at søge en nærmere forståelse af cellebiologiske mekanismer gennem anvendelse af celle- og vævsdyrkningsteknikker for at forstå bl.a. fluorids indvirkning på mineraliseringsprocessen.

Baggrunden for afhandlingen er således, ved at udvikle og anvende en in vitro-model til dyrkning af tandorganer, at opnå en større forståelse af basale mineraliseringsprocesser. I forbindelse med tandudviklingen er de basale mineraliseringsprocesser overvejende blevet undersøgt in vivo, hvor forholdene er så komplekse, at det ikke er muligt at isolere enkelte faktorer eller forhold. I tandorgankulturstudier kan der skabes kontrollerbare og reproducérbare udviklingsforhold. I modsætning til in vivo-situationen er det muligt løbende at monitorere enkeltfaktorer i dyrkningsmiljøet.

Formål

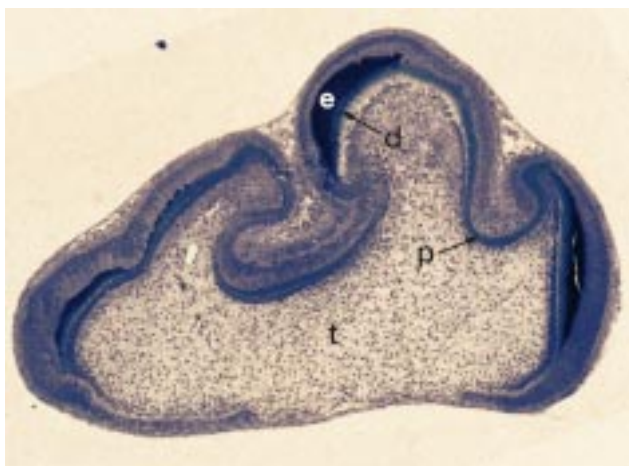
Formålet med ph.d.-afhandlingen var 1) at etablere en model til dyrkning af rottetandorganer, som, under kontrollerede in vitro-betingelser, tillod tandorganet at udvikle sig så lig in vivo-situationen som muligt, 2) at undersøge betydningen af dyrkningsmediets sammensætning, og 3) at undersøge den eventuelle betydning af nedbrydningen af basalmembranen i forbindelse med mineraliseringsudviklingen i de dyrkede tandorganer.

Etablering af dyrkningsmodel

Tandorganer dyrket if. den traditionelle *Trowell*-model mister deres tredimensionale struktur og bliver flade under dyrkningen. Senest er der introduceret en flydemodel, hvor dyrkede musetandorganer bevarede deres tredimensionale struktur og udviklede sig i overensstemmelse med in vivo-situationen. Rottemolarer i klokkestadiet blev ved anvendelse af flydemodellen dyrket i fire eller 10 dage. Efter fire dages dyrkning fandtes ingen emalje, hvorimod der efter 10 dages dyrkning kunne observeres mineraliseret dentin og emalje. Tandorganets sfæriske form var bevaret. Ultrastrukturelle observationer efter fire og 10 dages dyrkning viste, at udviklingen fra præsekretoriske til sekretoriske ameloblaster fulgte udviklingen in vivo. Efter fire dages dyrkning sås fuldt udviklede sekretoriske odontoblaster, hvorimod der efter 10 dage fandtes residualliggende legemer i deres cytoplasma som tegn på en begyndende degenerering. Dette skyldes sandsynligvis diffusionsproblemer forårsaget af den mineraliserede dentin og emalje. Forsøgene førte til etablering af en model til dyrkning af rottetandorganer, hvor tandorganet holdes flydende og derved bibeholder sin tredimensionale struktur. Modellen fører til dannelse af mineraliserede foci af dentin og emalje, hvis lokalisering forekommer mindre tilfældig end i tidligere beskrevne in vitro-studier.

Dyrkningsmediet

Studierne af betydningen af dyrkningsmediets sammensætning havde til formål 1) at studere hastigheden, hvormed vitamin C nedbrydes i medium og tandorganer, og 2) at sammenligne tandorganer dyrket i kemisk defineret eller i serumsuppleret medium mht. mineralisering af dentin- og emaljematricer. Tandorganer blev dyrket i tre forskellige medier i 48 timer, og koncentrationen af vitamin C i medium og tandorganer blev målt med HPLC. Koncentrationen af vitamin C i mediet var faldet til det halve efter 2-4 timer, og efter



Anlæg til 2. molar fra en to dage gammel rotte dyrket i 10 dage ved anvendelse af flydemodellen. t: tandpapillen; p: prædentin; d: dentin; e: emalje.

24 timer påvistes meget små mængder. I de dyrkede tandorganer faldt koncentrationen af vitamin C til det halve efter 24 timer. Tandorganer blev dyrket i 14 dage i kemisk defineret eller i serumsuppleret medium. I alle tandorganer dyrket i 14 dage i serumsuppleret medium mineraliserede dentin- og emaljematricer, hvorimod der kun blev observeret mineraliseret dentin og emalje i 60% af tandorganerne dyrket i kemisk defineret medium. Dette studium har vist, 1) at det tilsyneladende er tilstrækkeligt at skifte medium hvert andet døgn for at sikre en passende koncentration af vitamin C i de dyrkede tandorganer, og 2) at serum i mediet er væsentligt for at sikre mineralisering af dentin- og emaljematricer.

Nedbrydning af tandorganets basalmembran

Under tandudviklingen in vivo bliver basalmembranen nedbrudt i det sene klokkestadium. Den udviklingsmæssige betydning af denne nedbrydning er ikke kendt. I et in vitro-studie fandt man, at i tandorganer dyrket i kemisk defineret medium forblev tandorganets basalmembran intakt under dannelsen af en umineraliseret dentin. I nærværende undersøgelse blev tandorgankulturer anvendt til studier af den relative betydning af basalmembranen i forbindelse med mineraliseringsudviklingen. Tandorganer i klokkestadiet blev dyrket i kemisk defineret eller i serumsuppleret medium, og nedbrydningen af basalmembranen blev analyseret. Type IV kollagen og laminin blev ved at anvende immunmærkning lokaliseret langs hele basalmembranen ved begyndelsen af dyrkningsperioden. Efter 10 dages dyrkning, uanset hvilket medium der var anvendt, var type IV kollagen og laminin forsvundet fra kuserne. Ved anvendelse af in situ-hybridi-

sering blev aktivitetsniveauet af 72 kDa type IV kollagenasegenet mærket, da det in vivo er vist, at det kunne spille en rolle i nedbrydningen af basalmembranen. I alle de dyrkede tandorganer var aktivitetsniveauet højt i præodontoblaste og i odontoblaste under sekretion af den første prædentin nær kusptoppen, umiddelbart før nedbrydningen af basalmembranen kunne forventes at begynde. Disse fund svarer til tidligere fund in vivo. De ultrastrukturelle studier viste, at basallamina var forsvundet i de dyrkede tandorganer uanset det anvendte dyrkningsmedium. Fundene tyder på, i modsætning til tidligere observationer, at i tandorganer dyrket i kemisk defineret eller serumsuppleret medium er der ingen udviklingsmæssige forskelle i nedbrydningen af tandorganernes basalmembran.

Konklusion

Det har i nærværende forsøgsrække været muligt at etablere en organkultur af rottetandorganer, hvor tandorganerne, i modsætning til tidligere in vitro-studier, holdes flydende og derved bevarer en tredimensional udviklingsstruktur lig in vivo-situationen. Dyrkningsmodellen vil således kunne danne et godt grundlag for eksempelvis mikromanipulatoriske studier af interaktionsmekanismer i mineraliserende væv. Endvidere viser forsøgene behov for meget systematiske basisstudier af dyrkningsbetingelser, idet den relative betydning af centrale faktorer såsom temperatur, pH, vækstfaktorer etc. i dyrkningsmiljøet stadig er forholdsvis ukendt. I modsætning til den hidtidige opfattelse af, at dyrkning af tandorganer i kemisk defineret medium skulle føre til persistens af basalmembranen og manglende mineralisering af emaljematricer, viser de nærværende resultater, at med dyrkning i kemisk defineret medium nedbrydes basalmembranen, og induktion af dannelse og mineralisering af emaljen er tilsyneladende bevaret. ■

Kjølby M. *Tooth organ culturing and in vitro mineralization*. (Ph.d.-afhandling). Århus: Fællestrykkeriet for Sundhedsvidenskab, 1996.

Afhandlingen, der omfatter 63 sider + fire originalartikler, kan rekvireres hos forfatteren. Adresse: Afdeling for Tand sygdomslære, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet, Vennelyst Boulevard, 8000 Århus C.

Afhandlingen blev forsvaret på Tandlægeskolen, Aarhus Universitet, den 9. februar 1996. Medlemmer af bedømmelsesudvalget: professor, dr.odont. Ole Fejerskov og professor, odont.dr. Lars Hammarström.

Forfatter

Mette Kjølby, tandlæge, forskningsassistent, ph.d. Afdeling for Tand sygdomslære, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet.