

Kurzfassung

Knochen ist ein Nanokomposit-Biomaterial, das aus karbonisierten Hydroxylapatit-Nanokristallen und Kollagenfasern besteht. Es unterliegt ständigen Umwandlungsprozessen, um eine Struktur zu erhalten die optimiert ist den zyklischen mechanischen Belastungen standzuhalten und zur Mineralhomöostase beizutragen. Es wird angenommen, dass dieser Prozess von Osteozyten gesteuert wird, die die Knochenmatrix mit ihrem dichten Lacuno-canalicular Netzwerk (LCN) durchdringen. Das hohe Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und die Fähigkeit, Mineralvorstufen zu transportieren und Proteine abzusondern, deuten zudem auf eine entscheidende Rolle dieses Netzwerks bei dem Mineralisierungsprozess hin. Für das Verständnis dieses Mineralisierungsprozesses sind daher Materialcharakterisierungen auf der Micro- und Nanoskala unter Berücksichtigung von biologischen/zellulären Aspekten entscheidend. Dies ist nur mit neuesten bildgebenden 3D Methoden möglich, die sowohl eine hohe Auflösung aufweisen sowie große Messregionen abbilden können.

Ziel dieser Studie war es, die Wechselwirkung des LCN und dem sich bildenden Knochengewebe zu untersuchen, um neue Erkenntnisse über das frühe Stadium der Mineralisierung im neugebildeten kortikalen Knochen zu gewinnen. Zunächst wurde ein Jod-Färbeprotokoll zur Untersuchung der nichtmineralisierten Matrix unter Verwendung von Umwelt-Rasterelektronenmikroskopie (ESEM) erstellt und weiter optimiert hinsichtlich der Einwirkzeit und der Menge an Jod. Zudem wurde konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) verwendet, um eine 3D-Visualisierung des LCNs in geringer Vergrößerung darzustellen und Bereiche, in denen das LCN an die mineralisierende Matrix grenzt, zu identifizieren. Anschließend wurden hochauflösende Bilder dieser Regionen mit fokussierter Ionenstrahl-Rasterelektronenmikroskopie (FIB-SEM) erzeugt, um die Mineralisierung in der Nähe des LCNs sichtbar zu machen. Darüber hinaus wurden Analysewerkzeuge entwickelt, um die Korrelation zwischen Mineralisierungsgrad und Entfernung zum LCN zu ermitteln.

Die Beobachtungen und Analysen von den Oberschenkelschaften dreier Frauen ergaben, dass in allen neun untersuchten sich bildenden Osteonen, eine Mineralisationsfront an der Grenzfläche von nichtmineralisiertem und mineralisiertem Gewebe mit einer Breite von $\sim 3.67 \mu\text{m}$ existiert. Diese Front besteht aus Mineralisierungsherden von nur $\sim 50 \text{ nm}$ Größe, die sich in einer charakteristischen Distanz zum Havers-Kanal bilden und mit fortschreitender Mineralisierung allmählich wachsen. Dies zeigte sich daran, dass mit steigender Entfernung zum Havers-Kanal immer größere Mineralisierungsherde gefunden wurden. Relativ zur Distanz zum nächsten Canaliculus war Größe und Grad der Mineralisierung allerdings nahezu konstant. In allen FIB-SEM Messungen konnte zudem ein dichtes LCN in der nicht-mineralisierten Matrix gefunden werden, welches von einer Seite mit dem Havers-Kanal verbunden ist und auf der anderen Seite in die mineralisierte Matrix reicht. Überraschenderweise wurde an der Mineralisationsfront eine Region um die Canaliculi beobachtet, welche keine Mineralien enthält und erst mit Verzögerung mineralisiert.

Auf der Basis der beschriebenen Resultate wird die Hypothese aufgestellt, dass das LCN zusammen mit sekretierten nicht-Kollagenen Proteinen oder Proteoglykanen die als lokale Mineralisationsinhibitoren fungieren, eine entscheidende Rolle im Mineralisationsprozess spielt. Möglicherweise geschieht dies in der frühen Mineralisationsphase in der das LCN als Transportweg von Mineralisationsvorstufen oder Ionen zur Mineralisationsfront genutzt wird wodurch dort die Ionenkonzentration erhöht und so der Mineralisierungsprozess eingeleitet wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unter Verwendung von 3D-Elektronenmikroskopie in Kombination mit einer optimierten Färbeprozedur und einer neu entwickelten Auswertesoftware neue Einblicke in die Mineralisierung während der Knochenbildung gewonnen wurden. Die Resultate tragen dazu bei bisher unbekannte Aspekte des intensiv diskutierten Mineralisierungsprozesses und der Rolle der Osteozyten darin aufzudecken.

Abstract

Bone is a nanocomposite biomaterial consisting of carbonated hydroxyapatite nanocrystals and collagen fibrils. It is regularly remodeled to keep the integrity of its well-organized structure to endure cyclic mechanical loads and contribute to mineral homeostasis. This remodeling process is thought to be orchestrated by osteocytes that pervade the bone matrix with their dense lacuno-canalicular network (LCN). The LCN might also play a critical role in the mineralization process thanks to its high surface to volume ratio and its ability for the transport of mineral precursors and protein secretion. However, this process is still poorly understood since it also involves the biological/cellular compartment and happens at both the micro- and nanoscale. Hence, only a few techniques can achieve 3D imaging with high enough resolution and large enough fields of view.

The aim of this work was to investigate the interaction of the LCN and the forming bone tissue to gain new insights into early-stage mineralization of human remodeled cortical bone. First, an iodine staining protocol was established to observe the unmineralized matrix. Next, it was optimized by adjusting the amount of iodine and staining time, and by checking the stained matrix using environmental scanning electron microscopy (ESEM). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was utilized to image large fields of view for 3D visualization of the LCN. This technique enabled the selection of regions of interest (ROIs), where an LCN exists at the mineralizing matrix. Afterward, focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM) was employed to obtain high-resolution 3D image stacks of the selected ROIs and to visualize mineralization with respect to the LCN. Furthermore, an analytical tool was developed to provide a correlation between the degree of mineralization and the distance to the LCN.

After investigating post mortem samples from the femoral midshaft from three women exhibiting forming osteons, observations and analyses revealed that at the interface of unmineralized and mineralized matrices, a mineralization front characterized by a $\sim 3.67 \mu\text{m}$ width exists. This front is composed of mineralization foci as small as $\sim 50 \text{ nm}$, which form at a specific distance from the Haversian canal and gradually grow through the mineralization process. Therefore, an increase in the foci size was observed from the Haversian canal toward the mineralized matrix. However, the foci size, as well as the mineralization degree of foci, was almost constant with distance from the canaliculi. It was also found that in all FIB-SEM datasets, a dense LCN exists in the unmineralized matrix, which is connected to the Haversian canal from one side and extended to the mineralized matrix from the other side. Surprisingly, a free-of-mineral halo zone around the canaliculi was observed at the mineralization front that shrinks with the course of mineralization.

One hypothesis, which is formulated from results herein, is that the LCN potentially plays a crucial role in the mineralization, which might happen simultaneously with the secretion of non-collagenous proteins (NCPs) or proteoglycans that locally inhibit mineralization. A possible scenario under which this can happen is that at the early stage of mineralization, the LCN is used to transport mineral precursors or ions to the mineralization front and increase the ion concentrations in the unmineralized matrix to facilitate mineralization.

In conclusion, the 3D electron microscopy approach combined with an optimized staining procedure and an in-house developed analytical tool revealed novel insight into the mineralization process with respect to the LCN. The observed mineral distribution suggests new hypotheses on the role of the osteocytes in the mineralization process.