

of the process can be very long and a relatively large amount of lysosomal material can accumulate. This hypothesis is supported by the presence of acid phosphatase in the lysosomes and of cytochemical reaction product in the matrix of asbestos bodies.

To find out whether the process leading to the formation of an asbestos body is specific for asbestos and a few other fibrous materials or is a more general phenomenon, we injected non-fibrous particulates intraperitoneally. For this purpose we used two calcium phosphates, hydroxyapatite and tri-calcium phosphate, both applied as biomaterial (Chapter V). Injection of these particulates induced the above-described phenomena. Deposits with the morphology of types IV and IV/I asbestos bodies were seen regularly. Comparison of the findings for the two calcium phosphates showed that the degree of extracellular deposition is dependent on the type of material injected. Hydroxyapatite, which compared with crocidolite asbestos and tri-calcium phosphate gave minimal induction of iron accumulation and labyrinth formation, also gave rise to fewer extracellular deposits. Since this is not consistent with, for example, a difference in the degree of solubility of hydroxyapatite relative to that of the other materials, it is evident that the surface characteristics of the material must play a role as well. This conclusion is of interest with respect to the functioning of biomaterials, in which the activity at the interface plays a crucial role, and we plan to devote extensive studies to this point in the future.

Besides the formation of extracellular deposits after the intraperitoneal injection of the biomaterials under study, we also saw limited degradation of these materials, as indicated by the presence of small fragments of these materials in inclusion bodies. X-ray microanalysis showed the presence of not only calcium and phosphorus but also such elements as aluminum, silicon, iron, chrome, nickel and titanium. Because these elements also occur as trace elements in the biomaterials we used, it must be assumed the latter were the source from which they were released during degradation and remained in the residual bodies of macrophages. The biological effects of this trace element accumulation are not known, but the possibility that they can cause toxic reactions must be taken into account. Newly developed biomaterials should be carefully analysed for the presence of trace elements, and the potential for local toxicity of this kind of element should be established.

## SAMENVATTING

Asbest is een in de natuur voorkomend mineraal, opgebouwd uit extreem dunne vezels, met een hoge weerstand tegen chemische en temperatuur invloeden. Deze eigenschappen maken asbest tot een goed industrieel toepasbare grondstof, en het wordt als zodanig dan ook uitgebreid gebruikt. Bij het delven en het verwerken van asbest tot asbest houdende produkten, en bij het bewerken van deze produkten, kunnen asbestvezels als stof in de lucht voorkomen en na inademing in de longen achter blijven. Door de hierboven genoemde eigenschappen is asbest zeer moeilijk biologisch afbreekbaar, en het binnendringen van asbestvezels in de longen kan dan ook een chronische weefselreactie tot gevolg hebben.

Als gevolg van expositie van de longen aan asbeststof kunnen zich ernstige ziektebeelden ontwikkelen zoals asbestose, een door asbest geïnduceerde pneumoconiose, en het ontstaan van maligne tumoren waarvan het mesotheliom wel de meest beruchte is. Verder kunnen ten gevolge van asbest-expositie karakteristieke verschijnselen van een meer onschuldig karakter optreden. Het ontstaan van asbestlichaampjes is daarvan een voorbeeld. Een asbestlichaampje is een asbestvezel waaromheen, door het organisme waarin die asbestvezel is binnengedrongen, een organische mantel, rijk aan ijzer en soms aan calcium en fosfor, is opgebouwd.

Hoewel meerdere onderzoeksgroepen de betekenis van asbestlichaampjes hebben onderzocht, en hoewel een betrokkenheid van macrofagen bij het ontstaan van asbestlichaampjes door meerdere auteurs is gesuggereerd, is tot op heden geen duidelijk inzicht verkregen over het exacte mechanisme dat ten grondslag ligt aan het ontstaan van asbestlichaampjes.

Het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift was bedoeld om, via een dierexperimenteel model, meer inzicht te krijgen in de processen die het ontstaan van asbestlichaampjes tot gevolg hebben en met name om te onderzoeken welke rol macrofagen bij dit proces spelen. Tevens is onderzocht in hoeverre de waargenomen fenomenen beperkt zijn tot de aanwezigheid van asbestvezels, dan wel een algemene reactie blijken op de aanwezigheid van moeilijk verteerbare materialen.

Het mechanisme van de vorming van asbestlichaampjes kan worden onderzocht door proefdieren asbestvezels te laten inhaleren en vervolgens in de longen het vormingsproces te bestuderen. Een nadeel van een dergelijke

procedure, die wel door andere onderzoekers gevolgd is, vormen de andere stofdeeltjes die door de proefdieren worden geïnhaleerd, hetgeen de waarnemingen kan vertroebelen.

Het is echter bekend dat asbestlichaampjes soms in sputum worden aangetroffen, en dat zij uit de longen kunnen worden geïsoleerd door deze met een fysiologische oplossing uit te wassen. Wij namen daarom aan dat vrije longmacrofagen in staat zijn asbestlichaampjes te vormen.

Omdat vrije macrofagen ook in de peritoneaalholte voorkomen en omdat stofdeeltjes hierin niet kunnen doordringen, werd besloten om dit compartiment als model voor het onderzoek te gebruiken. Aangezien asbestlichaampjes zoals hierboven aangegeven, vrij in de longen voorkomen, werd het onderzoek in eerste instantie gericht op de mogelijke aanwezigheid van asbestlichaampjes in de geïsoleerde peritoneaalholte suspensies (hoofdstuk II).

Zoals te verwachten was, veroorzaakte het inspuiten van de asbest bevattende suspensie een ontstekingsreactie, waardoor vrij grote aantallen neutrofiële granulocyten en monocytën in de peritoneaal holte werden waargenomen. Na acht dagen had de peritoneale celpopulatie weer de oorspronkelijke samenstelling.

Echter, in deze suspensies bleken geen asbestlichaampjes aanwezig te zijn. Wel bleek zich een aantal morfologische veranderingen in de macrofagen te hebben voorgedaan. Met name betrof het hier een, aan de tijd gerelateerde, toename van de ijzerconcentratie in insluitlichaampjes van de macrofagen en een toename van de hoeveelheid cytoplasmatisch ferritine. Vastgesteld werd dat het ijzer niet afkomstig kon zijn van de asbestvezels, en dat een verhoogde ijzerconcentratie in de extracellulaire ruimten voor de toegenomen ijzerconcentratie in de macrofagen verantwoordelijk moet worden geacht. Verder kon niet worden uitgesloten dat tevens een storing in het ijzermetabolisme van macrofagen bij het proces van ijzeraccumulatie een rol speelt. Naast de toename in de hoeveelheid ijzer werd ook een toename in de gemiddelde afmeting van labyrinten, sponsachtige structuren die continu zijn met de plasmamembraan, in macrofagen waargenomen. Ook het aantal labyrinten bleek onder invloed van de asbest injectie en als functie van de tijd te zijn toegenomen. De betekenis van de labyrinten is besproken, en een mogelijke relatie met prostaglandine synthese werd aangegeven.

Het aantal asbestvezels, echter, dat in de geïsoleerde peritoneaal suspensies werd teruggevonden, en daarnaast ook de afmeting van de teruggevonden vezels, was zeer laag in vergelijking tot de oorspronkelijk

ingespoten hoeveelheid vezels. Dit bracht ons ertoe het onderzoek uit te breiden naar vreemdlichaam granulomen die in contact met het omentum, de organen en de peritoneaalwand werden aangetroffen (hoofdstuk III). In deze granulomen waren macrofagen en multinucleaire reuscellen in grote hoeveelheden aanwezig. Evenals dat het geval was bij de vrije peritoneaal macrofagen, werden ook in deze macrofagen en reuscellen ijzerrijke insluitlichaampjes aangetroffen. Verder bleken in de granulomen grote hoeveelheden asbestvezels voor te komen, waarvan de afmetingen zeer redelijk overeen kwamen met die in de oorspronkelijk ingespoten populatie. Een aantal van de langste vezels had aanleiding gegeven tot het ontstaan van een asbestlichaampje.

Mede op basis van transmissie electronenmicroscopische waarnemingen kon worden aangetoond dat asbestlichaampjes extracellulair gevormd worden. Tevens konden op basis van de morfologie en op basis van de chemische samenstelling, zoals bepaald met röntgen microanalyse, vier typen asbestlichaampjes worden onderscheiden: een type met een homogene ijzerrijke matrix (type I), een type met een ringvormige matrix waarin alternerend hoge concentraties ijzer en hoge concentraties calcium met fosfor werden aangetroffen (type II), een vrij zeldzaam voorkomend type met eveneens een ringvormig aspect, waarin weinig of geen chemische elementen met röntgen microanalyse konden worden aangetoond (type III) en een type met een homogene matrix waarin juist de elementen calcium en fosfor dominant aanwezig waren (type IV). Tevens werden regelmatig asbestlichaampjes waargenomen met een centraal gebied, overeenkomend met type IV, terwijl de begrenzendende rand de karakteristieken heeft van type I. Deze asbestlichaampjes zijn daarom type IV/I genoemd. In de ijzerrijke delen van de asbestlichaampjes werden regelmatig kleine asbest fragmenten aangetroffen. Omdat dergelijke fragmentjes ook waren aangetroffen in de ijzerrijke insluitlichaampjes van de macrofagen, werd de conclusie getrokken dat een relatie tussen de wijze van ontstaan van asbestlichaampjes, en de aanwezigheid van de insluitlichaampjes zou kunnen bestaan.

Om deze relatie verder te onderzoeken, werd een resident macrofaag populatie in kweek gebracht in ijzerrijke media. Aan deze kweek werd één maal een suspensie met asbestvezels toegevoegd. De asbestvezels werden gefagocyteerd door de macrofagen. Een aantal vezels bleek echter te lang om geheel te worden ingesloten, waardoor deze vezels extracellulair bleven. Het waren uitsluitend deze vezels die aanleiding gaven tot het ontstaan van

asbestlichaampjes in vitro. Hierdoor werd onomstotelijk aangetoond dat de vorming van asbestlichaampjes inderdaad een extracellulair proces is waaraan de macrofaag/vezel interactie ten grondslag ligt (hoofdstuk IV). Om de betrokkenheid van de insluitlichaampjes bij het ontstaan van asbestlichaampjes definitief te bewijzen, werd één maal aan het medium colloïdaal goud toegevoegd. De gouddeeltjes werden geëndocyteerd en kwamen zowel in de insluitlichaampjes als in de asbestlichaampjes terecht.

De waarneming dat insluitlichaampjes inderdaad colloïdale gouddeeltjes insluiten, gecombineerd met hun morfologie en met het feit dat zij positief zijn na de cytochemische zure fosfatase reactie toont aan dat deze organellen deel uit maken van het lysosomale apparaat.

Op basis van bovenbeschreven waarnemingen werd de volgende hypothese over het ontstaan van asbestlichaampjes opgesteld: asbestlichaampjes worden extracellulair gevormd door exocytotische activiteit van macrofagen of reuscellen. Het ontstaan van een asbestlichaampje is een zaak van toeval waarbij de juiste cel (macrofaag of reuscel) de juiste vezel tegenkomt, nl. een vezel die te groot is om volledig gefagocyteerd te worden. Indien een dergelijke situatie zich voordoet, zal de macrofaag of reuscel de vezel deels omsluiten en zijn lysosomale inhoud deponeren in het aldus gevormde micro milieu. De inhoud van de lysosomen zal zich hierbij in het micro milieu ophopen, waardoor het asbestlichaampje ontstaat.

Een dergelijk proces toont overeenkomst met de wijze van botresorptie door osteoclasten, waarbij de osteoclast eveneens het te verteren materiaal afsluit van de omgeving om vervolgens lysosomale enzymen in de extracellulaire ruimte hun werk te laten verrichten. Het verschil tussen de twee processen is echter dat, in tegenstelling tot bot, asbest niet goed biologisch afbreekbaar is, waardoor het proces langdurig door kan gaan en zich een relatief grote hoeveelheid lysosomaal materiaal kan ophopen.

De aanwezigheid van zure fosfatase in de lysosomen en het feit dat het cytochemische reactieproduct tevens werd aangetroffen in de matrix van de asbestlichaampjes, ondersteunt de hypothese.

Om te onderzoeken of het proces dat leidt tot de vorming van een asbestlichaampje beperkt blijft tot asbest en enige andere vezelige materialen, dan wel dat de waargenomen fenomenen een algemeen karakter hebben, werden materialen met een niet vezelige vorm intraperitoneaal ingespoten. Hiervoor werd gebruik gemaakt van, de als biomateriaal toegepaste, calcium fosfaten hydroxyapatiet en tri-calcium fosfaat (hoofdstuk V). Insputten van

deze materialen bleek inderdaad de hierboven beschreven fenomenen tot gevolg te hebben. Met name deposities met een morfologie als van asbestlichaampje type I/IV en type IV werden regelmatig aangetroffen. Vergelijking van de proefresultaten over de twee verschillende calcium fosfaten liet zien dat de mate waarin extracellulaire depositie optreedt afhankelijk is van het type ingespoten materiaal. Hydroxyapatiet, dat ook al minimale aanleiding had gegeven tot ijzer accumulatie en labyrint-vorming bleek ook, in vergelijking tot crocidoliet asbest en tri-calcium fosfaat, in veel mindere mate aanleiding te geven tot het ontstaan van extracellulaire deposities. Aangezien dit niet in overeenstemming is met bijvoorbeeld een verschil in de mate van oplosbaarheid van hydroxyapatiet ten opzichte van de andere materialen, moet geconcludeerd worden dat tevens de oppervlakte karakteristieken van het materiaal een rol spelen.

Met betrekking tot het functioneren van biomaterialen, waarbij de optredende interface activiteit een cruciale rol speelt, is dit een interessante gedachte waaraan in toekomstig onderzoek ruime aandacht besteed zal worden.

Naast de vorming van extracellulaire deposities ten gevolge van de intraperitoneale introductie van biomaterialen werd een beperkte afbraak van deze materialen waargenomen. Deze afbraak kwam met name tot uitdrukking doordat kleine biomateriaal fragmenten in insluitlichaampjes werden gevonden. Röntgen microanalyse metingen toonden aan dat niet alleen calcium en fosfor in deze insluitlichaampjes aanwezig waren, maar ook elementen zoals aluminium, silicium, ijzer, chroom, nikkel en titaan. Omdat deze elementen ook als sporenelement in de gebruikte biomaterialen aanwezig zijn, moet aangenomen worden dat deze sporenelementen door het afbraakproces uit die biomaterialen worden vrijgemaakt en in de "residual bodies" van macrofagen achter blijven. De biologische consequenties van deze sporenelement ophoping zijn vooralsnog onzeker maar met het veroorzaken van toxische reacties door deze verontreinigingen moet rekening worden gehouden. Het is daarom aan te raden om nieuw te produceren biomaterialen op de aanwezigheid van sporenelementen te controleren en de mogelijke lokale toxiciteit van dit soort elementen vast te stellen.