

Dedifferentiatie en redifferentiatie van chondrocyten

Mayke van Dort, s1606409

Januari 2010

## Inhoudsopgave

Samenvatting	pag. 3
Lijst met afkortingen	pag. 4
Inleiding	pag. 5
Shaving	pag. 5
Pridie drilling en microfractuur techniek	pag. 6
Tissue engineering	pag. 7
ACI, autologous chondrocyte implantation	pag. 7
Dedifferentiatie	pag. 9
Redifferentiatie	pag. 11
Opwekken van redifferentiatie	pag. 12
Invloed van 3D structuren	pag. 12
Invloed van LIPUS	pag. 12
Invloed van PEMF	pag. 13
Invloed van een laag zuurstofgehalte	pag. 15
Invloed van hydrostatische druk	pag. 16
Discussie	pag. 18
Reference list	pag. 19

## **Samenvatting**

In een gezond gewricht zit kraakbeen dat normale beweging van het gewricht pijnloos mogelijk maakt. Als er een defect in het kraakbeen optreedt, zal een patiënt in eerste instantie last hebben van pijn. Uiteindelijk kan een defect leiden tot complete degeneratie van het gewrichtskraakbeen en zal er operatief een gewrichtsprothese geplaatst moeten worden.

Er bestaan verschillende methoden om kraakbeendefecten te corrigeren, waaronder het implanteren van autologe chondrocyten, autologous chondrocyte implantation, ACI. Hiervoor worden autologe chondrocyten uit het kraakbeen geïsoleerd en in kweek vermenigvuldigd. Als er voldoende chondrocyten gevormd zijn, kunnen deze weer terug in het gewricht geplaatst worden, met de bedoeling van herstel van het gewricht.

Een probleem met het opkweken van chondrocyten is echter dedifferentiatie: als chondrocyten op een platte ondergrond gekweekt worden, zal deling optreden maar na verloop van tijd ook dedifferentiatie. Dit houdt in dat de chondrocyten meer fibroblastachtig worden en een andere extracellulaire matrix zullen produceren. Deze gedifferentieerde chondrocyten hebben niet dezelfde eigenschappen als normale kraakbeencellen en zullen de eigenschappen van gezond kraakbeen niet kunnen evenaren.

Ter bevordering van de redifferentiatie van gedifferentieerde chondrocyten kan gebruik gemaakt worden van low-intensity pulsed ultrasound of pulsed electromagnetic fields. Wat echter precies het effect op het redifferentiatieproces is, is onduidelijk. Ook de mate van positieve invloed van LIPUS, PEMF en andere behandelmethoden is niet kwantitatief bepaald. Door de verschillende behandelmethoden zijn de onderzoeken niet met elkaar te vergelijken.

## Lijst met afkortingen

ACI	Autologous chondrocyte implantation
BSA	Bovine serum albumin
Col1	Collageen type 1
Col2	Collageen type 2
DMEM	Dulbecc's modified eagle's medium
ECM	Extra cellulaire matrix
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
GAG	Glycosaminoglycan
GAPDH	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
LIPUS	Low intensity pulsed ultrasound
PEMF	Pulsed electromagnetic field
PG	Proteoglycanen
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta

## **Inleiding**

Het kraakbeen in gewrichten zorgt ervoor dat de gewrichten normaal bewogen kunnen worden, zonder pijn. Bovendien zorgt het ook voor gelijke verdeling van de krachten over het bot. Een defect in het gewrichtskraakbeen kan pijn veroorzaken en dit zorgt voor het niet goed kunnen functioneren van het gewricht. Ook is dan de belasting van de krachten op het bot niet meer goed verdeeld; het bot zal zich aanpassen aan deze veranderde verdeling van de krachten en zal vervormen. Uiteindelijk kan een defect in het kraakbeen leiden tot degeneratie van het gewricht.

Een defect kan ontstaan door een ongeval, maar ook artrose kan aanleiding zijn tot kraakbeendegeneratie. Als er geen herstel van het kraakbeen plaatsvindt, kan een defect uiteindelijk leiden tot het plaatsen van een totale knieprothese.

Vanwege het gebrek aan doorbloeding in het kraakbeen, heeft dit weefsel een zeer beperkt zelfherstellend vermogen. Bij kraakbeendefecten zal dan ook in de meeste gevallen operatief ingegrepen moeten worden. Naar schatting moeten alleen in Amerika al gemiddeld een miljoen mensen per jaar behandeld worden aan een defect in het kraakbeen (Malda et al. 5153-61).(Langer and Vacanti 920-26)

## *Shaving*

Het idee achter shaving is het weghalen van losse kraakbeen, zodat het oppervlak weer glad wordt en de mogelijke frictie vermindert. Hiermee wordt de pijn in het gewricht weggenomen. Deze methode wordt nog maar af en toe toegepast, bij chondromalacia patellae, verweking van het kraakbeen aan de achterkant van de knieschijf, of na traumatische kraakbeenbeschadigingen.

De biologische redenering achter deze methode is niet bekend. Het kan berusten op het idee iets goeds voor de patiënt te doen door het losse kraakbeen weg te halen, en zo het oppervlak gladder te maken om de frictie te verminderen. Vanuit biomechanisch oogpunt echter is dit niet aannemelijk. (Hunziker 432-63)

In konijnengewrichten leidt deze methode vaak uiteindelijk tot degeneratie van het kraakbeen. Uit een klinische studie is gebleken dat shaving alleen voordeel oplevert bij patiënten die last hebben van posttraumatische gewrichtspijn. (Ogilvie-Harris and Jackson 660-65) Er zijn echter geen verdere studies naar gedaan.

Een meer drastische versie van shaving is debridement. Hierbij wordt al het losse weefsel verwijderd. Net als bij shaving is er geen wetenschappelijke redenering achter deze methode bekend en er zijn geen bewijzen voor verbetering van het gewricht verkregen uit dierproeven. Toch zijn er wisselende resultaten in patiënten behaald: het effect varieert van goed, namelijk 65% vermindering van pijn, tot slecht, namelijk geen pijnvermindering. (Hunziker 432-63) Ook al is er soms een goed resultaat te behalen, de pijnvermindering is maar van tijdelijke aard. Debridement dient alleen voor tijdelijke vermindering van pijn en wordt soms toegepast bij arthrose.

#### *Pridie drilling en microfractuur techniek*

Boren, Pridie drilling, houdt in dat er therapeutische gaatjes met een grootte van 2.0 tot 2.5 mm in diameter geboord worden tot in het subchondrale beenmerg, hetgeen zou moeten resulteren in zelfherstel van het kraakbeen. Het weefsel dat gevormd wordt na het boren van de gaatjes is echter variabel in samenstelling, structuur en levensduur. Deze methode wordt toegepast bij patiënten die pijn in gewrichten hebben die veroorzaakt wordt door artrose en dient ter vermindering van de pijn en ter verbetering van de beweeglijkheid van het gewricht.

De methode is redelijk veilig. Een groot nadeel echter is dat de effecten slechts van kortere duur zijn; na enkele jaren zal het gewricht opnieuw pijnlijk zijn en behandeld moeten worden. (Hunziker 432-63)

Een variant op deze methode is de zogenaamde microfractuur techniek. Bij deze techniek worden meer gaatjes gemaakt die dichter opeen geplaatst worden. De grootte van de gaatjes is kleiner dan bij Pridie drilling (0.5 tot 1.0 mm in diameter) waardoor de perforatie van het subchondrale bot minder drastisch is.

Een voordeel van deze techniek is dat de operatie minimaal is, waardoor minder schade aan omliggend weefsel toegebracht wordt. De microfractuur techniek wordt toegepast bij jonge patiënten en sporters met traumatische kraakbeendefecten en heeft over het algemeen goede resultaten (verbetering van gewricht en 75% vermindering van pijn).

Het is echter maar de vraag of deze methode ook werkt voor artrosepatiënten, aangezien het zelf herstellend vermogen van het weefsel afgenomen is en er minder mesenchymale stamcellen aanwezig zijn. (Hunziker 432-63)

### *Tissue engineering*

Tissue engineering houdt in dat het weefsel opnieuw opgebouwd wordt; niet alleen de structuur maar ook de functionaliteit dient daardoor hersteld te worden. Voor deze methode zijn een scaffold (matrix ondersteuning), cellen en de juiste signaalmoleculen, zoals groeifactoren, nodig.

Matrixen zijn er in veel verschillende soorten met verschillende eigenschappen. Zo moet een matrix bijvoorbeeld poreus zijn om celmigratie toe te laten, maar de cellen moeten ook goed kunnen hechten aan de matrix. Ook de biocompatibiliteit is van belang aangezien de immunologische reactie minimaal moet zijn om een afstotingsreactie te vermijden. Daarnaast moet er rekening gehouden worden met de vormstabiliteit, vervorming en elasticiteit.

Een voorbeeld van z'n matrix is alginaat. Alginaat is een carbohydraat geïsoleerd uit algen. Polymerisatie treedt op als alginaat in aanraking komt met calcium. Bovendien bevordert deze matrix de chondrogenese. Een nadeel is echter dat alginaat een afweerreactie van het lichaam oproept. (Hunziker 432-63)

### *ACI, autologous chondrocyte implantation*

Implantatie van autologe chondrocyten, kraakbeencellen, is een veelbelovende techniek, aangezien het hier om het herstel met behulp van het eigen weefsel gaat. Daarmee wordt het afstotingsprobleem omzeild.

Daartoe wordt een stukje kraakbeen operatief uit het gewricht van de patiënt gehaald, waaruit met behulp van behandeling met collagenase de chondrocyten geïsoleerd worden. Vervolgens worden de geïsoleerde chondrocyten gekweekt in medium met 15% autoloog serum (serum van de patiënt). (Brittberg et al. 889-95)

Afhankelijk van het aantal gekweekte cellen, kunnen de chondrocyten 14 tot 21 dagen na de eerste operatie in het gewricht geïmplanterd worden, onder een zogenaamde 'periosteale flap'. (Brittberg et al. 889-95)

Een probleem is echter het opkweken van de chondrocyten. Deze cellen delen als ze worden gekweekt in een enkele laag, maar na een aantal delingen dedifferentiëren deze cellen. Dit houdt in dat de cellen hun ronde vorm verliezen en platter en uitgestrekter worden en meer gaan lijken op fibroblasten; ze veranderen van fenotype. Bovendien produceren ze collageen type 1 in plaats van het kraakbeenspecifieke collageen type 2 en gaat de productie van kraakbeenspecifieke proteoglycanen omlaag. Collageen type 2 en de proteoglycanen zorgen voor een speciale extracellulaire matrix, die in staat is de langdurige en zware krachtenbelasting te verdragen. (von der Mark et al. 531-32) Gededifferentieerde cellen

produceren een andere extracellulaire matrix, die de krachten in een gewricht slechter kunnen weerstaan.

Om deze chondrocyten toch als kraakbeencellen te kunnen gebruiken, zal redifferentiatie moeten optreden, dat wil zeggen: ze moeten hun ronde vorm terug krijgen en collageen type 2 produceren in plaats van collageen type 1. (Chen et al. 95-99;Kawanishi et al. 957-64)

Er is veel onderzoek gedaan naar de redifferentiatie van chondrocyten.

Zo werd er geprobeerd de cellen die op platte ondergrond gekweekt zijn, met behulp van een driedimensionale matrixstructuur aan te zetten tot redifferentiatie. Ook werd getracht de cellen door middel van groeifactoren, ultrasound of elektromagnetisch veld te laten redifferentiëren, zodat autologe chondrocyt transplantatie goed op patiënten toegepast kan worden.

Redifferentiatie van chondrocyten is van groot belang voor autologe chondrocyt implantatie. In deze scriptie zal de invloed van low-intensity pulsed ultrasound en pulsed electromagnetic fields aan de hand van wetenschappelijke publicaties onderzocht worden. Tevens worden enkele andere behandel methoden ter bevordering van de redifferentiatie van gedifferentieerde chondrocyten besproken.



## **Dedifferentiatie**

Bij dedifferentiatie veranderen de cellen van fenotype: ze strekken zich meer uit over het oppervlak en produceren collageen type 1 in plaats van collageen type 2. Daarnaast neemt de productie van kraakbeenspecifieke proteoglycanen af en lijken de cellen meer op fibroblasten. De extracellulaire matrix die geproduceerd wordt, verschilt van gezond kraakbeen en zal de krachten en belasting in een normaal gewricht niet kunnen weerstaan.

Gedifferentieerde chondrocyten zullen meer collageen type 1, 3 en 5, als ook andere proteoglycanen produceren dan chondrocyten in gezond kraakbeen.

In eerste instantie kunnen gedifferentieerde chondrocyten nog redifferentiëren, indien de cellen na korte tijd overgeplaatst worden in een driedimensionale structuur, bijvoorbeeld in alginaat. Na verloop van tijd echter, zullen de cellen onomkeerbaar veranderd zijn. Implantatie van onomkeerbaar gedifferentieerde cellen kan leiden tot kraakbeendegeneratie en disfunctioneren van het gewricht. In het algemeen geldt dat chondrocyten na de vijfde passage niet meer kunnen redifferentiëren als ze worden overgebracht in een 3D alginaat structuur. De cellen zullen geen kraakbeenspecifieke extracellulaire matrix, ECM, produceren, en zullen in veel gevallen overgaan tot apoptose.

Het activeren van caspase-3 speelt een centrale rol bij apoptose. Ook Erk1/2, extracellular-signal-regulated kinase 1/2, speelt een rol bij de regulatie van apoptose, proliferatie en dedifferentiatie van chondrocyten, het reguleert de activiteiten van een aantal nucleaire transcriptiefactoren.

Het adaptor eiwit Shc, Src-homology collagen, is een signaal eiwit van de integrine gemedieerde reactieketens, en is betrokken bij signaal transductie tussen tyrosine kinase en de Ras eiwitten. Ras activatie stimuleert de Erk MAP (mitogen-activated protein) kinase cascade. (Schulze-Tanzil et al. 448-58)

Het Shc adaptor eiwit vormt het Shc-Grb2 complex, dat de Ras-MAP kinasereactie keten activeert. Erk (extracellular-signal regulated kinase) MAP kinase cascade is een signaal transductie reactieketen, dat intracellulaire respons op extracellulaire binding van groeifactoren reguleert.

Het Shc adaptor eiwit in de geactiveerde Erk1/2 zijn mogelijk samen een onderdeel van een complex dat de Ras-MAP kinase pathway activeert. Inhibitie van het Erk signaal systeem stimuleert inductie van apoptose. (Schulze-Tanzil et al. 448-58)

Humane chondrocyten (uit de kop van het femur) die uit een 3D alginaatkweek in DMEM/F12 met 10% FCS migreren naar de bodem van een petrischaaltje, nemen flink in aantal toe bereiken na ongeveer drie dagen confluentie en lijken meer op fibroblasten dan op chondrocyten. Als deze cellen weer in alginaat 3D structuur gebracht worden, zijn de cellen na één tot vier passages in staat om te redifferentiëren en brengen collageen type II tot expressie. Deze cellen vormen een kraakbeenspecifieke extracellulaire matrix. Van de cellen uit passage 5 en passage 6 zijn slechts enkele in staat tot de productie collageen type 2, uit p7 en p8 geen enkele cel. De cellen uit passage 5-8 zijn niet in staat om matrix te produceren en ondergaan na verloop van tijd apoptose.

Het eiwit Shc bestaat uit drie isovormen, die betrokken zijn bij de eiwit-eiwit interacties. De cellen uit p1-p4 synthetiseren na recultivatie in 3D alginaat structuur, alle drie de vormen van Shc. Tussen p1 en p4 was een lichte stijging in Erk1/2 waar te nemen.

De cellen vanaf passage 5 produceerden geen van de drie vormen van het Shc eiwit meer en ook het Erk1/2 gehalte neemt opmerkelijk af na p4. In deze tweede groep cellen is geen interactie waar te nemen tussen het Shc eiwit en de Erk1/2, waardoor de inhiberende werking op het apoptose signaal vermindert. (Schulze-Tanzil et al. 448-58)

## **Redifferentiatie**

Redifferentiatie van chondrocyten wil zeggen dat de cellen hun ronde vorm terug krijgen en weer Col2 gaan produceren en kraakbeenspecifieke proteoglycanen, zodat de cellen samen met hun extracellulaire matrix weer een stevig, stressbestendig kraakbeenlaagje vormen.

Over het algemeen zijn chondrocyten in staat te redifferentiëren als ze worden overgeplaatst in 3D alginaat structuur, na 1 tot 4 passages.

De chondrocyten krijgen dan hun typische, ronde vorm terug en bezitten een goed ontwikkelde ruw endoplasmatisch reticulum, een groot Golgi apparaat en kleine vacuoles en granules. (Schulze-Tanzil et al. 448-58)

PI3K (Phosphatidylinositol-3-OH-kinase) is een cytoplasmatisch eiwit dat bestaat uit twee subeenheden, p110 (catalytisch) en p85 (regulatoir). Dit eiwit heeft een controlerende functie op verschillende signalen die tot apoptose leiden.

Akt is nauw betrokken bij de organisatie van de corticale actine ring tijdens de chondrogenese. Deze ring speelt waarschijnlijk ook een rol bij de redifferentiatie van chondrocyten op een chitosan membraan. Als de corticale actine ring verstoord wordt tijdens het overbrengen van de cellen op chitosan, wordt de collageen 2 expressie onderdrukt.

PI3K/Akt signalen zijn noodzakelijk bij chondrogenese. Tijdens redifferentiatie van gededifferentieerde chondrocyten met behulp van een chitosan membraan, is PI3K noodzakelijk voor het redifferentiatieproces: bij inhiberen van PI3K is geen collageen type 2 te vinden. De actinestructuur wordt echter niet beïnvloed door gebrek aan PI3K. Bij afwezigheid van Akt wordt er geen collageen type II geproduceerd, er is echter geen effect waar te nemen in de corticale actine ring. Dit duidt erop dat de activatie van PI3K/Akt noodzakelijk is voor productie van collageen type 2 en daarmee dus voor chondrocyt redifferentiatie op chitosan. Dit is gebleken uit een onderzoek met mesenchymale chondrocyten uit kippenembryo's, gekweekt in F12 medium met 10% FBS. De chondrocyten werken na passage 4 overgebracht op een chitosanmembraan. (Park et al. 1272-78)

## **Opwekken van redifferentiatie**

Er bestaan verschillende methoden die de redifferentiatie van gedifferentieerde chondrocyten kunnen induceren. Zo kan het overplaatsen van gedifferentieerde cellen in een 3D structuur een gunstig effect hebben op de redifferentiatie, maar ook behandelingen met ultrasound of elektromagnetisch veld worden gebruikt.

### *Invloed van 3D structuren*

Gedifferentieerde cellen redifferentiëren als ze in 3D structuur worden overgebracht, bijvoorbeeld in alginaat of agarose. De cellen worden weer sferisch van vorm en produceren de kraakbeenspecifieke extracellulaire matrix. Redifferentiatie gebeurt echter niet meer na een te lange periode van dedifferentiatie; zoals bovenvermeld wordt hier in het algemeen een periode van maximaal vier passages aangehouden. (Schulze-Tanzil et al. 448-58)

### *Invloed van LIPUS*

De mechanische energie van low intensity pulsed ultrasound kan door het weefsel geabsorbeerd worden en het kan micromechanische stress induceren. LIPUS heeft in tegenstelling tot continu ultrasound geen thermische effecten op het weefsel.

Low intensity pulsed ultrasound kan *in vivo* bijdragen aan verbetering van beschadigd kraakbeen. (Tien et al. 1174-81) Ook zou ultrasound *in vitro* bijdragen aan gunstigere kweekomstandigheden voor chondrocyten.

Bekend is dat LIPUS de osteogenese *in vivo* stimuleert. Daarnaast stimuleert het de vorming humane chondrocyten uit fibroblasten en de productie van kraakbeenspecifieke extracellulaire matrix bij behandeling van botbreuken. Ook zou de matrixproductie bij chondrocyten gekweekt in een enkele laag stimuleren. LIPUS behandeling in combinatie met TGF- $\beta$  zorgt ook voor een gunstig effect op het aggregaatchealte van zo'n enkele cellaag. (Korstjens et al. 1263-70) Of de cellen voor de behandeling met LIPUS gedifferentieerd waren werd helaas niet onderzocht.

Het effect van LIPUS op humane cellen in een 3D kweek (DMEM met 10% FBS) is ook onderzocht. Hiervoor werden humane chondrocyten uit gewrichtskraakbeen uit vingers of tenen geïsoleerd en in 3D kweek gebracht met behulp van agarose. Er wordt niet vermeld of er eerst de mate van dedifferentiatie van chondrocyten werd onderzocht voordat ze in de 3D omgeving gebracht werden. De samples werden dagelijks behandeld met verschillende intensiteiten LIPUS. (Tien et al. 1174-81) De hoeveelheid aggrecan in de LIPUS behandelde samples was toegenomen ten opzichte van de controle samples. Ook bleek dat voor de hoeveelheid aggrecan een intensiteit van  $48 \text{ mW/cm}^2$  het meest gunstig was. Daarnaast kwam naar voren dat de jonge chondrocyten, van 1 jaar, meer aggrecan produceerden dan de iets oudere chondrocyten, 10 jaar.

De hoeveelheid DNA bleef ongeveer gelijk bij de verschillende intensiteiten ultrasound. De hoeveelheid collageen type 2 was het meest gunstig bij  $48 \text{ mW/cm}^2$ , en was toegenomen ten opzichte van het controle-experiment.

Voor dit onderzoek (Tien et al. 1174-81) vond LIPUS behandeling plaats door de transducer in een waterbad te leggen, terwijl de samples zich aan het oppervlak van het water bevonden. De afstand die door het ultrageluid afgelegd moest worden door het water, was 15 cm. De frequentie bedroeg 1.0 MHz, met een  $200 \mu\text{s}$  pulsduur met een herhalingsfrequentie van 1.0 kHz.

### *Invloed van PEMF*

In het algemeen wordt gedacht dat pulsed electromagnetic field een reactie in het kraakbeen op gang brengt, waardoor de endochondrale ossificatie gestimuleerd wordt. PEMF wordt daarom gebruikt ter stimulatie van het herstel van botbreuken in het bijzonder in de ledematen. (Pezzetti et al. 396-401; Walker, Denegar, and Preische 530-35)

Uit zowel enkele *in vivo* als *in vitro* studies blijkt dat PEMFs bij kunnen dragen aan de verandering van enkele relevante fysiologische parameters van botcellen, zoals proliferatie, differentiatie, synthese van de ECM componenten en de productie van groeifactoren. (De Mattei et al. 163-68; Pezzetti et al. 396-401) Kraakbeen kan door PEMF gestimuleerd worden tot toename van de productie van kraakbeenspecifieke extracellulaire matrix. (Ciombor et al. 40-50).

Bij ratten (28-35 dagen oud) werd een botscaffold subcutaan ingebracht, waarna een deel van de ratten met PEMF behandeld werd en een deel niet, de controlegroep. Na acht dagen behandeling met PEMF was een drievoudige toename in aggrecan expressie en een tweevoudige toename in type II collageen expressie waar te nemen in vergelijking met de controlegroep. (Ciombor et al. 40-50) Immunolocalisatie voor proteoglycanen en type II collageen liet zien dat er meer ECM geproduceerd werd door cellen behandeld met EMF dan in de onbehandelde cellen. (Ciombor et al. 40-50) De hoeveelheid DNA was echter vergelijkbaar tussen de controlegroep en de PEMF-behandelde cellen, dus de hoeveelheid cellen is ongeveer gelijk gebleven.

Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden dat in weefsel dat behandeld wordt met PEMF een toename in chondrogenese waar te nemen is en een versnelling van het ECM productie proces. (Ciombor et al. 40-50) Hieruit blijkt dat PEMF een gunstige invloed zou kunnen hebben bij het redifferentiatieproces van chondrocyten.

*In vivo* studies hebben aangetoond dat PEMF de compositie van kraakbeenspecifieke ECM kan beïnvloeden. Het GAG niveau in embryonaal muizenkraakbeen en onvolwassen konijnenkraakbeen steeg bij behandeling met PEMF. (Pezzetti et al. 396-401)

Vijf dagen behandeling met PEMF zorgde voor een toename in proliferatie in zowel konijn chondrocyten als in menselijke kraakbeenchondrocyten. (Pezzetti et al. 396-401)

PEMF behandelingen zorgden voor een significante toename in DNA synthese in zowel nasale als in gewrichtschondrocyten, gekweekt in een cultuur met 10% of 0.5% FCS. (fetal calf serum) (Pezzetti et al. 396-401).

PEMF induceert een toename in proliferatie van humane chondrocyten. Zowel articulaire als nasale chondrocyten produceren *in vitro* collageen type II, een specifieke marker van het chondrocyten fenotype. De proliferatie respons is echter wel afhankelijk van de hoeveelheid aanwezig serum in het medium. Meestal is het serumgehalte rond de 10%. (De et al. 163-68;Pezzetti et al. 396-401)

PEMF zou mogelijk ook kunnen bijdragen aan de behandeling van degeneratieve kraakbeenaandoeningen, zoals artrose. (De Mattei et al. 163-68)

De grootste toename in proteoglycaansynthese in chondrocyten uit de teengewrichten van runderen, werd verkregen bij een PEMF sterkte van 1.5 mT, de behandeling duurde 24h. de cellen werden in enkele laag gekweekt in DMEM/F12 met 10% FBS. (Pulse duration: 1.3 ms,

frequentie 2-110 Hz). De toename in PG's was niet afhankelijk van de frequentie, maar van de behandelingsduur. (De Mattei et al. 163-68)

Voor zowel LIPUS als PEMF lijken de gegevens erop te wijzen dat deze behandelmethoden een gunstig effect zouden kunnen hebben op de redifferentiatie van gedifferentieerde chondrocyten. Er wordt echter in het algemeen gekeken naar de proliferatie van cellen en naar de productie van componenten uit de extracellulaire matrix, maar niet naar de dedifferentiatiegraad van de cellen. Er wordt gewerkt met chondrocyten in enkele laag of in een 3D structuur, terwijl een combinatie van deze twee kweekvormen, eerst kweken in enkele laag en vervolgens overbrengen in 3D structuur en behandelen, juist geschikt zou zijn om de redifferentiatie van chondrocyten te bestuderen.

#### *Invloed van een laag zuurstofgehalte*

De omstandigheden van chondrocyten in gewrichtskraakbeen zijn anders dan de omstandigheden in een kwekschaaltje. Zo is de hoeveelheid zuurstof in een gewricht veel lager dan in de lucht. Een lagere zuurstofconcentratie blijkt een positieve uitwerking te kunnen hebben op de redifferentiatie van gedifferentieerde chondrocyten. (Malda et al. 306-13)

Zuurstof speelt een grote rol als elektron acceptor en heeft een functie in onder andere de chondrogenese. Het zuurstofgehalte in gezond gewrichtskraakbeen bedraagt slechts 1%, hetgeen overeen komt met 5% verzadiging van zuurstof in de oplossing.

Het zuurstofgehalte blijkt invloed te hebben op de redifferentiatie van humane chondrocyten gekweekt in DMEM-Glutamax met 10% FCS. Hiervoor werd een pellet van gedifferentieerde cellen gekweekt onder verschillende concentraties zuurstof. De onderzochte percentages zuurstof waren 100% zuurstof verzadiging (21% zuurstof), 25% zuurstof verzadiging (5,25% zuurstof) en 5% zuurstof verzadiging (1% zuurstof). (Malda et al. 306-13)

Na 7 dagen bleek er bij de chondrocyten gekweekt onder 25% zuurstof verzadiging een toename in glycosaminoglycanen (GAG's) waar te nemen, en ook het aantal cellen was toegenomen. Na 21 dagen behandeling waren het aantal cellen en de hoeveelheid GAGs van de samples gekweekt onder 5% zuurstof verzadiging en 25% zuurstof verzadiging

vergelijkbaar. De cellen gekweekt onder 100% zuurstof verzadiging namen echter af in aantal. De hoeveelheid geproduceerd collageen type 2 lag in de samples na 21 dagen gekweekt onder 5% zuurstof verzadiging en 25% zuurstof verzadiging duidelijk hoger dan bij de samples onder 100% zuurstof verzadiging, de hoeveelheid collageen type 2 lag bij de onder 25% zuurstof verzadiging gekweekte samples na 21 dagen hoger dan de samples gekweekt bij 5% zuurstof verzadiging.

Dit duidt mogelijk op een positieve bijdrage van een zuurstofgehalte van 25% DO aan de redifferentiatie van gedifferentieerde chondrocyten. Hierbij moet echter wel rekening gehouden worden met factoren als samplegrootte ( $1 \text{ mm}^3$  in deze studie) en het feit dat deze cellen niet in een scaffold geïmplantéerd waren. (Malda et al. 306-13)

### *Invloed van hydrostatische druk*

In gezond gewrichtskraakbeen is de druk verschillen van de druk in een kweekcultuur (0,1MPa). De belasting van chondrocyten *in vivo* bedraagt 3,5-18 MPa. (Kawanishi et al. 957-64)

Omdat de druk in een gewricht zo verschillend is, is het mogelijk dat de cyclische hydrostatische druk bijdraagt aan de redifferentiatie van chondrocyten.

Uit kraakbeen afkomstig uit kniegewrichten van runderen ( $\leq 12$  weken) werden chondrocyten geïsoleerd en in Ham's F12 met 10% FBS op een platte bodem gekweekt. Na drie passages waren de cellen gedifferentieerd.

Vervolgens werden de gedifferentieerde chondrocyten in een pellet in DMEM met insulín transferrín selenium, ITS+, gebracht.

De gedifferentieerde chondrocyten werden in 3D pellet dagelijks vier uur blootgesteld aan een cyclische druk van 5 MPa, met een frequentie van 0,5 Hz. Dit om de natuurlijke druk in een gewricht na te bootsen. De samples werden in een kunststof zak (polyolefinen) in een vat onder druk gezet.

De zuurstof en koolstofdioxide omstandigheden waren als volgt:

$P_{O_2}$ : 140,5 mmHg (18,5%)

$P_{CO_2}$ : 33,5 mmHg (4,4%)

Uit de analyse bleek dat de aggrecan mRNA levels in de samples onder druk duidelijk omhoog gingen.



Cyclische hydrostatische druk zou dus kunnen bijdragen aan redifferentiatie van chondrocyten. Hierbij moet echter wel rekening gehouden worden met het feit dat de cellen niet in een scaffold geïmplantieerd waren, maar in een 3D pellet onder druk gebracht werden. (Kawanishi et al. 957-64)

## Discussie

De invloed van low-intensity pulsed ultrasound en pulsed electromagnetic fields op redifferentie van gedifferentieerde chondrocyten wordt in het algemeen als gunstig omschreven, al zijn er naar mijn mening (nog) geen doorslaggevende resultaten geboekt. De resultaten zijn meestal beter dan in de controle-experimenten, maar hoeveel beter het redifferentiatie proces precies verloopt, is niet gekwantificeerd.

In de verschillende studies werden verschillende experimenten uitgevoerd, met verschillende soorten cellen, verschillende kweekmethoden en verschillende intensiteit en duur van de behandelingen met LIPUS en PEMF. Bovendien werd vaak met chondrocyten gewerkt die direct uit het gewrichtskraakbeen geïsoleerd werden, zonder dat eerst dedifferentiatie plaats had gevonden. Ook werden niet alle gegevens in elk artikel vermeld. Dit maakt dat de onderzoeken niet echt met elkaar te vergelijken zijn.

In het algemeen bestaat er een positief effect van LIPUS of PEMF op het redifferentiatieproces, maar dan wel in combinatie met een 3D kweekstructuur.

Daarnaast bestaan er behandelmethoden om de omstandigheden in een gewricht na te bootsen, zoals een verlaagd zuurstofgehalte of cyclische hydrostatische druk. Ook deze methoden zouden een gunstig effect hebben.

Een concreet onderzoek naar de effecten van LIPUS en PEMF op redifferentiatie en het vergelijken van de verschillende methoden ontbreekt.

Het effect van LIPUS en PEMF op redifferentiatie van gedifferentieerde chondrocyten zou onderzocht kunnen worden door eenzelfde type chondrocyten te kweken tot dedifferentiatie opgetreden is, en daarna de cellen bloot te stellen aan verschillende concentraties LIPUS en PEMF. Belangrijk is dat cellen zich in een zelfde matrix bevinden en onder zelfde omstandigheden. Alleen de behandeling met LIPUS of PEMF mag variabel zijn, zodat de effecten van LIPUS en PEMF op redifferentiatie onderzocht kunnen worden.

## Reference List

1. Brittberg, M., et al. "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation." *N.Engl.J.Med.* 331.14 (1994): 889-95.
2. Chen, G., et al. "Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh." *FEBS Lett.* 542.1-3 (2003): 95-99.
3. Ciombor, D. M., et al. "Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins." *J.Orthop.Res.* 20.1 (2002): 40-50.
4. De Mattei, M., et al. "Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields." *Osteoarthritis.Cartilage.* 15.2 (2007): 163-68.
5. ---. "Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields." *Osteoarthritis.Cartilage.* 15.2 (2007): 163-68.
6. ---. "Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields." *Osteoarthritis.Cartilage.* 15.2 (2007): 163-68.
7. De, Mattei M., et al. "Proteoglycan synthesis in bovine articular cartilage explants exposed to different low-frequency low-energy pulsed electromagnetic fields." *Osteoarthritis.Cartilage.* 15.2 (2007): 163-68.

8. Hunziker, E. B. "Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects." *Osteoarthritis.Cartilage*. 10.6 (2002): 432-63.
9. Kawanishi, M., et al. "Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes enhanced by cyclic hydrostatic pressure under a gas-controlled system." *Tissue Eng* 13.5 (2007): 957-64.
10. Korstjens, C. M., et al. "Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes in vitro." *Med.Biol.Eng Comput*. 46.12 (2008): 1263-70.
11. Langer, R. and J. P. Vacanti. "Tissue engineering." *Science* 260.5110 (1993): 920-26.
12. Malda, J., et al. "Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation." *Biomaterials* 24.28 (2003): 5153-61.
13. Malda, J., et al. "Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes." *Osteoarthritis.Cartilage*. 12.4 (2004): 306-13.
14. Ogilvie-Harris, D. J. and R. W. Jackson. "The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae." *J.Bone Joint Surg.Br.* 66.5 (1984): 660-65.
15. Park, E. H., et al. "Integrity of the cortical actin ring is required for activation of the PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways in redifferentiation of chondrocytes on chitosan." *Cell Biol.Int.* 32.10 (2008): 1272-78.
16. Pezzetti, F., et al. "Effects of pulsed electromagnetic fields on human chondrocytes: an in vitro study." *Calcif.Tissue Int.* 65.5 (1999): 396-401.

17. Schulze-Tanzil, G., et al. "Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis." Osteoarthritis.Cartilage. 12.6 (2004): 448-58.
18. Tien, Y. C., et al. "Effects of pulsed low-intensity ultrasound on human child chondrocytes." Ultrasound Med.Biol. 34.7 (2008): 1174-81.
19. von der Mark, K., et al. "Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture." Nature 267.5611 (1977): 531-32.
20. Walker, N. A., C. R. Denegar, and J. Preische. "Low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic field in the treatment of tibial fractures: a systematic review." J.Athl.Train. 42.4 (2007): 530-35.