



Botcellen reageren op schuifspanning

A.D. Bakker¹
J. Klein-Nulend¹
K. Soejima²
E.H. Burger¹

Edentate patiënten vertonen een aanzienlijke reductie in botvolume door het verlies aan mechanische stimulatie van het botweefsel. Bot signaleert mechanische belasting via het ontstaan van een vloeistofstroom rondom het netwerk van osteocyten in de botmatrix. Op welke wijze deze vloeistofstroom de cellen activeert, is echter niet bekend. Mogelijk gebeurt dit door het opwekken van stroompotentialen, door het bevorderen van het chemotransport of via schuifspanning op cellen.

In dit onderzoek werden botcellen onderworpen aan een vloeistofstroom en werd de reactie van de botcellen bepaald door de productie van stikstofoxide (NO) en prostaglandine E₂ (PGE₂) te meten. Bij een aantal experimenten werd dextran aan het kweekmedium toegevoegd om de schuifspanning op de cellen te verhogen zonder de stroompotentialen of het chemotransport te beïnvloeden. De botcellen reageerden op de vloeistofstroom met een verhoogde productie van NO en PGE₂. De uitscheiding van beide signaalmoleculen nam bovendien toe met de toename van de schuifspanning. De conclusie is dat botcellen op mechanische belasting reageren via de schuifspanning die op de cellen wordt uitgeoefend.

BAKKER AD, KLEIN-NULEND J, SOEJIMA K, BURGER EH. Botcellen reageren op schuifspanning. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2002; 109: 383-386.

Inleiding

Bot is een levend weefsel en de beenderen in ons lichaam worden continu vernieuwd door de gecombineerde actie van osteoclasten en osteoblasten. Bot wordt aangemaakt op plaatsen waar de belasting hoog is en afgebroken waar de belasting laag is. Dit is in de praktijk vooral duidelijk bij de edentate patiënt. Doordat het kaakbot bij deze patiënten niet langer mechanisch wordt belast, wordt het afgebroken en 'slinkt' de kaakwal. Hierdoor kunnen problemen ontstaan met de stabiliteit en retentie van een gebitsprothese. Tegelijkertijd kan het plaatsen van orale implantaten bij deze patiënten moeilijk of onmogelijk zijn omdat er onvoldoende bot voorhanden is.

Wanneer beenderen onder fysiologische condities worden belast, zorgt dit voor minieme vervormingen. Deze vervormingen zijn zó klein dat het onwaarschijnlijk is dat deze direct door de botcellen op het botoppervlak geregistreerd worden (Burr *et al*, 1996). Verspreid in de gehele botmatrix liggen echter osteocyten, die 95% van de botcelpopulatie uitmaken. Osteocyten zijn onderling met elkaar verbonden door hun lange 'celvingers'. Op die manier vormen zij een groot netwerk dat in staat is om zeer snel gegevens uit te wisselen. Dit netwerk van osteocyten in de botmatrix wordt omgeven door een dun laagje viskeuze (strokerige) vloeistof. Wanneer bot onder invloed van belasting een klein beetje vervormt, gaat de vloeistof die het netwerk van osteocyten omgeeft, stromen. Dit is te vergelijken met het uitknijpen van een stijve, met water door drenkte spons. Die vloeistofstroom wordt geregistreerd door de osteocyten, die reageren door signaalmoleculen af te geven, zoals stikstofoxide (NO) en prostaglandine E₂ (PGE₂) (Burger en Klein-Nulend, 1999). Deze signaalmoleculen beïnvloeden daarna de activi-

teit van de osteoblasten en de osteoclasten. Hierdoor wordt bot aangemaakt waar dat nodig is of juist afgebroken. Zo zorgt mechanische belasting via het opwekken van een vloeistofstroom in het bot voor de aanpassing van botweefsel.

Alhoewel bekend is dat een door mechanische belasting geïnduceerde vloeistofstroom de botcellen activeert, is het niet precies bekend op welke wijze de vloeistofstroom de osteocyten activeert. Mogelijk vindt deze activering plaats via het opwekken van stroompotentialen, door het bevorderen van het chemotransport of via schuifspanning op de cellen (Pienkowski en Pollock, 1983; Reich *et al*, 1990; Jacobs *et al*, 1998).

Stroompotentialen zijn elektrische potentialen die ontstaan wanneer vloeistof langs de negatief geladen oppervlakten van de botmatrix en celmembranen stroomt (Cowin *et al*, 1995). Stroompotentialen kunnen mogelijk direct hun effecten op botcellen uitoefenen door activering van voltagevoelige ionenkanalen in de celmembraan.

Met chemotransport wordt het transport van voedings- en afvalstoffen van en naar de cellen bedoeld. Aangezien de vloeistofstroom rond de osteocyten, opgewekt door mechanische belasting, het transport van stoffen van en naar de botcellen zeer sterk verbetert, is het mogelijk dat chemotransport een rol speelt in de mechanotransductie (Piekarski en Munro, 1977; Knothe Tate *et al*, 1998).

Schuifspanning is een mechanische kracht, parallel aan de stroomrichting, die optreedt wanneer er een vloeistof op laminaire wijze stroomt, bijvoorbeeld over botcellen. Schuifspanning is in staat om de cellen te vervormen en zo signalen over te dragen via het cytoskelet van de cel en celhechtingseiwitten (integrines). Bovendien kan de vervorming van de cellen sommige soorten ionkanalen in de celmembraan activeren door

Samenvatting

Trefwoorden:

- Orale celbiologie
- Botmetabolisme

Uit 'de afdeling Orale Celbiologie van het Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA) en 'de afdeling Orthodontie van de Kagoshima School for Dentistry in Kagoshima, Japan.

*Bewerkte vertaling van eerder verschenen publicatie:

Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH. The production of nitric oxide and prostaglandin E₂ by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 2001; 34: 671-677.
Op 8 februari jl. werd aan dit artikel de Bohn Stafleu Van Loghum-Thoden van Velzen prijs toegekend.

Datum van acceptatie:

29 juli 2002.

Adres:

Mw. A.D. Bakker
ACTA
Van der Boechorststraat 7
1081 BT AMSTERDAM
ad.bakker.ocb.acta@med.vu.nl

Tabel 1. Karakteristieken van de pulserende vloeistofstroom.

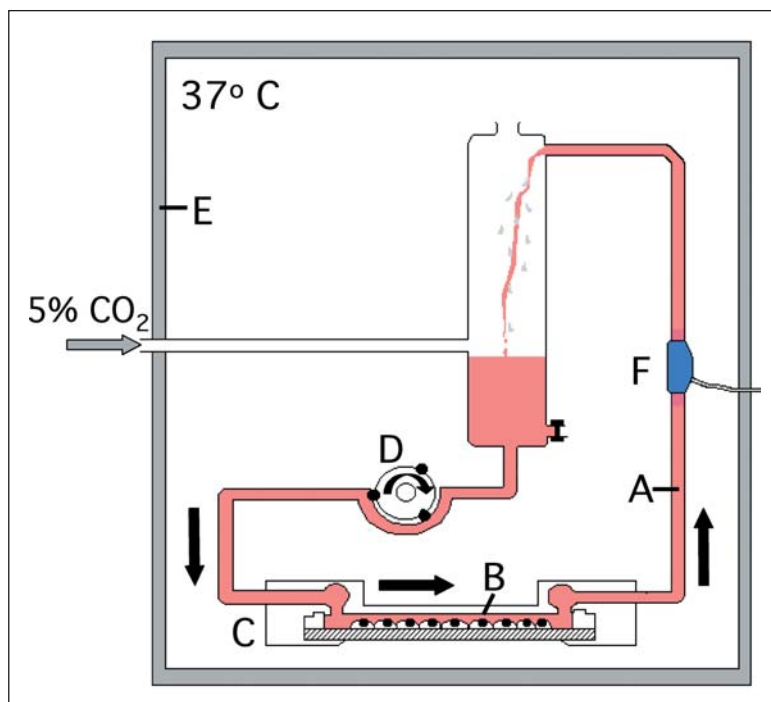
	Controle	Controle Dextran	PFF Laag	PFF Midden	PFF Hoog	PFF Dextran
Gemiddelde stroomsterkte (cm ³ /sec)	0	0	0,20	0,33	0,63	0,20
Gemiddelde schuifspanning (Pa)	0	0	0,39	0,64	1,20	1,20
Amplitude (Pa)	0	0	0,12	0,27	0,37	0,37

In de dextran PFF-groep was de schuifspanning gelijk aan de hoge PFF-groep, terwijl de stroomsterkte, en hiermee samenhangend de stroompotentialen en het chemotransport, gelijk waren aan de lage PFF-groep (de vetgedrukte getallen).

deze te openen (rekgeactiveerde ionenkanalen)(Ajubi *et al.*, 1996; Knudsen en Frangos, 1997; Carvalho *et al.*, 1998; Pavalko *et al.*, 1998).

In dit onderzoek werd onderzocht door welke van de bovengenoemde aspecten van een vloeistofstroom botcellen worden geactiveerd. Dit werd gedaan door botcellen bloot te stellen aan een vloeistofstroom, en daarbij de schuifspanning te variëren zonder het chemotransport en de stroompotentialen te beïnvloeden. NO- en PGE₂-productie werd gebruikt om de botcelactivering te bepalen, aangezien voor beide *in vivo* is aangetoond dat ze essentieel zijn voor de botformatie in reactie op mechanische belasting (Forwood, 1996; Turner *et al.*, 1996). De hypothese van het onderzoek was dat schuifspanning de factor is die de reactie van botcellen op een vloeistofstroom bepaalt.

Afb. 1. Diagram van het pulserende vloeistofstroomapparaat. De pulserende vloeistofstroom werd gegenereerd door kweekmedium (A) met behulp van een rollenpomp (D) over de cel-laag (B) te pompen. De cellen, uitgezaaid op een glazen plaatje, werden in een parallelle-plaat-flowkamer (C) geplaatst. Het geheel werd bij 37°C in een stoof geplaatst in een atmosfeer van 5% CO₂ in bevochtigde lucht (E) om de pH van het medium op peil te houden. De stroomsterkte werd gedurende het experiment gemeten m.b.v. een bloedstroommeter (F).



Materiaal en methode

Botcellen werden verkregen uit muizenbotten, die werden uitgerepareerd en in kleine stukjes geknipt. De botstukjes werden gekweekt in een kweekmedium waaraan antibiotica, alsmede vitamine C en 10% foetaal kalfserum werden toegevoegd. Als er genoeg cellen waren, werden deze geoogst en met 5×10^5 cellen op glazen plaatjes uitgezaaid voor het vloeistofstroomexperiment. Tijdens het experiment werd een kweekmedium met 0,2% bovine serum albumin (BSA) gebruikt.

Botcellen werden gedurende 15 minuten blootgesteld aan mechanische belasting door middel van een pulserende vloeistofstroom (pulsating fluid flow; PFF) van verschillende stroomsterkten. Daarbij is het belangrijk om op te merken dat stroompotentialen, chemotransport en schuifspanning alle toenemen bij toenemende stroomsterkte. De glaasjes, met daarop de cellen, werden in een zogenaamd 'flowapparaat' geplaatst (afb. 1). Controleglaasjes werden onder stationaire condities gehouden. In sommige experimentele en controlegroepen werd 2,8% neutrale dextran toegevoegd aan het medium om de viscositeit van het medium te verhogen. Op die manier werd de schuifspanning op de cellen verhoogd, zonder de stroompotentialen of het chemotransport te beïnvloeden. Elk glaasje werd aldus ingedeeld in één van in totaal 6 groepen, waarvan de condities zijn weergegeven in tabel 1. Mediummonsters werden genomen op 5, 10 en 15 minuten na start van het experiment en geanalyseerd op het gehalte aan NO en PGE₂. NO werd gemeten in de vorm van NO₂⁻ (het stabiele afbraakproduct van NO) met behulp van Griess reagens, dat is samengesteld uit sulfanilamide, naphthylethyleendiamine en H₃PO₄. De rode kleur die bij de reactie tussen Griess en NO₂⁻ ontstaat, werd gemeten met behulp van een spectrofotometer. PGE₂-uitscheiding in het kweekmedium werd gemeten met behulp van een enzym immunoassay (EIA) kit, die berust op de binding van PGE₂ aan een muizenantilichaam tegen PGE₂.

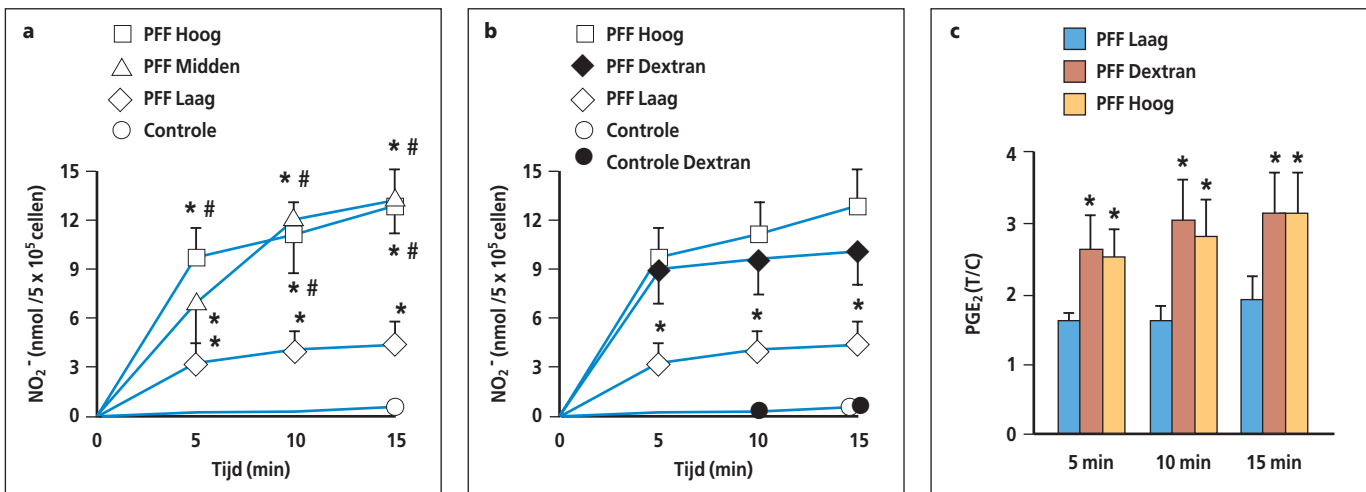
Data van separate experimenten werden uitgedrukt als gemiddelde \pm SEM. Vergelijkingen tussen de groepen werden uitgevoerd met een Mann-Whitney-U-test.

Resultaten

Cellen begonnen na 3-5 dagen in kweek uit de botstukjes te groeien, en bereikten confluente binnen 13-17 dagen.

Zoals te zien is in afbeelding 2a produceerden botcellen onder controlecondities slechts hele kleine hoeveelheden NO en reageerden ze op de PFF met een significant hogere NO-productie. Bovendien produceerden de cellen die waren blootgesteld aan een hogere schuifspanning (midden PFF en hoge PFF) meer NO dan de cellen die blootgesteld waren aan een lage schuifspanning (lage PFF).

Afbeelding 2b toont dat het toevoegen van 2,8% dextran aan controlekweken op zich geen effect had op de NO-productie. Werd dextran echter tijdens de vloeistofstroom (PFF) toegevoegd, waardoor de schuifspan-



Afb. 2. Effect van schuifspanning op de productie van signaalmoleculen door botcellen.

a. Effect van stroomsterkte op de NO-productie. Toenemende stroomsterkte veroorzaakte een dosisafhankelijke toename in NO-productie. * = significant effect van PFF; # = significant hogere NO-productie dan PFF laag ($p < 0,05$).

b. Effect van schuifspanning op de NO-productie. Verhogen van schuifspanning op de cellen tot op het niveau van hoge PFF, door toevoegen van dextran aan het medium, zorgt voor een toename in NO-productie. * = significant effect van verhogen schuifspanning ($p < 0,05$).

c. Effect van schuifspanning op de PGE₂-productie, uitgedrukt als behandelde/controlewaarden (treatment over control; T/C). Verhogen van schuifspanning tot op het niveau van hoge PFF, zorgt voor een toename in PGE₂-productie. * = significant effect van verhogen schuifspanning ($p < 0,05$).

ning op de cellen verhoogd werd tot het niveau van hoge PFF, dan zorgde dit voor een NO-productie die vergelijkbaar was met die van cellen onderworpen aan hoge PFF. Hetzelfde effect van verhogen van de schuifspanning, maar dan op de PGE₂-productie, is te zien in afbeelding 2c. Omdat de basale PGE₂-productie nogal variabel is, werden PGE₂-waarden van de PFF-behandelde groepen van elk experiment gedeeld door de PGE₂-productie in de bijbehorende controlebotcellen (treatment over control ratio; T/C). Wanneer de PGE₂-productie op die manier werd uitgedrukt, was het duidelijk dat verhogen van de schuifspanning door toevoegen van dextran eveneens een significante toename van de PGE₂-productie veroorzaakte.

Discussie

Dit onderzoek toont niet alleen aan dat botcellen *in vitro* in staat zijn om te reageren op een mechanische stimulus in de vorm van een vloeistofstroom, maar ook dat deze reactie afhankelijk is van de intensiteit van de stimulus. Toevoegen van dextran zorgt voor een toename van de viscositeit van het medium, waardoor de schuifspanning ook toeneemt, zonder dat de stroompotentialen of het chemotransport worden beïnvloed. Dit in tegenstelling tot het verhogen van de stroomsterkte, die een verhoging van alledrie bovengenoemde aspecten tot gevolg heeft. Het feit dat cellen onderworpen aan lage PFF met dextran (lage stroompotentialen en chemotransport, maar hoge schuifspanning) een vergelijkbare NO- en PGE₂-productie vertonen als cellen onderworpen aan hoge PFF (hoge stroompotentialen, schuifspanning en chemotransport), betekent dat de respons van botcellen op een vloeistofstroom vooral wordt bepaald door schuifspanning. Reich et al (1990) kwamen tot een vergelijkbare conclusie na het bestuderen van de productie van cyclisch adenosine-

monofosfaat (cAMP) door botcellen in reactie op een vloeistofstroom in de aan- of afwezigheid van dextran. In het hier beschreven onderzoek zijn NO en PGE₂ bestudeerd in plaats van cAMP, omdat *in vivo* is aangetoond dat deze signaalmoleculen belangrijk zijn voor de adaptatie van bot aan mechanische belasting (Forwood, 1996; Turner *et al*, 1997).

Ook McAllister en Frangos (1999) kwamen in hun onderzoek tot de conclusie dat schuifspanning een belangrijke mediator is voor de respons van botcellen op een vloeistofstroom, na het meten van NO als parameter van de botcelrespons. Zij bepaalden de NO-productie echter pas 6 uur na aanvang van de vloeistofstroom. Aangezien activering van eNOS (het enzym verantwoordelijk voor NO-productie door botcellen in reactie op mechanische stimuli) zeer snel plaats vindt, werd in het hier beschreven onderzoek de NO-productie gemeten tot 15 minuten na aanvang van de vloeistofstroom (Klein-Nulend *et al*, 1998; Zaman *et al*, 1999). Daarnaast maakten McAllister en Frangos (1999) gebruik van een constant gelijk blijvende vloeistofstroom. *In vivo* zal de vloeistofstroom langs het netwerk van osteocyten als gevolg van de variatie in de belasting waaraan bot onderhevig is (zoals kauwen of lopen) echter nooit statisch zijn. Daarom is een pulserende vloeistofstroom, zoals die hier is gebruikt, waarschijnlijk beter vergelijkbaar met de wijze waarop *in vivo* belasting wordt overgedragen.

In tegenstelling tot de hier beschreven resultaten is door Jacobs et al (1998) gesuggereerd dat de respons van botcellen op een vloeistofstroom wellicht afhankelijk is van chemotransport. De parameter die zij gebruikten om de reactie van botcellen te meten, namelijk een toename van intracellulair calcium, is echter wellicht beïnvloed door de aanwezigheid van serum in het medium. Het is *in vitro* aangetoond dat osteoblasten zeer snel reageren op serum in een medium en dat daarbij een toename in intracellulair calci-

um ontstaat (Pacifci *et al*, 1988). De groeifactoren in serum zijn niet aanwezig in de interstitiële vloeistof die de osteocyten omgeeft, in ieder geval niet in hoge concentraties (Freshney, 1988). Daarom zal een medium dat meer op interstitiële vloeistof lijkt, zoals 'Dulbecco's modified Eagle's medium' met BSA, geschikter zijn voor dergelijke experimenten.

Samenvattend: aangetoond is dat wat betreft de NO- en PGE₂-productie botcellen vergelijkbaar reageren wanneer ze worden blootgesteld aan een gelijke schuifspanning, zonder dat stroompotentialen en chemotransport hier invloed op hebben. Er wordt dan ook geconcludeerd dat de NO- en PGE₂-productie door botcellen in reactie op een vloeistofstroom niet het gevolg zijn van stroompotentialen of chemotransport. Schuifspanning lijkt veeleer de biologische stimulus te zijn die botcellen aanzet tot NO- en PGE₂-productie, en is dus mogelijk ook de stimulus voor aanpassing van botweefsel aan mechanische belasting.

Literatuur

- AJUBI NE, KLEIN-NULEND J, NIJWEIDE PJ, VRIJHEID-LAMMERS T, ALBLAS MJ, BURGER EH. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes: a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 62-68.
- BURGER EH, KLEIN-NULEND J. Mechanotransduction in bone - role of the lacunocanalicular network. *FASEB J* 1999; 13: S101-S112.
- BURR DB, MILGROM C, FYHRIE DP, ET AL. *In vivo* measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone* 1996; 18: 405-410.
- CARVALHO RS, SCHAFER JL, GERSTENFELD LC. Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: demonstration of a common role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation. *J Cell Biochem* 1998; 70: 376-390.
- COWIN SC, WEINBAUM S, ZENG Y. A case for bone canaliculi as the anatomical site of strain generated potentials. *J Biomech* 1995; 28: 1281-1297.
- FORWOOD MR. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading *in vivo*. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1688-1693.
- FRESHNEY RI. The culture environment. In: Freshney RI. Culture of animal cells, a manual of basic technique. New York: Alan R Liss Inc, 1988; 69-73.
- JACOBS CR, YELLOWLEY CE, DAVIS BR, ZHOU Z, CIMBALA JM, DONAHUE HJ. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. *J Biomech* 1998; 31: 969-976.
- KLEIN-NULEND J, HELFRICH MH, STERCK JG, ET AL. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 108-114.
- KNOTHE TATE ML, NIEDERER P, KNOTHE U. *In vivo* tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone* 1998; 22: 107-117.
- KNUDSEN HL, FRANGOS JA. Role of cytoskeleton in shear stress-induced endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol* 1997; 273: H347-H355.
- McALLISTER TN, FRANGOS JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 930-936.
- PACIFICI R, CIVITELLI R, RIFAS L, HALSTEAD L, AVIOLI LV. Does interleukin-1 affect intracellular calcium in osteoblast-like cells (UMR-106)? *J Bone Miner Res* 1988; 3: 107-111.
- PAVALKO FM, CHEN NX, TURNER CH, ET AL. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-intergrin interactions. *Am J Physiol* 1998; 275: C1591-C1601.
- PIEKARSKI K, MUNRO M. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature* 1977; 269: 80-82.
- PIENKOWSKI D, POLLACK SR. The origin of stress generated potentials in fluid saturated bone. *J Orthop Res* 1983; 1: 30-41.
- REICH KM, GAY CV, FRANGOS JA. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol* 1990; 143: 100-104.
- TURNER CH, OWAN I, JACOB DS, McCLINTOCK R, PEACOCK M. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone* 1997; 21: 487-490.
- TURNER CH, TAKANO Y, OWAN I, MURRELL GA. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol* 1996; 270: E634-E639.
- ZAMAN G, PITSILLIDES AA, RAWLINSON SC, ET AL. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1123-1131.

Summary

Key words:

- Oral cellular biology
- Bone metabolism

The response of bone cells to shear stress

Loading-induced flow of fluid is a signal for bone cell adaptive responses, but the nature of the flow-derived stimulus which activates the cell is debated. Candidate stimuli include shear stress, streaming potentials and chemotransport. In this study the nature of the cell stimulus was addressed by varying the shear stress, using nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂) production as a parameter of bone cell activation.

Mouse bone cell cultures were treated for 15 minutes with or without pulsating fluid flow (PFF). In a few experiments, dextran was added to the fluid to increase the shear stress without affecting streaming potentials or chemotransport. NO and PGE₂ production were dose-dependently stimulated by PFF. Application of dextran in the flow medium enhanced both NO and PGE₂ production by bone cells.

It was demonstrated that the production of NO and PGE₂ by bone cells is enhanced by fluid flow of increasing shear stress. Therefore, the stimulus leading to NO and PGE₂ production is shear stress rather than streaming potentials or chemotransport.