

# Towards in situ chondrogenesis of periosteum : a novel approach for cartilage repair?

Citation for published version (APA):

Emans, P. J. (2007). *Towards in situ chondrogenesis of periosteum : a novel approach for cartilage repair?* [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070405pe>

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## DOI:

[10.26481/dis.20070405pe](https://doi.org/10.26481/dis.20070405pe)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.



# 9

## Summary, Discussion and Future Prospects

Cartilage lesions have a limited ability for self repair and may even evolve in premature osteoarthritis (OA). Microfracturing or drilling of the subchondral bone are among the first attempts to heal cartilage lesions. These techniques enable mesenchymal progenitor cells, originating from the bone marrow, to penetrate into the cartilage lesion. Although clinical results may improve, the healing process thus far seems inadequate since no functional hyaline cartilage but fibrocartilage is formed. Due to the progress in the field of Tissue Engineering (TE), possibilities for the treatment of cartilage defects have improved considerably. Periosteal and perichondrial Arthroplasty, Autogenic Chondrocyte Transplantation (ACT), matrix-assisted ACT and mosaicplasty are the latest clinically applied techniques.

However culturing of cells, (e.g. in ACT) implies detailed and time consuming protocols, making these techniques expensive. Other drawbacks of these latest techniques are that the autogenic chondrocytes are isolated from a biopsy of articular cartilage taken from the affected joint. This way the joint is further damaged and donor site morbidity has to be taken into account.

The overall aim of this thesis was to examine periosteum as an alternative cell source for the repair of cartilage lesions. Currently periosteum as a complete tissue is used as a graft, for instance in ACT and periosteum transplantation. Exploring the possibilities of this tissue with its osteochondrogenic progenitor cells may lead to enhanced cartilage repair techniques, avoiding further joint damage as in techniques such as ACT and mosaicplasty.

In order to study cartilage repair, histological judgment of the tidemark and calcified cartilage layer is of critical importance. We have examined the effect of different decalcification protocols on general cartilage staining and the ability to use the terminal deoxy(d)-UTP nick end labeling (TUNEL) technique for studying apoptosis. **(Chapter 3)**.

This study demonstrated that decalcification with 10% EDTA is the best way to preserve the cartilage matrix integrity as well as the chondrocytes. Avoiding nuclear damage is of the utmost importance when studying cell apoptosis with the TUNEL technique. Reading different reports it seems that the amount of apoptosis in OA cartilage is highly controversial; this may be caused by digestion of the matrix using proteinase K. In chapter 3 an alternative for proteinase K digestion is described: fixation with methacarn proved to be far less harmful to the cells and resulted in more consistent results.

Periosteum is a potential source for osteochondral progenitor cells originating from the periosteal cambium layer, which is adjacent to the bone. It is known that the chondrogenic capacity of periosteum decreases with age in a rabbit model.



Others have reported that human periosteum-derived cells maintain their chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. We have examined the proliferation rate and the chondrogenic capacity of aged human periosteal cells exploring different culture conditions and growth factors (**Chapter 4**). For this purpose periosteum of the upper medial tibia was harvested from patients having a total knee replacement. Cells were isolated and the effect of addition of different nutrients and growth factors on cell proliferation and differentiation was examined. The use of Fetal Bovine Serum (FBS) proved to be essential for proliferation of aged human periosteal cells. Proliferation was enhanced by addition of FGF-2. Replacement of L-valine with D-valine in the culture medium, as in MEM (D)-valine, seemed to prevent fibroblast overgrowth. Using this medium, periosteal cells of aged patients had, although variable, chondrogenic potential. TGF- $\beta$  isomers were essential for inducing chondrogenic differentiation of periosteal cells. The cambium layer of aged human periosteum is much thinner than in the young patient making a good control of harvesting this layer virtually impossible. Overall, the heterogeneity of periosteal cell cultures and the lack to control the amount of progenitor cells may imply a variation in chondrogenesis when these cells, isolated from aged patients, are used as chondrogenic cell source.

In cell-based therapies isolated cells are after expansion in cell cultures, transplanted in the hostile conditions of a wound bed and experience cytokines, polymorphonuclear cells, mechanical forces etc. which may affect cell viability. This was studied by transplanting CMDiI fluorochrome-labeled, autogenic chondrocytes and periosteal cells seeded in PEGT/PBT scaffolds into osteochondral defects in rabbits (**Chapter 5**). After confirmation that transfer of label to endogenous cells did not take place within 5 days and the fluorochrome itself did not have any adverse effects on cell viability, cell survival was examined 5 days post-implantation. Different conditions which may affect cell viability were tested: (i) the type of cells: chondrocytes versus periosteal cells, (ii) the type of serum to supplement the culture medium: Fetal Bovine Serum (FBS) or Autogenic Serum (AS), (iii) the structure of the scaffold: Compression Moulded (CM) scaffolds versus Rapid Prototyped (RP) scaffolds. The latter have increased pore interconnectivity. In addition hyaluronan (HYA) was tested as a cell-protective agent.

The effectiveness of any cellular approach will depend on the retention of cell viability early after implantation. Chondrocytes survived the implantation into an osteochondral defect much better than periosteal cells. The tested factors did not seem to influence cell survival substantially. Addition of HYA increased the amount of viable periosteal cells. Chondrocytes originate from a non-vascular tissue dominated by mechanical forces and low oxygen levels.

Apparently, chondrocytes seem to be preconditioned for the hostile environment of the damaged joint. This preconditioning appeared to be maintained during expansion of the cells in monolayer cultures. Differentiating progenitor cells into chondrogenic lineage before implantation into an osteo-chondral lesion may enhance viability.

It would be ideal to stimulate periosteum *in vivo* to persuade the cambium layer to proliferate and differentiate into an ectopic cartilage as can be seen during fracture healing (**Chapter 6**). For this purpose we damaged the periosteum of skeletally mature New Zealand White rabbits by dissecting a piece of periosteum from the upper medial tibia. Cell proliferation and differentiation were examined at the wound edges of the periosteal defect. Initially (after 10 days), this led to the formation of an ectopic cartilage. In time this cartilage calcified (20 days) and was replaced by bone (completed within 40 days). These findings were confirmed by thionine staining, immunohistochemical staining of collagen types I and II and gene expression of chondrogenic and osteogenic markers. During fracture healing periosteal cells, endosteal cells and bone marrow cells (BMC's) contribute to the callus formation. BMC's are considered to be the main cell source for fracture repair. Our findings confirm that periosteum also plays an important role in callus formation. This model can be used to study endochondral bone formation, providing useful information for tissue engineering of cartilage and bone and a better understanding of fracture healing.

Endochondral bone formation is a multistep pathway in which chondrogenesis is followed by osteogenesis. The role and expression of important growth factors (Transforming Growth Factor  $\beta$ , Bone Morphogenic Proteins (BMP's) 2,-4,-7), Indian Hedgehog (Ihh) and Parathyroid Hormone related Protein (PTHrP), transcription factors Sox9 and Runx2, and adhesion molecules (periostin) have been studied in *in-vitro* models. Also cell metabolism in the first, presumably hypoxic, chondrogenic phase is largely unknown (expression of GAPDH, Hypoxia Inducible Factor (HIF)  $-1\alpha$  and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)). Our new *in-vivo* model enabled us to study the expression of these factors in time (**Chapter 7**). Interestingly, TGF- $\beta_1$  and members of its superfamily such as BMP-2, -4 and -7 were detected by immunohistochemistry during chondrogenesis (t=10) but no up-regulation was detected by the real time PCR. This may indicate that the production of these factors was regulated at a post-transcriptional level. Sox9, was up-regulated during chondrogenesis, which suggests that the function and kinetics of this transcription factor in ectopic cartilage formation is comparable to the cartilage formation during endochondral bone formation in an embryo and during callus formation. No exclusive evidence was found that this was regulated by the



Ihh/PTHrP interplay as is occurring in the growth plate. Periostin mRNA up-regulation and immunolocalization were present during chondrogenesis. Periostin is an adhesion molecule with presently unknown function. It has been suggested to enhance the recruitment and attachment of osteo-chondro progenitor cells during fracture healing. This molecule is known to be up-regulated during hypoxia. The presence of HIF-1 $\alpha$  and the up-regulation of GAPDH and HIF-1 $\alpha$  indicate a hypoxic environment, and an anaerobic metabolism. Cell survival after implantation into an osteochondral defect might be influenced by hypoxia. HIF-1 $\alpha$  has been shown to play an important role for chondrocyte survival under hypoxic conditions.

In order to study graft ingrowth, graft survival, and cartilage repair, 14 days after induction, ectopic cartilage grafts were implanted into 3 mm diameter osteochondral defects (**Chapter 8**). Three weeks and three months after implantation specimens were evaluated histologically. At 3 weeks follow up grafts were viable and had an excellent ingrowth in the surrounding bone. After three months the joint surface at the site of the defect stained positive for Collagen Type II. In several samples a newly formed tidemark and tissue architecture like in healthy mature articular cartilage were found. This was reflected in the O'Driscoll scores for articular cartilage repair, which were significantly higher if ectopic cartilage grafts were implanted (compared with empty controls). Addition of hyaluronan enhanced the repair process and improved subchondral bone healing. After implantation the graft was exposed into an environment with mechanical forces and synovial fluid. This change of environment is likely the main factor of maintaining the surface of the transplanted graft in a chondrogenic phase even at a follow-up of 3 months. Although ossification was not observed after a follow-up period of 3 months, calcification and factors, which may influence this process, have to be studied in the long term. Also the method of generating cartilage from periosteum needs to be optimized, since many progenitor cells are lost by dissecting periosteum. Injection of a gel between bone and periosteum is an interesting and elegant method to induce and control subperiosteal cartilage formation.

In summary, decalcification with 10% EDTA is the decalcification method of choice if cartilage has to be evaluated histologically. We showed that the chondrogenic potential of isolated periosteal cells was maintained in aged patients. However, harvesting, isolating and culturing these cells is difficult and time consuming. Moreover, after expansion in monolayer, only a small percentage of periosteal cells survive the transplantation in a damaged joint. Generating cartilage from periosteum is possible; this provides homologous ectopically produced cartilage grafts that are large enough to fill large osteochondral defects (in rabbits). This novel method can also be used as a

model to study periosteal endochondral bone formation. Finally, implantation of periosteum derived cartilage improved the repair of osteochondral defects. The repair was further enhanced by the addition of hyaluronan. This novel way of tissue regeneration bypasses expensive and time consuming laboratory techniques without further damage to the joint, thus holds promise as a procedure for articular cartilage repair.

### FUTURE PROSPECTS

Currently a project called; “Tissue engineering of cartilage using the “*in situ* incubator”: a novel therapeutic approach“ was started to further exploit the full potential of periosteal, *in vivo* derived cartilage. Three main goals have been formulated (i) Improving the success rate, the ability to control the process of ectopic cartilage formation from periosteum. This is thought to be essential to optimize the “*in situ* incubator” concept for human application. (ii) Improved insight into the “multipotency” and proliferative capacity of periosteal progenitor cells and a better understanding of the key factors and conditions that promote chondrogenesis (c.q. block osteogenesis) are essential to successful development of this and other potential clinical application (e.g. restoration of bone defects). (iii) Thorough understanding of factors and conditions influencing cell fate post implantation and prevention of subchondral bone protrusion (e.g growth factors, hypoxia, indomethacin, hyaluronic acid etc.).

## Samenvatting, Discussie en Toekomstverwachtingen



Kraakbeendefecten hebben een beperkte capaciteit om zelf te genezen en kunnen leiden tot vroegtijdige arthrose. Microfracturing en het opboren van het subchondrale bot behoren tot de eerste pogingen om kraakbeendefecten te herstellen. Door deze technieken kunnen mesenchymale stamcellen, die afkomstig zijn uit het beenmerg, het kraakbeendefect bereiken. Hoewel klinisch het resultaat kan leiden tot verbetering, is het genezingsproces niet in staat om kwalitatief goed hyalien kraakbeen aan te maken. Juist het slechtere fibreuze kraakbeen wordt gemaakt. De mogelijkheden om kraakbeendefecten te behandelen zijn aanzienlijk toegenomen door ontwikkelingen op het gebied van Tissue Engineering (TE). Periosteum en perichondium artroplastiek, Autologe Chondrocyt Transplantatie (ACT), matrix-geassisteerde ACT (MACT) en mosaicplastiek zijn nu klinisch toepasbare technieken.

Ingewikkelde, tijdrovende en dure technieken zijn echter nodig voor het opkweken van de cellen (bijvoorbeeld in ACT). Een ander nadeel van deze technieken is het feit dat er een stuk gewrichtskraakbeen geogst moet worden van de reeds beschadigde knie. Hierdoor wordt de knie verder beschadigd en moet er rekening gehouden worden met donorzijde morbiditeit.

Het doel van dit proefschrift was om te onderzoeken of periost (botvlies) een alternatieve bron kan zijn voor cellen die gebruikt kunnen worden om kraakbeendefecten te behandelen. Op dit moment wordt periost als weefsel gebruikt in technieken zoals ACT en periost transplantatie. Onderzoek van dit weefsel met zijn voorlopercellen die zowel richting bot als kraakbeen kunnen differentiëren, kan leiden tot verbeterde methoden om kraakbeendefecten te genezen. Indien dit mogelijk is, kan extra beschadiging van het gewricht door het nemen van een kraakbeen biopt, zoals in technieken als ACT en mosaicplastiek, vermeden worden.

Om herstel van kraakbeen te bestuderen is het belangrijk om de tidemark (overgang verkalkt kraakbeen en niet verkalkt kraakbeen) en de verkalkte kraakbeenlaag op histologisch niveau goed te kunnen beoordelen. We hebben het effect bestudeerd van verschillende ontkalkingprotocollen op kraakbeenkleding en op de terminal deoxy(d)-UTP nick end labeling (TUNEL) techniek. De laatste techniek wordt gebruikt om de mate van apoptose (geprogrammeerde celdood) te bestuderen (**Hoofdstuk 3**). Deze studie liet zien dat de ontkalking met 10% EDTA de beste methode is om schade aan de celkernen van de chondrocyten te voorkomen. Ook de kleuring van de kraakbeenmatrix blijft optimaal na ontkalking met 10% EDTA. Schade aan de celkern moet voorkomen worden om apoptose te bestuderen met behulp van de TUNEL techniek. In de literatuur worden verschillende waarden genoemd voor de mate van apoptose in arthrotisch kraakbeen. Dit kan veroorzaakt zijn door verschillen in de protocollen van digestie van de matrix (wel/niet gebruik

van enzymen zoals proteïnase K) in de TUNEL gebaseerde studies. In hoofdstuk 3 is een alternatief voor het gebruik van proteïnase K beschreven; fixatie met methacarn gaf minder verlies van celkernen en meer consistente resultaten.

Periost is een potentiële bron voor osteochondrale voorlopercellen. Deze cellen zitten in de cambiumlaag van het periost. Deze cambiumlaag ligt tegen de botzijde aan. Bij het konijn neemt de chondrogene capaciteit van periost af met de leeftijd. Sommige onderzoekers hebben beschreven dat cellen van humaan botvlies deze capaciteit behouden ongeacht de leeftijd van de donor. Wij hebben uitgezocht welke kweekcondities en groeifactoren van belang zijn voor een optimale proliferatie. Hierna hebben we de chondrogene capaciteit van humane periostcellen van oude donoren bepaald en ook hierbij de invloed van het gebruik van verschillende kweekcondities en groeifactoren onderzocht (**Hoofdstuk 4**). Hiervoor werd het periost geoogst van patiënten die een totale knieprothese kregen. Cellen werden geïsoleerd en het effect van toevoeging van verschillende nutriënten en groeifactoren op celproliferatie en differentiatie werden bestudeerd. Het gebruik van Fetal Bovine Serum (FBS) was essentieel voor de proliferatie van humane periostcellen van oude donoren. Door toevoeging van FGF-2 nam de proliferatie snelheid toe. Vervanging van L-valine met D-valine in het kweekmedium zoals in MEM (D)-valine leek fibroblastovergroei te voorkomen. Met behulp van dit medium werd, hoewel variabel, chondrogene differentiatie van periostcellen aangetoond. TGF- $\beta$  isomeren waren essentieel voor de chondrogene differentiatie van periost cellen. De cambiumlaag van oude donoren is veel dunner dan de cambiumlaag in jonge donoren. Hierdoor is een goede controle van de kwaliteit van het periost na het oogsten vrijwel onmogelijk. De heterogeniteit van de celpopulatie (fibroblasten en voorlopercellen) en het niet kunnen controleren van de hoeveelheid voorlopercellen tijdens het oogsten en opkweken leidt tot variabele bevindingen m.b.t. de chondrogene capaciteit.

In therapieën waarbij cellen worden geïsoleerd, opgekweekt en daarna geïmplantéerd, wordt het implantaat blootgesteld aan een vijandige omgeving nl. een wondbed waarin zich cytokines, polynucleaire leucocyten, mechanische krachten etc. bevinden. Dit kan de levensvatbaarheid van de getransplanteerde cellen beïnvloeden. Wij hebben de levensvatbaarheid van cellen bestudeerd. Hiervoor zijn de autologe chondrocyten en periostcellen gelabeld met het CMDiI fluochrome. Deze cellen zijn uitgezaaid in een PEGT/PBT scaffold. Daarna is de scaffold met de cellen erin geïmplantéerd in een osteochondraal defect (**Hoofdstuk 5**). Overleving van getransplanteerde cellen werd bestudeerd na 5 dagen. Vantevoren hebben we vastgesteld dat er geen transfer plaatsvond van label op endogene cellen binnen 5 dagen en dat het label zelf geen nadelige effecten had op levensvatbaarheid van de cellen. Verschillende



condities die overleving van cellen zouden kunnen beïnvloeden werden bestudeerd; (i) type cel: chondrocyten versus periost cellen, (ii) type serum dat toegevoegd werd aan het kweekmedium: Fetal Bovine Serum (FBS) of Auloog Serum (AS), (iii) structuur van de scaffold: Compression Moulded (CM) scaffolds versus Rapid Prototyped (RP) scaffolds. De laatste heeft een betere "pore interconnectivity". Verder werd toevoeging van hyaluronan (HYA), dat mogelijk een celbeschermende werking heeft, getest. De effectiviteit van elke methode waarin cellen gebruikt worden hangt af van de levensvatbaarheid van de getransplanteerde cellen. Chondrocyten overleefden de transplantatie veel beter dan periostcellen. De geteste factoren leken de levensvatbaarheid van de getransplanteerde cellen niet wezenlijk te beïnvloeden. Door toevoeging van HYA nam het percentage levende periostcellen toe. Chondrocyten komen uit een omgeving zonder bloedvaten, gedomineerd door mechanische krachten en met een lage zuurstofspanning. Het lijkt erop dat chondrocyten meer dan periostcellen voorbereid zijn op de vijandige omgeving van een beschadigd gewricht. Deze preconditionering van chondrocyten lijkt gehandhaafd te worden tijdens de expansie van deze cellen gedurende de kweek in monolayer. Het differentiëren van voorlopercellen richting kraakbeencel voor transplantatie in een osteochondraal defect zou het percentage dat de transplantatie overleefd kunnen verhogen.

Het zou ideaal zijn om het periost *in situ* te stimuleren zodat de cambiumlaag proliferereert en differentieert tot ectopisch kraakbeen zoals dit proces gezien wordt bij fractuurgenezing. In dit geval is het niet nodig om chondrocyten te oogsten in het gewricht, dat immers tot nog meer gewrichtsbeschadiging zal leiden. Eveneens wordt het gebruik van de ingewikkelde en tijdrovende kweekmethoden voorkomen (**Hoofdstuk 6**). We hebben de celproliferatie en differentiatie onderzocht aan de randen van een botvliesdefect. Dit defect is gemaakt aan de proximale mediale zijde van de tibia bij volwassen New Zealand White konijnen. Aanvankelijk (na 10 dagen), leidde dit tot de vorming van ectopisch kraakbeen. Na enige tijd verkalkte dit kraakbeen (na 20 dagen) en werd vervangen door bot (binnen 40 dagen). Deze bevindingen werden bevestigd met thionine kleuring, immunohistochemische kleuring van Collageen Types I en II en mRNA expressie van chondrogene en osteogene markers. Cellen afkomstig uit het periosteum, endosteum en de beenmergcellen (BMC) dragen bij aan callusvorming. BMC's worden beschouwd als de belangrijkste celbron bij de fractuurgenezing. Onze bevindingen tonen aan dat ook het periost een belangrijke rol in de callusvorming speelt. Dit model kan gebruikt worden om endochondrale botvorming te bestuderen.

Endochondrale botvorming bestaat uit een aantal stappen waarin chondrogenese gevolgd wordt door osteogenese. De rol en de expressie van de belang-



rijke groeifactoren (Transforming Growth Factor  $\beta$ , Bone Morphogenic Proteins (BMP'S) 2, -4, -7), Indian Hedgehog (Ihh) en Parathyroid Hormone related Protein (PTHrP), transcriptiefactoren Sox9 en Runx2, en adhesiemoleculen (periostin) zijn voornamelijk *in vitro* bestudeerd. Ook het celmetabolisme is in de eerste, vermoedelijk hypoxische, chondrogene fase, grotendeels onbekend (expressie van GAPDH, Hypoxia Inducible Factor (HIF) -1 $\alpha$  en de Vasculaire Endothelial Growth Factor (VEGF)). Met behulp van ons nieuwe model kunnen we deze factoren *in vivo* bestuderen (**Hoofdstuk 7**). Immunohistochemische kleuringen op TGF- $\beta$  en BMP-2, -4 en -7 waren positief tijdens de chondrogenese (t=10), maar er was geen up-regulatie op mRNA niveau. Dit kan erop wijzen dat de productie van deze factoren op post-transcriptioneel niveau wordt geregeld. Sox9, een belangrijke transcriptiefactor tijdens de chondrogenese, werd ge-upreguleerd. Dit indiceert dat deze transcriptiefactor bij ectopische kraakbeenvorming tot expressie komt op een vergelijkbaar moment als tijdens de endochondrale botvorming en tijdens de callusvorming. Het is niet bewezen dat de Ihh/PTHrP interactie, zoals beschreven bij de groeischijf, op dezelfde manier gereguleerd is als bij de vorming van ectopisch kraakbeen. Periostin mRNA was ge-upreguleerd. Met immunohistochemie kon dit adhesiemolecuul worden aangetoond. Hoewel de functie van dit molecuul onbekend is, lijkt Periostin een rol te spelen bij rekrutering en adhesie van osteochondroprogenitor cellen tijdens de fractuurgenezing. Het is bekend dat dit molecuul ge-upreguleerd wordt onder hypoxische omstandigheden. De aanwezigheid van HIF-1 $\alpha$  en upregulatie van GAPDH en HIF-1 $\alpha$  wijst op een hypoxisch milieu en een anaëroob metabolisme.

De overleving van cellen na implantatie in een osteochondral defect zou door hypoxie beïnvloedt kunnen worden. Van HIF-1 $\alpha$  is aangetoond dat het een belangrijke rol speelt in de overleving van chondrocyten onder hypoxische omstandigheden.

Om overleving, ingroei en kraakbeenreparatie te bestuderen, werd ectopisch periostaal kraakbeen 14 dagen na inductie geïmplanteerd in osteochondrale defecten (3 mm in diameter) (**Hoofdstuk 8**). Drie weken en drie maanden na implantatie werd ingroei en kraakbeenherstel histologisch geëvalueerd. De implantaten hadden een periode van 3 weken overleefd en er was een prima ingroei van implantaat in het omliggend bot. Na drie maanden kleurde het oppervlak van het implantaat positief voor Collageen Type II. In verscheidene samples werd een tidemark gezien en toonde de weefselarchitectuur gelijkenis met gezond gewrichtskraakbeen. De O'Driscoll scores voor gewrichtskraakbeenreparatie waren beduidend hoger in de groep waarin osteochondrale defecten werden gevuld met periostaal ectopisch kraakbeen dan in de groep met "lege" defecten. De toevoeging van hyaluronan verbeterde het reparatie-

proces. Na implantatie wordt het transplantaat blootgesteld aan mechanische krachten en synoviale vloeistof. Dit zijn waarschijnlijk de belangrijkste factoren waardoor zelfs na een periode van 3 maanden het oppervlak van implantaten kraakbeen bleef. Hoewel verbening van het oppervlak na een vervolgperiode van 3 maanden niet werd waargenomen, moet de mate van verkalking van het implantaat en de factoren die dit proces kunnen beïnvloeden op de lange termijn nog worden bestudeerd. Ook moet de methode om kraakbeen uit periost te maken worden geoptimaliseerd. Veel voorlopercellen gaan nu nog verloren tijdens het verwijderen van het periost van het bot. De injectie van een gel tussen bot en periost is een interessante en elegante methode om subperiostaal kraakbeenvorming te veroorzaken en te controleren.

Samenvattend kan worden gesteld dat ontkalking met 10% EDTA de beste ontkalkingsmethode is als de kwaliteit van chondrocyten en kraakbeenmatrix histologisch geëvalueerd moeten worden. Wij toonden aan dat het chondrogene potentieel van geïsoleerde periostcellen in oude patiënten nog aanwezig is. Nochtans, het oogsten, isoleren en cultiveren van deze cellen is moeilijk en tijdrovend. Na expansie in een monolayer overleeft slechts een klein percentage periostcellen de transplantatie in een osteochondraal defect. Het maken van kraakbeen uit periost is mogelijk. Dit leidt tot een homolog ectopisch geproduceerd kraakbeenimplantaat dat groot genoeg is om grote osteochondrale defecten (bij konijnen) op te vullen. Deze nieuwe methode kan ook als model dienen om periostale endochondrale botformatie te bestuderen. Tenslotte, de implantatie van ectopisch periostaal kraakbeen leidt tot een verbeterde reparatie van osteochondrale defecten. Deze reparatie werd nog meer verbeterd door de toevoeging van hyaluronan. Deze nieuwe manier van weefselregeneratie voorkomt het gebruik van dure en tijdrovende laboratoriumtechnieken en veroorzaakt ook geen verdere schade aan het gewricht.

## TOEKOMST

Momenteel is een project genaamd; “Tissue engineering of cartilage using the *in situ* incubator”: a novel therapeutic approach” gestart. In dit project zijn drie belangrijke doelstellingen geformuleerd; (i) Verbeteren van het succespercentage om periostaalkraakbeen te genereren onder gestandaardiseerde condities. Dit is essentieel om het *in situ* incubator“ concept voor menselijke toepassing mogelijk te maken. (ii) Een beter inzicht krijgen in de “multipotency” en de proliferatieve capaciteit van de periosteale voorlopercellen. (iii) Tevens moet onderzocht worden op welke wijze verbening van het implantaat kan worden voorkomen (b.v. de invloed van groeifactoren, hypoxie, indomethacine, hyaluronan enz.)