

De invloed van normoxia en hypoxia op de adipogene, osteogene en chondrogene differentiatie van humane mesenchymale stamcellen

Door: Nicole Baars, BSc student bij Developmental Bioengineering op Universiteit Twente



Xvivo System, Model X3, Biospherix at UTwente.

Datum

16 november 2023

Bachelor opdracht afstudeercommissie

Voorzitter commissie: dr.ing. Janine Post (DBE)
Dagelijks begeleider: Jacqueline Plass (DBE)
Extern lid: dr.ir. Jeroen Rouwkema (BE, EOST)

**UNIVERSITY
OF TWENTE.**

Voorwoord: Dankwoord

Enschede, 16-11-2023

Bij deze wil ik graag de Developmental Bioengineering groep bedanken dat ik mijn bachelor opdracht bij jullie kon en mocht doen en dat ik door iedereen zo openlijk ben ontvangen. Het is een fijne groep om mee te werken en ik heb er veel geleerd. Verder heb ik door deze bachelor opdracht kennisgemaakt met het Xvivo systeem waarmee ik cellen in hypoxia omstandigheden heb kunnen opkweken en laten differentiëren. Het was even wennen, maar ik vond het een leuke nieuwe ervaring, omdat het toch heel anders is dan een 'gewone' LAF-kast. Ook wil ik graag Janine Post en Jeroen Rouwkema uit mijn afstudeercommissie bedanken voor de feedback. En in het bijzonder wil ik graag mijn dagelijkse begeleider Jacqueline Plass bedanken voor de altijd snelle communicatie en de uitgebreide begeleiding gedurende het hele project.

Samenvatting (NL)

Wanneer kraakbeen beschadigd of versleten is, is dit nogal moeilijk te herstellen. Er zijn wel technieken om het te herstellen, maar die zijn te invasief. Daarom moeten er minder invasieve technieken komen om kraakbeen te herstellen.

In dit onderzoek wordt gezocht naar de optimale differentiatieomstandigheden op het gebied van zuurstofspanning. Een lage zuurstofspanning van 2,5% O₂ (hypoxia) zou namelijk een betere chondrogenese opleveren. Om te kijken hoe hypoxia de differentiatie van hMSC's beïnvloedt ten opzichte van normoxia (20% O₂) zijn er hMSC's opgekweekt in zowel normoxia als hypoxia omstandigheden. Vervolgens is er na 10 dagen opkweken gekeken naar 2D osteogene, 2D adipogene en 3D chondrogene differentiatie onder zowel normoxia als hypoxia omstandigheden.

Na 21 dagen differentiëren zijn de verschillende cellen gefixeerd in formaline. De cellen voor adipogene en osteogene differentiatie zijn respectievelijk gekleurd met Oil Red O en Alizarin Red S. De chondrogene pellets zijn ingebed in paraffine en gekleurd met Alcian Blue en Safranin O. Hierna zijn de kleuringen en de morfologie van alle cellen en pellets geanalyseerd.

Uit de resultaten blijkt dat er geen osteogene differentiatie heeft plaatsgevonden. Verder blijkt dat de hMSC's die in hypoxia zijn opgekweekt en in normoxia zijn gaan differentiëren de beste resultaten opleveren voor zowel de adipogene als de chondrogene differentiatie.

Abstract (EN)

When cartilage is damaged or worn out, it is quite difficult to repair. There are techniques to repair it, but those are too invasive. That is why new, less invasive techniques should be developed to restore cartilage.

This research is looking for the optimal differentiation conditions in terms of oxygen tension. A low oxygen tension of 2.5% O₂ (hypoxia) would result in better chondrogenesis. To see how hypoxia affects the differentiation of hMSC's compared to normoxia (20% O₂), hMSC's were cultured in both normoxia and hypoxia conditions. Then, after 10 days of culturing, 2D osteogenic, 2D adipogenic and 3D chondrogenic differentiation were examined under both normoxia and hypoxia conditions.

After 21 days of differentiation, the different cells were fixed in formalin. The cells for adipogenic and osteogenic differentiation were stained with Oil Red O and Alizarin Red S, respectively. The chondrogenic pellets were embedded in paraffin and stained with Alcian Blue and Safranin O. After this, the staining and morphology of all cells and pellets were analyzed.

The results show that no osteogenic differentiation took place. Furthermore, it appears that hMSC's that were cultured in hypoxia and differentiated in normoxia yield the best results for both adipogenic and chondrogenic differentiation.

Inhoudsopgave

Voorwoord: Dankwoord	ii
Samenvatting (NL)	iii
Abstract (EN).....	iii
Afkortingenlijst.....	1
1 Inleiding.....	2
2 Materialen en methodes	2
2.1 hMSC's ontdooien en opkweken.....	2
2.2 Inzetten differentiatie experiment	3
2.2.1 Condities differentiatie experiment.....	4
2.2.2 Zaaïen in wellsplaten	4
2.2.3 Differentiatie media.....	4
2.3 Fixatie van cellen, oogst van chondrogene pellets en analyse	5
3 Resultaten	5
3.1 Osteogene differentiatie	5
3.2 Adipogene differentiatie	6
3.2.1 Cytochemische kleuring met Oil Red O	7
3.3 Chondrogene differentiatie.....	8
3.3.1 Grootte, vorm en kleurverandering gedurende de tijd	8
3.3.2 Analyse met Alcian Blue kleuring ten opzichte van Safranin O kleuring.....	10
3.3.3 Samenvatting resultaten aan de hand van criteria	11
4 Discussie.....	12
5 Conclusie	14
6 Aanbevelingen.....	14
Referentielijst	15
Bijlagen	16
Bijlage A: Gegevens van hMSC's bij aanvang experiment.....	16
Bijlage B: Plaatindelingen differentiatie experiment.....	16
Bijlage C: Protocollen van verschillende kleuringen voor analyse	17
C1 Standard operating procedure, Oil Red O staining of monolayer cells	17
C2 Standard operating procedure, Alizarin Red S staining of monolayer cells.....	19
C3 Standard operating procedure, Alcian Blue staining of sections.....	21
C4 Standard operating procedure, Safranin O staining of sections.....	23
Bijlage D: Foto's ter aanvulling of toelichting op resultaten.....	25

Afkortingenlijst

- N→N In normoxia opgekweekt, in normoxia gedifferentieerd
- N→H In normoxia opgekweekt, in hypoxia gedifferentieerd
- H→N In hypoxia opgekweekt, in normoxia gedifferentieerd
- H→H In hypoxia opgekweekt, in hypoxia gedifferentieerd
- hMSC Humane mesenchymale stamcellen
- DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium
- α MEM Alpha modification of MEM with Earle's Balanced Salts
- FBS Fetal bovine serum
- Pen/Strep Penicillin/Streptomycin
- ITS-premix Insulin-Transferrin-Selenium
- AsAP Aster-Associated Protein (L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate)
- TGFbeta3 Transforming Growth Factor- β
- glutaMAX 200 mM L-alanyl-L-glutamine dipeptide in 0.85% NaCl
- IBMX 3-Isobutyl-1-methylxanthine
- betaGP β -Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate
- bFGF basic fibroblast growth factor
- GAG's Glycosaminoglycans

1 Inleiding

Beschadigd of versleten kraakbeen is één van de lastigste beschadigingen om te herstellen in het menselijk lichaam. Kraakbeen heeft nauwelijks zelf herstellend vermogen en de technieken die er zijn, zijn te invasief. De huidige implantatiemethode, Autologe Chondrocyten Implantatie (ACI) kan bij de oogst van chondrocyten letsel op de donorplaats veroorzaken [1,2]. Bovendien is er nog steeds in vitro expansie van cellen nodig om de populatie zodanig groot te maken dat de implantatie kan worden uitgevoerd. Daarnaast wordt dat laatste geassocieerd met dedifferentiatie en verlies van chondrogeen potentieel [3].

De bedoeling van de onderzoeksgroep Developmental Bioengineering binnen de Universiteit Twente is dan ook om een andere en voornamelijk efficiënte manier te vinden om kraakbeen te herstellen. Daarvoor wordt onder andere in verschillende onderzoeken gezocht naar optimale differentiatieomstandigheden om vanuit bijvoorbeeld humane Mesenchymale Stamcellen (hMSC's) naar chondrocyten te differentiëren. Onder andere het volgende is al getest: Het kweken onder fysiologische zuurstofcondities (2,5% O₂) leidt tot betere kraakbeenvorming en voorkomt hypertrofie in explantaten, evenals het differentiëren van MSC's [4–8].

Uit andere onderzoeken blijkt al dat een lage zuurstofspanning in het opkweken van MSC's de chondrogene en adipogene differentiatie positief beïnvloedt [9]. Dit is vooral het geval, omdat in het lichaam ook sprake is van een lage zuurstofspanning en hiermee dus eigenlijk de fysiologische omstandigheden worden nagebootst [9,10]. In het lichaam is namelijk nooit sprake van een hoge zuurstofspanning zoals bij in-vitro differentiatiemethoden over het algemeen het geval is.

In dit onderzoek wordt dieper ingegaan op een lage zuurstofspanning van 2,5% (hypoxia) ten opzichte van de meest gebruikte zuurstofspanning bij differentiëren van 20% (normoxia). Er zullen hMSC's van twee verschillende donoren, die al eerder in normoxia en hypoxia omstandigheden zijn opgekweekt, verder opgekweekt worden, waarna die gebruikt zullen worden voor chondrogene, adipogene en osteogene differentiatie.

Het doel is om op het gebied van zuurstofspanning de meest efficiënte en effectieve manier te vinden om hMSC's te laten differentiëren. Om de optimale omstandigheden op het gebied van zuurstofspanning te achterhalen wordt er gekeken naar opkweken en differentiëren in normoxia omstandigheden en opkweken en differentiëren in hypoxia omstandigheden. Ook wordt er gekeken naar een 'schok' daartussen, waarbij het opkweken bij de ene zuurstofspanning gebeurt en de cellen daarna gaan differentiëren bij de andere zuurstofspanning.

Er wordt naar aanleiding van eerdere onderzoeken wel verwacht dat de lage zuurstofspanning een positief effect zal hebben op de verschillende differentiatieprocessen. Uiteindelijk zullen de verschillende differentiatieprocessen dan ook geanalyseerd worden met behulp van verschillende specifieke (cytochemische) kleuringen. Hiermee zal gekeken worden of er daadwerkelijk differentiatie plaatsvindt en in hoeverre de zuurstofspanning hier invloed op heeft.

2 Materialen en methodes

2.1 hMSC's ontdooien en opkweken

Aan de start van dit traject zijn hMSC's van twee donoren, D42 en D56, uit het stikstof gehaald. Deze hMSC's zijn afkomstig uit de femur en waren in een eerder onderzoek opgekweekt in zowel normoxia als hypoxia omstandigheden en vormden hiermee dus complete sets voor dit

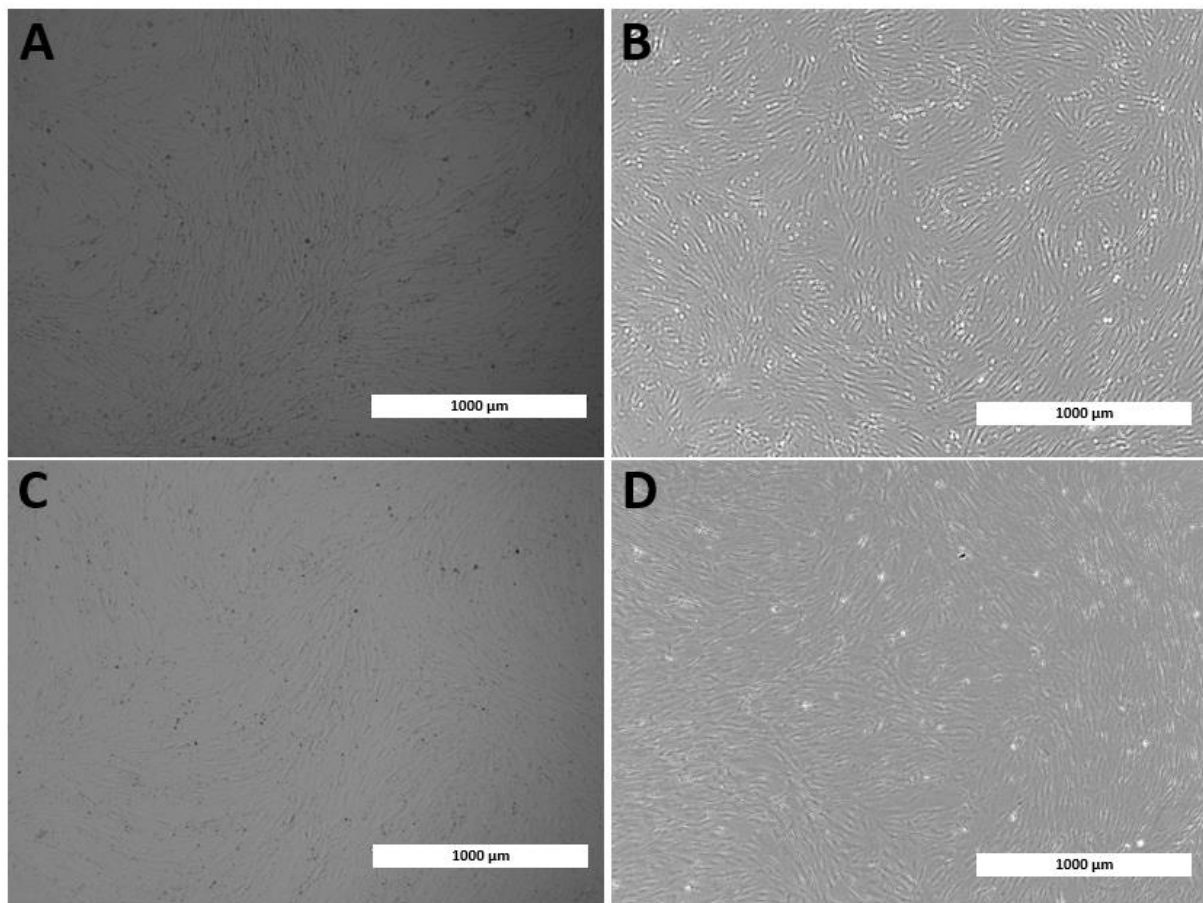
onderzoek. De hMSC's bevonden zich op dat moment in passage 2/3, zie ook Tabel 4 in Bijlage A.

Vervolgens zijn deze hMSC's in kweek gebracht in twee T175 kweekflessen per donor en conditie (normoxia of hypoxia), totaal dus acht kweekflessen. Iedere fles bevat 30mL MSC proliferatiemedium, laag glucose (1g/L). Het proliferatiemedium bestond uit α MEM (Invitrogen, 41965-062), 10% FBS (Sigma, F7524 (lot 013M3396)), 100 U/ml Pen/Strep (Invitrogen, 15140-163), 2 mM GlutaMAX (Invitrogen, 35050-087), 50 μ g/ml AsAP (Sigma, A8960-5G) en 1 ng/ml bFGF (Neuromics, PR80001-50).

Bij het opnieuw in kweek brengen van deze hMSC's zijn de in hypoxia opgekweekte cellen in normoxia omstandigheden ontdooid en in de kweekflessen overgebracht. Hierna zijn de normoxia flessen in een incubator met 20% O₂ gezet en de hypoxia flessen in een Xvivo systeem incubatorkamer met 2,5% O₂. Het medium is om de drie à vier dagen ververs.

2.2 Inzetten differentiatie experiment

Tien dagen later waren de hMSC's voldoende confluent, rond de 80% (zie Figuur 1), om het differentiatie experiment in te zetten, wat onder normoxia omstandigheden plaatsvond.



Figuur 1: EVOS foto's, gemaakt met 4x objectief, om confluentie na tien dagen opkweken van hMSC's weer te geven. Met in foto A, D42 Normoxia; foto B, D42 Hypoxia; foto C, D56 Normoxia; en foto D, D56 Hypoxia. (De foto's zijn met twee verschillende EVOS apparaten gemaakt, waarvan één in de Xvivo staat in hypoxia omstandigheden.)

De hMSC's werden per donor en conditie geteld en daarna werden de hMSC's van twee donoren met dezelfde kweekconditie uit vier kweekflessen samen gepoold. Oftewel, hMSC's van D42 en D56 in normoxia omstandigheden werden samengevoegd (42/56 N) en hMSC's van D42 en D56 in hypoxia omstandigheden werden samengevoegd (42/56 H). Dit is gebeurd

in een 1:1 verhouding, de helft van de cellen per conditie bestaat dus uit hMSC's van D42 en de helft uit hMSC's van D56.

2.2.1 Conditie differentiatie experiment

Om uit te zoeken wat de optimale omstandigheden zijn voor adipogene, osteogene en chondrogene differentiatie waren de condities voor het differentiatie experiment als volgt:

hMSC's opgekweekt in:	Verschillende differentiaties bij:	Afkorting
Normoxia omstandigheden (20% O ₂)	Normoxia omstandigheden (20% O ₂)	N→N
Normoxia omstandigheden (20% O ₂)	Hypoxia omstandigheden (2,5% O ₂)	N→H
Hypoxia omstandigheden (2,5% O ₂)	Normoxia omstandigheden (20% O ₂)	H→N
Hypoxia omstandigheden (2,5% O ₂)	Hypoxia omstandigheden (2,5% O ₂)	H→H

Hierbij werd dus gekeken naar het verschil tussen normoxia en hypoxia omstandigheden. De tweede en derde combinatie waren voornamelijk om te kijken naar de 'shok' in zuurstofspanning en de invloed daarvan op de verschillende differentiaties.

2.2.2 Zaaïen in wellsplaten

De adipogene en osteogene differentiaties werden in 2D uitgevoerd, dus in een monolaag van cellen in een 12-wellsplaat volgens de plaatindelingen in Figuur 7, Bijlage B. De chondrogene differentiatie werd in 3D uitgevoerd. Hierbij werden pellets gevormd in een 96-wellsplaat met een ronde (U-vormige) bodem volgens de plaatindelingen in Figuur 8, Bijlage B.

Bij het zaaïen van de cellen in de wellsplaten zijn de volgende zaaidichtheden gebruikt:

- Adipogene differentiatie: 15000 cellen/cm²
- Osteogene differentiatie: 1000 cellen/cm²
- Chondrogene differentiatie: 200000 cellen/well

Voor het bepalen van het aantal pellets dat gevormd kan worden zijn eerst de juiste aantallen cellen/cm² bepaald voor de adipogene en osteogene differentiatie. Daarna is wat daarvoor nodig was van de totale hoeveelheid cellen afgehaald. Uitgaande van 200000 cellen/well, konden van zowel 42/56 N, als 42/56 H, zo'n 46 pellets worden gemaakt. Deze pellets zijn in een verhouding 1:1 verdeeld over dit onderzoek en een ander onderzoek naar de invloed van laag en hoog glucose, waarvoor dezelfde cellen werden gebruikt.

2.2.3 Differentiatie media

Voor de verschillende differentiaties zijn verschillende differentiatie media gemaakt in verschillende hoeveelheden. De hoeveelheid per batch was afhankelijk van hoe vaak de media verversen moesten worden met medium uit deze desbetreffende batch. De verhoudingen bleven hierbij wel gelijk, slechts de totale hoeveelheid medium varieerde. De media werden om de drie à vier dagen verversen. Uitgaande van concentraties van stockoplossingen per component voor iedere differentiatie, was de samenstelling van deze media als volgt, zie Tabel 1:

Tabel 1: Chondrogeen, adipogeen en osteogeen differentiatie-medium met hun componenten naar de juiste verhoudingen.

Chondrogene differentiatie		Adipogene differentiatie		Osteogene differentiatie	
Mediumcomponenten		Mediumcomponenten		Mediumcomponenten	
DMEM		DMEM		α MEM	
Pen/Strep	100 U/ml	FBS	10%	FBS	10%
ITS-premix	1x	Pen/Strep	100 U/ml	Pen/Strep	100 U/ml
Proline	40 μ g/ml	GlutaMAX	2 mM	GlutaMAX	2 mM
AsAP	50 μ g/ml	Dexamethason	10^{-6} M	AsAP	50 μ g/ml
Sodium pyrofaat	1x	Sodium pyrofaat	1x	betaGP	0,01 M
TGFbeta3	10 ng/ml	Insuline	10 μ g/ml	Dexamethason	10^{-8} M
Dexamethason	10^{-7} M	IBMX	0,5mM		
		Indomethacin	0,2mM		

2.3 Fixatie van cellen, oogst van chondrogene pellets en analyse

De adipogene en osteogene cellen werden na 21 dagen gefixeerd met 10% gebufferde formaline (15 minuten lang) en geanalyseerd. De analyse werd gedaan met de cytochemische kleuringen Oil Red O voor vet volgens het protocol in Bijlage C1 en 2% w/v Alizarin Red S solution (pH 4,2) voor bot volgens het protocol in Bijlage C2.

De chondrogene pellets werden na 7 en na 21 dagen geoogst en gefixeerd met 10% gebufferde formaline (1 uur lang). Hierna werden ze één uur lang voorgekleurd met eosine (waterige oplossing) en 10% gebufferde formaline om daarna in paraffine te kunnen worden ingebed en zichtbaar te zijn in de paraffineblokjes. Van de paraffineblokjes zijn vervolgens met een microtoom coupes gesneden met een dikte van 5 μ m. Deze coupes zijn op objectglasjes overgebracht en geanalyseerd om te kijken hoe de differentiatie was verlopen. Deze analyse werd gedaan met 0,5% w/v Alcian Blue staining solution (pH 1,0) (dag 7 en dag 21) volgens het protocol in Bijlage C3 en met 0.1% w/v Safranin O solution (dag 21) volgens het protocol in Bijlage C4. De Alcian Blue kleuring kleurt de GAG's in de kraakbeen-specifieke extracellulaire matrix blauw, wanneer er sprake is van kraakbeenvorming. Safranin O kleurt de proteoglycanen in de extracellulaire matrix en/of de GAG's in gewrichtskraakbeen oranje-rood wanneer er sprake is van kraakbeenvorming. Op deze manier is te achterhalen of er daadwerkelijk sprake is van matrixvorming of niet. Als de kleuringen zich uiteten in dezelfde gebieden van de pellet, betekent dat dat ze allebei aankleuren in de aanwezige extracellulaire matrix. Komen die gebieden niet met elkaar overeen, kunnen er ook andere delen van de cellen zijn aangekleurd die niets te maken hebben met kraakbeenvorming. Safranin O vormt hiermee als het ware een controle voor de Alcian Blue kleuring. Vervolgens is de data hiervan verzameld met behulp van een Nanozoomer (Hamamatsu Photonics) waarin de gekleurde objectglasjes konden worden gescand en deze scans konden worden omgezet in gedetailleerde afbeeldingen.

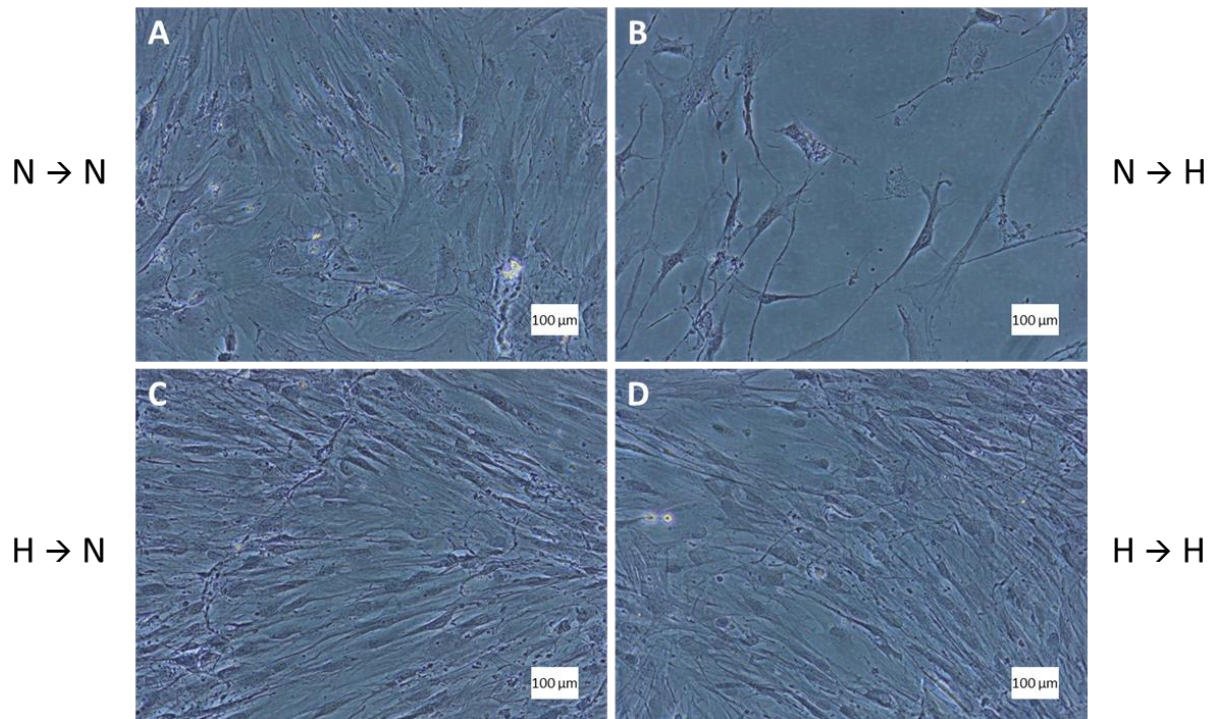
3 Resultaten

In dit hoofdstuk zullen de resultaten per differentiatie besproken worden.

3.1 Osteogene differentiatie

In de wellsplaten waarin de osteogene differentiatie was uitgevoerd was de morfologie anders dan bij botcellen, zie Figuur 2. De confluentie van de cellen die in normoxia zijn opgekweekt en in hypoxia zijn gedifferentieerd was ook veel minder dan de confluentie van de andere cellen, zie Figuur 2B. Daarnaast was de kleuring met Alizarin Red S niet zichtbaar in de

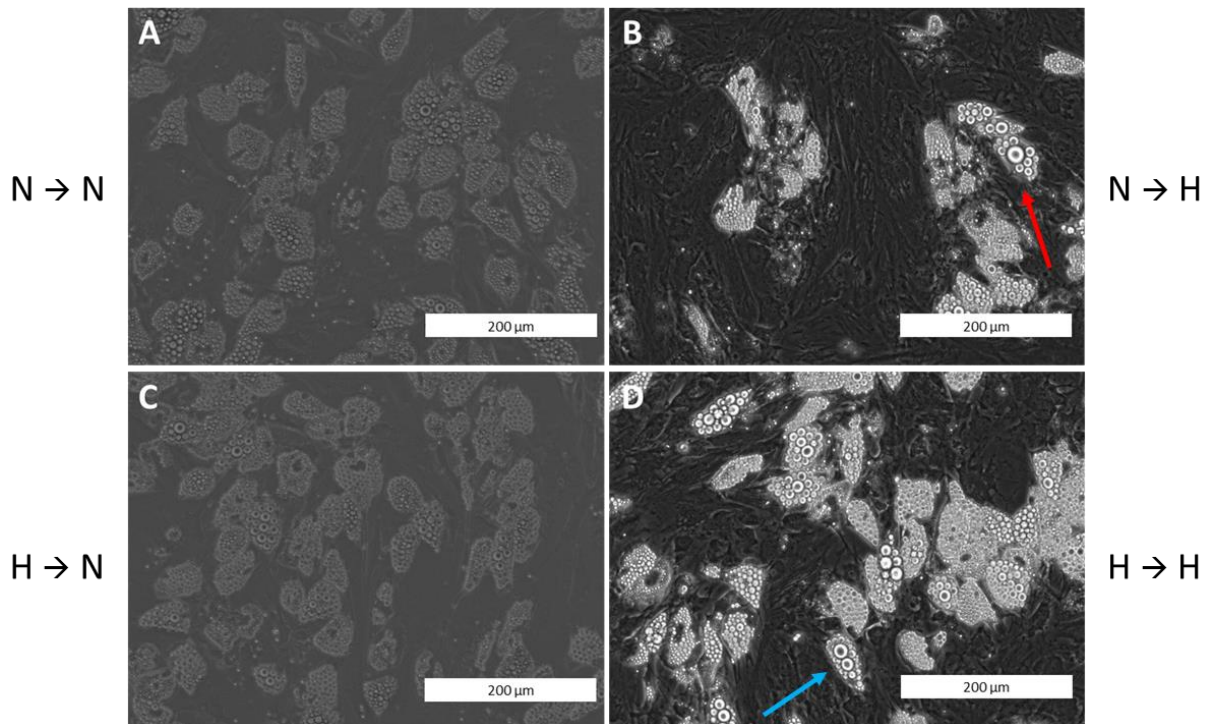
gefixeerde en gekleurde wells. Er zou dan namelijk calcium in de cellen aanwezig moeten zijn dat, samen met de Alizarin Red S kleuring, een oranje-rood complex vormt.



Figuur 2: Osteogene differentiatie na dag 21 fixatie en kleuring met Alizarin Red S. Foto's gemaakt met Nikon camera en omgekeerde microscoop. De morfologie is anders dan bij botcellen en de kleuring is niet zichtbaar. De confluentie van de cellen in foto B is veel minder dan de confluentie van de cellen in de andere foto's.

3.2 Adipogene differentiatie

In de wellsplaten waarin de adipogene differentiatie was uitgevoerd, was aan de morfologie goed te zien dat er adipocyten zijn ontstaan, zie Figuur 3. De confluentie verschilde per conditie. Voornamelijk bij de cellen die in normoxia zijn opgekweekt en in hypoxia zijn gaan differentiëren was de confluentie veel lager dan bij de cellen in de andere condities en hier waren wat grotere vetdruppels zichtbaar, zie Figuur 3B (rode pijl). Bij de cellen die in hypoxia zijn opgekweekt en in hypoxia zijn gaan differentiëren was de confluentie wat hoger en waren ook wat grotere vetdruppels zichtbaar, zie Figuur 3D (blauwe pijl). De laatste twee condities hadden een vergelijkbare confluentie (ten opzichte van elkaar) en hier waren minder grote vetdruppels zichtbaar, zie Figuur 3A en C.

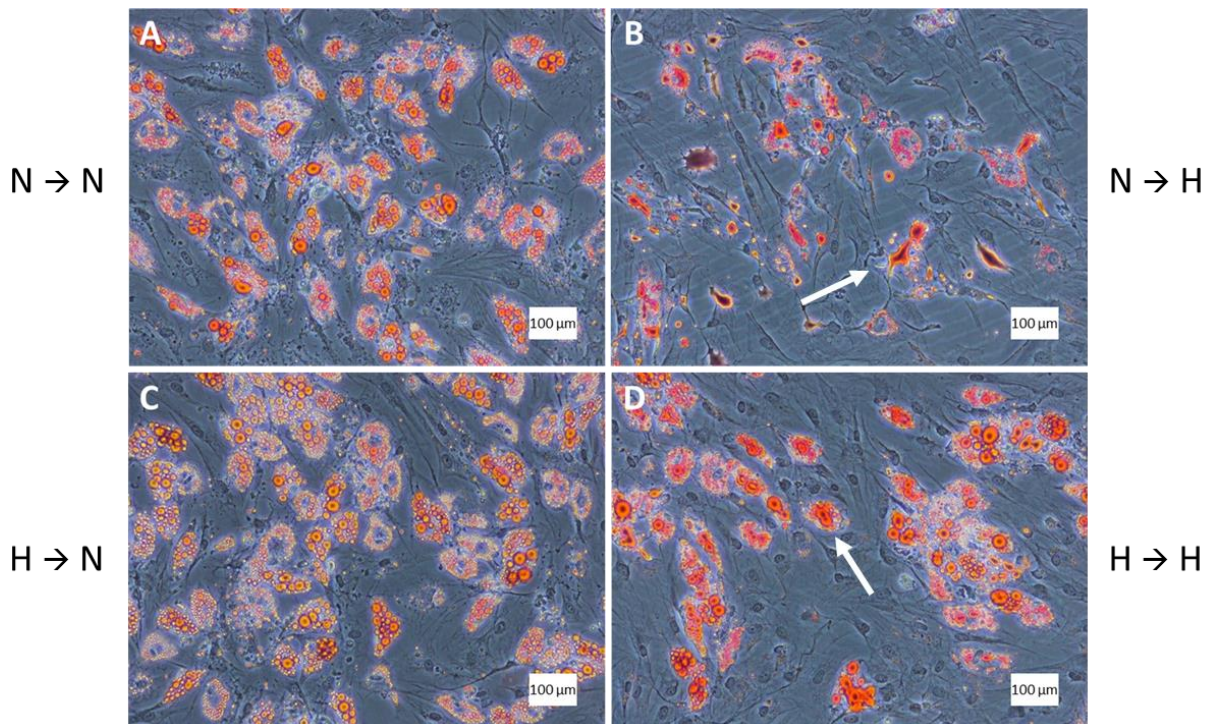


Figuur 3: EVOS foto's van adipogene differentiatie. Cellen op dag 21 vóór fixatie en kleuring. Er zijn duidelijk adipocyten zichtbaar in alle condities. De confluentie is erg verschillend per conditie, vooral in foto B is de confluentie echt veel lager en zijn ook grotere vetdruppels te zien (zie rode pijl). In foto D is het al wat meer en zijn ook wat grotere vetdruppels te zien (zie blauwe pijl). In foto A en C is de confluentie erg vergelijkbaar en hier zijn de vetdruppels wat kleiner. (De foto's zijn met twee verschillende EVOS apparaten gemaakt, waarvan één in de Xvivo staat in hypoxia omstandigheden.)

3.2.1 Cytochemische kleuring met Oil Red O

Zoals in paragraaf 2.3 al werd genoemd, zijn de adipocyten nog verder geanalyseerd door ze te kleuren met de cytochemische kleuring Oil Red O. Deze kleuring moest de lipide druppels die waren ontstaan door adipogene differentiatie rood aankleuren.

In Figuur 4 hieronder is te zien dat er inderdaad rood aangekleurde lipide druppels aanwezig waren in alle condities. In Figuur 4A en C is te zien dat de kleur wat meer oranje-rood was en de lipide druppels duidelijk van elkaar te onderscheiden waren. Verder is te zien dat de confluentie in deze twee foto's ook weer vergelijkbaar was, al lijkt foto C net iets voller te zitten met oranje-rode lipide druppels. Dit waren de cellen die in normoxia omstandigheden zijn gaan differentiëren. In Figuur 4B en D is te zien dat de kleur wat roder was en dat de lipide druppels geknapt lijken te zijn op verschillende plekken, zie ook de witte pijlen. Daarnaast is in foto B te zien dat de confluentie veel lager was ten opzichte van Foto A en C. In foto D was de confluentie iets hoger, maar nog steeds lager dan in Foto A en C. Dit waren de cellen die in hypoxia omstandigheden zijn gaan differentiëren.



Figuur 4: Adipogene differentiatie, cellen op dag 21, na fixatie en kleuring met Oil Red O. Foto's gemaakt met Nikon camera en omgekeerde microscoop. In foto A en C is een meer oranjerode kleur te zien in de duidelijk te onderscheiden lipide druppels. In deze twee foto's is verder een vergelijkbare confluentie te zien, al lijkt foto C net iets voller te zitten. In foto B en D is een wat rodere kleur te zien en lijken de lipide druppels geknapt te zijn op verschillende plekken, zie ook de witte pijlen. Daarnaast is de confluentie veel lager in foto B ten opzichte van Foto A en C. In foto D was de confluentie iets hoger dan in foto B, maar nog steeds lager dan in Foto A en C.

3.3 Chondrogene differentiatie

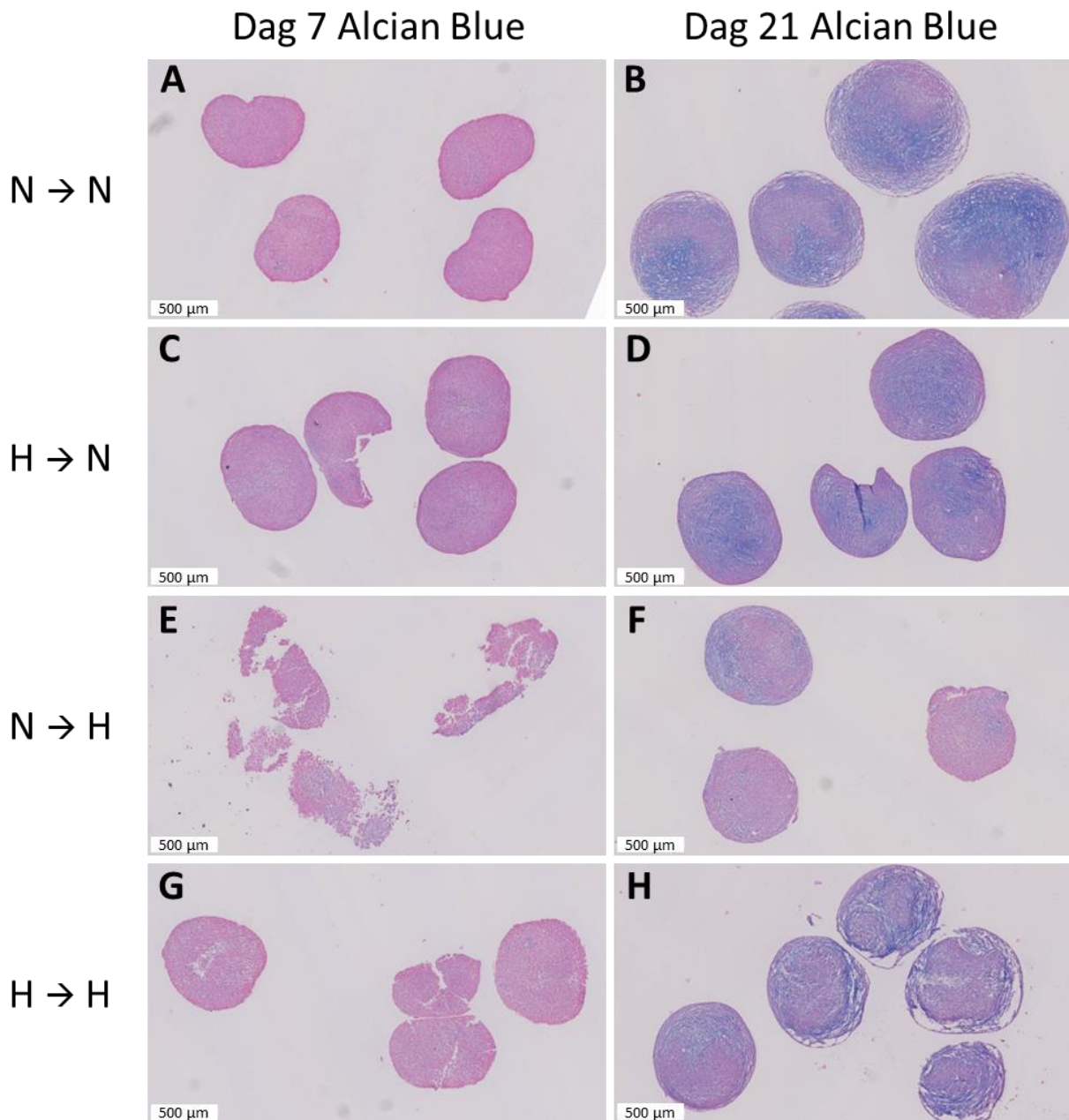
In dit hoofdstuk worden de resultaten van de chondrogene differentiatie besproken aan de hand van de morfologische verandering en de kleurverandering gedurende de tijd. Ook worden de Alcian Blue en de Safranin O kleuringen met elkaar vergeleken. Uiteindelijk worden die resultaten allemaal samengevat in de laatste paragraaf aan de hand van drie opgestelde criteria om de analyse te vereenvoudigen.

3.3.1 Grootte, vorm en kleurverandering gedurende de tijd

Eerst werden de grootte, de vorm en de kleurverandering bekeken in de loop van de tijd. Zoals in paragraaf 2.3 al werd genoemd, werden de pellets zowel op dag 7 als op dag 21 geoogst, gefixeerd en geanalyseerd met Alcian Blue kleuring. De Alcian Blue kleuring kleurt de GAG's in de kraakbeen-specifieke extracellulaire matrix blauw, wanneer er sprake is van kraakbeenvorming.

In Figuur 5 is per conditie te zien hoe de grootte, de vorm en de kleur zijn veranderd tussen dag 7 en dag 21. Zo is te zien dat de pellets van conditie N→N veel groter waren, met enigszins fibrotische randen, en een intense blauwe kleur hadden op dag 21 ten opzichte van dag 7, waar ze klein en niervormig waren en niet of nauwelijks kleuring bevatten, zie foto A en B. De pellets van conditie H→N waren ook wat groter geworden in de loop van de tijd en bevatten op dag 21 een redelijk intens blauwe kleuring die vanuit het midden leek te zijn ontstaan, zie foto D. Op dag 7 leek de kleuring vanuit het midden al enigszins te zijn ontstaan, maar dit was meer een gloed, dan echt duidelijke aankleuring, zie foto C. De pellets van conditie N→H lieten wel enigszins kleuring zien op dag 7, maar de pellets zelf waren nogal uit elkaar gevallen, zie foto E. Op dag 21 waren de pellets nog wel intact, maar lieten ze relatief weinig kleur zien. Eén van de drie pellets in foto F leek nog best wat kleuring te tonen, maar totaal bevatte deze conditie zes pellets, waarvan dit de enige was die echt meer kleur liet zien, zie ook Figuur 9 in

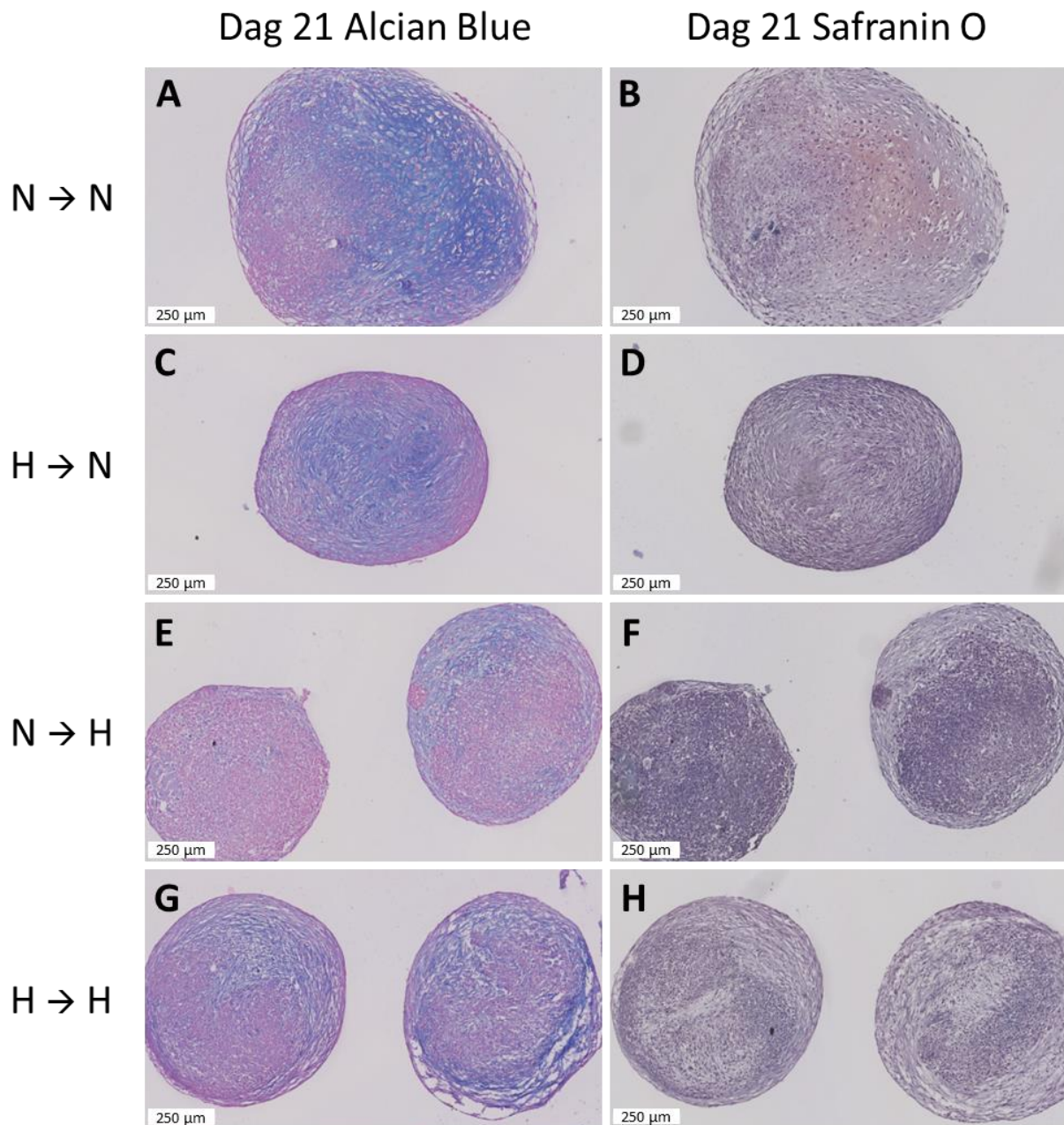
Bijlage D. De pellets van conditie H→H lieten op dag 7 ook weer niet of nauwelijks kleur zien, zie foto G. Op dag 21 lieten ze een intens blauwe kleuring zien, maar deze kleuring was voornamelijk erg intens aan de randen van de pellets, die er erg fibrotisch en instabiel uitzagen. Verder zijn de pellets op dag 21 ook weer wat groter ten opzichte van dag 7, zie foto H.



Figuur 5: Nanozoomer overzichtsfoto's van de chondrogene differentiatie op dag 7 en dag 21 na kleuring met Alcian Blue. In foto A zijn de pellets klein en niervormig en deze laten niet of nauwelijks Alcian Blue kleuring zien. In foto B is er intense kleuring aanwezig en zijn de pellets veel groter met enigszins fibrotische randen. In foto D zijn de pellets ook wat groter en bevatten een redelijk intens blauwe kleuring die vanuit het midden lijkt te zijn ontstaan. In foto C lijkt er al een blauwe gloed aanwezig in het midden van de pellets. In foto E laten de redelijk uit elkaar gevallen pellets wel enigszins kleuring zien, maar niet per se op stabiele plekken in de pellets. In foto F zijn de pellets wel intact, maar laten ze relatief weinig kleur zien. In foto G laten de pellets niet of nauwelijks kleur zien. In foto H is intens blauwe kleuring zichtbaar in de fibrotische randen van de pellets die ten opzichte van dag 7 weer iets groter zijn.

3.3.2 Analyse met Alcian Blue kleuring ten opzichte van Safranin O kleuring

De chondrogene pellets die op dag 21 zijn geoogst en gefixeerd zijn naast Alcian Blue ook met Safranin O gekleurd. Safranin O kleurt de proteoglycanen in de extracellulaire matrix en/of de GAG's in gewrichtskraakbeen oranje-rood wanneer er sprake is van kraakbeenvorming.



Figuur 6: Nanozoomer close-up foto's van de chondrogene differentiatie op dag 21 na kleuring met Alcian Blue en Safranin O ter vergelijking van de uiting van beide kleuringen. In foto A en B komen de kleuringen redelijk overeen qua gebied. Er is een rode gloed te zien in foto B waar in foto A intens blauwe kleuring te zien is. In foto C is het midden van de pellet redelijk intens blauw gekleurd en in foto D is het midden lichter gekleurd dan de buitenkant van de pellet. Zie ook rechtsonder in de pellets in foto C en D hoe de roze rand bij Alcian Blue, donker gekleurd is bij Safranin O. In foto E bevat de linker pellet nauwelijks blauwe kleuring en deze pellet is in foto F ook donker gekleurd. De rechterpellet laat in foto F een lichte kleuring zien aan de bovenkant, wat in foto E redelijk blauw gekleurd is. In foto G zijn de randen blauw aangekleurd (vooral rechterpellet) en rond het midden is het roze. In foto H zijn de randen licht gekleurd en rond het midden is het donker gekleurd.

In Figuur 6 hierboven zijn de foto's met de twee kleuringen naast elkaar te zien om goed te kunnen vergelijken hoe de kleuringen zich uiten. In foto A en B, conditie N→N, is te zien dat de kleuringen redelijk overeenkwamen qua gebied. De Safranin O kleuring was niet zo sterk

roodgekleurd, maar er was wel een rode gloed te zien in foto B in het gebied waar in foto A de blauwe kleuring heel intens was. In de rest van de foto's was er ook geen rode gloed meer te zien, maar was wel verschil te zien in kleur en structuur binnen de pellets die met Safranin O waren gekleurd. In foto C en foto D, conditie H→N, is te zien dat het midden van de pellet bij Alcian Blue redelijk intens blauw gekleurd was en dat het midden van de pellet bij Safranin O wat lichter gekleurd was dan de buitenkant van de pellet. Vooral rechtsonder in de pellet in foto D is te zien dat de rand donkerder gekleurd is, waar diezelfde rand in foto C heel roze is. In foto E en F, conditie N→H, is te zien dat de linker pellet nauwelijks blauwe kleuring liet zien bij Alcian Blue en dat diezelfde pellet bij Safranin O voornamelijk donker gekleurd was. In de rechter pellet is te zien dat voornamelijk de bovenkant bij Safranin O wat lichter gekleurd was en dat kwam overeen met het blauwe gedeelte van die pellet bij Alcian Blue. Ook in foto G en H, conditie H→H, kwamen de kleuringen overeen. Rond het midden van de pellets was bij Alcian Blue roze gekleurd wat donker gekleurd was bij Safranin O. De randen waren bij Alcian Blue blauw aangekleurd, vooral de rechterpellet, en bij Safranin O waren deze ook weer lichter gekleurd.

Voor meer gedetailleerde foto's van de eerste twee condities (N→N en H→N) en hun kleuring en structuur, zie Figuur 10 in Bijlage D.

3.3.3 Samenvatting resultaten aan de hand van criteria

Bij de pellets van de chondrogene differentiatie waren veel verschillen te zien in de morfologie per conditie, maar ook per pellet binnen één conditie. Om toch een beeld te krijgen van hoe de condities zich tot elkaar verhouden, zijn er drie criteria opgesteld: Grootte, kleurintensiteit bij Alcian Blue en fibrotisch uiterlijk van de pellet. Deze criteria werden per pellet en per conditie zo objectief mogelijk beoordeeld en geschaald met + en -. Waarbij een kleine pellet wordt aangeduid met + en een grote met bijvoorbeeld + + +, geen Alcian Blue kleuring wordt aangeduid met - en intense kleuring met bijvoorbeeld + + en een niet-fibrotische pellet wordt aangeduid met - en een fibrotische pellet met +. Voor een positief resultaat wordt uitgegaan van pellets die zo groot mogelijk, zoveel mogelijk gekleurd (het liefste vanuit het midden) en zo min mogelijk fibrotisch zijn.

Hieronder in Tabel 2 staat de gemiddelde grootte (in μm) van de pellets weergegeven per conditie. Deze grootte is bepaald door de diameter van alle individuele pellets op de met Alcian Blue gekleurde coupes op te meten in het Nanozoomer view programma NDP.view 2, zie ook Figuur 11 in Bijlage D voor een voorbeeld. Hiervan is per pellet de grootste waarde genomen die voorkwam binnen de coupes van elke conditie, gezien er naar het midden en dus de grootste diameter wordt gekeken. Uiteindelijk is met die getallen een gemiddelde pellet-grootte per conditie bepaald die dan weer is omgezet naar +'jes.

Tabel 2: De gemiddelde grootte van de pellets is gebaseerd op de groottes van iedere pellet in iedere coupe van een conditie. Eerst zijn per conditie de diameters opgemeten van alle individuele pellets in alle coupes. Vervolgens is per pellet de grootste waarde genomen die voorkwam binnen de coupes van elke conditie, gezien het de bedoeling is dat er naar het midden van elke pellet, oftewel de grootste diameter wordt gekeken. Uiteindelijk is daarmee een gemiddelde pellet-grootte met standaarddeviatie bepaald per conditie. Deze grootte is dan weer omgezet naar +'jes .

	Gemiddelde grootte van pellets per conditie (in μm)			Grootte omgezet naar +
	Grootte	Standaarddeviatie	Aantal pellets (n)	
N→N	1070,4	120,10	5	+ + + +
H→N	907,50	38,613	4	+ + +
N→H	754,17	74,997	6	+
H→H	861,40	90,082	5	+ +

Als dan alle criteria voor alle condities op een rij worden gezet komt daar het volgende overzicht uit, zie Tabel 3:

Tabel 3: Alle criteria per conditie op een rij, geschaald naar '+' en '-'.

Conditie	Grootte pellets	Alcian Blue kleuring	Fibrotisch
N→N	++++	++	+
H→N	+++	+	-
N→H	+	-	-
H→H	++	+	+++

In de resultaten, en daarmee in bovenstaande tabel, is te zien dat de pellets die in normoxia zijn opgekweekt en in normoxia zijn gaan differentiëren (N→N) heel groot zijn, intense Alcian Blue kleuring bevatten en enigszins fibrotisch zijn. De pellets die in hypoxia zijn opgekweekt en in normoxia zijn gaan differentiëren (H→N), zijn nog aan de grote kant, hebben ook nog redelijk intense Alcian Blue kleuring en zijn niet fibrotisch. De pellets die in normoxia zijn opgekweekt en in hypoxia zijn gaan differentiëren (N→H) zijn wat aan de kleinere kant, vergeleken met die in de eerder genoemde condities, de Alcian Blue kleuring is nauwelijks zichtbaar op kleine stukjes na en ze zijn niet fibrotisch. De pellets die in hypoxia zijn opgekweekt en in hypoxia zijn gaan differentiëren (H→H) zijn aan de kleinere kant, vergeleken met die in de andere condities, de Alcian Blue kleuring is al wat intenser, maar is vooral te zien in de zeer fibrotische randen van de pellets.

4 Discussie

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt ten eerste dat er geen osteogene differentiatie heeft plaatsgevonden. Dit komt overeen met een onderzoek in Hoofdstuk 5 van het proefschrift van Nicole Georgi, die met cellen van dezelfde donoren heeft gewerkt [9]. Er was in dat onderzoek maar één donor die na vier weken calcificatie liet zien. Bij de andere donoren was daarvan geen sprake. Bovendien blijkt uit eerder onderzoek al dat hypoxia de osteogenese van hMSC's juist remt [11].

Verder blijkt dat er wel adipogene differentiatie heeft plaatsgevonden en dat voornamelijk de hMSC's die in normoxia zijn gaan differentiëren positief zijn beïnvloed. De hMSC's die in hypoxia zijn gaan differentiëren hadden een lagere confluentie na differentiatie. En na fixatie en kleuring leken sommige vetlipiden geknapt en misschien dus instabiel te zijn. De hMSC's die in hypoxia zijn opgekweekt en in normoxia zijn gaan differentiëren lijken het dan nog het beste te hebben gedaan met de hoogste confluentie en goede aankleuring met Oil Red O. Al zijn de verschillen niet zo groot ten opzichte van de in normoxia opgekweekte en in normoxia gedifferentieerde cellen. Dit klopt ook met het eerder genoemde onderzoek van Nicole Georgi, waarin ook de condities N→N en H→N zijn gebruikt [9]. Uit dat specifieke onderzoek bleek het opkweken van hMSC's in hypoxia en het differentiëren in normoxia een betere invloed te hebben op de adipogene differentiatie dan het opkweken én differentiëren in normoxia omstandigheden.

Wat verder nog opviel na kleuring met Oil Red O was dat de in normoxia gedifferentieerde cellen een meer oranje-rode kleur hadden en de in hypoxia gedifferentieerde cellen een meer rode kleur, zie ook Figuur 4. Hiervoor is gekeken naar de belichtingstijd van de foto's, maar die was overal hetzelfde en er is ook steeds dezelfde zoom/vergroting en hetzelfde objectief gebruikt. Het zou dus kunnen dat dit door de zuurstofspanning in de cellen zelf komt, maar hier is verder nog geen specifieke bevestiging op gevonden in eerdere onderzoeken.

Wat de chondrogene differentiatie betreft, lijkt het erop dat de in normoxia gedifferentieerde pellets het in dit geval ook beter hebben gedaan dan de in hypoxia gedifferentieerde pellets en daadwerkelijk wat kraakbeenvorming bevatten. Het grootste verschil tussen de condities $N \rightarrow N$ en $H \rightarrow N$ zit hem in de kleuring, en dus de matrix, die zich bij $N \rightarrow N$ meer richting de randen van de pellets bevindt en bij $H \rightarrow N$ meer in het midden. Daarnaast hebben de pellets van de conditie $N \rightarrow N$ een enigszins fibrotisch uitziende rand, wat de $H \rightarrow N$ pellets niet hebben. De in hypoxia gedifferentieerde pellets zagen er minder goed uit. Ze waren kleiner en bij de $N \rightarrow H$ pellets was de kleuring niet of nauwelijks aanwezig waaruit dan te concluderen is dat hier niet of nauwelijks sprake is van kraakbeenvorming. De $H \rightarrow H$ pellets bevatten wel redelijk intense kleuring, maar dit zat zodanig in de extreem fibrotisch uitziende randen van de pellets, dat er niet echt te spreken is van een mooie matrixvorming voor kraakbeen. Het fibrotische uiterlijk kan komen door snijartefacten en/of doordat de pellets niet stabiel of stevig genoeg waren. Een instabiele pellet of een pellet die niet stevig genoeg is, zal ook eerder beschadigen bij het snijden van de coupes.

Wat ook opviel is dat de pellets van de verschillende condities aanzienlijk gegroeid waren op dag 21 ten opzichte van dag 7. Tijdens het experiment is aangenomen dat een grotere pellet ook positief is ten opzichte van een kleinere pellet. Nu hoeft een grotere pellet niet per se te betekenen dat er sprake is van veel matrixvorming. De groei kan komen door die matrixvorming door het ontstaan van kraakbeen, maar kan ook komen door de proliferatie van de cellen zelf. Verder is de grootte van de pellets niet geheel exact bepaald, zie ook paragraaf 3.3.3 en Figuur 11 in Bijlage D. Voor vervolgonderzoek of het reproduceren van dit onderzoek wordt dan ook aangeraden om hier een exactere manier voor te vinden en sowieso een methode te gebruiken om dit te kwantificeren.

Over het algemeen leken de hMSC's die in hypoxia zijn opgekweekt dus het beste te differentiëren in normoxia en de hMSC's die in normoxia zijn opgekweekt differentiëerden ook het beste in normoxia. Dat eerste komt, zoals eerder vermeld, overeen met andere onderzoeken [4–9]. Het tweede is de standaard manier om in-vitro differentiaties uit te voeren. Nu is er ook een ander onderzoek waarin er tijdens de differentiatie zelf een switch is gemaakt van normoxia naar hypoxia [10]. Er is toen 7 dagen in normoxia gedifferentieerd en 14 dagen in hypoxia en dit zou een betere chondrogenese hebben opgeleverd, maar dit werd dan wel gedaan met MSC's afkomstig uit navelstrengbloed.

Het belangrijkste is in dit geval dat dit een kort onderzoek was naar de optimale omstandigheden op het gebied van zuurstofspanning voor differentiatie. Kijkend naar de andere condities in dit onderzoek zelf, was dus wel te zien dat de $H \rightarrow H$ pellets aangekleurd waren, maar erg beschadigd waren. Misschien, als ze langer door hadden kunnen differentiëren, zouden ze wel groter en steviger geweest zijn en ook betere resultaten hebben kunnen geven. Ook een hogere passage, zoals in het onderzoek van Nicole Georgi, zou misschien betere resultaten hebben kunnen geven [9]. Nu was er maar beperkte tijd en was dat niet mogelijk.

Uit de specifieke resultaten van dit onderzoek zelf, valt te zeggen dat het opkweken in hypoxia (2,5% O_2) en het differentiëren in normoxia (20% O_2) betere resultaten oplevert voor adipogene en chondrogene differentiatie dan de standaardmethode met zowel opkweken als differentiëren in normoxia omstandigheden. En dit wordt bevestigd door eerder onderzoek. De kans dat het opkweken in hypoxia een veelbelovende toekomst heeft ten opzichte van de standaard differentiatiemethoden is dan ook erg groot. Echter, om dit met zekerheid te implementeren in de toekomstige differentiatiemethoden is nog wat meer onderzoek nodig naar deze verschillende condities en de periode van differentiatie.

5 Conclusie

Voor de osteogene differentiatie is uit dit onderzoek nog niet helemaal duidelijk wat de invloed van hypoxia precies is. Uit dit onderzoek is wel te concluderen dat hMSC's die in hypoxia omstandigheden worden opgekweekt en in normoxia omstandigheden differentiëren de beste resultaten opleveren voor de adipogene en chondrogene differentiatie. En dat hMSC's die in normoxia omstandigheden worden opgekweekt en in hypoxia omstandigheden differentiëren de slechtste resultaten opleveren voor de adipogene en chondrogene differentiatie. Dat hypoxia een positieve invloed zou hebben op de verschillende differentiatieprocessen is dus niet het geval voor osteogene differentiatie, maar wel voor adipogene en chondrogene differentiatie. Al volgt wel uit dit onderzoek dat het ervan afhangt of er in hypoxia omstandigheden wordt opgekweekt of gedifferentieerd. Voor de toekomst kan het opkweken van hMSC's in hypoxia omstandigheden dus een goed alternatief zijn op de standaardmethode van hMSC's opkweken in normoxia omstandigheden voor differentiatie.

6 Aanbevelingen

Zoals in de Discussie ook al werd vermeld was dit een erg kort onderzoek. Om betere en meer resultaten te verkrijgen wordt aangeraden om waar mogelijk langer de tijd te nemen. Op die manier kunnen de differentiaties langer worden doorgezet dan 21 dagen en zijn er meer en misschien nog andere analysemethoden mogelijk om een conclusie op te kunnen baseren.

Een aanbeveling is dus om de chondrogene differentiatie langer door te zetten en op tussentijdse momenten al data te verzamelen. Wat hier is gedaan met dag 7 en dag 21, maar dan langer door en bijvoorbeeld iedere twee of drie weken fixeren, kleuren en analyseren. Op die manier kan worden onderzocht wat de optimale differentiatieperiode is voor de verschillende condities.

Ook zou het in een vervolgonderzoek bijvoorbeeld mogelijk kunnen zijn om meer kleuringen toe te passen. Trichrome staining zou misschien nog wel interessant zijn om te doen voor de chondrogene pellets, omdat dan meerdere onderdelen van het weefsel tegelijk worden aangekleurd, zoals de specifieke cellen en omliggend weefsel. Of IHC kleuringen met COL2 of RUNX2 om beter te kijken of er kraakbeen gevormd is na chondrogene differentiatie.

Daarnaast is het mogelijk om in een vervolgonderzoek voor bijvoorbeeld de adipogene differentiatie een colorimetrische assay of qPCR toe te passen als extra analyse. Of om andere kwantificatiemethoden toe te passen voor de verschillende differentiaties. Op die manier is exacter te beoordelen hoe een differentiatieproces precies is verlopen en is vergelijken tussen condities ook meer objectief.

Referentielijst

- [1] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889–95. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401>.
- [2] Georgi N, Cillero-Pastor B, Eijkel GB, Periyasamy PC, Kiss A, van Blitterswijk C, et al. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells under Hypoxia and Normoxia: Lipid Profiles Revealed by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Anal Chem* 2015;87:3981–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00114>.
- [3] Ma B, Leijten JCH, Wu L, Kip M, van Blitterswijk CA, Post JN, et al. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthr Cartil* 2013;21:599–603. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.01.014>.
- [4] Leijten JCH, Moreira Teixeira LS, Landman EBM, van Blitterswijk CA, Karperien M. Hypoxia Inhibits Hypertrophic Differentiation and Endochondral Ossification in Explanted Tibiae. *PLoS One* 2012;7:e49896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049896>.
- [5] Amarilio R, Viukov S V., Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E. HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* 2007;134:3917–28. <https://doi.org/10.1242/dev.008441>.
- [6] Markway BD, Cho H, Johnstone B. Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R92. <https://doi.org/10.1186/ar4272>.
- [7] Schrobback K, Klein TJ, Crawford R, Upton Z, Malda J, Leavesley DI. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell Tissue Res* 2012;347:649–63. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1193-7>.
- [8] Leijten J, Georgi N, Moreira Teixeira L, van Blitterswijk CA, Post JN, Karperien M. Metabolic programming of mesenchymal stromal cells by oxygen tension directs chondrogenic cell fate. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:13954–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410977111>.
- [9] Georgi N. Multiple choice: leveraging instructive culture models to improve cartilage tissue engineering. University of Twente, 2013. <https://doi.org/10.3990/1.9789036535205>.
- [10] Gómez-Leduc T, Desancé M, Hervieu M, Legendre F, Ollitrault D, de Vienne C, et al. Hypoxia Is a Critical Parameter for Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells in Type I/III Collagen Sponges. *Int J Mol Sci* 2017;18:1933. <https://doi.org/10.3390/ijms18091933>.
- [11] Yang D-C, Yang M-H, Tsai C-C, Huang T-F, Chen Y-H, Hung S-C. Hypoxia Inhibits Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells through Direct Regulation of RUNX2 by TWIST. *PLoS One* 2011;6:e23965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023965>.

Bijlagen

Hieronder volgen bijlagen waarin gegevens van donorcellen, plaatindelingen, protocollen en foto's als aanvulling of toelichting op resultaten zijn opgenomen.

Bijlage A: Gegevens van hMSC's bij aanvang experiment

Hieronder in Tabel 4 staan de gegevens van de hMSC's die worden gebruikt voor het gehele experiment. Gegevens zoals celtype, het aantal cellen en de passage waarin ze verkeren.

Tabel 4: Gegevens horend bij hMSC's van donoren D42 en D56 die uit stikstof zijn gehaald. Gegevens zoals: celtype, aantal cellen, passage waarin ze verkeren en in welke omstandigheden ze zijn opgekweekt.

12.1	cell type	nr cells	of	passage	date	frozen by	comments
10	MSC D42	1.0x10 ⁶		P2	02/11/10	NG	N(ormoxia)
12	MSC D42	1.0x10 ⁶		P2	02/11/10	NG	H(ypoxia)
32	MSC 56	1.0x10 ⁶		P2/3	01/02/11	NG	H(ypoxia)
34	MSC 56	1.0x10 ⁶		P2/3	01/02/11	NG	N(ormoxia)

Bijlage B: Plaatindelingen differentiatie experiment

In deze bijlage staan de plaatindelingen voor het differentiatie experiment zoals ze uiteindelijk waren bij het inzetten van het experiment. Ook staan de specifieke cytochemische kleuringen erbij vermeld waarmee uiteindelijk geanalyseerd wordt.

A	Oil Red O H→N	Oil Red O N→N	Alizarin Red S H→N	Alizarin Red S N→N	Adipo/Osteo
B	Oil Red O H→N	Oil Red O N→N	Alizarin Red S H→N	Alizarin Red S N→N	12-well
C	Oil Red O H→N	Oil Red O N→N	Alizarin Red S H→N	Alizarin Red S N→N	3 weken
Adipo (hoog glucose)		Osteo (laag glucose)			

A	Oil Red O H→H	Oil Red O N→H	Alizarin Red S H→H	Alizarin Red S N→H	Adipo/Osteo
B	Oil Red O H→H	Oil Red O N→H	Alizarin Red S H→H	Alizarin Red S N→H	12-well
C	Oil Red O H→H	Oil Red O N→H	Alizarin Red S H→H	Alizarin Red S N→H	3 weken
Adipo (hoog glucose)		Osteo (laag glucose)			

Figuur 7: Definitieve plaatindelingen voor adipogene en osteogene differentiatie voor normoxia (links) en hypoxia (rechts). Daarnaast staan ook de specifieke cytochemische kleuringen vermeld, waarmee geanalyseerd wordt.

A		PBS	PBS	PBS						chondro
B		PBS	N→N	PBS		PBS	PBS	PBS		96-well
C		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		U-bodem
D		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		7 dagen
E		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		20% O2
F		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		
G		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		
H		PBS	PBS	PBS		PBS	PBS	PBS		

A		PBS	PBS	PBS						chondro
B		PBS	N→H	PBS		PBS	PBS	PBS		96-well
C		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		U-bodem
D		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		7 dagen
E		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		2.5 % O2
F		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		
G		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		
H		PBS	PBS	PBS		PBS	PBS	PBS		

A		PBS	PBS	PBS						chondro
B		PBS	N→N	PBS		PBS	PBS	PBS		96-well
C		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		U-bodem
D		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		21-28 dagen
E		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		20% O2
F		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		
G		PBS	N→N	PBS		PBS	H→N	PBS		
H		PBS	PBS	PBS		PBS	PBS	PBS		

A		PBS	PBS	PBS						chondro
B		PBS	N→H	PBS		PBS	PBS	PBS		96-well
C		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		U-bodem
D		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		21-28 dagen
E		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		2.5 % O2
F		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		
G		PBS	N→H	PBS		PBS	H→H	PBS		
H		PBS	PBS	PBS		PBS	PBS	PBS		

Figuur 8: Definitieve plaatindelingen voor chondrogene differentiatie voor normoxia (links) en hypoxia (rechts) en voor 7 dagen (boven) en 21 dagen (onder).

Bijlage C: Protocollen van verschillende kleuringen voor analyse

In deze bijlage staan de protocollen van de verschillende kleuringen die zijn gebruikt voor de analyse van de cellen en pellets na fixatie.

C1 Standard operating procedure, Oil Red O staining of monolayer cells

Chemicals and reagents

- PBS
- 10% buffered Formalin (Sigma, HT501128-4L)
- Oil Red O (Sigma O0625-100g)
- dH₂O
- isopropanol (Boom, 76051455.5000)
- 60% v/v isopropanol in dH₂O

Safety

Hazard statement(s)

Isopropanol:

- H225 Highly flammable liquid and vapour.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H336 May cause drowsiness or dizziness.

Precautionary statement(s)

Wear lab coat, eco-Nitrile gloves, safety goggles and work in fume hood. Rinse cautiously with water for several minutes if in eyes or on skin. Remove gloves IMMEDIATELY in case of contact.

Preparation of Oil Red stock solution

Dissolve 500 mg Oil Red O in 99 ml isopropanol plus 1 ml dH₂O. The stock solution is a clear dark red solution with few insoluble particles.

Preparation of Oil Red O staining solution

- ALWAYS prepare fresh before use.
- Mix 42 mL of stock with 28 mL dH₂O
- Filter the solution using syringe filter.

Procedure

1. Remove medium and GENTLY wash 2x with PBS.
2. Fix monolayer cells with 10% formalin solution for 15 min @ RT
3. Remove fixative (collect in tube)
4. GENTLY rinse monolayer cells 2x with PBS
5. Store under PBS @ 4°C or continue
6. GENTLY rinse monolayer cells 2x with dH₂O
7. Work in fumehood
8. Incubate 5 minutes @ RT in 60% isopropanol
9. Incubate 5 minutes @ RT in freshly filtered Oil Red O staining solution
10. GENTLY Rinse monolayer cells several times with dH₂O until it remains clear
11. Visualize and image the stained cells using an inverted microscope (ML-I lab). Lipid droplets appear red.

Optional: counterstain with Haematoxylin for 1 minute and wash with dH₂O until it remains clear. Nuclei appear blue.

C2 Standard operating procedure, Alizarin Red S staining of monolayer cells

Chemicals and reagents

- PBS
- 10% buffered Formalin (Sigma, HT501128-4L)
- Alizarin red S (Sigma A5533-25g)
- 25% ammonium hydroxide (NH₄OH) solution (Fluka 09860)
- HCl (1 M, 2 M, 4M, 6 M, or fuming)

Safety

Hazard statements

10% neutral buffered formalin:

- H302 Harmful if swallowed.
- H317 May cause an allergic skin reaction.
- H341 Suspected of causing genetic defects.
- H350 May cause cancer.

25% ammonium hydroxide:

- H302 Harmful if swallowed.
- H314 Causes severe skin burns and eye damage.
- H335 May cause respiratory irritation.
- H400 Very toxic to aquatic life.

HCl (1 M, 2M, 4 M, 6M or fuming):

- H290 May be corrosive to metals.
- H315 Causes skin irritation.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H335 May cause respiratory irritation.

Precautionary statement(s)

Wear lab coat, eco-Nitrile gloves, safety goggles and work in fume hood. Rinse cautiously with water for several minutes if in eyes or on skin. Remove gloves IMMEDIATELY in case of contact.

Preparation of 2% w/v Alizarin red solution, pH 4.2:

- Dissolve 2.0 g Alizarin red S in 90 mL dH₂O and mix on a magnetic stirrer until completely dissolved.
- Adjust the pH to 4.2 with 25% ammonium hydroxide or HCl. Add drop-wise to prevent the formation of a precipitate. Add dH₂O to the volume of 100 mL. Filter into a suitable glass bottle. Only use freshly filtered solution!

Procedure

1. Remove medium and Y wash 2x with PBS.
2. Fix monolayer cells with 10% formalin solution for 15 min @ RT
3. Remove fixative (collect in tube)
4. Rinse monolayer cells 2x with PBS
5. Store under PBS @ 4°C or continue
6. Rinse monolayer cells 2x with dH₂O
7. Incubate 1-2 minutes @ RT in freshly filtered Alizarin Red S staining solution, pH 4.2

8. Rinse monolayer cells several times with dH₂O until it remains clear
9. Visualize and image the stained cells using an inverted microscope (ML-I lab). Calcium deposits appear orange-red.

Optional: counterstain with Haematoxylin for 1 minute and wash with dH₂O until it remains clear. Nuclei appear blue.

Notes:

- The staining time is dependent on the amount of calcium in the sections; the staining can be controlled microscopically until the deposits are orange-red in colour.
- The calcium deposits stained with Alizarin Red S are birefringent.

C3 Standard operating procedure, Alcian Blue staining of sections

Chemicals and reagents

- Paraffin embedded sections or cryosections on slides
- GLC™ Mounting Medium (Sakura, #1408 – 6x500mL)
- Dako Ultramount (Agilent, S1964)
- 100% Xylene (VWR (Klinipath, 4055-9005 – 5L)
- 100, 96, 90, 80 and 70% EtOH (Assink Chemie, 0050.41.210.5 – 5L)
- dH2O
- Alcian Blue 8GX (Sigma, A3157-25 g)
- HCl (1 M, 2 M, 4M, 6 M, or fuming)
- 0.1 w/v % Nuclear Fast Red solution

Safety

Hazard statements

HCl (1 M, 2M, 4 M, 6M or fuming):

- H290 May be corrosive to metals.
- H315 Causes skin irritation.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H335 May cause respiratory irritation.

Glacial acetic Acid:

- H226 Flammable liquid and vapour.
- H314 Causes severe skin burns and eye damage.

Xylenes:

- H226 Flammable liquid and vapour.
- H304 May be fatal if swallowed and enters airways.
- H312 + H332 Harmful in contact with skin or if inhaled
- H315 Causes skin irritation.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H335 May cause respiratory irritation.
- H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

Ethanol:

- H225 Highly flammable liquid and vapour.
- H319 Causes serious eye irritation.

GLC™ Mounting Medium (DPX, Sigma):

- H226 Flammable liquid and vapour.
- H304 May be fatal if swallowed and enters airways.
- H312 + H332 Harmful in contact with skin or if inhaled
- H315 Causes skin irritation.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H335 May cause respiratory irritation.
- H360Df May damage the unborn child. Suspected of damaging fertility.
- H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

Precautionary statement(s)

Wear lab coat, eco-Nitrile gloves, safety goggles and work in fume hood. Rinse cautiously with water for several minutes if in eyes or on skin. Remove gloves IMMEDIATELY in case of contact.

Preparation of 0.5 % w/v Alcian Blue staining solution, pH 1.0

For 100 mL, dissolve 0.5 g of Alcian Blue in 1 M HCl (dilute from higher M in dH2O). Check that pH is 1.0 and adjust accordingly with HCl or NaOH). **Only use freshly filtered solution!**

Preparation of Nuclear Fast Red solution

Dissolve 15 g of aluminium sulphate in 300 mL dH₂O in a glass beaker. Leave on stirrer to dissolve. Add 0.3 g Nuclear Fast Red. Slowly heat mixture in microwave until boiling. Leave to cool down. Filter before use.

Procedure

1. Dry sections on slides overnight at 37°C (oven ZH185) or for 1 hour at 65°C (oven ZH182).
2. Filter 250 mL Alcian Blue and Nuclear Fast Red staining solutions prior to use and transferring to designated stain containers.
3. Deparaffinize in 100% Xylene 1, 5 min (fume hood)
4. Deparaffinize in 100% Xylene 2, 5 min (fume hood)
5. Rinse in 100% EtOH (fume hood)
6. Rehydrate in EtOH series:
 - 100% EtOH, 2min
 - 100% EtOH, 2min
 - 96% EtOH, 2min
 - 90% EtOH, 2min
 - 80% EtOH, 2min
 - 70% EtOH, 2min

Note: Dry cryosections overnight at room temperature.

7. Rinse in demiwater for more than 1 minute (discard the first bath in sink to remove remaining EtOH and shake slides).
8. Incubate for 30 minutes in freshly filtered Alcian Blue staining solution.
9. Rinse with tap water, change the 1st bath (discard in sink).
10. Incubate 5 minutes in freshly filtered Nuclear Fast Red staining solution.
11. Rinse briefly in tap water, change the 1st bath (discard in sink).

Note: for cryosections it may be better not to dehydrate, so rinse in demi water and then mount with Dako Ultramount

12. Dehydrate in EtOH series:
 - 1x 70% EtOH for 2 min
 - 1x 80% EtOH for 2 min
 - 1x 90% EtOH for 2 min
 - 1x 96% EtOH for 2 min
 - 1x 100% EtOH for 2 min
 - 1x 100% EtOH for 2 min
13. Incubate 5 min in Xylene 3
14. Incubate 5 min or longer in Xylene 4 (leave in xylene when mounting)
15. Mount immediately in GLC Mounting medium: apply 3 drops with plastic Pasteur pipet (fill up for all slides, close bottle, do NOT leave pipet in bottle). Carefully place coverslip on one side of slide and slowly drop other side while avoiding air bubbles
16. Dry in fume hood

C4 Standard operating procedure, Safranin O staining of sections

Chemicals and reagents

- Paraffin embedded sections on slides
- GLC™ Mounting Medium (Sakura, #1408 – 6x500mL)
- 100% Xylene,
- 100, 96, 90, 80 and 70% EtOH
- 70 % EtOH for rinsing
- dH2O
- Gill hematoxylin #3 staining solution
- 0,1 w/v % Safranin O staining solution
- 0,001% w/v Fast green staining solution
- 1 v/v % Acetic Acid solution

Safety

Hazard statement(s)

Xylenes:

- H226 Flammable liquid and vapour.
- H304 May be fatal if swallowed and enters airways.
- H312 + H332 Harmful in contact with skin or if inhaled
- H315 Causes skin irritation.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H335 May cause respiratory irritation.
- H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

Ethanol:

- H225 Highly flammable liquid and vapour.
- H319 Causes serious eye irritation.

37% HCl:

- H290 May be corrosive to metals.
- H314 Causes severe skin burns and eye damage.
- H335 May cause respiratory irritation.

GLC™ Mounting Medium (DPX, Sigma):

- H226 Flammable liquid and vapour.
- H304 May be fatal if swallowed and enters airways.
- H312 + H332 Harmful in contact with skin or if inhaled
- H315 Causes skin irritation.
- H319 Causes serious eye irritation.
- H335 May cause respiratory irritation.
- H360Df May damage the unborn child. Suspected of damaging fertility.
- H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.

Precautionary statement(s)

Wear lab coat, eco-Nitrile gloves, safety goggles and work in fume hood. Rinse cautiously with water for several minutes if in eyes or on skin. Remove gloves IMMEDIATELY in case of contact.

Preparation of 0.001 w/v % Fast Green solution

Dissolve 0.1 gram Fast Green in 1 L dH₂O. Filter before use.

Preparation of 1 v/v % Acetic Acid solution

Dilute 10 mL of glacial Acetic Acid in 990 mL of dH₂O.

Preparation of 0.1 w/v % Safranin O solution

Dissolve 1 g of Safranin O in 1 L dH₂O. Filter before use.

Procedure

1. Dry sections overnight at 37°C(oven ZH185) or for 1 hour at 65°C (oven ZH182)
2. Filter Safranin O, Fast Green and haematoxylin staining solution prior to use and transferring to staining containers
3. Deparaffinize the slides by washing the slides in:
4. Deparaffinize in 100% Xylene 1, 5 min (fume hood)
5. Deparaffinize in 100% Xylene 2, 5 min (fume hood)
6. Rinse in 100% EtOH (fume hood)
7. Rehydrate in EtOH series:
 - 100% EtOH, 2min
 - 100% EtOH, 2min
 - 96% EtOH, 2min
 - 90% EtOH, 2min
 - 80% EtOH, 2min
 - 70% EtOH, 2min

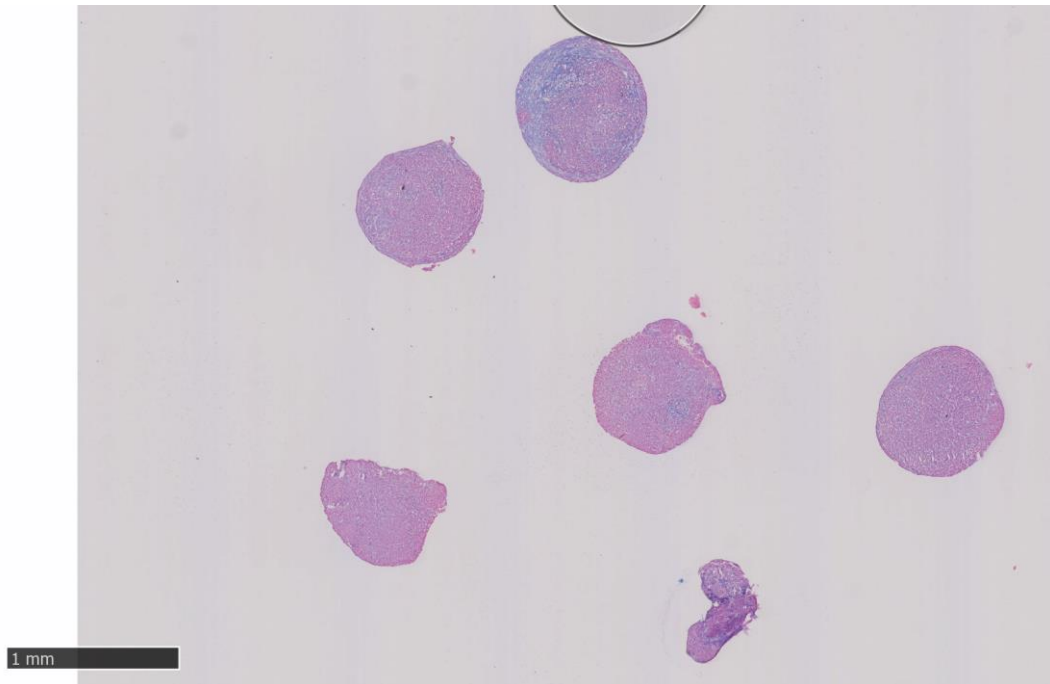
Note: dry cryosections overnight at room temperature.

8. Rinse in demiwater for more than 1 minute (discard 1st bath in sink)
9. Optional: Stain with Gill #3 hematoxylin staining solution for 5 to 7 minutes and wash in running tap water for 10 minutes or longer (discard 1st bath in waste can)
10. Stain with Fast Green staining solution for 3 ± 0.5 minutes
11. Rinse quickly with Acetic Acid solution for no more than 10 to 15 seconds (discard in sink)
12. Stain in Safranin O staining solution for 5 to 7 minutes
13. Rinse in dH₂O (discard in sink)
14. Rinse 2 times in 70% EtOH for 1 min, replace in between (discard in waste can)
15. EtOH dehydration:
 - 1x 80% EtOH for 2 min
 - 1x 90% EtOH for 2 min
 - 1x 96% EtOH for 2 min
 - 1x 100% EtOH for 2 min
 - 1x 100% EtOH for 2 min
16. Incubate 5 min in Xylene 3
17. Incubate 5 min or longer in Xylene 4 (leave in xylene when mounting)
18. Mount immediately in GLC Mounting medium: apply 3 drops with plastic Pasteur pipet (fill up for all slides, close bottle, do NOT leave pipet in bottle). Carefully place coverslip on one side of slide and slowly drop other side while avoiding air bubbles
19. Dry in fume hood

Bijlage D: Foto's ter aanvulling of toelichting op resultaten

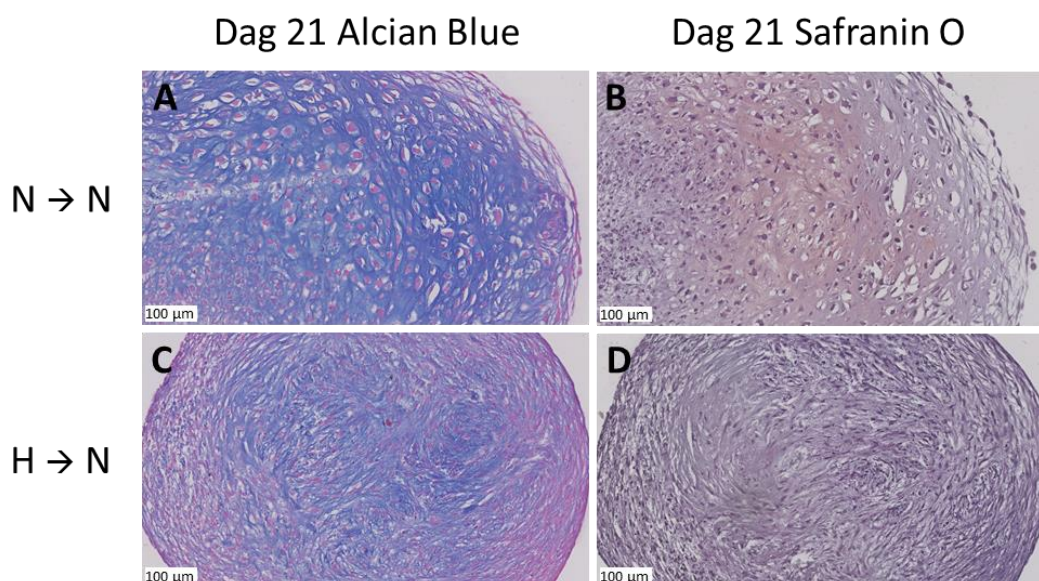
In deze bijlage staan foto's die als aanvulling en/of toelichting dienen op de resultaten.

In de foto hieronder staat het totaal aantal pellets van conditie N→H, zie Figuur 9. Hierin is te zien dat voornamelijk de bovenste pellet best wat blauwe kleuring bevat van de Alcian Blue. Daar staat tegenover dat de rest van de pellets nauwelijks kleuring laat zien en dat de onderste pellet wel wat kleuring bevat, maar dit niet de meest representatieve pellet is.



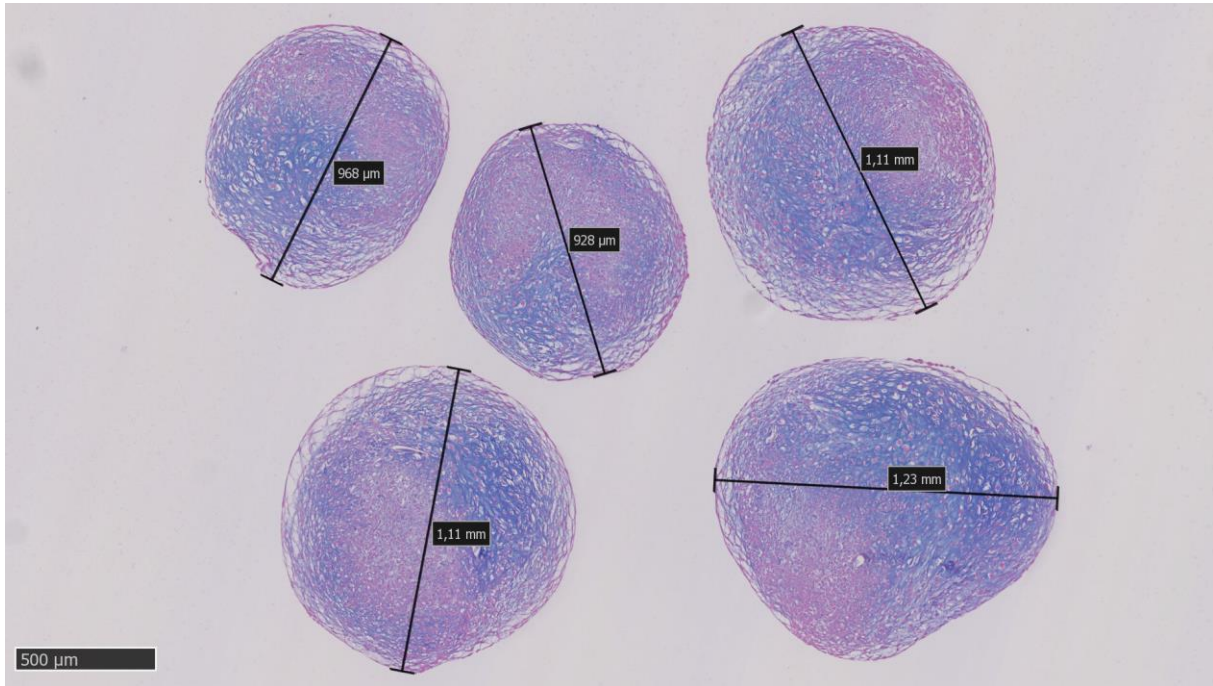
Figuur 9: Nanozoomer foto van conditie N→H met alle 6 de pellets in één coupe, waarbij voornamelijk de bovenste pellet als enige Alcian Blue kleuring en enigszins matrixvorming laat zien.

Hieronder, in Figuur 10 zijn de condities N→N en H→N te zien met nog verder ingezoomde foto's van de Nanozoomer. Deze condities hebben namelijk beide redelijk intense kleuringen, alleen in andere gebieden binnen de pellet en met een iets andere structuur.



Figuur 10: Nanozoomer foto's, nog verder ingezoomd om deze twee condities qua kleur en structuur te kunnen vergelijken.

Hieronder, in Figuur 11, staat een voorbeeld van hoe de diameters van de verschillende coupes zijn opgemeten in het Nanozoomer programma NDP.view 2.



Figuur 11: Voorbeeld van hoe de pellets in diameter zijn opgemeten per coupe en conditie in NDP.view 2. In dit geval zijn het de N→N pellets.