

## *Studie van de cellulaire differentiatie en proliferatie*

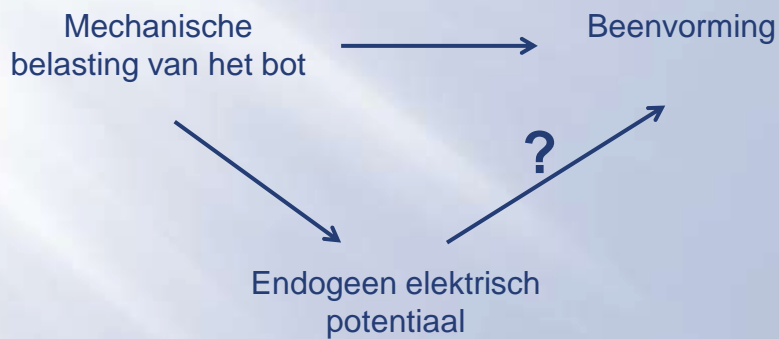
M. Hinsenkamp, J.-F. Collard

Laboratoire de Recherche en Orthopédie-Traumatologie  
Université Libre de Bruxelles  
Hôpital Erasme

Belgian BioElectroMagnetics Group

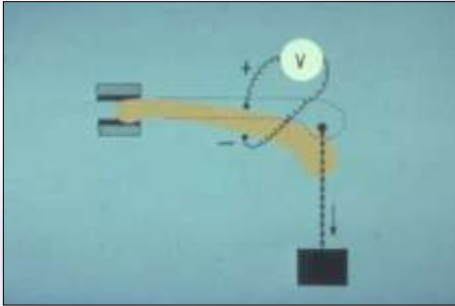


### Hypothese

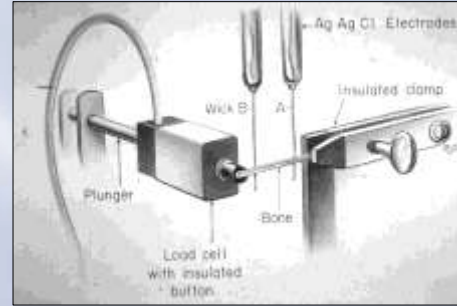


Yasuda, 1953  
Fukada, 1957

## Hypothese

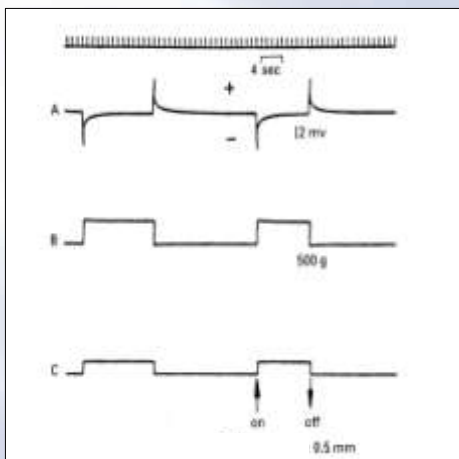


Yasuda, 1953  
Fukada, 1957  
Bassett 1968

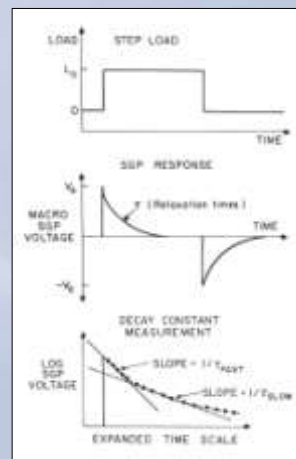


Cochran 1968

## Hypothese

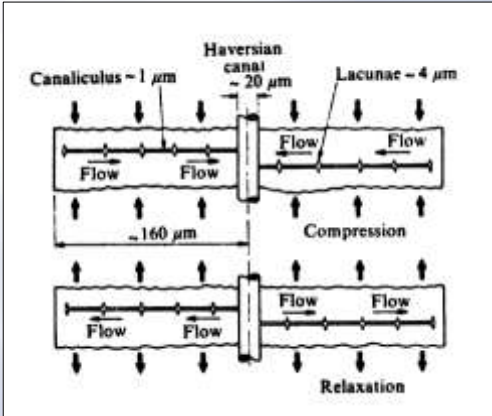


Cochran 1968

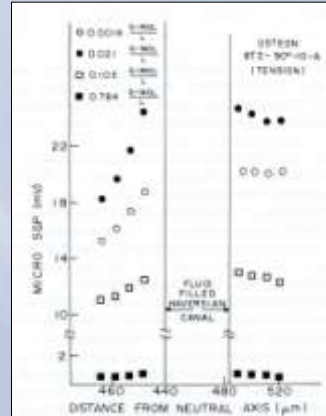


Pienkowski 1983

## Hypothese

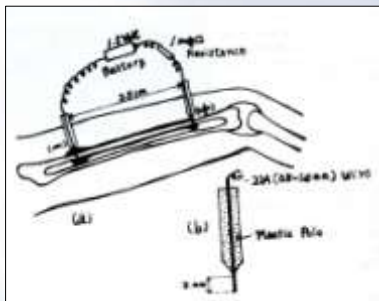


Piekarski 1977

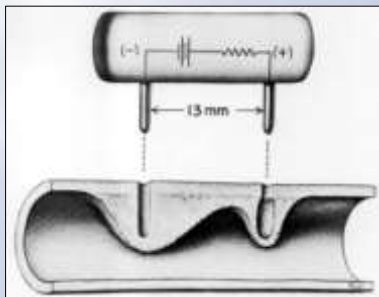


Pienkowski 1983

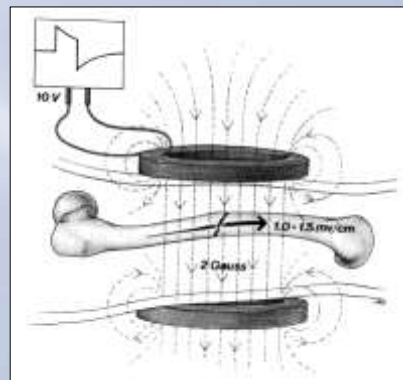
## Hypothese



Yasuda 1974



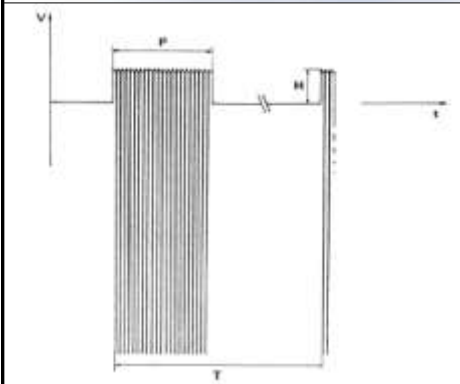
Bassett 1971



Bassett 1981

## Kenmerken van elektrische velden

- Lage frequenties : 0Hz à 300kHz
- Zwakke amplitude : B : 0,22 mT effectieve waarde  
E : 0,72 V/m effectieve waarde



- Impuls:
  - draaggolf : 5kHz
  - modulatie : 15Hz

## Klinische behandelingen in de jaren 80 - historiek

- Klinische toepassingen zonder duidelijke indicatie
- Ontgoochelende resultaten
- Kan chirurgische ingrepen niet vervangen
- Klinische effecten worden bij bepaalde pathologieën waargenomen:
  - pseudarthrosen
  - breuken
  - osteonecrosen

## Klinische studies: pseudarthrose

### Resultaten

	Hypertrofisch	Atrofisch
Consolidatie	86,1%	56,1%

$\chi^2$ : 15,02; ddl.: 1;  $p < 0,001$ ;  $n=129$

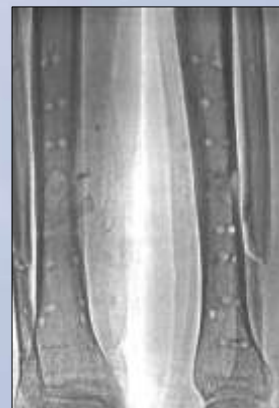


Gossling (1982) observeerde in callus biopsieën een verband tussen het voorkomen van belangrijk fibreus kraakbeenweefsel bij hypertrofe pseudarthrosen en consolidatie na behandeling met EM-velden

## Klinische studies: recente breuken

### Resultaten:

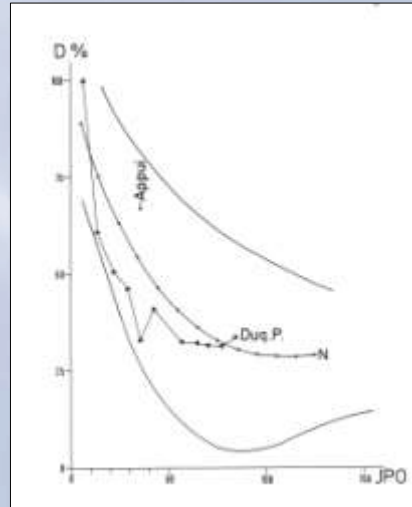
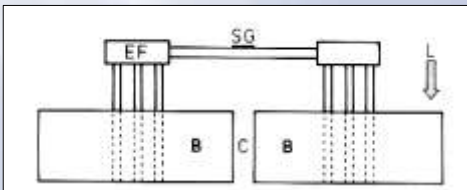
- Statistisch significante vermindering ( $p < 0,05$ ) van de duur van consolidatie maar te gering om klinisch belangrijk te zijn
- Weinig of geen callus ondanks externe elastische fixatie



## Klinische studies: recente breuken

Resultaten:

- Vroegtijdige toename van de rigiditeit van de callus



## Klinische studie: osteonecrose

Resultaten Rx : vergelijking met traditionele behandelingen (literatuur)

Ficat II

Auteurs	T.	n	Follow up (mois)	% altération
Hungerford, 1980	Cons.	22	21	86
Steinberg, 1982	Cons.	11	21?	82
Musso, 1986	Cons.	7	16	86
Hinsenkamp, 1993	PEMF	6	36	0
	PEMF	4	58	0

Ficat III

Auteurs	T.	n	Follow up (mois)	% altération
Hungerford, 1980	Cons.	11	28	91
Steinberg, 1982	Cons.	10	21	90
Musso, 1986	Cons.	26	16	46 ?
Hinsenkamp, 1993	PEMF	14	36	50
	PEMF	7	54	64

Besluit: stabilisatie van Ficat II zonder reële littekenvorming van de lesies

## Embryonale *in vitro* studie

### Materiaal en Methoden

- Embryonale ledematen van de muis (aanleg)
- Kleuring:
  - toluidineblauw
  - Colloïdaal ijzer
  - Dubbele skelettale kleuring (*in toto*)



## Embryonale *in vitro* studie

### Resultaten

- Toename van zure GAGs
- Rigidere structuur van de kraakbeenmatrix
- Proximodistale gradiënt



### Commentaar

- GAGs worden in de kraakbeenmatrix zuurder net voor de beenvorming



## Discussie

- Modificatie van de ruimtelijke configuratie van het DNA
- Toename van RNA productie
- Versnelling van de beenvorming
  - Toename van de concentratie van zure GAGs
  - Versnelling van de beenvorming van embryonale beenrudimenten
  - Vroegtijdige verhoging van de rigiditeit van de callus
  - ossificatie van fibreus kraakbeen in hypertrofe pseudarthrosen
- Deze waarnemingen komen overeen met een versnelling van de maturatie en/of differentiatie van kraakbeen gedurende het beenvormingsproces.

## Discussie

### Maar...

- De definitie van de elektrische karakteristieken van de velden blijft empirisch omdat de elektrische parameters die specifiek op de cellulaire mechanismen inwerken onbekend zijn
- De metabole processen die betrokken zijn bij ontvangst, transcriptie en de respons op elektromagnetische velden zijn niet geïdentificeerd

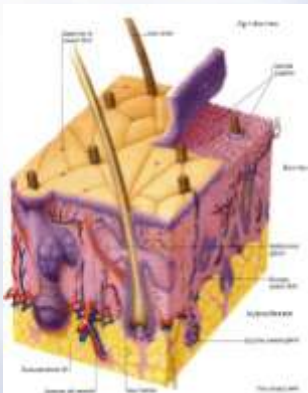


## Evolutie

Wij hebben gepoogd het biologisch model en het elektrische milieu te vereenvoudigen:

- Keratinocyten in groei
- Gepulseerd elektrisch veld (lage frequentie)

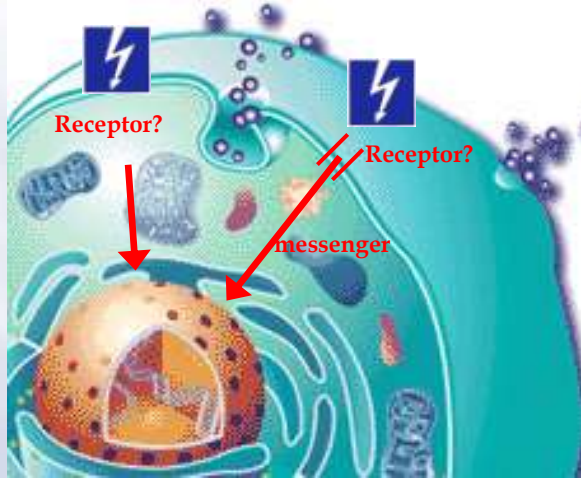
## Experimenteel model



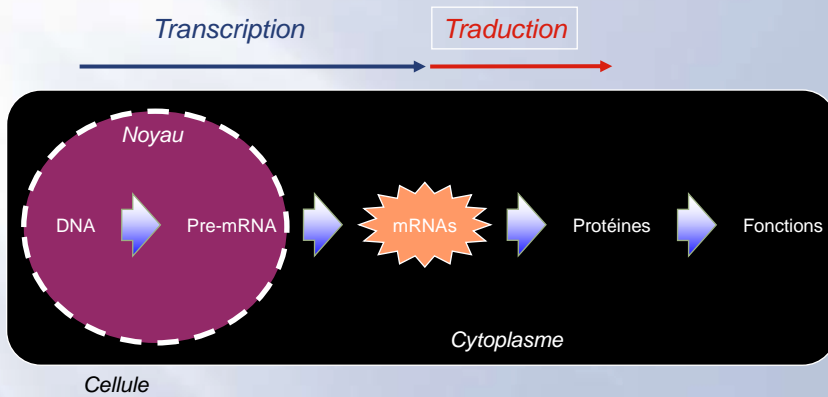




## Microarray



## Microarray

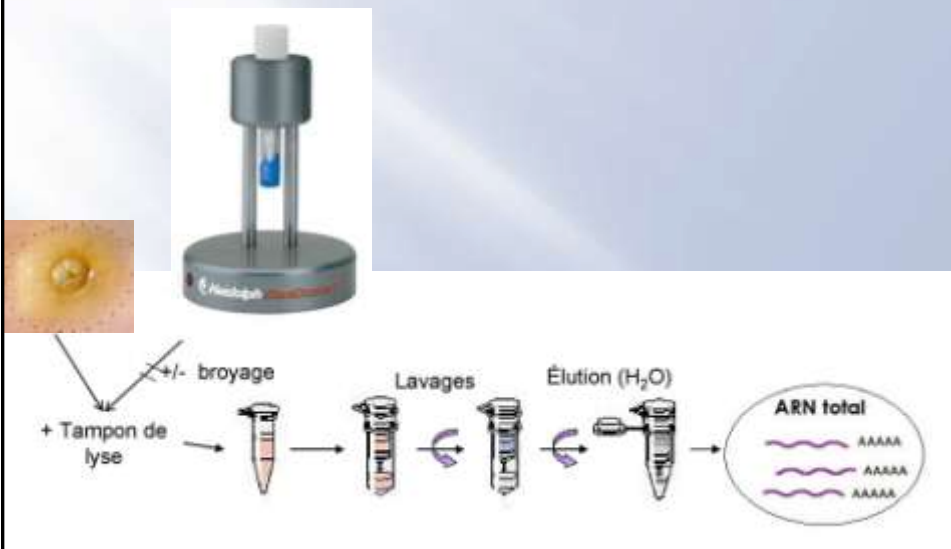


## Microarray

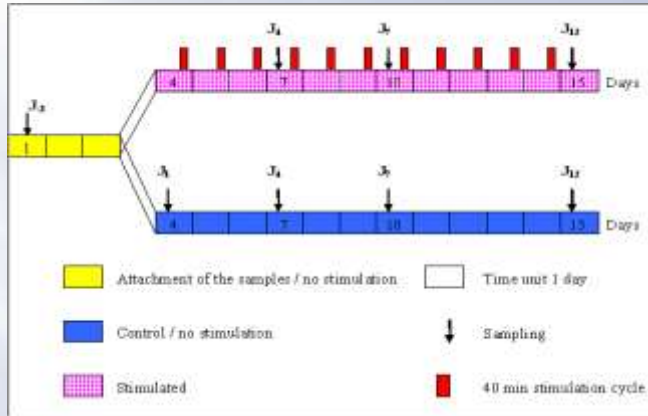
- Affymetrix U133 Plus 2.0 chips
- Analyse van de transcriptionele expressie van 38,500 genen



## Microarray



## Experimenteel model



8 staalnames X 3 patienten = 24 stalen mRNA

## Experimenteel model



8 staalnames X 3 patienten = 24 stalen mRNA

## Resultaten Microarrays

Aantal uitgedrukte genen (+ of -)

Vergelijking	Gestimuleerd Controle		
	$\frac{J4_s}{J4_t}$	$\frac{J7_s}{J7_t}$	$\frac{J12_s}{J12_t}$
Verhoogde expressie	39	30	237
Verminderde expressie	265	190	259

$P < 0,05$  et  $FC > 2$

## Resultaten Microarrays

Aantal uitgedrukte genen (+ of -)

Vergelijking	Gestimuleerd Controle		
	$\frac{J4_s}{J4_t}$	$\frac{J7_s}{J7_t}$	$\frac{J12_s}{J12_t}$
↑ Expressie	39	30	237
↓ Expressie	265	190	259

3 gemeenschappelijke genen J4S/J4T, J7S/J7T, J12S/J12T

$P < 0,05$  en  $FC > 2$

## Resultaten Microarrays

**TXNRD1** : Thioredoxin reductase 1

FC : J4=2,02 J7=3,22 J12=2,34

verminderde proliferatie bij het embryo

**ATF3** : Activating transcription factor 3

FC : J4=2,49 J7=13,41 J12=9,28

Verhoogde concentratie bij differentiatie van chondrocyten

**MME** : Membrane metallo-endopeptidase

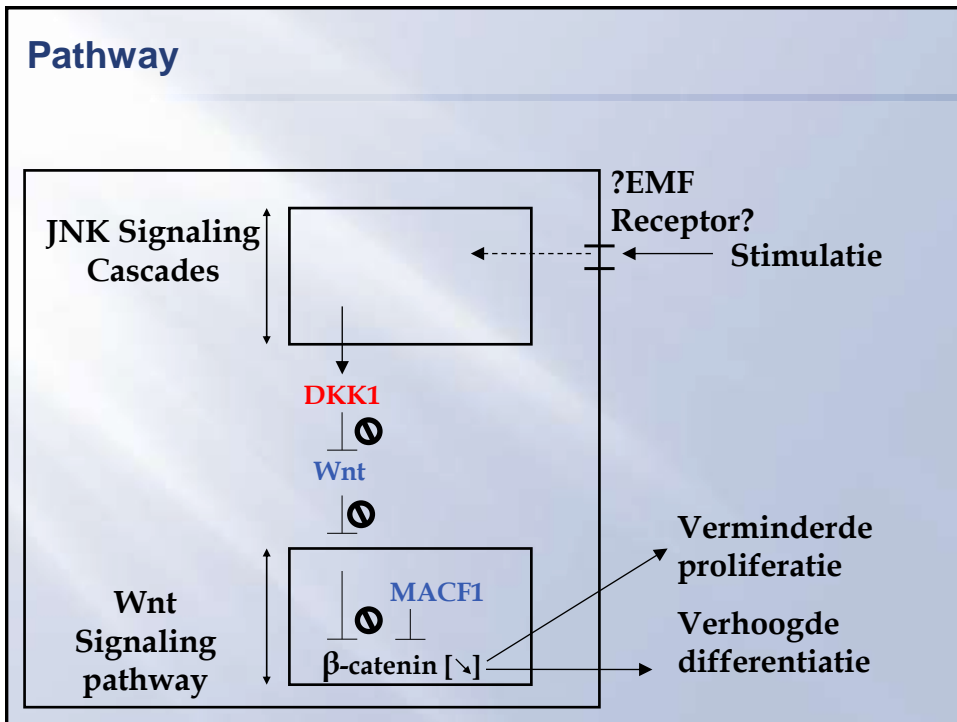
FC : J4=3,02 J7=5,53 J12=20,28

Blokkeert de mitose in het G1 stadium van de celcyclus, vermindert de proliferatie

## Resultaten Microarrays

- Celdifferentiatie
- Celproliferatie
- Regulatie celdeling
- Bescherming t.o.v. stress





## Interessante waarnemingen

### Parallel tussen

Onze microarray resultaten  
en  
de mechanismen van acute lymfoblastische (ALL) die in de  
literatuur zijn beschreven:

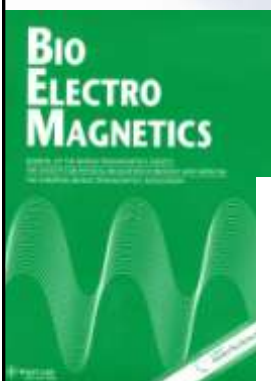
Inversie in de regulatie van sommige interessante genen

## Interessante waarnemingen

“...inhibition of  $\beta$ -catenin induces apoptosis of ALL establishes this pathway (Editor's note: WNT pathway) as an attractive target for the use of more specific therapies...”

Roman-Gomez et al., Blood. 2007 Apr 15;109(8):3462-9

## Publicatie



Bioelectromagnetics 32:28–36 (2011)

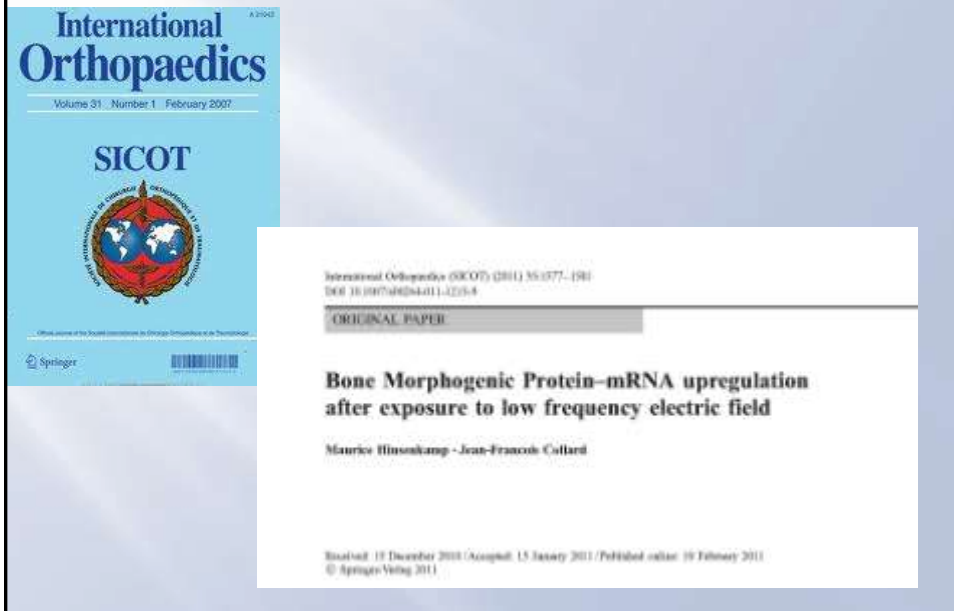
### In Vitro Study of the Effects of ELF Electric Fields on Gene Expression in Human Epidermal Cells

Jean-Francois Collard, Benjamin Mertens, and Maurice Hinsenkamp\*

Laboratoire de Recherche en Géthérapie Traumatologie (L.RGT)  
Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium

Acceleration of differentiation, in the absence of proliferation, is observed after exposure of various biological models to low frequency and low amplitude electric and electromagnetic fields. Following these results showing significant modifications, we try to identify the biological mechanisms involved at the cell level through transcriptome screening. For this study, we use epidermal cultures harvested from human skin biopsies. Two platinum electrodes are used to apply the electric signal. The gene expression of 35,510 well characterized human genes are analyzed using Affimetrix<sup>®</sup> microarray (VX3 Max 210 chips). The protocol is repeated on three different patients. After three periods of exposure, a total of 24 chips have been processed. After the application of ELF electric fields, the microarray analysis confirms a modification of the gene expression of epidermal cells. Particularly, four up-regulated genes (ORC1L, TNFSF10, ATR1, and SMO1) and one down-regulated gene (GNAQ1) are involved in the regulation of proliferation and differentiation. Expression of these five genes was also confirmed by real-time qPCR in all samples used for microarray analysis. These results corroborate an acceleration of cell differentiation at the expense of cell proliferation. Bioelectromagnetics 32:28–36, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

## Publicatie: BMP-2



## Publicatie: BMP-2

De menselijke epidermale cellen tonen een aanzienlijke overregulering van BMP-2 mRNA na 12 dagen stimulatie (40 min/dag) door een elektrische stroom van lage frequentie en lage intensiteit.

$$(FC J12_s/J12_t = 2.82, p\text{-value}=0.038)$$

## Publicatie: triangulatie

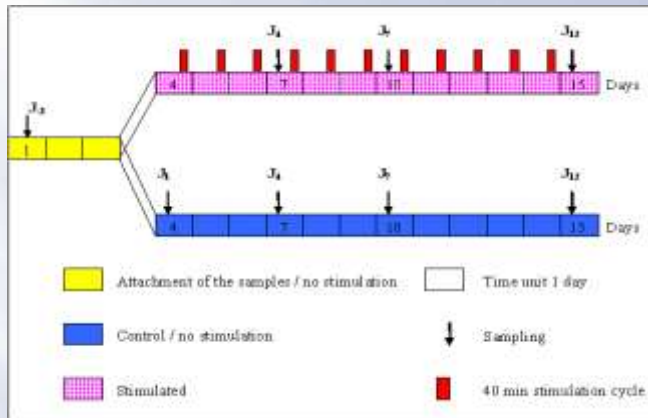


The image shows the cover of the journal 'Progress in Biophysics & Molecular Biology' on the left and a screenshot of an article in press page on the right. The journal cover is blue and green, with the title in white and yellow. The article in press page is white with a blue header and footer. The article title is 'Statistical validation of the acceleration of the differentiation at the expense of the proliferation in human epidermal cells exposed to extremely low frequency electric fields'. The authors are J.-F. Collart<sup>1</sup>, C. Lazar<sup>2</sup>, A. Nivo<sup>3</sup>, and M. Hinsenkamp<sup>1\*</sup>. The journal's website is www.tandfonline.com/doi/10.1080/10409179.2013.791111.

## Publicatie triangulatie : Doel van de publicatie

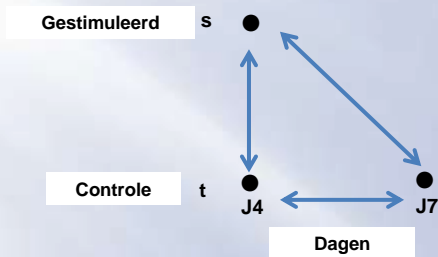
- Validatie van de resultaten door een 2e statistische methode.
- Bevestiging van de hypothese dat de ELF stimulatie de over- of onderregulatie van bepaalde genen versnelt. Deze wijzigingen komen ook, maar vertraagd voor in de controles.

## Triangulatie : Hypothese



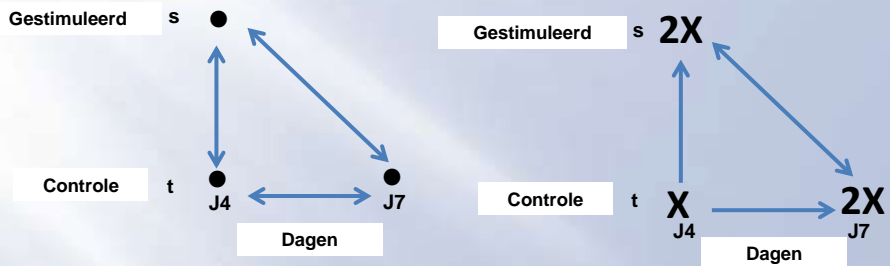
Staalnames na verloop van tijd laten toe de natuurlijke evolutie in controles te vergelijken met de effecten van de stimulus

## Triangulatie : Hypothese



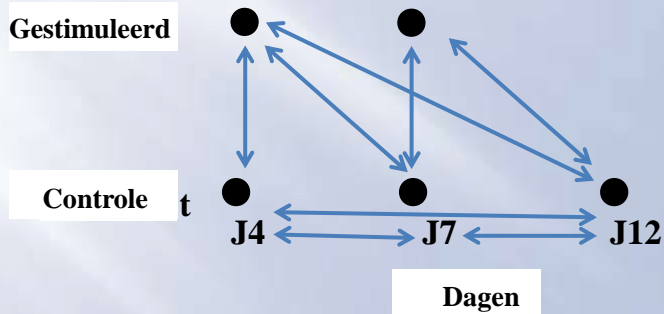
Heeft de ELF-stimulatie hetzelfde effect op de cel als de tijd bij natuurlijke evolutie van een niet gestimuleerde cel?

## Triangulation : Hypothese



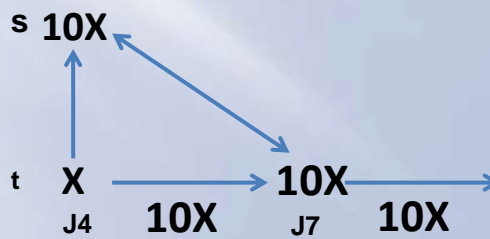
Heeft de ELF-stimulatie hetzelfde effect op de cel als de tijd bij natuurlijke evolutie van een niet gestimuleerde cel?

## Triangulatie : Hypothese



## Triangulatie : Resultaten

- Triangle  $J4_s$ - $J4_t$ - $J7_t$ 
  - Er zijn 319 genen die voldoen aan de 3 voorwaarden voor de p-waarde in de driehoek  $J4_s$ - $J4_t$ - $J7_t$



## Triangulatie : Resultaten

### DKK1

- Inhibeert de signalisatiepathway Wnt
- Deze inhibitie is noodzakelijk voor de inductie van de cellulaire differentiatie en de inhibitie van de celproliferatie

## Triangulatie : Resultaten

### SPRR3

- De expressie is geassocieerd met de normale epidermale differentiatie van de huid.

## Triangulatie : Resultaten

### NDRG4

- Er is overexpressie van dit proteïne gedurende celdifferentiatie en onderexpressie in verschillende tumorale celtypes.



## Triangulatie : Resultaten

### CHEK1

- CHEK1 heeft een essentiële rol maar die is niet goed gedefinieerd in geval van proliferatie van normale cellen.

## Triangulatie : Resultaten

### UBE2D3

- Heeft een rol in de signalisatie van BMP

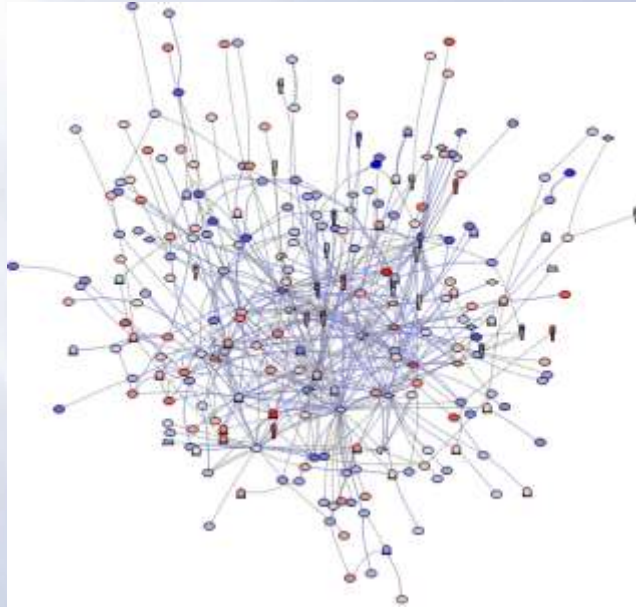
De rol hiervan in de osteogenese en de consolidatie van fractures is goed gekend.

## Triangulatie : Besluiten

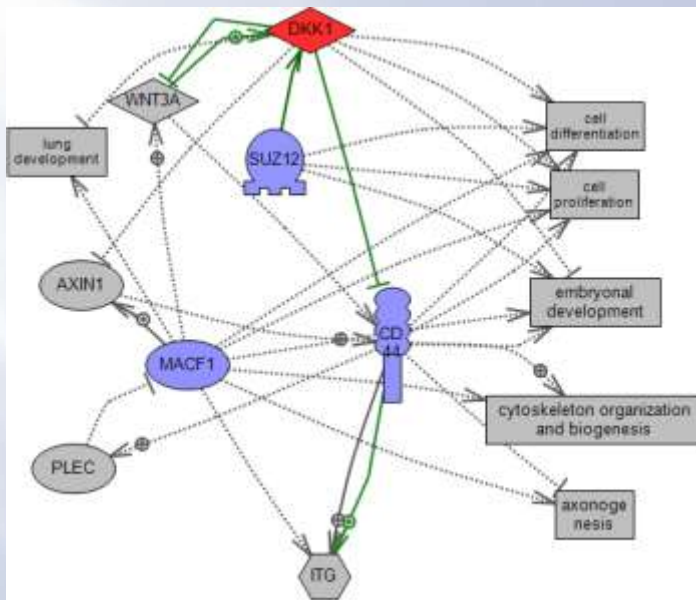
- Nieuwe validatie door een tweede statistische methode van de microarrays toont significante over- of onderexpressie van een aantal genen.
- De ELF stimulatie versnelt de over- of onder-regulatie van bepaalde genen die, onder normale omstandigheden, hetzelfde, maar dus vertraagde regulatiepatroon zouden hebben gevolgd (over - of onderregulatie).

**Pathway Studio**

## Pathway Studio



## Pathway Studio



## Besluiten

- De resultaten tonen:
  - Coherentie met vroegere *in vitro* en *in vivo studies*
  - Een versnelling van de celdifferentiatie ten nadele van de proliferatie
  - Een wijziging van de genexpressie
  - Het voorkomen van een reeks genen die een rol spelen in de versnelling van normale mechanismen (proliferatie en differentiatie, ....)
  - Een selectie van genen zou kunnen gebruikt worden als merkers voor gevoeligheid van een weefsel t.o.v. een EM-veld