

## Hoe botten naadloos herstellen

Het gebruik van computermodellen is niet weg te denken uit traditionele ingenieurssectoren zoals de auto-industrie, lucht- en ruimtevaart. Computersimulaties vonden ook hun weg naar de medische sector. Zo komen ze van pas bij het ontwerp van prothesen.

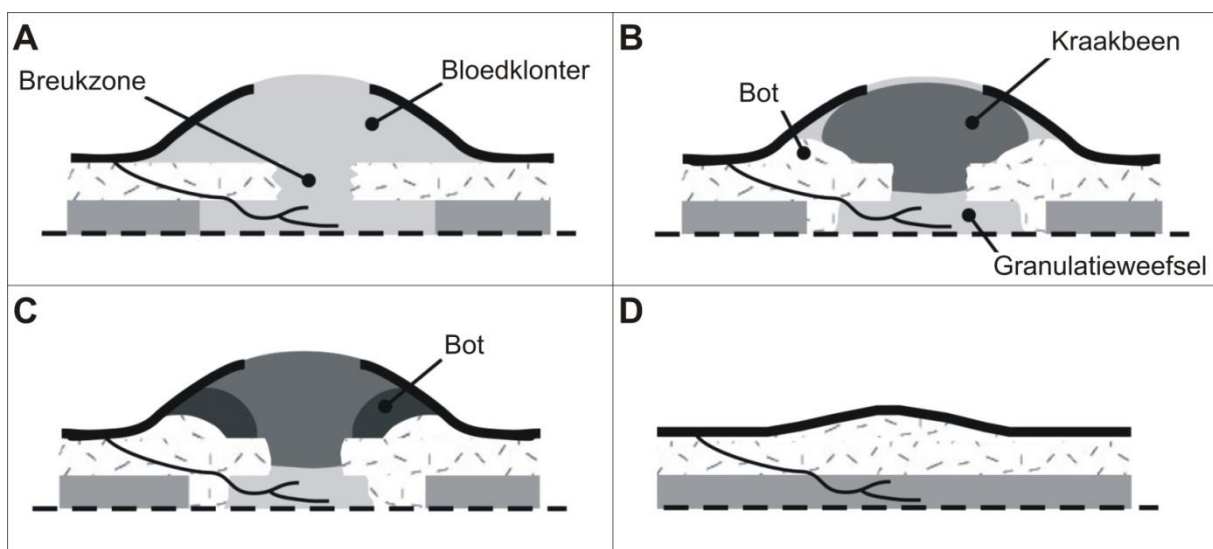
Maar heeft u al stilgestaan bij de meerwaarde die modelvorming kan betekenen bij de behandeling van traag genezende botbreuken? Dit artikel bespreekt een wiskundig model van botbreukheling dat werd uitgewerkt in het kader van een masterproef aan de K.U.Leuven.



Véronique Peiffer

Een ongeluk is snel gebeurd. Het genezingsproces dat je nadien moet ondergaan, duurt helaas heel wat langer, zeker als je bij het ongeval een botbreuk opliep. Nochtans mogen we wat breukheling betreft in zekere zin van geluk spreken. Botten kunnen herstellen zonder litteken na te laten. Hiervoor moeten verschillende celsoorten in de breuk gecoördineerd reageren op mechanische en chemische prikkels. Als er wat misloopt bij de communicatie, evolueert de heling echter trager of stopt ze zelfs volledig. Dat gebeurt bij bijna 10% van alle botbreuken [1].

Traditionele behandelingsmethoden van vertraagde heling trachten de mechanische omstandigheden van de breuk te verbeteren (zie kader *Hoe vertraagde heling aanpakken?*). Nieuwe technieken richten zich eerder op het biologische aspect van het proces door bepaalde chemische stoffen of cellen toe te dienen. Voorwaarde is wel dat de invloed van die factoren op de heling goed kan worden ingeschat. En daar knelt het schoentje. Hoewel de grote lijnen van het helingsproces gekend zijn, blijft het een raadsel waarom sommige breuken niet genezen. Dat is dan ook het



Figuur 1: Botbreukheling verloopt in vier fasen [2].

### Hoe vertraagde heling aanpakken?

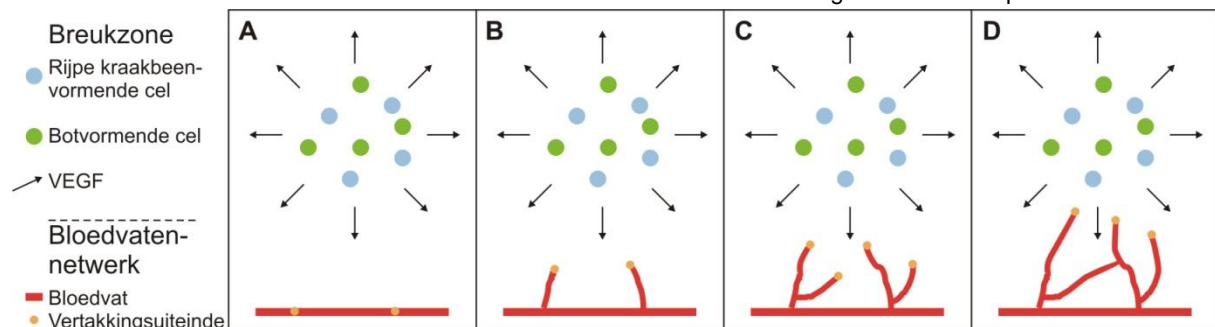
Wanneer een breuk te traag geneest, plaatst de orthopedist meestal een plaat of schroeven om de mechanische omstandigheden van de breuk te verbeteren. Een grotere holte wordt opgevuld met een stukje botweefsel uit bijvoorbeeld het bekken van de patiënt. Deze behandelingen gebeuren operatief en dat houdt steeds een risico in. Niet alleen is er gevaar voor infecties, het bot en de omliggende weefsels kunnen tijdens de ingreep bijkomende schade oplopen. Osteoporotische patiënten zijn met geen van beide technieken gebaat. Doordat hun botten erg bros zijn, is het onmogelijk het fixatiemechanisme correct te plaatsen. Daarenboven is het bot van te slechte kwaliteit om als botgreffe te fungeren.

Deze complicaties drijven de zoektocht naar nieuwe strategieën. De gedachte de patiënt te kunnen helpen met een eenvoudige prik spreekt aan. Door regulerende stoffen (groeifactoren) toe te dienen of gebruik te maken van stamceltechnologie tracht men de biologie van het proces bij te sturen.

onderwerp van heel wat onderzoek. Zogenaamde *in vivo* studies analyseren breukheling in proefdieren. Andere onderzoeksgroepen bestuderen het gedrag van de relevante cellen en weefsels *in vitro*. Jammer genoeg zijn experimenten tijdsintensief en duur. Daarom is een nieuwe, *in silico* benaderingswijze aantrekkelijk. De idee is dat computersimulaties kunnen helpen bij het ontrafelen van het breukhelingsproces door verschillende hypothesen te modelleren en te toetsen aan de werkelijkheid. Met een goed wiskundig model van het proces zou het bovendien mogelijk zijn nieuwe behandelingsstrategieën te ontwerpen en te evalueren alvorens ze daadwerkelijk toe te passen. Kortom, een gedetailleerd model van botbreukheling kan de orthopedische patiënt alleen maar ten goede komen.

### De biologie van breukheling

Bij de ontwikkeling van een computermodel is de



Figuur 2: Tijdens angiogenese vertakken bloedvaten onder invloed van VEGF.

eerste betrachting het proces, voor zover dat gekend is, in wiskundige vorm te gieten. Onderzoekers delen breukheling op in vier fasen (zie figuur 1) [2]. Wanneer een bot breekt, scheuren heel wat bloedvaatjes. Daardoor ontstaat een bloedklonter en neemt de aanvoer van zuiver bloed af. Veel cellen in de breukzone overleven dit niet en het weefsel ontsteekt (A). Het ontstekingsregime veroorzaakt een invasie van nieuwe cellen, waaronder bindweefselvormende cellen. Geleidelijk vormt er zich een zacht *granulatiweefsel*, precies zoals de rode hobbelige korst die op een genezende huidwonde verschijnt. Cellen in en rondom dit weefsel produceren *groeifactoren*, eiwitten die de activiteit van bepaalde cellen beïnvloeden. Zo stimuleren ze *mesenchymale stamcellen* zich te specialiseren tot kraakbeen- of botvormende cellen. Omdat bot niet kan overleven bij lage zuurstofconcentraties, ontstaat in het midden van de breukzone eerst kraakbeen. Elders vormt er zich dadelijk botweefsel (B). Om de heling te voltooien moet de concentratie aan zuurstof en voedingsstoffen overal op peil worden gebracht. De sleutel daartoe is de vorming van een bloedvaten-netwerk. Hierbij komen weerom groeifactoren kijken. Cellen in zuurstofnood produceren namelijk *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Dit VEGF trekt bloedvatcellen aan, zodat er nieuwe bloedvaten beginnen te groeien in de breuk. Zodra er voldoende aanvoer van zuurstof en voedingsstoffen is, schakelen rijpe kraakbeenvormende cellen zich om tot botvormende cellen en verbeent de verbinding volledig (C). De structuur van het nieuwe bot is, in tegenstelling tot die van het originele bot, erg wanordelijk. De laatste fase van het helingsproces bestaat er daarom in de orde te herstellen (D). Op die manier krijgt het bot zijn oorspronkelijke vorm terug zonder dat er een litteken overblijft. Het volledige proces kan wel enkele maanden tot zelfs jaren in beslag nemen.

### Opbouw van een wiskundig kader

Bij breukheling blijken verscheidene soorten cellen, weefsels en groeifactoren betrokken te zijn. Ook de concentratie aan zuurstof en voedingsstoffen is belangrijk. Een model van botbreukheling beschrijft hoe de verdeling van deze componenten evolueert.

### Modelvergelijkingen

Bij de ontwikkeling van een computermodel komt uiteraard wat wiskunde kijken. Het breukhelingsmodel bevat onder andere elf vergelijkingen die de verandering in concentratie van verscheidene variabelen beschrijven. Deze vergelijkingen hebben alle dezelfde vorm:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \underbrace{D\Delta c}_{\text{diffusie}} - \underbrace{\nabla \cdot (c\nabla m)}_{\text{taxis}} + \underbrace{g}_{\text{reacties}}$$

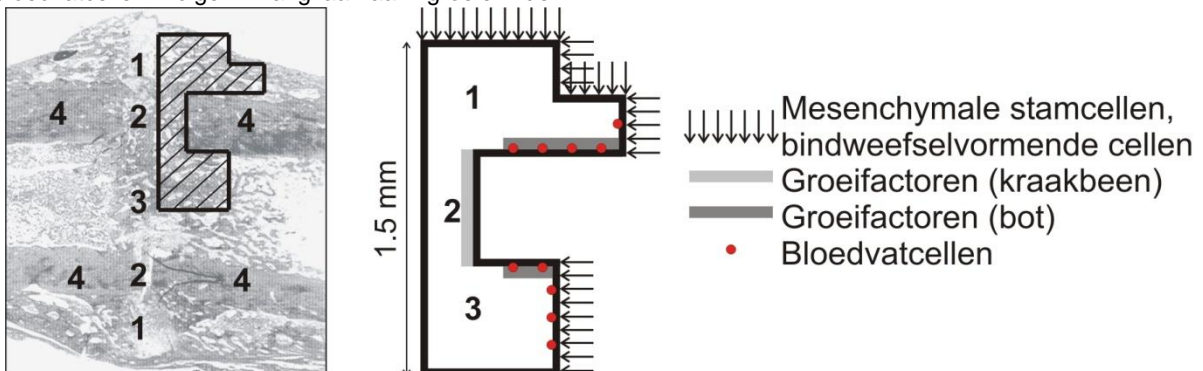
Neem hierbij aan dat  $c$  de concentratie van een bepaald celtype voorstelt. Het zou evengoed om een concentratie aan groeifactoren, weefsel of zuurstof en voedingsstoffen kunnen gaan. De vergelijking stelt dat er drie mogelijke oorzaken zijn voor een wijziging in concentratie. De eerste is diffusie. Er bewegen immers meer cellen van sterk geconcentreerde naar weinig geconcentreerde regio's dan omgekeerd. De tweede term drukt uit dat de celconcentratie  $c$  kan veranderen onder invloed van een gradiënt in een groeifactor- of weefselconcentratie ( $\nabla m$ ). Bij *chemotaxis* worden cellen aangetrokken door groeifactoren, terwijl bij *haptotaxis* de weefseldensiteit de drijvende kracht is. Ten slotte wijzigt de celconcentratie wanneer cellen ontstaan of afsterven. De term  $g$  vat deze reacties bondig samen.

Meestal worden de wijzigingen in termen van concentraties uitgedrukt. Voor elke variabele bevat het wiskundig model dus een vergelijking die de tijdsevolutie van de bijhorende concentratie beschrijft (zie kader *Modelvergelijkingen*). Enkel de verdeling van bloedvatcellen is niet realistisch voor te stellen aan de hand van deze theorie. De reden hiervoor is dat bloedvatcellen zich niet zomaar over de hele breukzone verspreiden. Ze organiseren zich veeleer in een netwerkstructuur. Dat kan in simulaties slechts tot uiting komen indien de ontwikkeling van het bloedvatennetwerk in de wiskundige formulering meer in detail is uitgewerkt. Figuur 2 geeft het verloop van dit zogenaamde *angiogeneseproses* schematisch weer. Kraakbeen- en botvormende cellen in de breuk ondervinden een tekort aan zuurstof. Als reactie hierop scheiden ze VEGF af (A). Deze groeifactor zet sommige cellen in de wanden van bloedvaten ertoe aan een vertakking te vormen (B). In hun beweging laten deze cellen zich leiden door *chemo-* en *haptotaxis* (zie kader *Modelvergelijkingen* voor de betekenis van deze termen). Ook de vezelige structuur van het omliggende weefsel beïnvloedt het pad dat de bloedvatcellen volgen. Langzaam groeien de

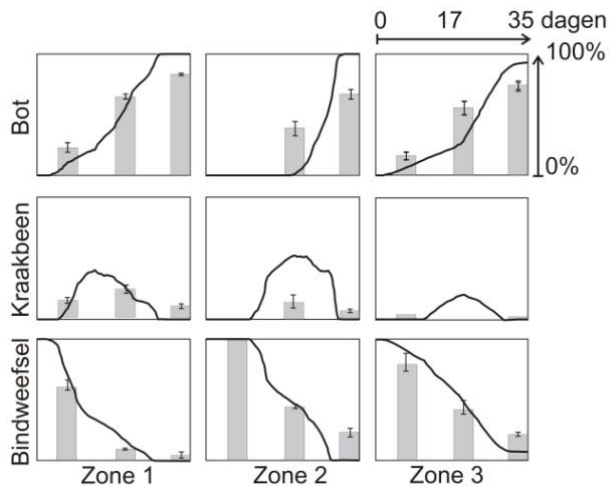
vertakkingen de breukzone binnen. In de nieuwe bloedvaten zullen na een tijd weer cellen die veel VEGF waarnemen, beslissen op te splitsen (C). Dit proces gaat verder tot er zich een volwaardig netwerk heeft gevormd (D). Wiskundig kan dit verloop worden beschreven door de beweging van de uiteindes van alle vertakkingen op te volgen.

### Modelleren van normale breukheling

Figuur 3 toont hoe een botbreuk er in doorsnede kan uitzien en illustreert het berekeningsdomein dat hiervan werd afgeleid. Omdat de breuk bij benadering 'mooi' recht is, buit het computerprogramma symmetrie-eigenschappen uit. Het volstaat daardoor slechts een vierde van de doorsnede in de berekeningen op te nemen. Vanuit het beenmerg en de zachte weefsels rondom de breuk dringen mesenchymale stamcellen en bindweefselvormende cellen de breukzone binnen. Groeifactoren komen vrij in de omgeving van de gebroken bothelften. In deze studie werd de heling gesimuleerd vanaf de *reparatieve fase* (figuur 1B). De breuk is op dat ogenblik gevuld met fibreus weefsel en het bloedvatennetwerk is beschadigd.



Figuur 3: Het berekeningsdomein van het wiskundig model is afgeleid van een experimenteel waargenomen breukgeometrie [4].



**Figuur 4: Het voorspelde breukhelingsverloop (volle lijn) komt goed overeen met experimentele waarnemingen (staafdiagram, [4]). (Zones 1-3 zoals in figuur 3.)**

Enkel aan de randen van het domein blijven enkele bloedvatcellen over.

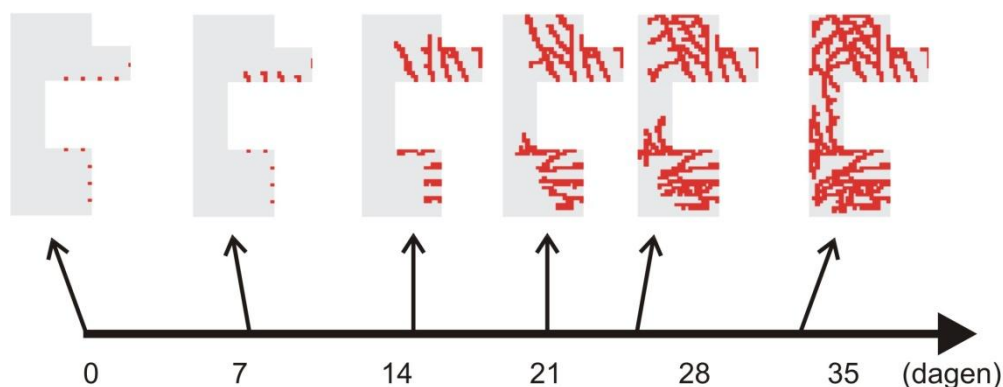
Elf differentiaalvergelijkingen die concentratiewijzigingen beschrijven en één differentiaalvergelijking per dimensie en per bloedvatvertakking, dat is de complexe balans van het breukhelingsmodel. Om dit stelsel uit te werken is er duidelijk meer nodig dan pen en papier. Het softwarepakket Matlab (The MathWorks, Inc.) is een prima bondgenoot. Ook verderbouwen op bestaande code kan onderzoek alleen maar ten goede komen. Het programma dat voor deze studie werd ontwikkeld, maakt gebruik van het werk van prof.dr.ir. L. Geris (K.U.Leuven) [3]. Dat model bouwt dan weer voort op een eindige volume-code die speciaal is ontworpen voor biologische problemen (dr. A. Gerisch, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg). De methode ziet erop toe dat concentraties nooit negatief worden en de totale hoeveelheden van alle variabelen behouden blijven. Het probleem is opgelost op een  $25 \times 25 \mu\text{m}$  rooster. Hoewel het model een aantal ideeën uit andere studies overneemt, is de wiskundige beschrijving

van angiogenese volledig nieuw.

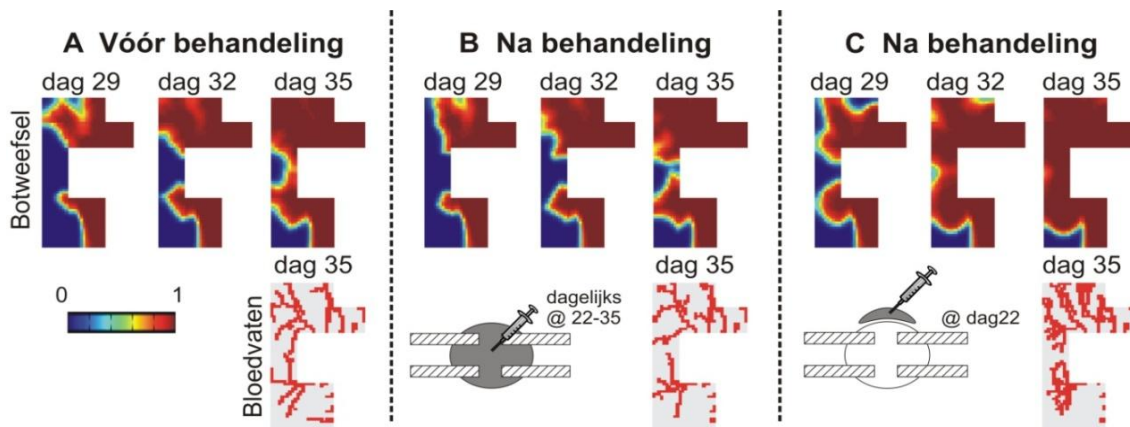
De kracht van een goed breukhelingsmodel bestaat erin dat het, mits het aanpassen van enkele parameterwaarden, zowel normale als verstoorde heling kan simuleren. Laten we eerst een normaal helingsgeval onder de loep nemen. Om met experimentele gegevens te kunnen vergelijken zijn de parameters afgesteld op het helingsverloop van een dijbeen in een rat. De continue curve in figuur 4 toont de evolutie van de weefselsamenstelling. Het fibreuze weefsel dat de breukzone oorspronkelijk vult, maakt geleidelijk plaats voor bot. Deels verloopt deze overgang via een kraakbenige tussenstap. Figuur 5 laat zien hoe bloedvaten de breukzone binnenvoeren. Er ontstaat een netwerk dat de volledige breuk van zuurstof en voedingsstoffen kan voorzien.

De enige maatstaf voor een wiskundig model is zijn waarheidsgetrouwheid. Figuur 4 toetst de resultaten van de simulatie daarom aan experimentele waarnemingen [4]. De globale evolutie is zeer gelijklopend. Het gesimuleerde verbeningsproces verloopt wel wat vlugger dan in werkelijkheid. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het model geen rekening houdt met de tijd die elke cel nodig heeft om te rijpen. Een ander opvallend verschil is dat de voorspelde hoeveelheid kraakbeen groter is dan in werkelijkheid. De reden hiervoor kan zijn dat de koppeling tussen de aanwezigheid van zuurstof en voedingsstoffen en de opbouw van kraakbeen (nog) niet volledig is uitgewerkt in het model. De resultaten stemmen in grote lijnen overeen met voorspellingen van weefseldensiteiten in eerder uitgevoerde studies [3]. De mogelijkheid om terzelfdertijd angiogenese in kaart te brengen maakt dit model echter uniek. De gesimuleerde ontwikkeling lijkt alvast realistisch tijdens de eerste twee weken van het proces [5]. Het is nog wachten op bijkomende experimentele data voor validatie bij latere tijdstippen.

Om aan te tonen dat het probleem correct is



**Figuur 5: Dit breukhelingsmodel heeft als troef dat het ook bloedvatvorming simuleert. (Geometrie zoals in figuur 3. Resultaten weergegeven voor dagen 0, 7, 15, 21, 25 en 32.)**



**Figuur 6: Het model kan verstoorde helingsgevallen simuleren en behandelingsstrategieën uittesten. (Geometrie zoals in figuur 3.)**

opgelost moet het model nog enkele testen doorstaan. Een convergentie-analyse geeft aan dat de numerieke methode stabiel is. De oplossing blijkt wel afhankelijk van het gekozen rooster. De reden hiervoor is echter dat een verandering in rooster-grootte ook de bloedvatdiameter doet wijzigen. Door de getalwaarden van enkele modelparameters te wijzigen en de invloed op de resultaten te bestuderen komen we meer te weten over het gedrag van het model. Zo geven simulaties aan dat variaties in de vezelstructuur van het weefsel de algemene conclusies over angiogenese niet beïnvloeden. Bovendien suggereren andere simulaties dat een fractuur zelfs kan herstellen indien de bloedtoevoer bij aanvang van de heling zeer beperkt is.

### Wat als het misloopt?

Wanneer er wat foutloopt tijdens het hierboven uiteengezette proces, geneest de botbreuk te traag of zelfs helemaal niet. De precieze oorzaak is vaak onbekend. Een van de veronderstelde mechanismen speelt in op het niveau van bloedvatvorming. Door een tekort aan het enzym *matrix-metalloproteinase* (MMP9) verliest VEGF haar vermogen om angiogenese te stimuleren [6]. In het model is dit te interpreteren als een daling van de VEGF-productie. Figuur 6A illustreert de voorspelde helingsrespons voor zo'n MMP9-arme breuk. De ontwikkeling van het bloedvatennetwerk is duidelijk verstoord. Omdat de vorming van bot deze tendens volgt, evolueert de heling te traag.

Patiënten met dit soort helingsgedrag hebben behandeling nodig. Om na te gaan in welke mate het wiskundig model kan bijdragen bij het ontwerp van dergelijke therapieën, werden twee mogelijkheden virtueel uitgetest. De eerste strategie omvatte dagelijkse VEGF-injecties (B). Bij de tweede behandeling werd eenmalig een drager ingespoten voor een geleidelijke vrijgave van VEGF (C). Door figuren 6B en 6C met elkaar te vergelijken komen we tot de conclusie dat de laatste methode het

beste resultaat oplevert. Dit besluit dient wel te worden genuanceerd. Ten eerste beschouwt het voorbeeld een breuk in een rattenbot. De tijdschaal is bijgevolg niet relevant voor menselijke breuken. Bovendien is het voorspelde effect van het eerste behandelingstype kleiner dan wat de experimentele literatuur aangeeft [6]. Beschouw dit in silico experiment dus eerder als een smaakmaker die aangeeft waartoe een verder uitgewerkt model in staat kan zijn.

### Besluit

Het menselijk lichaam is een complex mechanisme. Ook de processen die zich erin afspelen, zitten ingenieus in elkaar. Botbreukheling vormt hierop geen uitzondering. Het in dit artikel voorgestelde wiskundig kader maakt de analyse van het helingsproces en het ontwerp van behandelingsprotocollen mogelijk.

En mocht u ooit geholpen worden dankzij deze techniek, dan weet u alvast welke berekeningen erachter zitten.

### Referenties

- Röntgenfoto: O. Ghekiere, Department of Radiology, Cliniques CHC St-Joseph Liège.
- [1] A. Praemer, S. Furner, D.P. Rice. Musculoskeletal conditions in the United States. Am. Acad. Orth. Surgeons, Park Ridge, 2<sup>de</sup> uitgave, 1999.
  - [2] A. Bailón-Plaza en M.C.H. Van der Meulen. A mathematical framework to study the effects of growth factor influences on fracture healing. J. Theor. Biol., 212:191-209, 2001.
  - [3] L. Geris, A. Gerisch, J. Vander Sloten, R. Weiner, H. Van Oosterwyck. Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. J. Theor. Biol., 25:137-158, 2008.
  - [4] L.J. Harrison, F.L. Cunningham, L. Srörberg, A.E. Goodship. Controlled induction of a pseudarthrosis: A study using a rodent model. J. Orthop. Trauma., 17:11-21, 2003.
  - [5] C.L. Duvall, W.R. Taylor, D. Weiss, A.M. Wojtowicz, R.E. Guldberg. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. J. Bone Miner. Res.,

22(2):286-297, 2007.

[6] C. Colnot, Z. Thompson, T. Miclau, Z. Werb, J.A. Helms. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*, 130:4123-4133, 2003.

#### **Dankwoord**

Dit artikel is gebaseerd op de masterproef "Hybride modellering van angiogenese tijdens botbreukheling", gepromoot door prof.dr.ir. Dirk Vandepitte en prof.dr.ir.

Hans Van Oosterwyck. De auteur wenst ook prof. dr.ir. Liesbet Geris te bedanken voor de goede begeleiding.

#### **De auteur**

Véronique PEIFFER studeerde in 2009 af aan de K.U.Leuven als burgerlijk werktuigkundig ingenieur. In oktober 2009 startte ze een doctoraat aan Imperial College London. Gesteund door de British Heart Foundation werkt ze er mee aan multidisciplinair onderzoek naar het ontstaan van atherosclerose.

*E-mail: v.peiffer09@imperial.ac.uk*