

ALGEMENE SAMENVATTING

HUMANE VETSTAMCELLEN VOOR BOTREGENERATIE
IN EEN SINUSBODEMELEVATIE MODEL:
STUDIES VOOR KLINISCHE TOEPASSING

ALGEMENE SAMENVATTING

Met de wereldwijde vergrijzing nemen ook de prevalentie van kaakatrofie en de daarmee geassocieerde behandelingen toe. Na verlies van eigen tanden en/of kiezen treedt doorgaans atrofie van de kaak op. In het kader van de prothetische vervanging van gebitselementen kunnen tandwortelimplantaten worden geplaatst, op voorwaarde dat het kaakbotvolume voldoende is. Indien dit laatste niet het geval is, kan onder meer in de zijdelingse delen van de bovenkaak het bot worden opgehoogd met een specifieke chirurgische procedure, namelijk de sinusbodemelevatie (SBE).

Tot op heden wordt het gebruik van autoloog bot beschouwd als de gouden standaard tijdens botaugmentatieprocedures in het algemeen en de SBE in het bijzonder. Het autologe bottransplantaat bevat onder andere osteoblasten en osteogene voorlopercellen, en voorziet in osteoinductieve en osteoconductive eigenschappen die noodzakelijk zijn voor de migratie en differentiatie van voorlopercellen. Het oogsten van autoloog bot uit de crista iliaca anterior of de mandibula heeft verschillende nadelen, zoals de met deze ingrepen gepaard gaande morbiditeit en de beperkte hoeveelheid beschikbaar bot. Daarom zijn er alternatieve materialen ontwikkeld en geëvalueerd, resulterend in de introductie en het gebruik van botsubstitutie materialen zoals allografts, xenografts, en zuiver synthetische materialen, die veelvuldig worden gebruikt tijdens tandheelkundige en kaakchirurgische ingrepen.

Synthetische botsubstituten zoals β -tricalciumfosfaat (β -TCP, bijv. Ceros®), hydroxyapatiet (HA), en bi-fasisch calciumfosfaat (BCP, een combinatie van HA/ β -TCP, bijv. Straumann BoneCeramic®) zijn interessante alternatieven om te gebruiken tijdens een SBE vanwege de ongelimiteerde beschikbaarheid en houdbaarheid, hetgeen ze zeer geschikt maakt als 'off-the-shelf' producten. Het gebruik van synthetische botsubstituten maakt de noodzaak tot additionele operaties en de daarmee geassocieerde mogelijke complicaties overbodig.

Groefactoren en/of osteoblast voorlopercellen zijn nodig voor het osteoinductieve karakter van het 'tissue-engineering' construct. Een specifieke groeifactor is 'bone morphogenetic protein' (BMP-2), een sterk osteoinductief molecuul, waarvan is bewezen dat het de osteogene differentiatie stimuleert van ongedifferentieerde cellen. Een *in vitro* studie waarin vetstamcellen van de geit werden toegepast liet zien dat de toepassing van BMP-2 in een fysiologische concentratie (nanogram-range), en gedurende een korte periode, zeer geschikt was voor 'tissue-engineering' doeleinden.

In dit proefschrift werd gebruik gemaakt van voorlopercellen die werden geïsoleerd uit humaan vetweefsel. Dit weefsel is een eenvoudig toegankelijke en ongelimiteerde bron van de benodigde hoeveelheid mesenchymale cellen. Dit laatste maakt een innovatieve 'one-step'-regeneratie strategie mogelijk. Dit nieuwe concept ondervangt de huidige problemen met celtherapieën zoals noodzakelijke celkweken, hoge kosten en meerdere chirurgische ingrepen. Met het gebruik van onbewerkte, minimaal gemanipuleerde cellen kunnen vele logistieke drempels worden omzeild, en kan daarmee de introductie in de kliniek worden versneld.

Binnen het concept 'tissue engineering' speelt de SBE een unieke rol, zodanig dat het mogelijk is om histologisch onderzoek te doen op de bipten die worden verkregen, voordat de tandwortelimplantaten worden geplaatst. In dit proefschrift wordt de toepassing van humane op

vetstamcellen (hASCs) voor botregeneratie geëvalueerd en een nieuw concept geïntroduceerd, waarbij in een 'one-step' chirurgische procedure hASCs worden geoogst uit vetweefsel en worden uitgezaaid op een calciumfosfaatdrager (botsubstituut), waarna dit "bioactieve" materiaal tijdens een SBE wordt toegepast.

In **hoofdstuk 2** wordt geconcludeerd dat het gebruik van hASCs tijdens een 'one-step' procedure haalbaar is, en een innovatieve basis vormt voor botweefselregeneratie. Tevens bleek het SBE model geschikt voor het meten van de ingroei van nieuw bot alsmede het verkrijgen van inzicht in de mechanismen van het regeneratieproces.

In **hoofdstuk 3** werd het effect van een korte behandeling met BMP-2 op hASCs onderzocht, nadat ze waren uitgezaaid en gekweekt op een calciumfosfaatdrager. Het bleek dat de aanhechting van hASCs aan verschillende botsubstituten gelijk was en niet werd beïnvloed door BMP-2. Daarnaast stimuleerde BMP-2 de genexpressie van de osteogene markers CBFA1, collagen-1, osteonectin, en osteocalcin in hASCs gekweekt op BCP en β -TCP. Downregulatie van de osteopontine genexpressie door BMP-2 werd alleen gezien in cellen gekweekt op BCP. Behandeling met BMP-2 inhibeerde de expressie van de adipogene marker PPAR- γ . Het bleek dat een 15-minuten-durende stimulatie van BMP-2 in een lage dosis de hASCs *in vitro* minstens 21 dagen stimuleerde tot osteogene genexpressie en tot verminderde expressie van adipogene markers.

Het secretoom van stamcellen heeft grote invloed op de resultaten van "tissue engineering" strategieën. Er werd onderzocht hoe het secretoom van hASCs wordt beïnvloed op verschillende substraten, door behandeling met BMP-2 en door de differentiatiegraad.

Daarom werd in **hoofdstuk 4** de hypothese geponeerd, dat gedurende differentiatie hASCs steeds meer factoren produceren die zijn betrokken bij de angiogenese en botremodelering. Er werd gevonden dat, ten opzichte van een plastic kweekbodem, hASCs die werden gekweekt op BCP, een meer dan 2-voudige expressie toonden van ongeveer 20 factoren, waaronder cytokinen zoals IL-6, groeifactoren zoals FGF7 en adhesiemoleculen zoals VCAM1. Echter, 50 genen werden meer dan 2-voudig verminderd tot expressie gebracht op BCP in vergelijking met plastic, ook al was er een betere osteogene expressie op BCP dan op plastic. Behandeling met BMP-2 versterkte de expressie van 30 factoren door cellen gekweekt op BCP, terwijl het de expressie van PGF, PPARG en PTN verminderde. Er bleek geen duidelijk verband te zijn tussen de osteogene differentiatie van hASCs en het productiepatroon van trofische factoren. Omdat er geen associatie bleek te zijn tussen de differentiatiegraad en de productie van angiogenese- en botremodelering-gerelateerde factoren, wordt gesuggereerd dat toekomstige studies op het gebied van weefselregeneratie meer de focus zouden moeten leggen op het systematisch rangschikken van het secretoom van hASCs, en niet alleen maar op de differentiatie ervan. Een korte incubatie met BMP-2 kan een veelbelovende behandeling zijn om zowel de differentiatie als de directe invloed op de omgeving van de hASCs te versterken.

In **hoofdstuk 5** werd de hoeveelheid nieuw ontstaan botweefsel gemeten na SBE met gebruik van het eiwitarme bovine botgraft (DBA) vergeleken met een bifasisch calciumfosfaat (BCP) middels een 'split-mouth design'. De gebitsrehabilitatie bleek bij alle patiënten naar tevredenheid te zijn verlopen. Eén van de geplaatste implantaten ging verloren. De peri-implantaire weefsels toonden geen afwijkingen. Botvolume, graftvolume, mineralisatiegraad, en

aantal osteoclasten en osteocyten bleken gelijk te zijn, maar de BCP-biopten bleken meer osteoïd te bevatten dan de DBA-biopten. Het gebruik van BCP en DBA lieten dus een vergelijkbaar osteoconductief patroon en hoeveelheid gemineraliseerd bot zien, hoewel in de patiënten die waren behandeld met BCP er sprake leek te zijn van een verhoogde botremodellering.

In **hoofdstuk 6** werd het effect van een oplosbaar collageenmembraan op de botregeneratie beschreven, dat wordt gebruikt om de opening in de laterale wand van de kaakholte ("lateral window") af te dekken tijdens een SBE. Het gebruik van het genoemde membraan is al langere tijd een onderwerp van discussie, omdat het nooit onomstotelijk is bewezen of het gebruik ervan voordelig is. Er werden vergelijkbare resultaten gevonden tussen de groepen met en zonder collageenmembraan wat betreft de snelheid van osteoconductie, bot- en graftvolume, aantal osteoclasten en de structurele parameters van nieuw gevormd bot per aandachtsgebied ("region of interest"). Echter de hoeveelheid osteoïd in de geopereerde kaakholte zonder membraan was significant hoger dan in de groep waar wel een membraan was gebruikt. Deze bevindingen laten zien dat de toepassing van een collageenmembraan over de opening in de laterale wand van de kaakholte tijdens een SBE met β -TCP niet bijdraagt aan de botregeneratie en zelfs de osteoïdvorming vermindert, hetgeen op lange termijn zou kunnen leiden tot verminderde botvorming.

Ondanks het succesvolle klinische gebruik van bifasische calciumfosfaten (BCP) met een hydroxyapatiet/tricalciumfosfaat (HA/TCP) ratio van 60/40, zou het hoge percentage hydroxyapatiet het botremodeleringsproces mogelijk kunnen vertragen. Daarom werd in **hoofdstuk 7** de hypothese geponereerd, dat het gebruik van BCP 20/80 tijdens een SBE uiteindelijk een grotere hoeveelheid bot, dan wel botweefsel van een beter kwaliteit oplevert ten opzichte van BCP 60/40. Een vergelijkende studie tussen deze twee typen botsubstituut was nog niet eerder in een humaan model uitgevoerd. De groep met BCP 20/80 bleek minstens even goede resultaten te laten zien als de groep met BCP 60/40. Ondanks het ontbreken van significantie is er een duidelijke tendens zichtbaar in de micro-computertomografie en histomorfometrische analyses, die duidt op een betere ingroei van bot in de '20/80' groep. De osteoïdvolumes van beide groepen waren vergelijkbaar, terwijl in de '60/40' groep de osteoclastenactiviteit significant hoger was; dit duidt op een betere balans in de botremodelering in de '20/80' groep. Er werd geconcludeerd dat het nieuwe botsubstituut BCP 20/80 tenminste even goed, maar mogelijk zelfs beter presteert in vergelijking met BCP 60/40.

Tenslotte, in het afsluitende **hoofdstuk 8** worden de belangrijkste conclusies van de hierboven beschreven studies nader beschouwd, alsmede een uiteenzetting gegeven van de implicaties van de resultaten voor de toekomst. Samenvattend kan worden gesteld dat het gebruik van direct geïsoleerde en met BMP-2 voorbehandelde humane vetstamcellen (hASCs) binnen een 'one-step' procedure een haalbare en innovatieve basis vormt voor de regeneratie van botweefsel. Daarnaast is het SBE model zeer geschikt voor het meten van ingroei van nieuw gevormd bot en draagt het bij aan een beter begrip van het botremodeleringsproces. De resultaten van deze studie vormen een belangrijke basis voor toepassing van botweefselregeneratie technieken in andere vakgebieden, zoals de orthopedische chirurgie.

