

SAMENVATTING

Tissue engineering is een potentieel veelbelovende behandlungsstrategie die tot doel heeft kraakbeen in zowel morfologische als functionele zin te herstellen. Dit kraakbeen kan beschadigd zijn als gevolg van trauma, een aangeboren afwijking of door artrose, ook wel slijtage van het gewricht genoemd. In dit proefschrift worden onderwerpen aangesneden die tot doel hebben een 1-staps procedure te ontwikkelen voor de behandeling van kraakbeendefecten, waarbij de principes van tissue engineering worden toegepast, te weten een combinatie van cellen die gezaaid worden op een dragermateriaal waaraan bioactieve signalen worden toegevoegd die de cellen in de gewenste richting moeten laten differentiëren. De Internationale Sociëteit voor Cellulaire Therapie (ISCT) heeft een aantal criteria opgesteld waaraan mesenchymale stamcellen moeten voldoen. Hierop gebaseerd toonden wij in **Hoofdstuk 2** aan dat stamcellen in de dermis en het subcutane vetweefsel van de humane huid hetzelfde stamcel fenotype hebben en beide in staat zijn in meerdere celtypen te differentiëren, waaronder bot, kraakbeen en vet. Naast deze identieke stamceleigenschappen, bleken de dermale stamcellen en vetstamcellen eenzelfde functionele chemokine receptor profiel te bezitten. Door dit receptorprofiel zijn de stamcellen in staat direct te kunnen reageren op chemokine gradiënten zoals die worden gevonden in wondgenezing. Een interessante bevinding hierbij was dat vers geïsoleerde stamcellen in de stromale vasculaire fractie een hoger chemokine receptor profiel bevatten dan gekweekte stamcellen. Dit werd toegeschreven aan de heterogene cel populatie waaruit de stromale vasculaire fractie bestaat, zoals stamcellen, endotheelcellen en infiltrerende macrofagen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat deze cellen in principe in aanmerking komen voor toepassing in een 1-staps procedure voor regeneratie van kraakbeen, aangezien zij gunstige eigenschappen bezitten van mesenchymale stamcellen en in staat zijn snel te kunnen reageren in pathologische situaties door hun hoge chemokine receptor expressie. Echter de voorkeur gaat uit naar vetstamcellen, aangezien zij in een korter bestek te isoleren zijn en in grotere frequentie aanwezig. Hierdoor besloten we alleen vetstamcellen verder te onderzoeken. In **Hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of de opbrengst en functionele eigenschappen van vetstamcellen (ASC) die in de zogenaamde heterogene stromale vasculaire fractie (SVF) zitten, afhangt van de plaats waar ze geoogst worden. Daarbij hebben we gekeken naar de twee meest gebruikte regio's voor liposuctie of resectie: de buik en de heup/dij regio. We toonden aan dat de opbrengst van vetstamcellen in de stromale vasculaire fractie in de buik hoger is dan in de heup, terwijl het totaal aantal SVF cellen hetzelfde was. De gekweekte cellen hadden dezelfde groeikinetic en hetzelfde cel oppervlakte markerexpressie profiel. Functioneel bleken de vetstamcellen van beide oogstplaatsen in staat in dezelfde mate te kunnen differentiëren naar bot en kraakbeen. Deze resultaten in acht nemend, zou de buikregio de te prefereren oogstplaats zijn voor het verkrijgen van stamcellen voor een 1-staps procedure voor de behandeling van kraakbeendefecten, gezien de hoge opbrengst van vetstamcellen in de stromale vasculaire fractie.

De 1-stapsprocedure is erg patiënt vriendelijk doordat onder andere een secundaire interventie wordt voorkomen. Ook al zijn abdomen en heup/dijregio de meest voorkomende plaatsen voor het oogsten van vetstamcellen, zijn er genoeg andere

potentiële vetoogstplaatsen die een waardevolle bron kunnen zijn van vetstamcellen voor regeneratieve therapieën. Zo is de knie een van de mogelijk waardevolle oogstplekken, aangezien zij een infrapatellaire vetpad bevat, ook wel Hoffa vetpad genoemd. De keuze om deze vetpad te gebruiken zou patiëntvriendelijk kunnen zijn bij regeneratieve knie therapieën, aangezien met een enkele incisie zowel het vet geogst kan worden voor het verkrijgen van de vetstamcellen, alsook het chondrale defect behandeld kan worden met een met cellen bezaaid dragermateriaal. In **Hoofdstuk 4** hebben we derhalve de haalbaarheid van deze 1-stapsprocedure getest voor de behandeling van osteochondrale kniedefecten met behulp van vers geïsoleerde stamcellen uit de infrapatellaire vetpad. Drie voorwaarden voor de ontwikkeling werden getest en goed bevonden. Ten eerste toonden we aan dat er klinische relevante hoeveelheden vasculaire stromale cellen kunnen worden geogst uit de infrapatellaire vetpad. Ten tweede toonden we aan dat deze stromale vasculaire fractie cellen bevat, die qua fenotypisch marker profiel, groeikinetiek en multidifferentiatie potentieel op vetstamcellen lijken. Vervolgens zaaiden we deze cellen op een poly(L-lactide-co-caprolactone) scaffold en toonden aan dat ze in staat waren te differentiëren naar kraakbeen, zowel op genetisch niveau door op-regulatie van chondrospecifieke genen, alsook op eiwitniveau door vorming van een chondrogene matrix met productie van glycosaminoglycanen. Uit deze studie concludeerden we dat door een variabele en gelimiteerde opbrengst van stamcellen uit een gezonde structuur, die betrokken is bij stabiliteit en innervatie van het kniegewricht, de infrapatellaire vetpad alleen geschikt is als bron van vetstamcellen voor kleine focale kraakbeendefecten. Voor de grotere artrotische defecten kan beter uitgeweken worden naar andere subcutane vetoogstplaatsen.

172

Nadat de gunstige eigenschappen en preferentiële oogstplaats van vetstamcellen als zodanig gekarakteriseerd zijn, hebben we de tweede fase van de 1-stapsprocedure onderzocht, betreffende de stimulatie van de geïsoleerde stamcellen richting kraakbeen. Gebaseerd op eerdere onderzoeksresultaten uit onze groep, hadden we al laten zien dat conventionele stimulatie met TGFβ1 in staat bleek de cellen te laten differentiëren in de chondrogene richting. De studie gepresenteerd in **Hoofdstuk 5** onderzocht de invloed van hyperosmolariteit en hypoxie (twee biofysisch/-chemische modaliteiten die onder fysiologische omstandigheden aanwezig zijn in een gewricht, op de chondrogene differentiatie van vetstamcellen. De vetstamcellen werden hiervoor gezaaid in een collageen type 2 hydrogel en de resultaten werden vergeleken met conventionele TGFβ1 stimulatie. We vonden dat het effect van hyperosmolariteit en/of hypoxie geen significant verschil had op de viabiliteit en de proliferatie van de gekweekte vetstamcellen met de conventionele TGFβ1 stimulatie. Als de cellen gezaaid werden in de collageen type 2 gel, hadden zij onder alle omstandigheden een ronde morfologie, behalve met de TGFβ1 stimulatie. Dit induceerde een sterke aggregatie van de vetstamcellen naar een nodule ofwel celcluster. Dit impliceert dat hyperosmolariteit en hypoxie de vetstamcellen in een milde vorm stimuleerden richting chondrogenese, terwijl TGFβ1 stimulatie resulteerde in een snelle aggregatie en (hypertrofische) differentiatie van de vetstamcellen. Als laatste had de combinatie van hypoxie en hyperosmolariteit een gelijke chondrogene inductie tot gevolg als de conventionele TGFβ1 stimulatie. Dit hebben we zowel op genetisch niveau aangetoond door middel van op-regulatie van chondro-specifieke genen, alsook

op eiwitniveau door proteoglycaan kleuring en gekwantificeerde glycosaminoglycaan formatie. Deze data kunnen leiden tot interessante alternatieven voor korte stimulatie van stamcellen in een 1-stapsprocedure voor de behandeling van kraakbeendefecten.

Nu we wisten dat deze cellen richting kraakbeen kunnen differentiëren, onderzochten we vervolgens de derde fase van de 1-stapsprocedure. Voor de implantatie en het in situ houden van de cellen in een kraakbenig defect, zullen de cellen in een dragermateriaal moeten worden gezaaid. Naast een aantal eigenschappen waaraan het dragermateriaal zelf moet voldoen, moeten de stamcellen voor toepassing in een 1-staps procedure ook snel aan het dragermateriaal kunnen hechten, om de tijdsspanne van de procedure kort te houden (idealerweise korter dan 2,5 uur). In **Hoofdstuk 6** hebben we twee radiolucente biodegradeerbare polymere scaffolds voor dit doel getest: een natuurlijke poreuze collageen type I/III scaffold en een macroporeuze poly(L-lactide-co-caprolactone) scaffold. We toonden aan dat de cellen snel aan beide materialen hechten (~10min), zodra de heterogene stromale vasculaire fractie op beide scaffoldtypen werd gezaaid. Er was een significant verschil in het totaal aantal stromale cellen dat aan beide materialen hechtte; een hoger percentage cellen hechtte aan de poly(L-lactide-co-caprolactone) scaffold. De meeste van de heterogene populatie cellen uit de stromale fractie die aan de scaffolds hechtten, bleken stamcellen te zijn, aangezien de niet gehechte celfractie significant minder stamcellen bevatte in colony-forming unit assays. Als laatste toonden we aan dat de gehechte cellen in dezelfde mate differentieerden richting bot en kraakbeen in beide scaffoldmaterialen, zowel door op-regulatie van osteo- en chondrospecifieke genen en door depositie van bot en kraakbeenmatrix. We concludeerden dat beide scaffoldmaterialen toepasbaar zijn in de 1-stapsprocedure voor de behandeling van osteochondrale defecten. Met deze studie werd het *in vitro* testen van de haalbaarheid van alle fasen de 1-staps procedure voor de behandeling van chondrale defecten afgesloten.

Om het concept van de 1-staps procedure naar de klinische setting te transleren, hebben we het concept vervolgens *in vivo* getest. In Hoofdstuk 7 hebben we het regeneratieve potentieel van stromale cellen uit het vetweefsel van geiten getest in een 1-staps procedure voor de behandeling van een osteochondraal defect in de knie. We hebben dit vergeleken met de toepassing van gekweekte vetstamcellen van geiten, en de zogenaamde subchondrale boor techniek, waarbij alleen de cellen vanuit het onderliggende beenmerg voor regeneratie moeten zorgen. Al deze cellen werden geïmplanteerd in een collageen type I/III scaffold. Na 4 weken zagen we opvallend genoeg al enige regeneratie bij immunohistologische analyse, waarbij de gekweekte stamcellen het beste resultaat lieten zien, gevolgd door de vers geïsoleerde cellen en als slechtste de acellulaire defecten. Na 4 maanden follow-up was de regeneratie duidelijk toegenomen, waarbij de stromale cellen en de gekweekte stamcellen vergelijkbare resultaten lieten zien in zowel immunohistologische, radiologische, biochemische en mechanische analyse. Ook al was dit slechts een pilot-studie met een beperkt aantal dieren (n=8), deze studie liet duidelijk aanwijzingen zien voor een toegenomen regeneratie van het osteochondrale defect door toepassing van de stromale cellen in een 1-staps procedure. Voordat deze therapie echter in de kliniek toegepast kan worden, zullen nog additionele studies uitgevoerd moeten worden die deze resultaten reproduceren met grotere defecten en een langdurige follow-up. De resultaten tot zover zijn in ieder geval veelbelovend

en openen hopelijk deuren naar meerdere preklinische studies die het effect van deze veelbelovende regeneratieve cellen onderzoeken voor de behandeling van osteochondrale defecten.

In **Hoofdstuk 8** tenslotte, de discussie, werden verschillende onderwerpen aangaande de 1-staps procedure besproken en in een bredere context geplaatst.