

# VU Research Portal

## Adipose stem cells on a biodegradable polymer for spinal fusion

Kroeze, R.J.

2014

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Kroeze, R. J. (2014). *Adipose stem cells on a biodegradable polymer for spinal fusion: pre-clinical studies*.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Samenvatting

Het verkrijgen van autoloog bot uit de bekkenkam gaat meestal gepaard met morbiditeit ter plaatse van het donor gebied. Het gebruik van autoloog bot *in-vivo* maakt differentiatie tussen het peroperatief geplaatste bot en nieuw gevormd bot lastig met behulp van röntgenfoto's. Vanwege deze redenen hebben wij getracht een geschikt alternatief voor autoloog bot te vinden. Wij hebben een biodegradeerbaar en radiolucent polymeer (poly(L-lactide-co-caprolacton); PLCL) geëvalueerd met en zonder het gebruik van vetstamcellen zowel *in-vitro* als *in-vivo*. Deze stamcellen hebben wij onderzocht in verband met de mogelijk toegevoegde waarde bij botgroei *in-vivo*.

Voor de *in-vivo* experimenten hebben wij een tussenwervelfusie model in de geit gebruikt. In de geprepareerde tussenwervelschijf ruimte wordt een 'cage' (open kooitje) geplaatst, waardoor bot van de ene wervel, door de cage, naar de andere wervel kan groeien. Het poreuze PLCL materiaal met en zonder vetstamcellen werd gebruikt als vulmateriaal voor de cage.

Dit promotieonderzoek is gericht op het optreden van botgroei bij het gebruik van PLCL met en zonder vetstamcellen in een één-staps procedure. Hiervoor hebben wij de volgende doelen geformuleerd:

- Het onderzoeken van de haalbaarheid van een één-staps procedure waarin het vet wordt geoogst en de verkregen vetstamcellen worden teruggeplaatst.
- Het analyseren van het degradeerbare en radiolucente PLCL polymeer als vulmateriaal voor een wervelcage.
- Het evalueren of het toevoegen van vetstamcellen aan het PLCL materiaal van toegevoegde waarde is bij wervelfusie operaties.

In **Hoofdstuk 2**, geven wij een bondig en algemeen overzicht in het gebruik van biodegradeerbare polymeren in bot tissue engineering. We beschrijven zowel de terminologie die gebruikt wordt in de polymeertechnologie alsmede de onderwerpen van biocompatibiliteit en biofunctionaliteit. Het belang van deze twee onderwerpen bij het gebruik van degradeerbare polymeren *in-vivo* wordt hierbij onderstreept. Tevens worden enkele materiaal eigenschappen van polymeren beschreven, welke in biomedische artikelen zouden moeten worden genoemd bij het gebruik van biodegradeerbare polymeren, ten einde meer transparantie tussen verschillende onderzoeksgroepen te verkrijgen.

De hypothese van **Hoofdstuk 3** was dat de manier van sterilisatie van PLCL veranderingen in oppervlakte eigenschappen van het polymeer teweeg zou brengen, en

derhalve zou leiden tot een verschil in stamcel response. Hiervoor hebben we stamcellen gekweekt op PLCL folie, die gesteriliseerd waren door middel van een van de volgende drie technieken: ethyleenoxide gas (EO), plasma sterilisatie (PS) of bestraling met elektronen (electron-beam; E-beam). Significante verschillen in oppervlakteruwheid (EO>PS>E-beam) en hydrofilititeit (PS>E-beam>EO) werden waargenomen. Wij vonden een evenredig verband tussen een toegenomen hydrofilititeit van het oppervlak en een toename in celhechting en proliferatie snelheid. Voor de osteogene differentiatie van de stamcellen bleek juist ethyleenoxide de beste resultaten te geven, op basis van de significant hogere activiteit van het alkalische-fosfatase enzym. Aangezien osteogene differentiatie van deze stamcellen mogelijk een bijdrage kan leveren tijdens bot tissue engineering, hebben wij ethyleenoxide gebruikt om PLCL te steriliseren voor de vervolggexperimenten.

Het doel van **Hoofdstuk 4** is het beschrijven van de verschillende protocollen om osteogene differentiatie te induceren in vetstamcellen die momenteel gebruikt worden in ons laboratorium. Het ontwikkelen en implementeren van deze protocollen is altijd onderhevig aan continue verbeteringen en kunnen zelfs in beperkte mate verschillen in hetzelfde laboratorium tussen onderzoekers onderling. Hopelijk leidt de uitwisseling van zulke protocollen tussen verschillende onderzoeksgroepen tot meer overeenstemming en uniformiteit in de protocollen. Het uiteindelijke doel is dat verkregen data tussen verschillende onderzoeksgroepen beter met elkaar vergelijkbaar zijn.

In **Hoofdstuk 5** kijken we naar de haalbaarheid van een één-staps procedure, met vers geoogste vetstamcellen *in-vitro*. Wij hebben hiervoor twee radiolucente en biodegradeerbare polymeren geanalyseerd voor de toepassing in kraakbeen en bot tissue engineering. Een collageen I/III polymeer en het PLCL materiaal werden hiervoor bezaaid met een vers geoogste heterogene celpopulatie (stromal vascular fraction; SVF), waarin zich ook de vetstamcellen bevinden. De cellen waren snel gehecht aan de polymeren (~10 minuten) en de gehechte celpopulatie bleek met name uit stamcellen te bestaan, aangezien de niet-gehechte celpopulatie nauwelijks kolonies kon vormen *in-vitro*, wat als een van de kenmerkende eigenschappen van stamcellen wordt gezien. De gehechte celpopulatie was in staat tot proliferatie en osteogene differentiatie, waarmee de haalbaarheid van de één-staps procedure bij het gebruik van PLCL als dragermateriaal *in-vitro* werd aangetoond.

Na deze *in-vitro* experimenten werd een lumbale intercorporele wervelfusie studie in een groot diermodel verricht. Dit geitenmodel is eerder gebruikt in onze onderzoeksgroep en voor dit promotieonderzoek zijn de cages gemaakt van radiolucent polyetheretherketon (PEEK). In deze kleinschalige geitenstudie, zoals beschreven in **Hoofdstuk 6**, worden zowel de vers geoogste vetstamcellen (verkregen via de één-staps-procedure) als gekweekte vetstamcellen op het PLCL materiaal gezaaid en vervolgens als vulmateriaal van de cage in de wervelkolom van de geit geïmplanteerd. Bij de uitkomsten van deze studie werd met

name gelet op de biocompatibiliteit van het PLCL materiaal, al dan niet gezaaid met vers geoogste of gekweekte vetstamcellen. Na 1 maand follow-up werden geen lokale en/of systemische nadelige effecten gevonden. Bovendien, in vergelijking met de autologe bot groep, waren er meer bloedvaten aanwezig in het PLCL materiaal en zagen wij een toegenomen bloedvat diameter in de vers geoogste stamcel groep. Vanwege deze gunstige effecten op de vaatnieuwvorming zou versnelde botformatie wellicht mogelijk zijn.

Derhalve werd er na deze kleinschalige studie een grootschaligere geitenstudie opgezet met een identieke opzet maar met een langere follow-up van 3 en 6 maanden, om te onderzoeken of PLCL, al dan niet gezaaid met vers geoogste of gekweekte vetstamcellen, zou kunnen fungeren als een potentiële vervanger voor autoloog bot als vulmateriaal voor een cage (**Hoofdstuk 7**). In deze studie werd voor het eerst de praktische haalbaarheid van de voorheen theoretische één-staps procedure voor bot tissue engineering aangetoond in een (groot) dierenmodel. Het gebruik van zowel het PLCL materiaal als de vetstamcellen leidde zelfs tot 6 maanden na de operatie niet tot locale en/of systemische nadelige effecten. Daarnaast maakte het gebruik van het radiolucente PLCL materiaal visualisatie van het nieuw gevormd bot mogelijk met behulp van gewone röntgenfoto's. Alhoewel er inderdaad intercorporele wervelfusie optrad in alle experimentele groepen na 6 maanden, waren de resultaten te wisselend om gedegen conclusie te trekken ten aanzien van PLCL als een geschikt vulmateriaal voor de cage en de mogelijk toegevoegde waarde van vetstamcellen in wervelfusieoperaties.

**Hoofdstuk 8** beschrijft de biomechanische analyses van de wervelkolommen van de geitenstudie uit hoofdstuk 7. Aangezien er verschillende stadia van wervelfusie aanwezig waren bij de verschillende geiten na de obductie, kon er inzicht verkregen worden in de afname van beweeglijkheid gedurende het proces van wervelfusie. Een significante afname in beweeglijkheid in flexie/extensie werd reeds gevonden bij matige botingroei en bij lateroflexie zelfs bij minimale botingroei in de cage, in vergelijking met de direct postoperatieve situatie. Deze studie toonde aan dat de stabiliteit in het geopereerde segment reeds optrad voordat volledige fusie aanwezig was op de röntgenfoto.

Ten slotte, in **Hoofdstuk 9**, de algemene discussie, worden de resultaten van alle verrichte experimenten besproken en in een bredere context geplaatst. Vervolgens worden de beperkingen van de experimenten aangegeven alsmede mogelijk verbeteringen voor eventuele toekomstige experimenten beschreven.

Concluderend is de praktische haalbaarheid van de één-staps procedure, waarin vetweefsel wordt geoogst en de vetstamcellen worden gereïmplanteerd, voor het eerst aangetoond in een bone tissue engineering toepassing. Het radiolucente cage vulmateriaal PLCL, maakte het inderdaad mogelijk om nieuw gevormd bot *in-vivo* te visualiseren met

behulp van simpele röntgenfoto's. Tenslotte lijkt PLCL een inferieur vulmateriaal voor de cage in vergelijking met autoloog bot. De toevoeging van zowel vers geïsoleerde als gekweekte vetstamcellen versnelde het wervelfusie proces niet in deze initiële studies. Echter, deze studies hebben verscheidene beperkingen van de experimenten duidelijk gemaakt, waardoor we in toekomstige experimenten deze factoren kunnen verbeteren.