

## **Adipose Stem Cells en de Regeneratie van Tussenwervelschijven: de Rol van Micro-Omgevingen**

### **Algemene Samenvatting**

De huidige behandelingen voor gedegenererde tussenwervelschijven (TWS) omvatten zowel conservatieve als invasieve chirurgische therapieën; beide zijn echter gericht op pijnverlichting in plaats van weefselherstel, gericht op herstel van de biologische en mechanische functie van de TWS. Weefselherstel gebaseerd op celtherapie (tissue engineering) zou kunnen voldoen aan de klinische wens voor het herstel of de regeneratie van beschadigd weefsel, en zou daarmee een potentieel ideale therapie zijn voor de gedegenererde TWS en diens gewrichtsfunctie. Het uiteindelijke doel van dit proefschrift is de ontwikkeling van een één-staps-procedure voor het regenereren van de TWS middels een minimaal invasieve procedure, die bestaat uit het injecteren van vetstamcellen (“adipose stem cells”; ASCs) in de nucleus pulposus (NP) van de TWS, al dan niet gecombineerd met een dragermateriaal.

Stamcellen en voorlopercellen bevinden zich in sterk gereguleerde micro-omgevingen (zogenaamde “niches”), die een evenwicht tussen zelfvernieuwing en cel differentiatie kunnen bewerkstelligen. Volwassen stamcellen en voorloper cellen, als onderdeel van normale regeneratie processen, verlaten hun niches en komen vervolgens in de circulatie terecht, om zich daarna vast te zetten en te differentiëren in de micro-omgeving van het beoogde weefsel. In onze strategie voor TWS regeneratie middels vetstamcel injectie, zullen vetstamcellen onvermijdelijk geconfronteerd worden met een NP micro-omgeving die bestaat uit cellen, extracellulaire matrix, hypoxische condities, en andere factoren. Wij veronderstellen dat de regie van de ingespoten vetstamcellen zal worden gevoerd door de complexe NP omgeving, waardoor concepten zonder exogene stimulatie met groeifactoren of andere stimuli, dus met minimaal gemanipuleerde stam/voorlopercellen mogelijk zijn

De NP cel is het enige celtype dat in de NP aanwezig is. Echter, de lage dichtheid van deze NP cellen maakt het optreden van directe cel-cel contacten tussen NP cellen en geïnjecteerde vetstamcellen zeldzaam. Daarmee rijst de vraag hoe, en in hoeverre de vetstamcellen zullen worden beïnvloed door de NP cellen die aanwezig zijn in de NP. In **hoofdstuk 2** hebben we daarom de interactie tussen vetstamcellen en NP cellen bestudeerd in combinatieweken zonder directe cel-cel contacten door het

gebruik van transwell systemen Door bovendien het probleem van *in vitro* de-differentiatie van kraakbeenachtige cellen te voorkomen door een hoge dichtheid van gezamenlijke NP cellen te kweken in een zogenaamde micromass, waren we in staat om aan te tonen dat oplosbare factor(en), uitgescheiden door NP cellen, verantwoordelijk zijn voor en in staat zijn tot het sturen van de vetstamcellen in de richting van het NP fenotype, onder de voorwaarde dat deze NP cellen zich in een gedifferentieerde staat bevinden.

Vanwege de hoge matrix/cel ratio in de NP, zullen de meeste geïnjecteerde vetstamcellen contacten ondervinden met de matrix en alleen indirect een interactie aangaan met NP cellen, via bovengenoemde oplosbare factoren. In **hoofdstuk 3** hebben wij de kraakbeenmatrix (in de vorm van collageen type II hydrogel) -gemedieerde effecten op kraakbenige differentiatie van vetstamcellen in kaart gebracht door ze te vergelijken met de effecten bewerkstelligd door collageen type I hydrogelen. Wij hebben aangetoond dat oplosbare factoren afgegeven door NP cellen de chondrogene differentiatie van ASCs in collageen hydrogelen kunnen bevorderen, en dat de combinatie met een nucleus pulposus-nabootsende collageen type II micro-omgeving de differentiatie naar een meer uitgesproken kraakbeen / NP fenotype tilt vergeleken met collageen type I hydrogelen.

**Hoofdstukken 4 en 5** van dit proefschrift beschrijven onze experimenten om inzicht te krijgen in de mechanismen die leiden tot het verschil in fenotype verkregen bij het gebruik van verschillende dragermaterialen (zoals de verschillende typen collageen), met als leidraad de recente literatuur over de rol van de celvorm op de differentiatie-uitkomst. In **hoofdstuk 4** hebben we aangetoond dat  $\beta 1$  integrines een grotere rol spelen bij de latere stadia van kraakbeenvorming vergeleken met de eerdere stadia, zoals blijkt uit het feit dat  $\beta 1$  integrine blokkade in vetstamcellen verrassenderwijs de genexpressie van kraakbeenmarkers bevordert in de vroege fase, maar juist remt in de latere fasen van de chondrogenese. Verder laten we zien dat de initiatie van chondrogenese door  $\beta 1$  integrine blokkade verklaard zou kunnen worden doordat het de ROCK signaaltransductie remt en de afronding van cellen versterkt. De mogelijke rol van het type collageen waarvan de 3D hydrogelen werden gemaakt op de  $\beta 1$  integrine-gemedieerde Rho A/ROCK signaaltransductie en celvorm-adaptatie, en het daaruit voortvloeiende niveau van chondrogene genexpressie wordt behandeld in **hoofdstuk 5**. Onze resultaten bevestigen dat collageen type II de inductie richting

chondrogene differentiatie in vetstamcellen bewerkstelligt, door de rondheid van de cellen via de  $\beta 1$  integrine-gemedieerde Rho A/ROCK signaaltransductie-cascade te beïnvloeden. Samenvoeging van de gegevens van de **hoofdstukken 4 en 5** maakt duidelijk dat dragermaterialen, in combinatie met oplosbare bioactieve factoren (zoals transforming growth factor- $\beta 1$ ), stamceldifferentiatie efficiënter richting kraakbeenvorming kunnen sturen door het induceren van een ronde celvorm, en dat deze effecten worden bewerkstelligd via  $\beta 1$  integrine-gemedieerde Rho A/ROCK signaaltransductie.

In **hoofdstuk 6** hebben we een beschrijving opgenomen betreffende de huidige stand van zaken inzake cellulaire therapieën, en welke kennis momenteel beschikbaar is over welke micro-omgevingscondities wellicht de uitkomsten van de behandeling van tussenwervelschijven kunnen beïnvloeden. We concluderen dat de vetstamcel-gebaseerde cellulaire behandeling een haalbaar alternatief kan bieden voor de huidige behandelingsmodaliteiten.

In **hoofdstuk 7** wordt de haalbaarheid van het injecteren van vers geïsoleerde vetstamcel-preparaten (d.w.z. de stromale vasculaire fractie; SVF) in de NP om zodoende degeneratie van tussenwervelschijven terug te draaien, te stoppen, ofwel te vertragen geëvalueerd in een degeneratiemodel dat recentelijk in de geit werd ontwikkeld door onze onderzoeksgroep. Dit model vertoont een vergelijkbare pathologische ontwikkeling van de tussenwervelschijf degeneratie als de mens met betrekking tot de biomechanica, geometrie, structuur, biochemie en de afwezigheid van notochordaal cellen. Tot onze verrassing constateerden we in een eerste proef dat SVF resulteerde in een snelle en massale cellulaire infiltratie die ernstige degeneratieve veranderingen en osteoclastische activiteit in omliggende botstructuren tot gevolg had. In een tweede dierproef, uitgevoerd om inzicht te krijgen in de mogelijke oorzaken voor deze negatieve verschijnselen hebben we aangetoond dat deze ontstekingsreactie niet werd waargenomen in nagenoeg alle tussenwervelschijven die behandeld waren met ofwel gekweekte vetstamcellen ofwel met opgezuiverd (rode bloedcel- arm) SVF. Hoewel dit suggereert dat de rode bloedcellen gezien kunnen worden als (een van) de causale factor(en), hebben wij in latere studies deze suggestie weerlegd (zie hoofdstuk 7 voor details). Onze huidige interpretatie van de resultaten uit onze tot dusver verrichte dierstudies is dat grondig verwijderen van het enzym collagenase dat gebruikt wordt voor het extraheren van de SVF uit het vetweefsel van essentieel belang is.

In **hoofdstuk 7** laten we ook zien dat in ongeveer 50% van de met cellen behandelde tussenwervelschijven een toegenomen celaantal wordt gevonden. In TWSen met een verhoogde celdichtheid werd een significant verhoogde expressie van de extracellulaire matrixeiwitten collageen type II en aggrecan waargenomen. De vaststelling dat het vet(stam)cel-specifieke PPAR- $\gamma$  gen ook consistent verhoogd tot expressie kwam in deze schijven, is een sterke aanwijzing dat de vetstamcellennaast dat ze overleven, mogelijk ook actief betrokken zijn bij de opregulatie van deze anabole genen, reeds binnen drie maanden na SVF injectie.

## **Conclusie**

In proefschrift is de haalbaarheid van de een-staps minimaal invasieve procedure voor tussenwervelschijf regeneratie geanalyseerd door het bestuderen van (1) de interacties tussen vetstamcellen en de nucleus pulposus micro-omgeving, (2) de onderliggende mechanismen waarmee sommige dragermaterialen inductie van kraakbeendifferentiatie kunnen bewerkstelligen, en (3) de toepassing van een-staps SVF of vetstamcel injectie strategie voor tussenwervelschijf regeneratie in een geitenmodel. Wij toonden aan dat: (i) de basale componenten binnen de NP micro-omgeving in staat zijn om de inductieve signalen voor kraakbenige differentiatie van vetstamcellen te leveren; (ii) inductie van een ronde celvorm via  $\beta 1$  integrinegemedieerde Rho A/ROCK signaaltransductie routes een belangrijk criterium vormt bij de keuze van een dragermateriaal voor behandelingsmodaliteiten gebaseerd op tissue engineering van kraakbeenachtige weefsels (bijv. NP); (iii) de kwaliteit van SVF en de verwijdering van verontreinigingen uit SVF van kritische waarde is wanneer SVF wordt gebruikt voor injectiebehandeling voor degeneratieve tussenwervelschijven. Hoewel de in vivo gegevens, zoals gepresenteerd in dit proefschrift, op dit moment nog onvoldoende geoptimaliseerd zijn om de voorgestelde eenstaps-procedure voor tussenwervelschijf-regeneratie als klinische toepassing te lanceren concluderen we dat SVF/ASC injectie strategieën vooralsnog een veelbelovend en haalbaar concept lijken voor toekomstige klinische toepassing.