

VU Research Portal

Cytokines and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells

Bastidas Coral, A.P.

2019

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Bastidas Coral, A. P. (2019). *Cytokines and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Implications for Bone Tissue Engineering*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

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



CYTOKINES EN OSTEOGENE DIFFERENTIATIE VAN MESENCHYMALE STAMCELLEN

Implicaties voor Bot Tissue Engineering

Algemene Samenvatting

ALGEMENE SAMENVATTING

De behandeling van grote botdefecten is nog steeds een grote uitdaging in de orthopedie en kaakchirurgie. Grote botdefecten in de schedel kunnen ontstaan als gevolg van een trauma of pathologische aandoeningen. Deze defecten vormen een aanzienlijke sociaal-economische last. Autoloog bot wordt nog steeds beschouwd als de “gouden standaard” voor de behandeling van grote botdefecten. Het gebruik ervan heeft echter nadelen zoals een beperkte beschikbaarheid en kwaliteit, evenals de morbiditeit van de donorlokatie. Allograft is een alternatief voor de behandeling van botdefecten, maar brengt infectierisico's met zich mee, en het probleem van donor beschikbaarheid beperkt het gebruik ervan.

Polymethylmethacrylaat (PMMA) is vanwege zijn hoge mechanische stabiliteit en lage kosten het meest gebruikte botsubstituut om grote botdefecten van de schedel te behandelen. Ondanks de positieve klinische resultaten, staat het gebruik van PMMA nog steeds ter discussie vanwege cytotoxische problemen. In een defect van de schedel zal het geïmplanteerde PMMA worden omringd door de osteoblasten (botvormende cellen) die zich in het botweefsel bevinden. Daarnaast zullen mesenchymale stamcellen (MSCs) worden aangetrokken naar de plek waar het PMMA implantaat wordt geplaatst. Zowel MSCs als osteoblasten zijn dus geschikte celtypen om de mogelijke cytotoxische effecten van PMMA *in vitro* te testen. In hoofdstuk 2 hebben wij getest: 1) de mogelijke nadelige en cytotoxische effecten van PMMA op humane vetstamcellen (hASCs) en humane osteoblasten (hOBs); 2) of PMMA de productie van botafbrekende factoren uitgescheiden door hASCs en/of hOBs verbetert. We hebben gevonden dat PMMA niet cytotoxisch is en niet interfereert met het osteogene differentiatievermogen van hASCs en hOBs, en dat het de productie van botafbrekende factoren uitgescheiden door hASCs en hOBs niet verbetert *in vitro*. We hebben laten zien dat PMMA de botvorming niet remt en dat activering van osteoclasten (botafbrekende cellen) door de productie van botafbrekende factoren als gevolg van PMMA onwaarschijnlijk is.

Ondanks de recente vooruitgang in technieken om botweefsel te herstellen, biomaterialen, en stamceltechnologie, blijft de behandeling van grote botdefecten een belangrijk klinisch probleem vanwege de complexiteit van het beschadigde botweefsel dat moet worden hersteld. Botweefseltechnologisch aanpakken kunnen de beperkingen van de gebruikelijke bottransplantaten overwinnen en zijn daarom een goede strategie voor de behandeling van grote botdefecten zoals grote schedeldefecten. De botweefseltechnologie maakt gebruik van een combinatie van stamcellen, waaronder MSCs, scaffolds en inductieve factoren om een bioactief

botconstruct te maken. Na implantatie van dit construct in een botdefect kan deze bijdragen aan het herstel van het bot.

Botherstel is een erg ingewikkeld proces. Het omvat hematoomvorming en verlaging van de zuurstofconcentratie gevolgd door een ontstekingsreactie waarbij verschillende immuuncellen worden aangetrokken. De ontstekingsreactie brengt het herstelproces op gang waarbij cytokines zoals TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8 en IL-17F worden afgegeven op de plaats van de wond. In hoofdstuk 3 zijn de effecten van de ontstekingsbevorderende cytokines TNF- α , IL-6, IL-8 en IL-17F en het ontstekingsremmende cytokine IL-4 op de proliferatie en osteogene differentiatie van hASCs bestudeerd. Om het vroege stadium van het fysiologische proces van botherstel na te bootsen werden de cytokines gedurende 72 uur aan hASCs toegevoegd. We hebben gevonden dat TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8 en IL-17F zowel de osteogene differentiatie van hASCs kunnen stimuleren als inhiberen. Met name IL-6 zou geschikt kunnen zijn om de osteogene differentiatie van MSCs te induceren, hetgeen botherstel zou kunnen bevorderen.

Een verlaging van de zuurstofconcentratie in de micro-omgeving is een andere belangrijke gebeurtenis na het ontstaan van een botbreuk. Na implantatie van een botconstruct *in vivo* zal er een ontstekingsreactie in het weefsel plaatsvinden waarbij cytokines worden afgegeven en de zuurstofconcentratie wordt verlaagd. Zowel cytokines als verlaging van de zuurstofconcentratie zijn dus kenmerken van het vroege stadium van de genezing van botbreuken. De door cytokines geactiveerde routes kunnen interacteren op het niveau van signaaltransductie. Daarom werd in hoofdstuk 4 het effect van cytokines en verlaging van de zuurstofconcentratie onderzocht om de modulering van de MSC-ondersteunde botgenezing door cytokines voor botweefseltechnologie doeleinden om grote botdefecten te behandelen beter te voorspellen. We vonden dat IL-4 de osteogene differentiatie van hASCs verminderde. Dit geeft aan dat deze cytokine de botgenezing en botregeneratie zou kunnen remmen. Bovendien hebben we laten zien dat de remmende effecten van IL-4 werden gematigd in de aanwezigheid van IL-6. Deze matiging zal waarschijnlijk optreden via een mTOR onafhankelijke route. Daarom is het belangrijk voor een beter begrip van botgenezing, met name voor weefseltechnologische doeleinden, om het effect van de zuurstofconcentratie en de combinatie van cytokines te bestuderen.

Als een botconstruct eenmaal is geïmplantéerd in een botdefect zal deze worden blootgesteld aan het effect van cytokines en verlaging van de zuurstofconcentratie. De MSCs in het construct zullen interacteren met de "scaffold" substraat. Dit substraat kan een rol spelen door de reactie van MSCs op cytokines verlaagde van de zuurstofconcentratie aan te passen. *In vitro* studies die zijn ontworpen om de interactie tussen MSCs en biomaterialen onder een

verlaagde zuurstofconcentratie en in de aanwezigheid van cytokines te onderzoeken zijn essentieel voor het ontwikkelen van een succesvol construct om grote botdefecten te behandelen. In hoofdstuk 5 onderzochten we het directe effect van een driedaagse stimulatie (72 uur) van een cocktail van cytokines bestaande uit TNF- α , IL-4, IL-6 en IL-17F op de osteogene differentiatie en VEGF expressie van hASCs gekweekt op bifasisch calcium fosfaat (BCP) “scaffolds” en op plastic kweekplaten onder een verlaagde zuurstofconcentratie. We hebben aangetoond dat een combinatie van cytokines en verlaging van de zuurstofconcentratie de VEGF expressie verhoogde in hASCs gekweekt op BCP, maar dat het geen effect had op hun osteogene differentiatie. Cytokines en verlaging van de zuurstofconcentratie beïnvloeden het gedrag van MSCs en is substraat afhankelijk. Dit geeft aan dat de principes van het *in vivo* botherstel proces (cytokines en verlaging van de zuurstofconcentratie) moeten worden opgenomen in de evaluatie van een botconstruct.

Ten slotte worden in hoofdstuk 6 de belangrijkste bevindingen en conclusies van alle studies besproken evenals hun implicaties voor botweefsel technologische toepassingen in de orthopedie en kaakchirurgie. De auteurs concluderen dat complexe *in vitro* studies, die niet alleen de principes van het *in vivo* botherstel proces incorporeren maar ook de principes van weefseltechnologie, cruciaal zijn voor een succesvolle ontwikkeling van een botconstruct voor de behandeling van patiënten met grote botdefecten. De resultaten beschreven in dit proefschrift dragen bij aan een beter begrip van het mechanisme van botherstel waarbij MSCs betrokken zijn. Dit kan leiden tot de implementatie van nieuwe onderzoeksstrategieën voor de botweefseltechnologie.