Hydrogelen met wisselende visco-elastische eigenschappen sturen Mesenchymale Stamcel Differentiatie

Wessel van Veenen
s2762757
30-06-2017
Department of Biomedical Engineering
Supervisors P.K. Sharma & P. van Rijn

Abstract

Spanningsrelaxatie en kruip komen steeds vaker naar voren als een belangrijke eigenschappen als het gaat om de reactie van cellen op mechanische signalen. De meeste menselijke weefsels en ook materialen die voor regeneratieve doeleinden worden gebruikt zijn namelijk visco elastisch en hebben een mate van spanningsrelaxatie. Om het effect van spanningsrelaxatie op celspreiding, groei en de differentiatie van mesenchymale stamcellen te onderzoeken zijn alginate hydrogelen gemaakt met een spanningsrelaxatie die onafhankelijk van de stijfheid aan te passen is. hydrogelen met een snellere spanningsrelaxatie bevorderen zowel de spreiding als de proliferatie van cellen. Door een RGD peptide toe te voegen werd dit effect nog eens versterkt. Verder vormden mesenchymale stamcellen een gemineraliseerde matrix die lijkt op die van bot bij een stijfheid van 17kPa. In vivo leiden hydrogelen met daarin humane mesenchymale stamcellen met snellere spanningsrelaxatie tot verbeterde osteogenese in ratten. Na drie maanden was er significant meer botgroei in alginate hydrogelen met een snelle spanningsrelaxatie vergeleken met langzamere spanningsrelaxatie met dezelfde stijfheid. Zelfs zonder stamcellen leidde een snellere spanningsrelaxatie tot meer botvorming dan een langzaam relaxende hydrogel met stamcellen. Ook in Polyacrylamide hydrogelen werd er bij versterkte visco-elastische eigenschappen verbeterde differentiatie naar zowel vet- als botcellen gevonden. Deze resultaten laten zien dat spanningsrelaxatie en kruip een belangrijke rol spelen in het sturen van de differentiatie van mesenchymale stamcellen, en hoe deze cellen toegepast kunnen worden in regeneratieve toepassingen zoals de vorming van nieuw botweefsel.

Inhoudsopgave

Abstract.....1
Introductie.....1
Materialen en methoden.....3
Celspreiding en proliferatie.....4
Spanningsrelaxatie reguleert MSC differentiatie.....5
Celactiviteit.....6
Signaaltransductie.....7
Botvorming in vivo.....9
In vitro resultaten.....9
In vivo resultaten.....10
Histologie.....11
Invloed van kruip op MSC differentiatie.....14
Discussie.....16
Literatuurlijst.....18

Introductie

In het veld van biomaterialen komt er steeds meer aandacht voor zogeheten hydrogelen. Deze gels hebben een hoog water gehalte en hebben daardoor eigenschappen die lijken op die van de extracellulaire matrix (ECM). Het grote voordeel van deze hydrogelen zijn dat ze een 3D omgeving kunnen bieden voor omringende cellen, vergeleken met bijvoorbeeld een platte petrischaal met

polystyreen die twee dimensionaal is[1]. Hierdoor geven de hydrogelen een beter model voor de extracellulaire matrix en kunnen ze de cel adhesie ondersteunen door bijvoorbeeld het toevoegen van verschillende ECM eiwitten[2]. Dit geeft een beter inzicht in hoe deze materialen zich in het menselijk lichaam zullen gedragen. Daarnaast is het makkelijk om fysieke en chemische eigenschappen te veranderen aan zowel het oppervlak als de bulk van het materiaal[1].
Het is al lang bekend dat het veranderen van verschillende eigenschappen zoals ruimtelijke structuur, topografie van het oppervlak en mechanische eigenschappen zoals stijfheid de interactie tussen materiaal en cel kunnen beïnvloeden. ECM receptoren reageren op de stijfheid van de matrix en kunnen als mechanoreceptoren mechanische signalen doorgeven naar het cytoskelet en hiermee het celgedrag aanpassen. Hierdoor verandert de manier waarop de cellen groeien, uitspreiden en bewegen[3].
Een ander belangrijk aspect is de biologische afbreekbaarheid van het biomateriaal. Als een materiaal in het lichaam wordt geïmplanteerd reageert het lichaam hier op. Als het materiaal niet op een goede manier afbreekt kan dit blijvende schade toebrengen aan het omringende weefsel. Aan de andere kant zorgt de degradatie van het materiaal ervoor dat de cellen meer ruimte krijgen voor proliferatie en het uitstrekken van de cellen[4]. Dit kan juist helpen om een gunstige reactie van het lichaam uit te lokken bij implantatie van het biomateriaal. Het verschilt dus per toepassing of de afbraak van het materiaal gewenst is.
Hydrogelen worden vaak in twee verschillende categorieën ingedeeld, namelijk natuurlijke en synthetische hydrogelen. Natuurlijke hydrogelen zijn bijvoorbeeld collageen, alginate, hyaloron zuur en chitosan. Zoals de naam al zegt komen deze stoffen uit de natuur of zijn ze van natuurlijke materialen afgeleid. Aan de andere kant heb je de synthetische hydrogelen zoals Poly Ethylene Glycol (PEG), Poly Vinyl Alcohol (PVA) en Polyacrylamide (PAM). Het voordeel van deze hydrogelen is dat vaak ze sterker zijn en betere elastische eigenschappen hebben. Ook is de chemie makkelijker aan te passen[4].
Alginate is een polysaccharide geëxtraheerd uit bruine algen. Het is wijd verkrijgbaar, goedkoop en biocompatibel waardoor het steeds vaker gebruikt wordt. Vaak wordt alginate als een injecteerbare hydrogel toegepast[5]. Door middel van calcium ionen wordt alginate een dichte, driedimensionale structuur. Het grote nadeel van natuurlijke hydrogelen zoals alginate is dat het lastig is om de degradatie te controleren. Ook kan de cel adhesie problemen opleveren[6]. Om de degradatie te voorkomen kan er een hybride worden gemaakt van alginate met poly ethylene glycol diacrylate (PEGDA). De hydrogel krijgt zo een hardheid die groter is dan die van natuurlijk kraakbeen en heeft ook goede elastische eigenschappen. Om de cel adhesie te verbeteren kan gebruik worden gemaakt van een RGD peptide[7]. Deze RGD sequentie is het integrine bindend domein van verschillende ECM eiwitten zoals fibronectine en vitronectine die de adhesie mogelijk maken[8].
Een van de toepassingen van alginate hydrogelen is om ze te gebruiken voor regeneratieve geneeskunde[6]. Miljoenen mensen wereldwijd verliezen of beschadigen weefsel door bijvoorbeeld ongelukken of ziekte. Stamcellen zijn een veelbelovende oplossing voor het genezen van deze beschadigingen. Er zijn verschillende typen stamcellen zoals embryonale stamcellen (ESC), induced pluripotent stemcels (iPS) en mesenchymale stamcellen (MSC). Het laatste type is het wijdst verkrijgbaar voor klinische doeleinden[6]. MSCs worden bij voorbeeld al gebruikt als therapie voor het herstel van defecten in de ruggengraat.
Mesenchymale stamcellen kunnen zowel door biologische cues zoals hormonen en groeifactoren als fysieke cues zoals stijfheid, vorm van het oppervlak en schuifspanning worden beïnvloed zodat hun gedrag kan worden gereguleerd. Door de verandering van de stijfheid kan bijvoorbeeld gestuurd worden of de stamcellen uitgroeien tot zowel vetcellen (adipose) als botcellen (osteogeen)[9].
Aangezien alginate een natuurlijke hydrogel is vertonen ze visco elastisch gedrag. Dit geeft een beter model van het menselijk lichaam omdat de meeste menselijke weefsels zoals hersenen, lever en vetweefsel allemaal visco elastisch zijn en dus spanningsrelaxatie bevatten[10]. Spanningsrelaxatie beschrijft hoe snel een materiaal bij gelijke compressie vermindert in spanning[11]. In een recent onderzoek is beschreven dat alginate hydrogelen met dezelfde stijfheid maar met een variabele spanningsrelaxatie tot grote verschillen leiden bij de differentiatie van MSCs. Dit laat zien dat niet

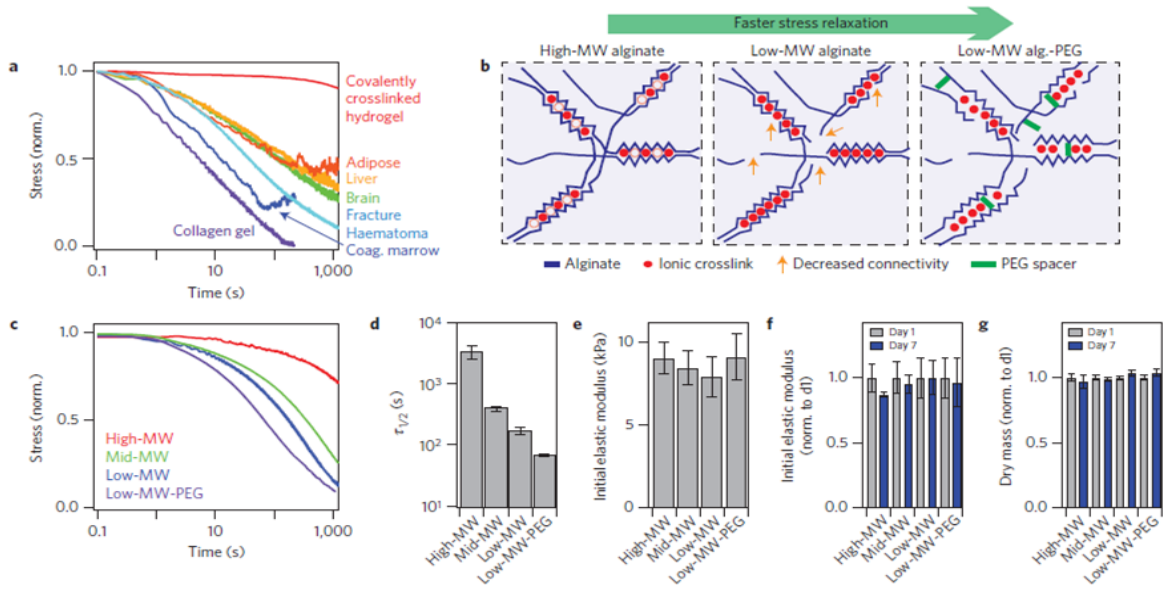
alleen de stijfheid maar ook de snelheid waarmee de spanning op het materiaal afneemt een belangrijke eigenschap is voor de celrespons[10].
In dit artikel wordt beschreven hoe in de eigenschappen van alginate hydrogelen kunnen worden aangepast om met gelijke stijfheid een wisselende spanningsrelaxatie kan worden bereikt. Verder wordt er gekeken naar hoe spanningsrelaxatie celgedrag beïnvloedt. Ten slotte wordt er antwoord gegeven op de vraag wat het effect is van deze wisselende spanningsrelaxatie op de differentiatie van MSCs en de verschillende mechanismen die hierbij betrokken zijn. De hypothese hierbij is dat hoe sneller de spanningsrelaxatie is, des te sneller stamcellen zullen differentiëren aangezien er door de vervorming van het materiaal meer ruimte komt voor celgroei[10]. Verder wordt er nog een toepassing beschreven van deze alginate hydrogelen met wisselende spanningsrelaxatie voor de regeneratie van bot in ratten. Samen geven deze artikelen het belang aan van spanningsrelaxatie als in de differentiatie van MSCs en hoe deze uiteindelijk kunnen worden gebruikt voor regeneratieve toepassingen.

Methoden

Het hoofdartikel (bron 10) werd geleverd door de onderzoeksgroep Biomedical Engineering van de Rijksuniversiteit Groningen. Hierna is gebruik gemaakt van Smartcat van de RUG om op zoek gegaan naar bijpassende literatuur. De eerste zoekterm 'Alginate Stress Relaxation' leverde 266 resultaten op. Het eerste artikel (bron 22) sloot naadloos aan op het hoofdartikel. Het tweede artikel over kruip werd hierin vaak gerefereerd.

Materialen

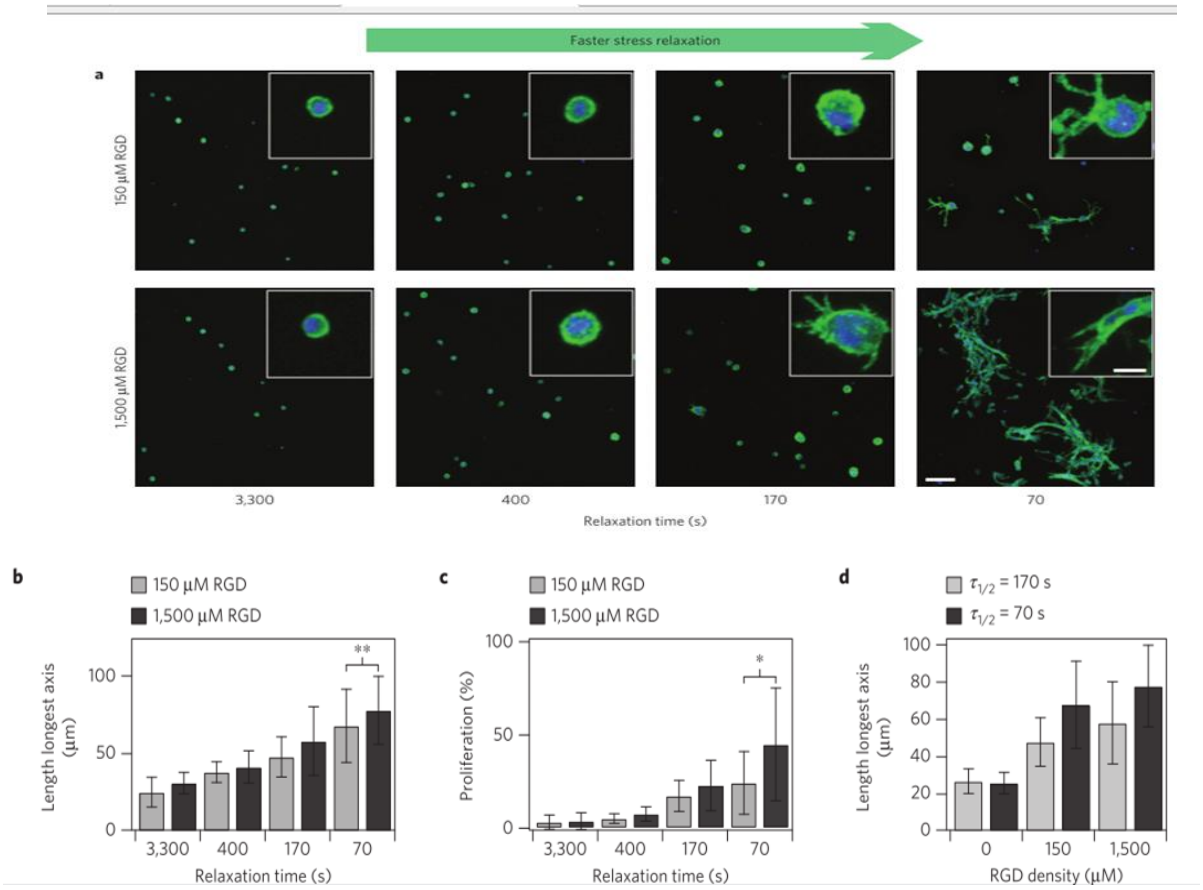
Voor het onderzoek naar het effect van spanningsrelaxatie op de differentiatie van mesenchymale stamcellen werd gebruik gemaakt van een alginate hydrogel aangezien ze niet worden afgebroken door zoogdiercellen[12]. Normaal gesproken hebben alginate hydrogelen minimale eiwit adsorptie waardoor de cel adhesie moeilijk verloopt. Deze adhesie kan worden verbeterd door de hydrogel covalent te binden met een RGD sequentie[8]. Om de spanningsrelaxatie te reguleren werd er normaal gesproken de moleculaire structuur van de crosslinker[13] of de polymeer concentratie[3] veranderd. In dit onderzoek werd een alternatieve manier gebruikt, namelijk door gebruik te maken van hydrogelen met een gelijke concentratie alginate maar met verschillende molecuulmassa's((high, mid en low MW). Als de stijfheid van een hydrogel met een lagere molecuulmassa niet groot genoeg was kon dit worden gecompenseerd door de hoeveelheid calcium te verhogen. Verder werd er gebruik gemaakt van PEG spacers, die covalent werden gebonden aan de hydrogel. Deze zorgen ervoor dat de crosslinking sterisch gehinderd wordt en dus de spanningsrelaxatie nog verder wordt verhoogd(figuur 1b).
In figuur 1c is te zien dat het verlagen van de molecuulmassa van alginate van 280 tot 35kDa leidt tot een groot verschil in spanningsrelaxatie. Spanningsrelaxatie wordt hier weergegeven als t1/2, die laat zien hoe lang het duurt voordat het materiaal de helft van zijn spanning verloren heeft. De t1/2 kan gereguleerd worden van ongeveer een uur tot ongeveer 1 minuut(figuur 1d), wat vergelijkbaar is met die van verschillende weefsels. Cellen beginnen namelijk al met een tijdschaal van enkele minuten[3] met het trekken aan het materiaal en ze spreiden met een tijdschaal van minuten tot uren[14].
De hydrogelen waren stabiel in mechanische eigenschappen over een periode van tenminste zeven dagen (figuur 1e,f). Ook bleef het drooggewicht gelijk(figuur 1g). Samen laat dit zien dat er een verwaarloosbare degradatie van het materiaal was over deze tijdschaal. Hiermee kan worden geconcludeerd dat het is gelukt om alginate hydrogelen te maken met dezelfde beginstijfheid en polymeer concentratie zonder dat het materiaal degradeerde. De enige eigenschap die is veranderd is de spanningsrelaxatie.



Figuur 1
Eigenschappen van alginate hydrogelen. 1a) Verschillende spanningsrelaxatie tijden van menselijke weefsels, een covalent gebonden acrylamide hydrogel en een collageen gel. 1b) Grafische weergave van de opbouw van de verschillende hydrogelen. 1c) Spanningsrelaxatie van verschillende hydrogelen, de spanningsrelaxatie neemt toe bij lagere molecuulgewichten en door de toevoeging van PEG. 1d-g) Spanningsrelaxatie, stijfheden aan het begin en na 7 dagen en drooggewicht van de hydrogelen. Stijfheid en gewicht bleven gelijk na zeven dagen. Data zijn gemiddelden ± standaarddeviatie.[10]

Celspreiding en proliferatie

Met behulp van de bovengenoemde hydrogelen werd het effect van wisselende spanningsrelaxatie op de celspreiding en proliferatie in een 3D omgeving geanalyseerd en er waren duidelijke verschillen. 3T3 fibroblasten werden in de alginate hydrogelen met verschillende spanningsrelaxatie snelheden geplaatst die een beginstijfheid hadden van ongeveer 9kPa. Voor de hydrogelen met een langzamere spanningsrelaxatie (t1/2 ~1 uur) waren zowel de spreiding als de proliferatie van de cellen geremd. Ook hadden de fibroblasten ronde randen, vergelijkbaar met cellen die zich op een niet afbreekbare, elatische hydrogel bevinden[10].
De hydrogelen met een snellere spanningsrelaxatie hadden zowel een verhoogde spreiding als proliferatie. Door het verhogen van de RGD concentratie wordt dit effect nog verder vergroot. Dit geeft aan dat het effect van spanningsrelaxatie gemedieerd wordt door adhesies met intergrines. Deze verhoging van de proliferatie en celspreiding komt dus alleen door veranderen van de spanningsrelaxatie, aangezien zowel de concentratie alginate als de beginstijfheid gelijk zijn gebleven. De RGD concentraties waren ook constant, namelijk 0, 150 of 1500 µM. De drastische verandering van vorm van de fibroblasten in de sneller relaxende hydrogelen suggereert dat de cellen mechanisch de structuur van de hydrogelen hebben aangetast. De hydrogelen zijn nanoporeus en niet afbreekbaar, dus de proliferatie en celspreiding moeten wel door de vervorming van de hydrogel zijn verbeterd[10].

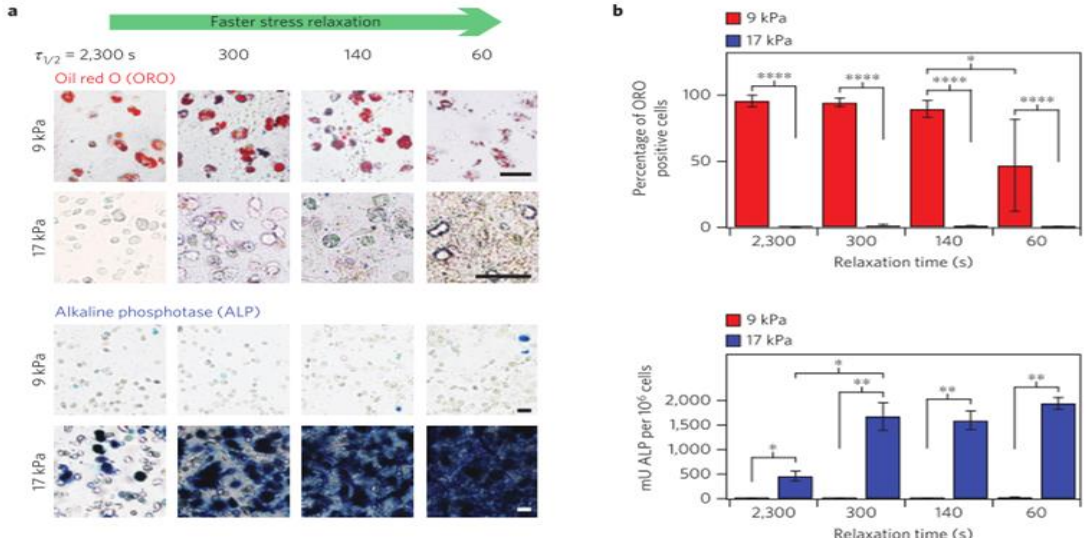


Figuur 2
2a) 3T3 fibroblasten in een alginate hydrogel met verschillende spanningsrelaxatie tijden. Blauw gekleurd is de celkern, groen de actine na zeven dagen. Schaal is 100µm voor de witte balk, 20µm voor de ingezoomde weergave. 2b) Kwantificatie van de langste 3T3 fibroblast in de bovengenoemde condities. Lengte neemt significant toe met snellere spanningsrelaxatie. 2c) Kwantificatie van de proliferatie van 3T3 fibroblasten. Proliferatie neemt toe met snellere spanningsrelaxatie. 2d) Lengte van de langste fibroblasten in de twee snelst relaxende hydrogelen bij verschillende RGD concentraties. De spreiding neemt significant toe bij een hogere RGD concentratie.[10]

Spanningsrelaxatie reguleert MSC differentiatie

Vervolgens werd gekeken naar de invloed van substraat spanningsrelaxatie op de differentiatie van D1 MSCs uit muizen in een 3D culture. Eerder onderzoek heeft al aangetoond dat D1 MSCs en humane MSCs in ionisch gecrosslinkte alginate hydrogelen vooral adipogene cellen differentiatie ondergaan bij stijfheden tussen 1 en 10kPa en juist osteogene differentiatie tussen 11 en 30kPa[15]. Een aanname die wordt gemaakt is dat cellen gedurende de tijd de stijfheid verlagen. Als dit zo is dan zou bij een snellere spanningsrelaxatie bij een stijfheid van 11-30kPa een lagere osteogene differentiatie plaatsvinden, aangezien de stijfheid sneller naar beneden gaat. Om dit te testen werden MSCs in alginate hydrogelen geplaatst met verschillende spanningsrelaxatie tijden (2300, 300, 140 en 60 seconden) en verschillende beginstijfheden (9kPa en 17kPa). Bij een stijfheid van 9kPa differentieerden de MSCs voornamelijk naar vetcellen, aangegeven met een Oil Red O (ORO) kleuring voor neutrale vetten en een alkaline phosphatase kleuring voor botcellen(figuur 3a). De hoeveelheid adipogenese was lager bij de snel relaxende hydrogelen van 60 seconden. Wanneer de stijfheid werd verhoogd naar 17kPa was er geen adipogene differentiatie meer te zien en dus alleen maar osteogene(figuur 3b). Ook was in dit geval de osteogene differentiatie juist versterkt bij een

snellere spanningsrelaxatie. Dit is juist het tegenovergestelde van wat verwacht was, want als de cellen de stijfheid van de hydrogel zouden verlagen zou er juist meer adipogenese en minder osteogenese verwacht worden bij snellere spanningsrelaxatie. De calcium crosslinker had geen invloed op de differentiatie, zoals ook al eerder aangetoond was[15]. Ook bij dit experiment zorgen een snellere spanningsrelaxatie voor een grotere hoeveelheid spreiding bij de MSCs, net als bij de 3T3 fibroblasten. Na een periode van zeven dagen waren er wel meer cellen aanwezig in de stijvere hydrogelen van 17kPa, maar dit zou ook kunnen komen doordat botcellen sneller groeien dan vetcellen. De vorm van de cellen was echter wel gelijk bij de langzaam relaxende hydrogelen van 9kPa en 17kPa. Ook was de vorm van MSCs in de 17kPa hydrogelen met 2300 en 300 seconden vergelijkbaar terwijl er weer meer osteogenese plaatsvond. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de vorm van de cellen los staat van de differentiatie en groei, wat ook al bekend was[15].



Figuur 3
3a) ORO en ALP kleuringen voor adipose (rood) en osteogene (blauw) differentiatie na zeven dagen bij een RGD concentratie van 1500µM. De schaal is 25 µm. 3b) Kwantitatieve weergave van de hoeveelheid ORO (rood) en ALP (blauw) voor 9kPa en 17kPa na zeven dagen. ORO was verwaarloosbaar bij 17kPa en ALP bij 9kPa. Osteogene differentiatie neemt sterk toe bij verhoogde spanningsrelaxatie.[10]

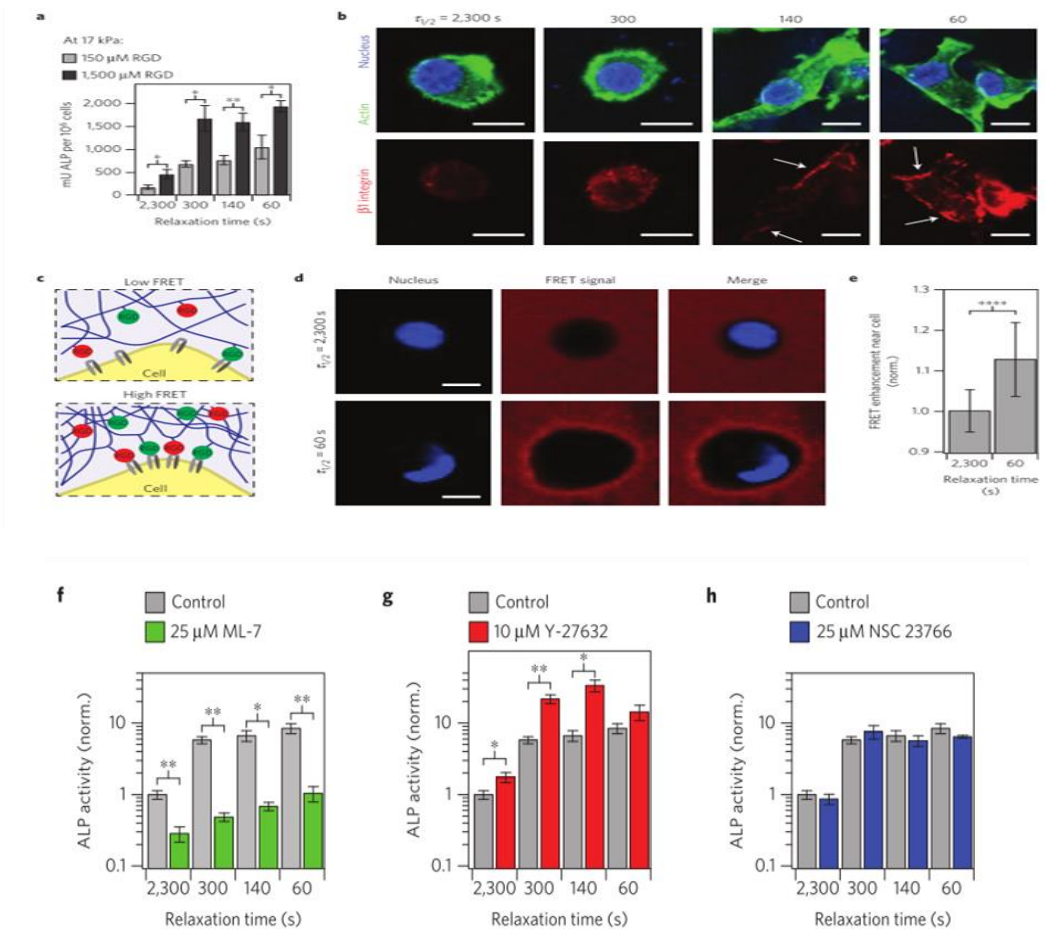
Celactiviteit

Naast het analyseren van de differentiatie is ook de activiteit van de osteogene cellen bekeken. Er zijn al onderzoeken geweest naar osteogene differentiatie van MSCs van langzaam relaxende hydrogelen en voor alginate[15], PEG[16] en hyaluronzuur[17] hydrogelen was die ook aanwezig. Alleen was er hier nog geen sprake van een verbonden, gemineraliseerd en collageen-I rijk netwerk. Samen zijn dit de drie hoofdonderdelen van bot. Om deze aan te tonen zijn hier een Von Kossa kleuring, immunohistochemie en energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) toepast. Zowel de mineralisatie als de hoeveelheid collageen type I waren hoger in de hydrogelen met snellere spanningsrelaxatie na 14 dagen. Ook vormden de MSCs een matrix die lijkt op die van botweefsel in snel relaxende hydrogelen met tijden van ~1 min. Dit is ook de tijdschaal die vergelijkbaar is met die van het uitbarsten van een hematoom bij een breuk en van de formatie van callus[18]. Dit laat zien dat de snel relaxende hydrogelen niet alleen maar de hoeveelheid osteogene cellen bevorderen maar ook de formatie van bot verbeteren in de osteogeen gedifferentieerde stamcellen.
Hierna is gekeken naar het mechanisme van de spanningsrelaxatie dat deze grote veranderingen teweegbrengt. Cellen reageren op mechanische cues in de ECM door te binden aan ECM liganten. Om deze binding te analyseren werd het effect van een wisselende RGD concentratie op de MSC differentiatie bekeken. Bij een lagere concentratie RGD (150 µM) vond al een vermeerderde osteogene differentiatie plaats bij hydrogelen met een stijfheid van 17kPa. Dit effect was alleen nog

veel sterker wanneer de concentratie werd verhoogd naar 1500 µM (figuur 4a). Dit laat zien dat het effect van spanningsrelaxatie op osteogene differentiatie door ECM liganten geregeld wordt. Cellen binden aan de ECM door middel van integrine receptoren[19]. Door β1 integrines te localiseren met behulp van een antilichaam is hier aangetoond dat in de snel relaxende hydrogelen er meer β1 integrines zichtbaar waren. Er was echter geen paxillin rond de cellen gevonden, wat aangeeft dat er geen normale focal adhesions zijn gevormd in alle hydrogelen[20]. Zoals al eerder aangetoond is het clusteren van liganten geassocieerd met osteogene differentiatie. Deze clustering is hier bekeken met behulp van een Förster resonance energy transfer (FRET) techniek. FRET wordt gebruikt om de afstand (vaak op nanoschaal) tussen een donorende en een ontvangende fluorofoor te meten[21]. Het wordt vaak toegepast om informatie over de conformatie van eiwitten te verkrijgen. FRET tussen fluorescent- en carboxytetramethylrhadamine (TAMRA)- gelabelde RGD gebonden aan de hydrogelen met MSCs werden hierna bekeken door een confocale microscoop. Er was een hogere hoeveelheid energy transfer in de omgeving rond de MSCs bij de sneller relaxende hydrogelen vergeleken met de langzamere over een periode van 18 uur. Het FRET signaal was rond het hele omgevende gebied van de cellen sterker in de sneller relaxende hydrogelen, alhoewel er in sommige gevallen een meer asymmetrische verdeling was. Aangezien het FRET signaal een zeer sensitieve meting is van afstand van de sturende en ontvangende fluoroforen laat dit zien dat RGD liganten op een nanoschaal clusteren bij de sneller relaxende hydrogelen van 17kPa. Dit effect was ook te zien in de hydrogelen met een stijfheid van 9kPa, alleen was de energy transfer hier significant minder dan bij de stijvere hydrogelen.

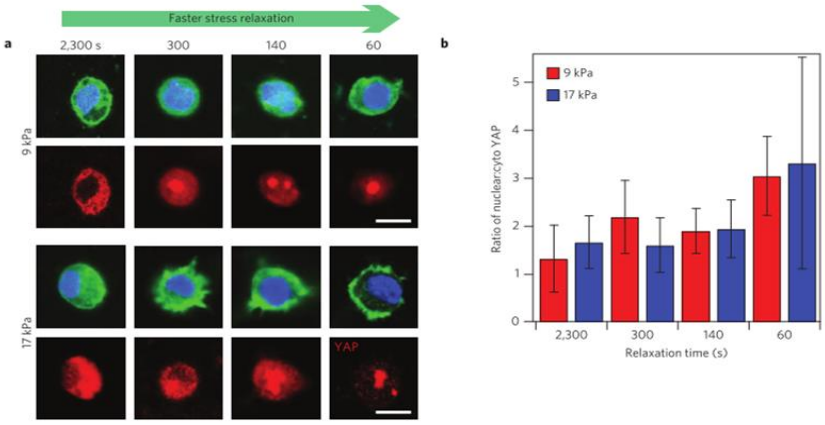
Signaaltransductie

Het binden en clusteren van integrines activeert de signaaltransductie. Dus is er hier gekeken naar de rol die deze transductie speelt bij de osteogenese in hydrogelen met verschillende spanningsrelaxatie tijden. Er is al eerder aangetoond dat cellen de stijfheid van de ECM kunnen voelen doormiddel van de contractie van actomyosine[22]. Vaak gebeurt dit door de activatie van de Rho signalling pathway. Ook voelen cellen de loss modulus (visceuse component van spanningsrelaxatie) van een 2D acrylamide substraat door activatie van de Rac signalling pathway[3]. Hier zijn de myosine, de Rho en de Rac1 geremd in de MSCs die in de hydrogelen met een stijfheid van 17kPa zaten om te kijken of deze pathways betrokken waren bij de osteogenese. De myosine light chain kinase werd geremd met ML-7 (inhibitor voor light chain kinase) en dit zorgde voor verminderde osteogenese(figuur4f). Myosine is dus betrokken bij de verbeterde osteogenese in de sneller relaxende hydrogelen. Inhibitie van Rho met Y-27632 zorgde juist voor een versnelde osteogenese bij drie van de vier verschillende spanningsrelaxatie tijden(figuur 4g). Inhibitie van Rac1 met NSC23766 zorgde niet voor een significant effect op de osteogenese(figuur 4h).



Figuur 4
4a) Kwantificatie van ALP activiteit ten opzichte van RGD concentratie na zeven dagen bij een stijfheid van 17kPa. 4b)Immunofluorescente kleuring voor actine (groen), kern(blauw) en β1 integrine(rood) in MSCs na zeven dagen. 4c) Schematische weergave van FRET om de RGD clustering te monitoren. 4d) Confocale microscopie plaatjes van de cel kernen (blauw/DAPI) en het FRET ontvanger signaal (rood). 4f-g) ALP activiteit van actomyosine, Rho en Rac1 voor verschillende spanningsrelaxatie tijden.[10]

Ten slotte is de rol van de YAP transcriptie regulator onderzocht. YAP staat bekend als een van de belangrijkste elementen die de genexpressie van cellen op mechanische en geometrische cues reguleert[23]. De lokalisatie van YAP leidde al eerder tot MSC differentiatie van adipose of osteogene celllen voor MSCs in 2D acrylamide substraten met verschillende stijfheden[24]. Hier is de hoeveelheid translocatie van YAP hoger bij hydrogelen met snellere spanningsrelaxatie voor beide stijfheden(figuur 5b). Matrix spanningsrelaxatie heeft dus invloed op de activiteit van de transcriptie factoren. De hoeveelheid nucleaire YAP was interessant genoeg vergelijkbaar bij de twee verschillende stijfheden. Aangezien adipose differentiatie vooral optreed bij de 9kPa hydrogelen en osteogene differentiatie bij de 17kPa hydrogelen kan hieruit worden geconcludeerd dat alleen de hoeveelheid YAP niet leidend is voor de differentiatie van MSCs in 3D omgevingen.



Figuur 5
5a) Immunofluorescente kleuring voor actine (groen), celkern (blauw) en YAP (rood) in MSCs na een week. Schaal is 10µm. 5b) Kwantificatie van de ratio tussen nucleaire YAP en YAP in het cytoskelet. Nucleaire YAP neemt toe met snellere spanningsrelaxatie voor beide stijfheden.

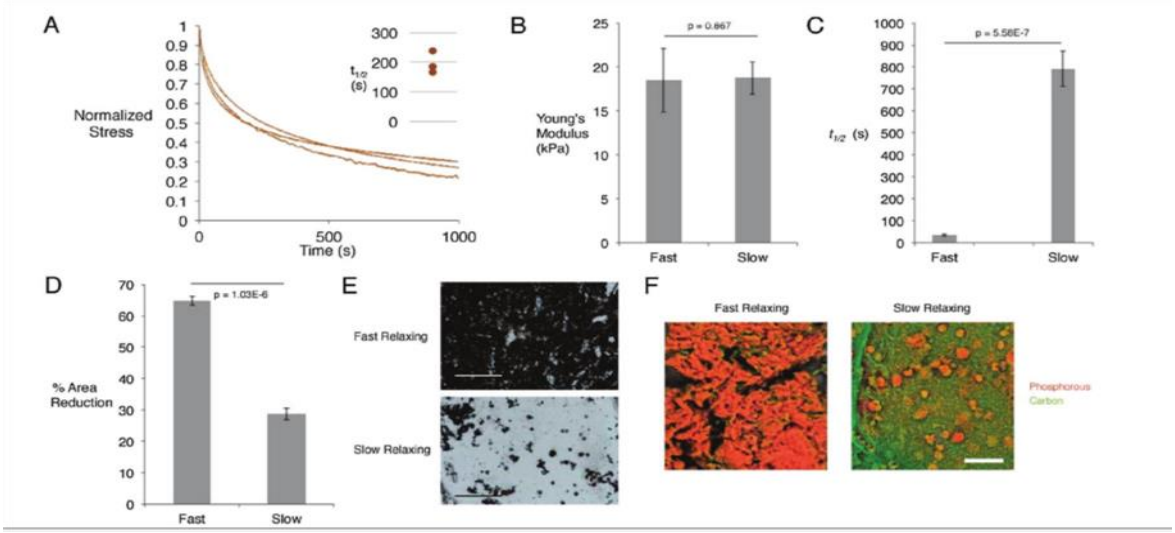
Botvorming in vivo

Om het effect van wisselende spanningsrelaxatie op de osteogenese in een verder stadium te onderzoeken zijn er inmiddels ook dierproeven gestart. Een recente studie heeft humane mesenchymale stamcellen (hMSCs) in alginate hydrogelen met verschillende spanningsrelaxatie tijden geplaatst en daarna geïmplanteerd in defecte schedels van ratten[25]. Om het effect van deze snel relaxende hydrogelen te onderzoeken werden ook dezelfde hydrogelen in de schedels geplaatst maar dan zonder hMSCs. Zoals al eerder genoemd kan de wisselende spanningsrelaxatie in vitro de differentiatie van MSCs naar osteogene cellen reguleren[10], alleen is dit nog niet voor hMSCs getest of in een in vivo omgeving. Ook hier zijn alginate hydrogelen met een calcium crosslinker gebruikt omdat hiermee de stijfheid en de spanningsrelaxatie onafhankelijk van elkaar kunnen worden aangepast. De alginate hydrogelen werden gemaakt met een beginstijfheid iets lager dan de optimale stijfheid voor osteogene differentiatie in MSCs[15]. Dit werd gedaan zodat de cellen alleen werden blootgesteld aan het effect van de spanningsrelaxatie, en dat de stijfheid dus niet de overhand had qua mechanische eigenschappen. Deze hydrogelen waren ook gemodificeerd met een RGD peptide om de celadhesie te verbeteren. Verder bevatten ze geen groeifactoren of andere oplosbare factoren. Dit specifieke model voor de regeneratie van bot was gekozen omdat deze al vaker gebruikt is binnen dit veld en dit de mogelijkheid gaf om defecten te genezen zonder externe stabilisatie[26].
Na de explantatie waren er bij de hydrogelen met snelle spanningsrelaxatie tijden meer bot gevormd dan bij de implantaten met langzamere spanningsrelaxatie. Ook was er een sterkere hervorming van de matrix en was er minder van de hydrogel meer aanwezig bij de snel relaxende hydrogelen. Door het genezingsproces te analyseren werd duidelijk dat de snel relaxende hydrogelen dramatisch werden hervormd gedurende de eerste twee weken. Ook in vitro onderzoeken hebben al laten zien dat cellen beter in staat zijn om in snel relaxende hydrogelen te migreren. Dit biedt een nieuwe methode om de infiltratie van scaffolds te reguleren zonder de degradatie of porositeit aan te passen. Spanningsrelaxatie blijkt wederom een belangrijke invloed te hebben op de regeneratie van bot.

In vitro resultaten

Eerst werd onderzocht of de natuurlijke omgeving van de botgenezing, het hematoom, zelf spanningsrelaxatie bevat om uit te zoeken of deze toepassing wel fysiologisch relevant is. Humane hematomen waren uit de kliniek ontvangen van volwassen donoren en door middel van een compressie test onderzocht. De hematomen hadden een gemiddelde spanningsrelaxatie tijd van 195 seconden. De hematomen hebben dus een snelle spanningsrelaxatie die met de alginate hydrogels te simuleren is(figuur 6a).
Alginate hydrogelen met een hoge of lage molecuulmassa werden gebruikt om verschillende spanningsrelaxatie tijden te verkrijgen. Eerst waren de mechanische eigenschappen en de impact

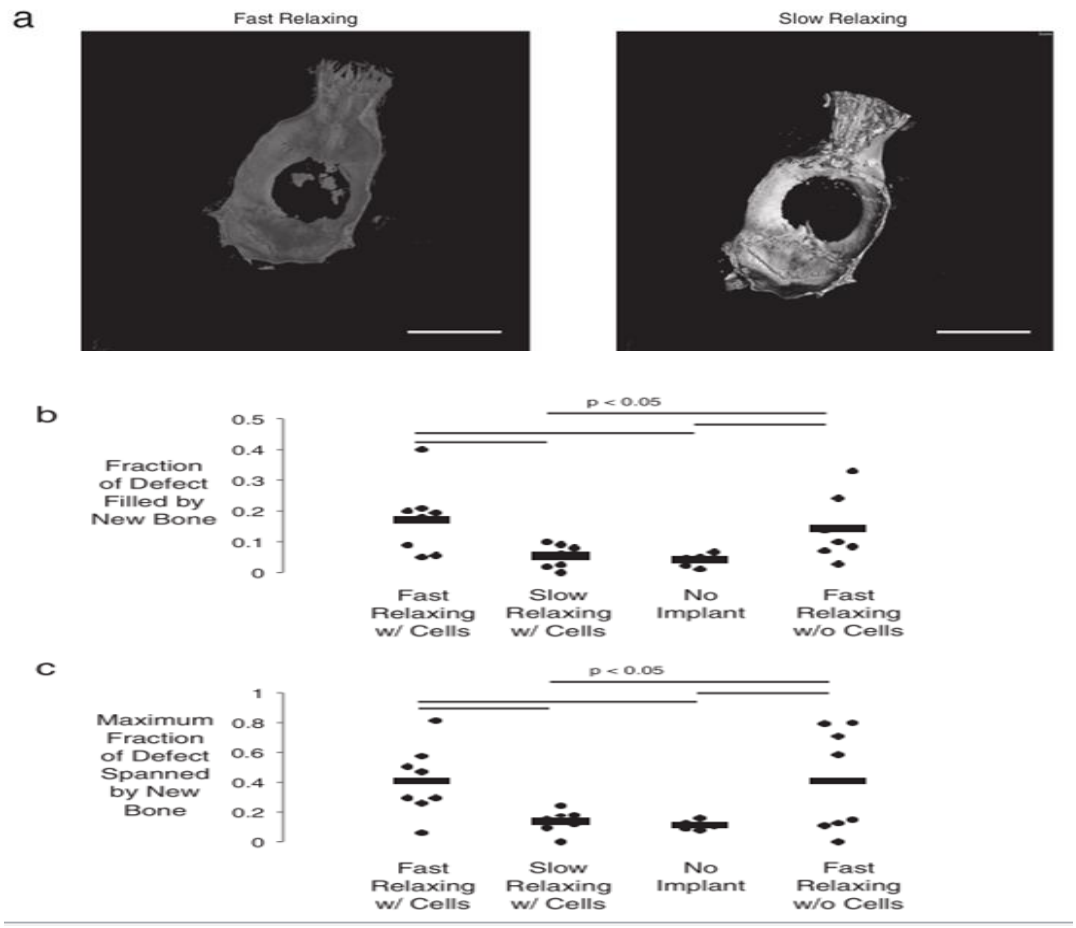
van deze hydrogelen op hMSCs in vitro getest. Compressie testen lieten zien dat er geen significant verschil in stijfheid was tussen de snel en langzaam relaxende hydrogelen (figuur 6b). Zoals verwacht hadden de hydrogelen met een hoge molecuulmassa een langzamere spanningsrelaxatie dan die met een lage molecuulmassa (figuur 6c).
Hierna werden hMSCs in de twee typen alginate hydrogelen geplaatst en voor twee weken in osteogeen inductie medium gehouden. Snel relaxende hydrogelen (t1/2 = 50s) lieten significant meer contractie zien dan langzaam relaxende hydrogelen(t1/2 = 800s). Ook werd er met behulp van een von Kossa kleuring meer matrix depositie en mineralisatie voor de snel relaxende hydrogelen gevonden(8). Dit geeft aan dat er osteogene differentiatie van hMSCs heeft plaatsgevonden(figuur 6d,e). Om de verhoogde mineralisatie te bevestigen werd er energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) toegepast het fosfor in de hydrogelen te laten zien. Er werd meer fosfor gevonden in de snel relaxende hydrogelen, consistent met de von Kossa kleuring. Dit wijst wederom op een verhoogde osteogene differentiatie en grotere mineraal depositie(figuur 6f).



Figuur 6
6a) Spanningsrelaxatie meting van humane hematomen met behulp van een compressie test bij 15% constante spanning. 6b,c) Stijfheden(kPa) en spanningsrelaxatie(t1/2) van lage en hoge concentratie alginate hydrogelen bij 15% constante spanning. 6d) Contractie van hydrogelen met MSCs na twee weken implantatie. 6e) Von Kossa kleuring voor MSCs in osteogeen inductie medium na twee weken voor matrix mineralisatie. Schaal is 300 µm. 6f) EDS maps voor fosfor in snel en langzaam relaxende gels na twee weken. Oranje is fosfor depositie, groen is voor koolstof.[25]

In vivo resultaten

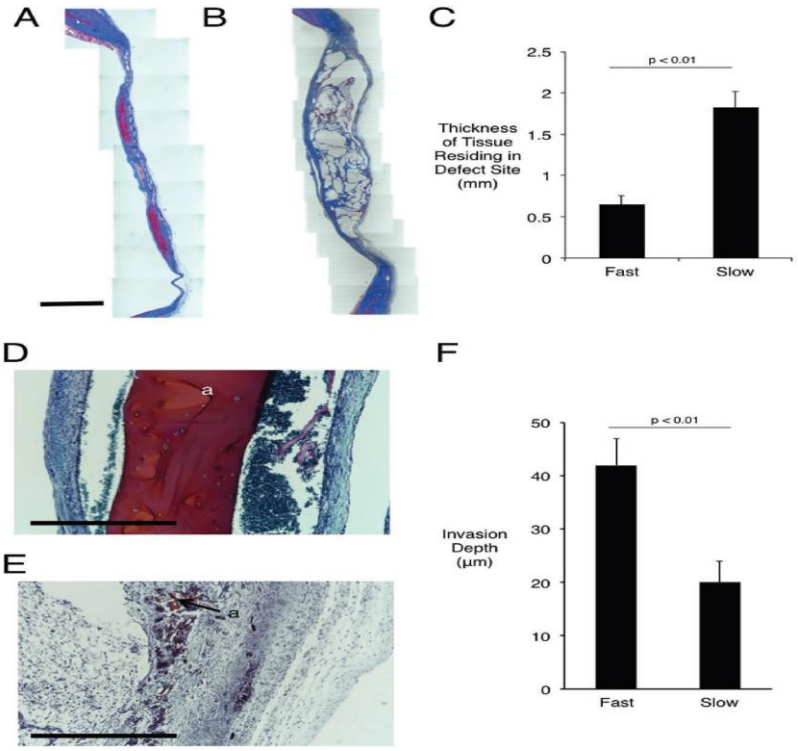
Om de in vivo effecten van spanningsrelaxatie te onderzoeken werden beide typen hydrogelen met hMSCs en een snel relaxende hydrogel zonder cellen geïmplanteerd in een RNU rat. Ter controle werd er een rat zonder behandelmethode gevolgd. Deze ratten hadden een defect van 8mm in hun schedel. De langzaam relaxende gels waren niet gebruikt om diermisbruik te voorkomen, aangezien in vitro al was aangetoond dat de cellen in deze hydrogelen geen optimaal resultaat leveren[27]. Na drie maanden werden de ratten geëuthanaseerd en werden hun schedels verwijderd. De schedels werden hierna met behulp van een X-ray microcomputed tomography (µCT) geanalyseerd. Er was een kwantitatief significant verschil gevonden in het volume van nieuwe bot in de hydrogelen met een snelle spanningsrelaxatie vergeleken met de hydrogelen met een langzamere spanningsrelaxatie. De lege controle liet bijna geen regeneratie zien. Opvallend was dat de snel relaxende hydrogelen zonder cellen bijna net zo veel botgenezing hadden als die zonder cellen(figuur 7b,c).



Figuur 7
7a)µCT plaatjes van ratten schedels drie maanden na implantatie. Schaal is 1cm. 7b) Maximale fractie van het defect gevuld door het nieuwe bot voor de vier beschreven methoden. 7c)Fractie van het gebied van het originele defect dat nu met nieuw bot is gevuld na drie maanden.

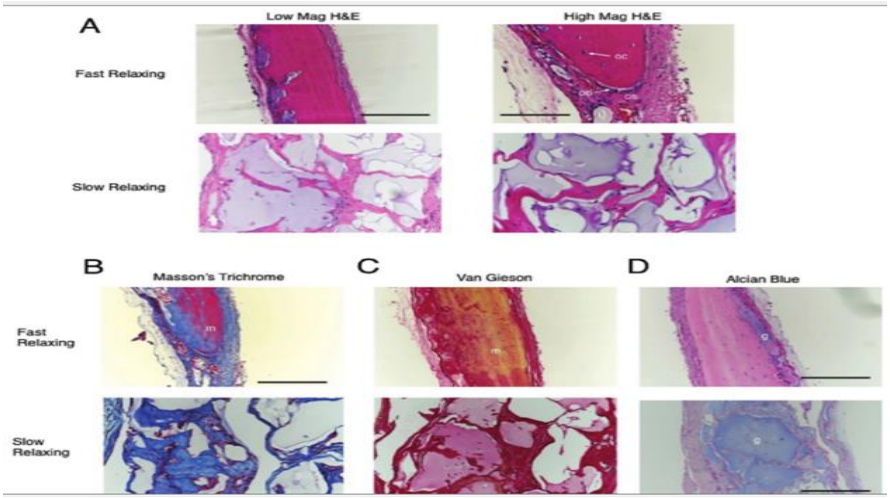
Histologie

Verder was er nog gekeken naar de histologie van de defecten om de structuur van het nieuwe bot te bekijken. Masson's Trichroom kleuring liet zien dat er een verschil in dikte was van het weefsel in het defect, waar deze in langzaam relaxende hydrogelen bijna twee keer zo dik was(figuur 8a-c). Om te meten wat voor effect het verlies van hydrogel heeft op deze diktes waren de de snel- en langzaam relaxende hydrogelen na twee weken verwijderd. Safranin O kleuring werd gebruikt om de alginate te kleuren. In de langzaam relaxende hydrogel was deze nog intact, maar in de snel relaxende gel had er een drastische hervorming van de matrix plaatsgevonden. Ook was er fibreus weefsel gevormd waardoor de alginate bijna helemaal verdwenen was(figuur 8d,e). Als hypothese werd hier gesteld dat dit effect zou kunnen komen doordat omliggende cellen beter de scaffold konden infiltreren. Om dit te testen waren fibroblasten bovenop de hydrogelen geplaatst en na een week werd duidelijk dat de cellen bijna twee keer zo diep kwamen in de sneller relaxende hydrogelen(figuur 8f). Een snellere spanningsrelaxatie helpt de cellen dus om de scaffold binnen te dringen en te vervormen.



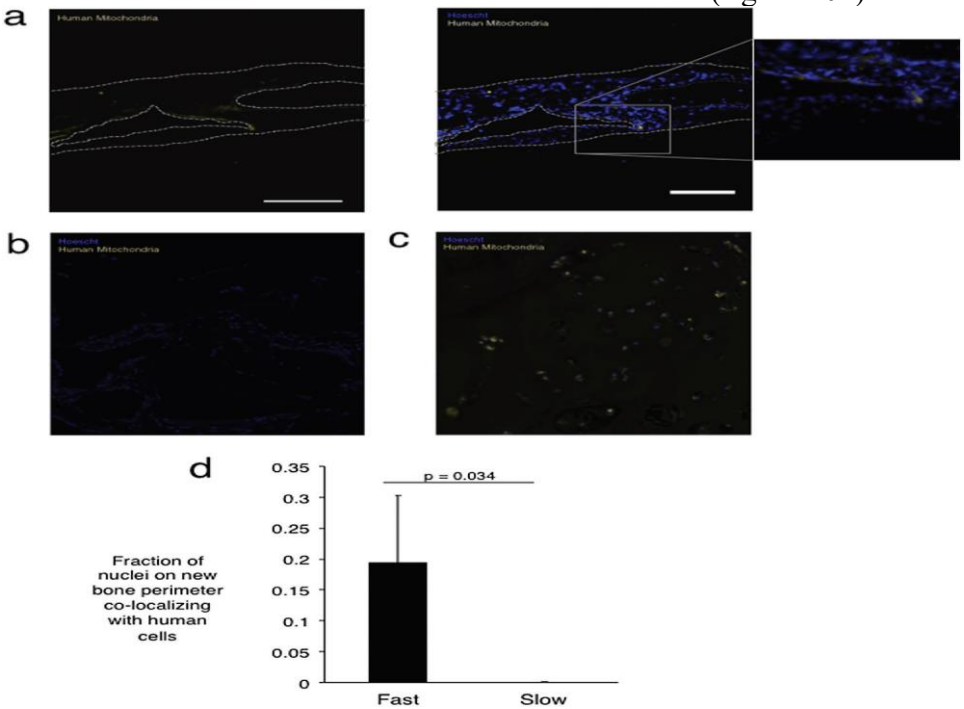
Figuur 8
8a,b) Masson's Trichroom kleuring voor snel (8a) en langzaam(8b) relaxende hydrogelen. Schaal is 2mm. 8c) Dikte van overgebleven defecten voor langzaam en snel relaxende gels. 8d,e) Safrin O kleuring voor snel(8d) en langzaam (8e) relaxende hydrogelen twee weken na implantatie. 8f) kwantificatie van fibroblast infiltratie in langzaam en snel relaxende hydrogelen een week na plaatsing op de oppervlakte van de hydrogel.

Hematoxylin en eosin (H&E), von Gieson en Masson's Trichroom kleuringen werden gebruikt om de hydrogelen na drie maanden te kleuren. Deze lieten zien dat het nieuwe botweefsel volwassen en collageen rijk was in de snel relaxende hydrogelen. Verder waren er verlengde osteoblasten te zien aan de buitenkant van het nieuwe bot. De langzaam relaxende hydrogelen hadden juist collageen dat dun en verspreid was. Ook was er minder botvorming in het centrum en minder volwassen bot(Figuur 9a-c). Alcian Blue kleuring was hierna toegepast om de hoeveelheid overgebleven alginate aan te tonen. In de snel relaxende hydrogelen was bijna geen hydrogel meer te zien waar er bij de langzamere hydrogelen juist significant meer alginate overbleef(figuur 9d). Samen met de grotere dikte van de defecten voor de langzaam relaxende hydrogelen laat dit zien dat ook tussen de periode van twee weken tot drie maanden er grote verschillen zijn in de hervorming van de hydrogelen.



Figuur 9
9a) H&E gekleurde preparaten uit de snel en langzaam relaxende hydrogelen voor osteoid en nieuw bot. 9b) Masson's Trichroom kleuring voor volwassen bot. 9c) Von Gieson kleuring voor volwassen bot en collageen. 9d) Albican blue kleuring voor overgebleven alginate.

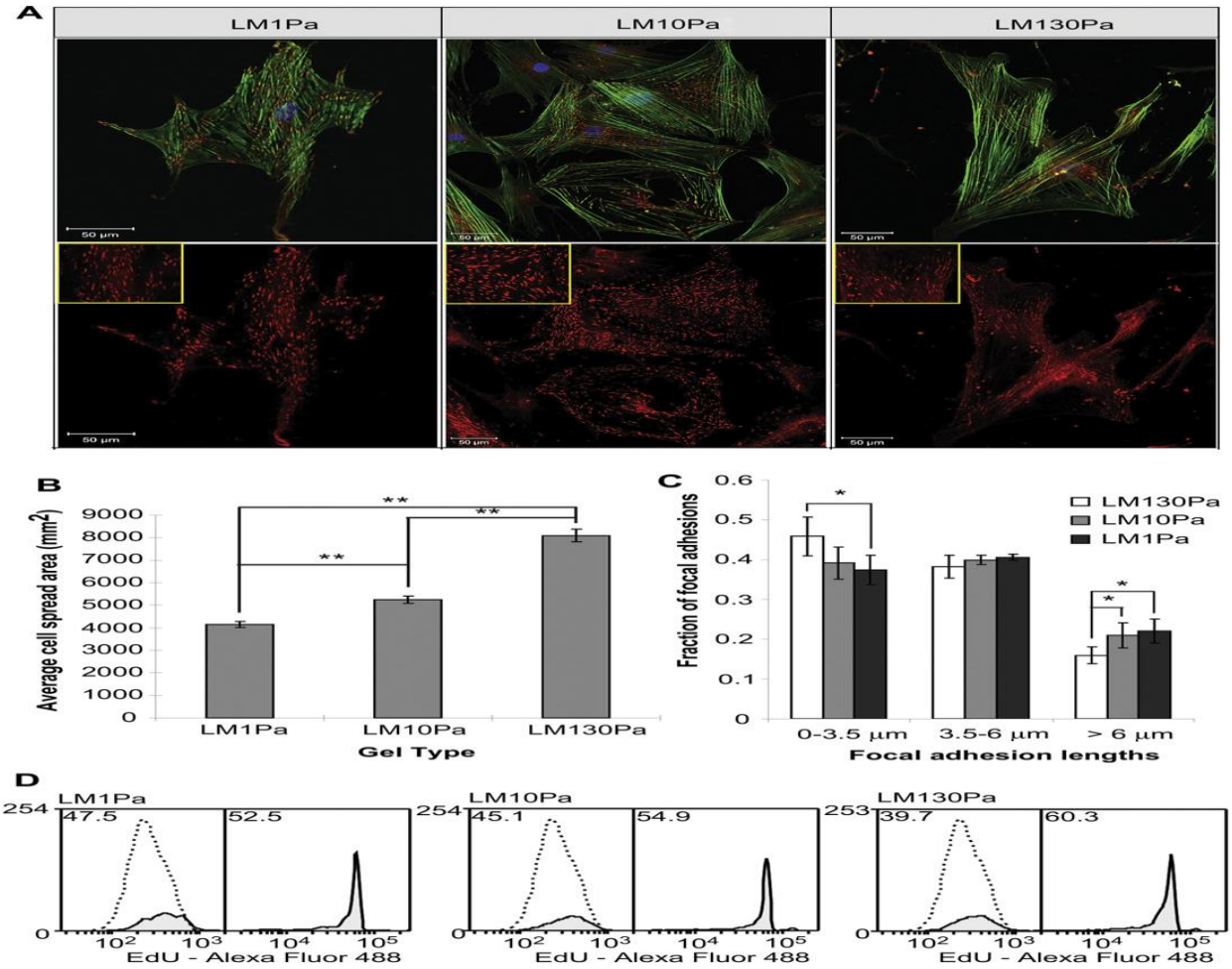
Ten slotte werd er nog gekeken naar de relatieve contributie van de menselijke cellen ten opzichte van die van de rat. Dit geeft weer hoe goed de hervorming van het weefsel daadwerkelijk te wijden is aan de getransplanteerde cellen. Hiervoor werden de mitochondria van de humane cellen gekleurd om de getransplanteerde cellen aan te tonen. Humane cellen waren in de langzaam relaxende gels vrijwel helemaal afwezig, waar in de snel relaxende gels er nog wel humane cellen om het nieuwe botweefsel werden aangetroffen. Door de cellkernen te tellen werd duidelijk dat 20 ± 11% van de cellen rond het nieuwe weefsel vanuit de mens kwamen(figuur 10d)



Figuur 10
10a) Gekleurde humane mitochondria in snel relaxende hydrogelen laat de humane cellen zien. De rechter afbeelding laat een overlay van de mitochondria en celkernen samen zien.
10b) Langzaam relaxende hydrogelen met mitochondria kleuring laten geen humane cellen zien.
10c) Positieve controle voor humane mitochondria in het humane bot. 10d) Fractie van humane celkernen rond het nieuwe bot in de snel relaxende hydrogelen.

Invloed van kruip op stamcel differentiatie

Een andere visco-elastische eigenschap dan spanningsrelaxatie is creep (kruip). Het verschil is dat bij spanningsrelaxatie de deformatie gelijk blijft en de spanning na verloop van tijd afneemt. Bij kruip blijft de spanning echter gelijk en neemt de deformatie juist toe. Zoals de naam al zegt bestaat visco-elasticiteit uit een elastisch deel en een visceus en een elastisch deel. Deze worden weergeven als een storage modulus (G') voor het elastische deel en een loss modulus (G'') voor het visceuze deel[3]. In eerdere studies lag de focus vooral op effect van het elastische deel op celgedrag en niet zo zeer op het visceuze deel. In het volgende onderzoek zijn polyacrylamide (PAM) hydrogelen toegepast om de loss modulus onafhankelijk van de storage modulus aan te passen en het effect hiervan op hMSC te bestuderen. PAM hydrogelen worden al langer toegepast om het effect van mechanische eigenschappen op celgedrag te bekijken. Om de loss modulus te veranderen zijn hier de concentraties van het acrylamide monomeer en bis-acrylamide crosslinker te veranderen is het gelukt om hydrogelen te maken met een vrijwel gelijke storage modulus en een verschil in loss modulus. De hydrogelen hadden een storage modulus van ongeveer 4.7kPa met een standaarddeviatie van 10% maar wisselende loss moduli van 1 Pa, 10Pa en 130Pa. De kruip werd hierna geanalyseerd door een schuifspanning op deze gels aan te brengen en deze voor een langere periode vast te houden. De kruip nam toe wanneer de loss modulus ook verhoogd was, met een variatie in de orde van de tweede macht. De deformatie was gelijk voor de drie verschillende hydrogelen bij een gelijke spanning, dus de storage modulus was inderdaad gelijk gebleven. Met deze hydrogelen werden vervolgens morfologie, lengte van focale adhesies, proliferatie en differentiatie onderzocht[3].
Celspreiding van de hMSCs werd 48 uur na zaaiing bekeken. De cellen waren volledig gespreid en gehecht aan de drie verschillende hydrogelen. De gemiddelde spreiding was groter wanneer de loss modulus toenam(figuur 11b). Het verschil in oppervlakte tussen LM1Pa en LM130Pa was ongeveer 4000µm, vergelijkbaar met hoe cellen spreiden bij een verschil in stijfheid van 1-10,000Pa[28]. Hieruit kan dus worden geconcludeerd dat cellen gevoeliger zijn voor een verschil in loss moduli dan in storage moduli.
Door een vinculine immunokleuring in hMSCs werden zowel de formatie als de maturatie van focale adhesies(FA's) bekeken. Bij de hogere loss moduli waren er meer kortere FA's aanwezig en minder langere(figuur 11c). Kortere FA's zijn vaak nog niet volwassen, wat suggereert dat een hogere loss modulus de formatie van volwassen FA's vermindert. Dit is tegenstrijdig met eerder onderzoek waar er alleen naar de stijfheid werd gekeken. Hier kwam namelijk naar voren dat de meest uitgespreide cellen ook de grootste hoeveelheid volwassen FA's bevatten[28]. Hierbij wordt gesuggereerd dat door de deformatie over tijd (kruip) in de gel de cellen hun grip verliezen en dus constant hun periferie moeten aanpassen om grip te blijven houden op de hydrogelen.
Proliferatie werd door middel van flowcytometrie geanalyseerd om de hoeveel EdU (5-ethynyl-2´-deoxyuridine) te bepalen in de hMSCs. hMSCs op de 130Pa loss modulus gelen hadden een hogere mate van proliferatie na 24 uur, namelijk 60.3% waar de 10Pa en 1Pa maar 54.9% en 52.5% proliferatie hadden(figuur 11d).

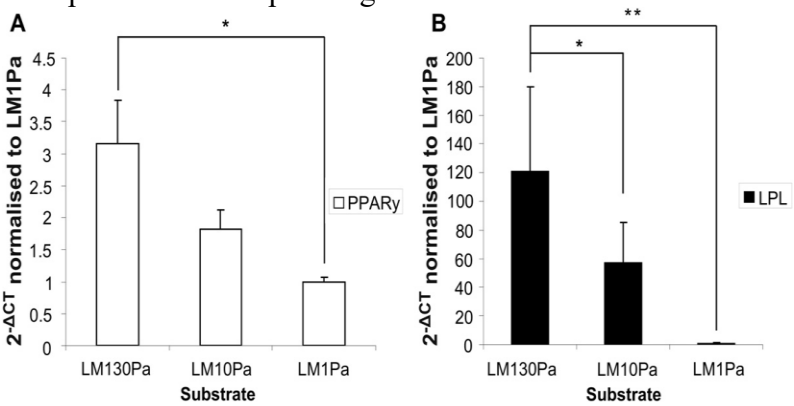


Figuur 11, Spreiding, FA lengte en proliferatie
11a) hMSCs op gels met wisselende loss moduli. Kleuringen voor actine (groen), kern(blauw) en vinculine (rood) voor de bovenste rij en alleen vinculine (rood) onder. Schaal is 50µm.
11b) Gemiddelde oppervlak van de celspreiding na 48 uur. 11c) Fractie van totale aantal FA's in verschillende lengte categorieën. 11d) Flow cytometrie histogrammen die het percentage hMSCs met EdU laten zien. De gestippelde lijn is de controle, de zwarte lijn de behandelde, gelabelde cellen.

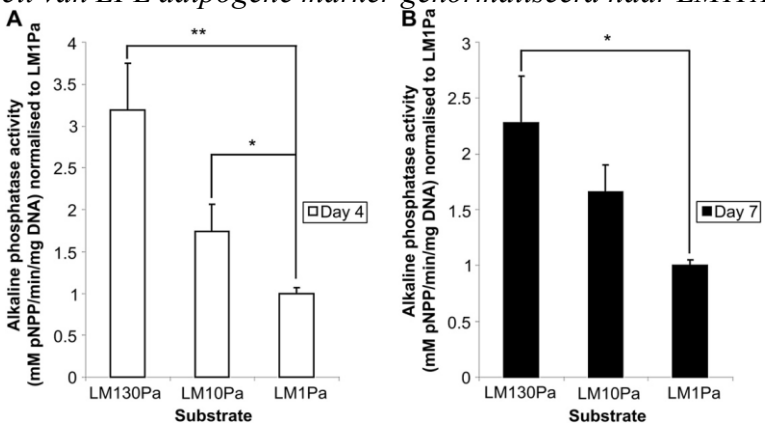
Differentiatie

Hierna werd gekeken of een wisselende loss modulus hMSC differentiatie zou kunnen beïnvloeden. De hoeveelheden myogene, adipogene en osteogene markers werden in basaal medium gemeten om te kijken of er ook spontane differentiatie plaatsvond. Er was geen verschil in expressie in adipogene of osteogene markers, maar hMSCs op LM130Pa hydrogelen hadden een significant hogere expressie van αSMA dan die op LM10Pa en LM1Pa gelen. hMSCs lijken dus een voorkeur te hebben om te differentiëren naar myogene (spier) cellen, vooral naar gladde spiercellen bij hogere loss moduli.
Ook werden de cellen op de verschillende gels voor 7 dagen in adipogeen inductie medium gekweekt. Ook in dit geval was er een significante toename in expressie van de hMSCs op de LM130Pa hydrogelen voor zo wel PPARγ als LPL(figuur 12). Dit is tegenstrijdig met eerder onderzoek, waar namelijk werd aangetoond dat een verminderde celspreiding voor een sterkere expressie van adipogene markers zorgt[29]. Het is dus ook mogelijk dat er meer adipogenese werd gemeten omdat er meer cellen aanwezig waren op de LM130Pa hydrogelen.
Ten slotte werd er nog onderzocht of een wisselende loss modulus effect zou kunnen hebben op osteogene differentiatie. De hMSCs werden nu gekweekt in medium met osteogene supplementen en daarna werd alkaline fosfatase gebruikt om osteogenese aan te tonen. De alkaline fosfatase activiteit van hMSCs op de LM130Pa hydrogelen was significant hoger dan die op de LM1Pa,

zowel na 4 als na 7 dagen(figuur 13). Dit suggereert dat een verhoogde loss modulus osteogene differentiatie versterkt in hMSCs. Net als bij de adipose differentiatie zou dit ook verklaar kunnen worden door verbeterde proliferatie en spreiding van de cellen.



Figuur 12
12a) qRT-PCR analyse van PPARy op gels met verschillende loss moduli genormaliseerd naar LM1Pa. 12b) Activiteit van LPL adipogene marker genormaliseerd naar LM1PA



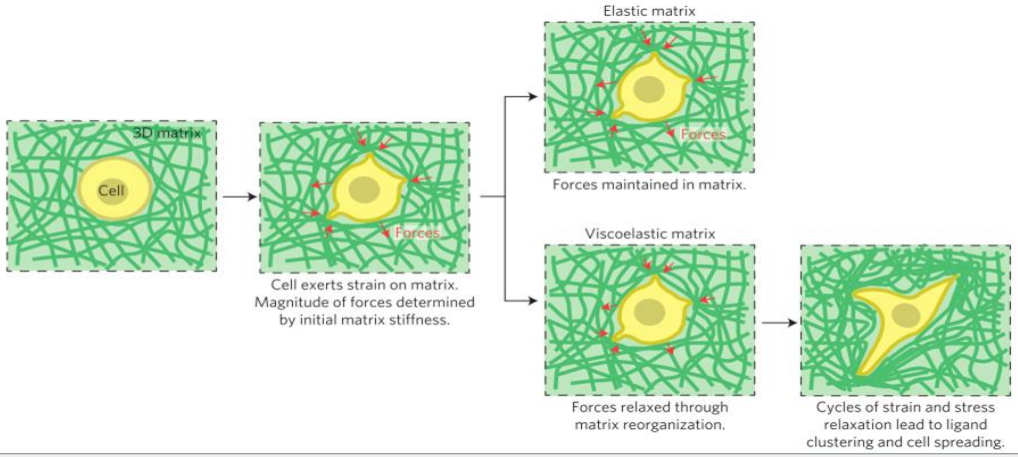
Figuur 13
13a) Alkaline fosfatase activiteit na 4 dagen in hMSCs op hydrogels met verschillende loss moduli genormaliseerd naar LM1PA. 13b) Activiteit na 7 dagen.

Discussie

In dit artikel wordt een manier beschreven om alginate hydrogelen met verschillende spanningsrelaxatie te creëren zonder de stijfheid te veranderen. Met deze hydrogelen is aangetoond dat spanningsrelaxatie een groot effect heeft op de celbiologie. Ook bij de acrylamide hydrogelen was er een verschil in celgroei en differentiatie. Deze methoden lieten zien dat bij een verhoogde loss modulus en kruip er meer osteogene differentiatie van MSCs in een 2D omgeving en betere celspreiding plaatsvond[3],[30]. Ook veranderde de vorm van de cellen in een 3D omgeving[13]. Wat er uniek is aan het eerste onderzoek in dit artikel is dat er maar één type crosslinker werd gebruikt. Ook waren de materialen biocompatibel in een 3D omgeving en bleef de alginate concentratie constant. Hiermee kan de spanningsrelaxatie zo worden aangepast dat hij vergelijkbaar is met die van verschillende weefsels[31]. Ook geeft het een goed model voor een homogene micro omgeving voor cellen die cel-ECM interacties kan weergeven. Er is wel een verband tussen de stijfheid en de spanningsrelaxatie voor alginate met een bepaalde molecuulmassa en binding met PEG. Door de hydrogelen te verstijven van 9 naar 17 kPa nam de spanningsrelaxatie juist af. De tijdschaal van 9kPa was van 3300 tot 70 seconden waar die van 17kPa 1300 tot 40 seconden was. Deze manier om de spanningsrelaxatie onafhankelijk te maken van de stijfheid heeft ook potentie voor andere toepassingen.

Met betrekking tot de biologische mechanismen is gevonden dat de versterking van celspreiding, proliferatie en osteogene differentiatie van MSCs door snellere spanningsrelaxatie komt door integrine adhesies, clustering van RGD liganten, actomyosine contracties en lokalisatie van YAP. MSC differentiatie hangt sterk van van de beginstijfheid van de matrices in 3D, aangezien

osteogene differentiatie alleen plaatsvond bij een stijfheid van 17kPa. MSC differentiatie heeft normaal gesproken juist minder gevoeligheid bij hogere stijfheden in elastische hydrogelen die covalent gebonden zijn[17].
Spanningsrelaxatie is dus een belangrijke parameter in cellen die reageren op mechanische cues van de ECM. Inhibitie van actomyosine zorgde ervoor dat er geen osteogene differentiatie meer plaatsvond. De contractiekrachten die hierbij komen kijken spelen dus een belangrijke rol bij de osteogenese. Actomyosine zorgt er hierbij voor dat RGD liganten gaan clusteren in de hydrogelen met snellere spanningsrelaxatie. Samen met integrine zorgt deze RGD clustering voor een activatie van de signaaltransductie. Deze transductie is al eerder geassocieerd met osteogene differentiatie[15]. Hierdoor kan er een link gelegd worden tussen de verschillende spanningsrelaxatie tijden en hoe deze het celgedrag beïnvloeden wat tot de differentiatie leidt. Alhoewel Rho-gemidieerde contractie bekend staat als een essentieel onderdeel voor osteogenese in afbreekbare hydrogelen[17], leidde inhibitie van Rho niet tot verminderde osteogenese. In een paar gevallen werd deze zelfs versterkt. Ook was al bekend dat een verhoogde loss modulus er voor zorgt dat de Rac activatie wordt verhoogd in acrylamide hydrogelen[30]. Bij deze alginate hydrogelen zorgde de remming van Rac er niet voor dat de osteogenese werd gestopt. Dit suggereert dat de rol van Rho en Rac per toepassing varieert.
Vele voorgaande onderzoeken hebben al het belang van de vervorming van de matrix door middel van de proteolytische degradatie op het celgedrag onderzocht. Het gedrag van de cellen in de snel relaxende gels suggereert ook dat het vermogen van cellen om mechanisch hun matrix te herorganiseren een belangrijke component is van de cel-ECM interacties(figuur 11). Het is aannemelijk dat hoe beter de hydrogelen te vervormen zijn door de snellere spanningsrelaxatie, des te sneller de RGD ligant clustering verloopt. Deze clustering verbetert dan de cel spreiding, proliferatie en de formatie van een matrix die lijkt op die bot met behulp van osteogeen gedifferentieerde MSCs. Vergelijkbaar met de trend dat verminderde spanningsrelaxatie leidt tot een lagere osteogene differentiatie is er recent ook aangetoond dat osteogene differentiatie van MSCs wordt verminderd in niet afbreekbare covalent gebonden hydrogelen die niet mechanisch hervormd kunnen worden[17]. De materialen die hierbij gebruikt waren zijn echter niet te vergelijken met de



alginate hydrogelen van dit artikel, dus de resultaten ook niet.
Figuur 14
Verschil in celrepons op elasctische en visco elastische matrices. In visco elastische matrices vervormen de cellen actief de matrix en veranderen zelf mee van vorm.

Ook is het belang van matrix degradatie op bot regeneratie[32] en de vorming van kraakbeen in implanteerbare scaffolds al langer bekend[33]. Dit artikel geeft de mogelijkheid dat het effect van deze degradatie zal kunnen volgen uit het concept dat versnelde spanningsrelaxatie zorgt voor snellere degradatie in bepaalde stukken van de matrix. Recent is al gevonden dat proteolytische degradatie van PEG hydrogelen van covalent gebonden PEG hydrogelen door MSCs lokaal de elastische matrix wordt omgezet in visco elastische vloeistoffen[34].

Verder is aangetoond dat spanningsrelaxatie een veelbelovende regulator is voor botregeneratie in vivo. Defecten in de schedels van ratten behandeld met hydrogelen die hMSCs erin hadden lieten een betere botgroei zien na een periode van drie maanden bij snellere spanningsrelaxatie tijden. Het nieuwe bot had een gemineraliseerde matrix met osteocyten er omheen. Omdat de botgroei een ingewikkeld proces is, betekent het dat als één van deze elementen mistte er waarschijnlijk geen regeneratie had plaatsgevonden. Deze volwassen morfologie is vergelijkbaar met die van vorige studies die ook hebben geprobeerd om groeifactoren zoals BMP-2 toe te brengen tijdens de regeneratie[35]. Niet alleen biologische maar ook mechanische factoren spelen dus een belangrijke rol bij de vorming van nieuw botweefsel.
De aanwezigheid van humane cellen in de omgeving van het nieuwe bot bij de snel relaxende gels en de afwezigheid bij de langzaam relaxende gels geven aan dat de snel relaxende gels overlevingssignalen geven aan de getransplanteerde cellen. Ook blijven de overlevende cellen betrokken bij het genezingsproces. De cellen zijn aanwezig in de regio's waar er nieuw bot gevormd wordt en niet in het volwassen botweefsel. Dit suggereert dat de getransplanteerde cellen actief betrokken zijn bij de groei van nieuw botweefsel. Dezelfde hydrogelen zonder cellen hadden minder regeneratie van bot dan de hydrogelen met MSCs, wat laat zien dat de cellen wel degelijk zijn betrokken bij de genezing.

Hierbij moet wel gezegd worden dat de twee hoofdartikelen over spanningsrelaxatie die hier besproken zijn door dezelfde onderzoeksgroep zijn gepubliceerd. Er wordt twee maal gebruik gemaakt van het zelfde materiaal met dezelfde crosslinker. Verder onderzoek moet dus nog uitwijzen of snellere spanningsrelaxatie in meerdere systemen of voor andere materialen tot verbeterde uitkomsten leidt. Ook is het lastig om een vertaling te maken van het gedrag van humane cellen in ratten van humane cellen in de mens. Pas als de hydrogelen in de mens kunnen worden geplaatst kan er pas wat gezegd worden over zaken als degradatie en infiltratie.
Verder onderzoek is nodig om te monitoren hoe de degradatie zelf verloopt en hoe deze te reguleren is. Ook is het nog zoeken naar een balans tussen de afbreekbaarheid van het materiaal en de interactie met het omgevende weefsel. De hydrogelen met een snelle spanningsrelaxatie waren na drie maanden bijna helemaal verdwenen. Voor langzamere botgenezing kan dit een probleem opleveren aangezien er dan elke keer een nieuwe hydrogel moet worden geïmplanteerd. Een te snelle afbraak kan ook een te sterke vreemd lichaamsreactie veroorzaken wat eventueel negatieve gevolgen kan geven voor het omliggende weefsel. Na deze bevindingen ligt het voor de hand om alleen nog maar hydrogelen te gebruiken met snelle spanningsrelaxatie. Het is echter de vraag of dit voor alle toepassingen de beste oplossing is en of in andere materialen dit ook het geval is.

Voor nu is het belangrijk om mee te nemen dat alleen de stijfheid niet voldoende is om wat te zeggen over de celrespons op mechanische cues. Het effect van spanningsrelaxatie en kruip opent nieuwe mogelijkheden vooral voor toepassingen binnen de regeneratieve geneeskunde.

Literatuurlijst

1. Caliari SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods*. 2016;13(5):405-414. doi:10.1038/nmeth.3839.
2. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng*. 2009;103(4):655-663. doi:10.1002/bit.22361.
3. Cameron AR, Frith JE, Cooper-White JJ. The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype. *Biomaterials*. 2011;32(26):5979-5993. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.003.
4. Tsou Y-H, Khoneisser J, Huang P-C, Xu X. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioact Mater*. 2016;1(1):39-55. doi:10.1016/j.bioactmat.2016.05.001.
5. Purcell BP, Lobb D, Charati MB, et al. Injectable and bioresponsive hydrogels for on-

demand matrix metalloproteinase inhibition. *Nat Mater*. 2014;13(6):653-661. doi:10.1038/nmat3922.
6. Higuchi A, Ling Q, Chang Y, Hsu S, Umezawa A. Physical Cues of Biomaterials Guide Stem Cell Di ff erentiation Fate. 2013.
7. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. 1999;20(1):45-53. doi:10.1016/S0142-9612(98)00107-0.
8. Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(18):4205-4210. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.029.
9. Das RK, Gocheva V, Hammink R, Zouani OF, Rowan AE. Stress-stiffening-mediated stem-cell commitment switch in soft responsive hydrogels. *Nat Mater*. 2016;15(3):318-325. doi:10.1038/nmat4483.
10. Chaudhuri O, Gu L, Klumpers D, et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nat Mater*. 2015;15(November):326-333. doi:10.1038/nmat4489.
11. Chaudhuri O, Gu L, Darnell M, et al. Substrate stress relaxation regulates cell spreading. *Nat Commun*. 2015;6:6365. doi:10.1038/ncomms7365.
12. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*. 2001;101(7):1869-1879. doi:10.1021/cr000108x.
13. McKinnon DD, Domaille DW, Cha JN, Anseth KS. Biophysically defined and cytocompatible covalently adaptable networks as viscoelastic 3d cell culture systems. *Adv Mater*. 2014;26(6):865-872. doi:10.1002/adma.201303680.
14. Mooney DJ, Langer R, Ingber DE. Cytoskeletal Filament Assembly and the Control of Cell Spreading and Function by Extracellular-Matrix. *J Cell Sci*. 1995;108:2311-2320.
15. Huebsch N, Arany PR, Mao AS, et al. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater*. 2010;9(6):518-526. doi:10.1038/nmat2732.
16. Parekh SH, Chatterjee K, Lin-Gibson S, et al. Modulus-driven differentiation of marrow stromal cells in 3D scaffolds that is independent of myosin-based cytoskeletal tension. *Biomaterials*. 2011;32(9):2256-2264. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.065.
17. Khetan S, Guvendiren M, Legant WR, Cohen DM, Chen CS, Burdick JA. Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nat Mater*. 2013;12(5):458-465. doi:10.1038/nmat3586.
18. McDonald SJ, Dooley PC, McDonald AC, Schuijers JA, Ward AR, Grills BL. Early fracture callus displays smooth muscle-like viscoelastic properties ex vivo: Implications for fracture healing. *J Orthop Res*. 2009;27(11):1508-1513. doi:10.1002/jor.20923.
19. Bridgewater RE, Norman JC, Caswell PT. Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(16):3695-3701. doi:10.1242/jcs.095810.
20. Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*. 2010;468(7323):580-584. doi:10.1038/nature09621.
21. Truong K, Ikura M. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(5):573-578. doi:10.1016/S0959-440X(00)00249-9.
22. Wozniak MA, Chen CS. Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(1):34-43. doi:10.1038/nrm2592.
23. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011;474(7350):179-183. doi:10.1038/nature10137.
24. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, et al. Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science (80-)*. 2013;341(6149):1240104-1240104. doi:10.1126/science.1240104.
25. Darnell M, Young S, Gu L, et al. Substrate Stress-Relaxation Regulates Scaffold Remodeling and Bone Formation In Vivo. *Adv Healthc Mater*. 2016;201601185:1601185. doi:10.1002/adhm.201601185.
26. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone

regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012;7(10):1918-1929. doi:10.1038/nprot.2012.113.
27. Huebsch N, Lippens E, Lee K, et al. Matrix elasticity of void-forming hydrogels controls transplanted-stem-cell-mediated bone formation. *Nat Mater*. 2015;14(12):1269-1277. doi:10.1038/nmat4407.
28. Engler A, Sheehan M, Sweeney HL, Discher DE. Substrate compliance vs ligand density in cell on gel responses. In: *European Cells and Materials*. Vol 6. ; 2003:7-8. doi:10.1016/S0006-3495(04)74140-5.
29. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004;6(4):483-495. doi:10.1016/S1534-5807(04)00075-9.
30. Cameron AR, Frith JE, Gomez GA, Yap AS, Cooper-white JJ. Biomaterials The effect of time-dependent deformation of viscoelastic hydrogels on myogenic induction and Rac1 activity in mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2014;35(6):1857-1868. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.023.
31. Levental I, Georges PC, Janmey PA. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter*. 2007;3(3):299-306. doi:10.1039/B610522J.
32. Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating Bone Formation *via* Controlled Scaffold Degradation. *J Dent Res*. 2003;82(11):903-908. doi:10.1177/154405910308201111.
33. Metters AT, Anseth KS, Bowman CN. Fundamental studies of biodegradable hydrogels as cartilage replacement materials. In: *Biomedical Sciences Instrumentation*. Vol 35. ; 1999:33-38.
34. Schultz KM, Kyburz KA, Anseth KS. Measuring dynamic cell–material interactions and remodeling during 3D human mesenchymal stem cell migration in hydrogels. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(29):E3757-E3764. doi:10.1073/pnas.1511304112.
35. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett*. 2009;31(12):1817-1824. doi:10.1007/s10529-009-0099-x.