

University of Groningen

Topography-mediated myofiber formation and endothelial cell sprouting

Almonacid Suarez, A M

DOI:
[10.33612/diss.127414004](https://doi.org/10.33612/diss.127414004)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Almonacid Suarez, A. M. (2020). *Topography-mediated myofiber formation and endothelial cell sprouting*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.127414004>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Verlies van spier of spierfunctie kan voortkomen vanuit trauma of aandoeningen zoals gelaatsverlamming. De huidige oplossingen om dit verlies te compenseren zijn bijvoorbeeld revisie chirurgie waarbij een gezonde spier van de patiënt elders uit het lichaam wordt gebruikt om functie te herstellen. Echter, dit is niet ideale oplossing, beter zou zijn om nieuwe functionele spier te maken zodat er geen gezond weefsel gebruikt hoeft te worden. De technologische strategie die het mogelijk maakt nieuw spier te ontwikkelen is tissue engineering (letterlijk: weefselbouw). Tissue engineering bestaat uit het instrueren van cellen met behulp van onder andere materialen die fungeren als basisconstructie, de steiger dan wel stellige. De steiger zorgt voor stevigheid en vorm van het weefsel. Daarnaast zijn de (bio)chemische eigenschappen van groot belang en de fysisch-chemische eigenschappen van de steiger om de cellen te kunnen dirigeren. Een belangrijke eigenschap van de steiger is de oppervlaktestructuur waarmee de cellen in aanraking komen. Dit wordt onderzocht in dit proefschrift. De steigers die gebruikt worden voor tissue engineering worden gemaakt uit verschillende natuurlijke of synthetische materialen of een combinatie hiervan. Idealiter worden cellen gebruikt van de patiënt waarvoor het weefsel gemaakt wordt zodat afstoting van het weefsel wordt voorkomen.

Het vervaardigen van een specifiek weefsel vereist dat de morfologie van dat weefsel zo goed mogelijk wordt nagebootst opdat de weefseleigenschappen en functie zo natuurgetrouw mogelijk laten zijn. In het geval van skeletspier is het nodig de interne structuur en componenten in acht te nemen. Skeletspier bestaat uit parallel georiënteerde langwerpige multikernige cellen (myofibers) die omgeven zijn door bloedvaten en worden bijeengehouden door het extracellulaire matrix. De extracellulaire matrix is de ondersteunende steiger, die naast vorm (architectuur) ook cellen instrueert met betrekking tot deling, groei, differentiatie, migratie, ontwikkeling en homeostase. Rondom de cellen is een dun membraan (basaalmembraan) aanwezig bestaande uit collageen IV, laminine en proteoglycanen. Voorbij het basaalmembraan zit het interstitium, een tussenmatrix, bestaande uit eiwitfibers van o.m. collageen I en III die zorgen voor de sterkte. De matrix bevindt zich in een sterk gehydrateerde gel substantie bestaande uit negatief geladen polysaccharides (glycosaminoglycanen en proteoglycanen). Deze gel bindt regulerende groeifactoren die essentieel zijn voor skeletspier homeostase en functie.

De uitlijning van cellen is mogelijk door gebruik te maken van topografie die lineair is uitgelijnd. Cellen voelen deze topografie en geeft de cellen de instructie om het cytoskelet de topografie te laten volgen. De uitgelijnde sinusvormige topografie kan worden gegenereerd door het oppervlak te oxideren lucht plasma . Door gebruik te maken van een lokale afscherming voor oxidatie kan een gradiënt worden gemaakt van de topografie waar de golflengte en amplitude van de sinusvormige topografie geleidelijk varieert over het oppervlak. Onze groep heeft dit systeem al veelvuldig gebruikt en heeft laten zien dat de uitgelijnde topografie gradiënten een krachtige manier is om uitlijning te bepalen en te

bewerkstelligen van verschillende type cellen. In dit proefschrift beschrijven de toepassing van de structuren op het vervaardigen van skeletspier.

In hoofdstuk 2 is de optimale uitlijning van humane myoblasten onderzocht en de hypothese die getoetst werd was dat myoblasten een voorkeur hebben voor een specifiek uitgelijnde topografie om te delen, fuseren en ontwikkelen tot myotubes. Hiervoor is de topografie gradiënt gebruikt op basis van een siliconen substraat (polydimethylsiloxaan, PDMS) waarbij de uitgelijnde topografie met sinusstructuur aan het oppervlak gaandeweg verandert van golflengte (λ) = 1,520 nm en amplitude (A) = 176 nm tot λ = 9,934 nm en A = 2,168 nm. We toonden aan dat humane myoblasten differentiëren en spontaan contraheren, onafhankelijk van de aangeboden sinusvormige topografie dimensies. De gevormde myotubes leken sterk op de weefselstructuur van natuurlijk skeletspier met hun kernen in een perifere positie. De myotubes hadden een gemiddelde diameter van 66 ± 59 μm . Tevens observeerden we dat het differentiatieproces vertraagd werd door de kleinere topografieën dan wel door de afwezigheid van de uitgelijnde topografieën (vlak). Het kiezen van een optimale oppervlaktestructuur (topografie) blijkt essentieel voor efficiënte uitlijning en differentiatie van de spier stamcellen. Dit hoofdstuk geeft aan hoe belangrijk de uitlijning is voor de myotube functionaliteit.

Rondom skeletspierweefsel cellen bevinden zich bloedvaten. Het netwerk van microbloedvaten is een zeer vertakt netwerk om iedere myotube te ondersteunen met tenminste vier capillairen om efficiënte uitwisseling van gassen, voedingsstoffen en afvalstoffen mogelijk te maken. Daarom was het nodig om ook de effecten van de topografie op endotheelcellen te onderzoeken en de uitlijning hiervan dan wel het vormen van beginnende vaatstructuren in kaart te brengen om zo een stap richting gevasculariseerd spierweefsel te zetten. In hoofdstuk 3 is de endotheelcel uitlijning en vaatvorming als reactie op de topografieën uiteengezet. We speculeerden dat verschillende topografieën invloed zou hebben op de uitlijning en vaatvorming van de endotheelcellen en vonden dat dit inderdaad een zeer sterke stimulus is voor dit celtype. Endotheelcellen lijden uit op siliconen microtopografieën (golflengtes van 4.8 μm tot 9.9 μm en amplitudes van 1015 nm tot 2169 nm) terwijl op nanotopografieën en vlakke siliconesubstraten de endotheelcellen beginnende netwerkstructuren en aggregaten vormden. Deze aggregaten migreerden en bij de overgang van vlak naar microfotografieën vielen deze aggregaten uit elkaar. Tevens hebben we laten zien dat op deze oppervlakken de netwerkvorming van endotheelcellen gestabiliseerd wordt door de aanwezigheid van een instructieve cellaag bestaande uit stromale cellen (ASC) uit vetweefsel. Uit eerder werk was ook gebleken dat de aanwezigheid van ASCs een positief effect hadden op het vormen van vasculaire netwerken.

Na het onderzoeken van de invloeden van de topografieën op beide celtypen – myoblasten en endotheelcellen – was het belangrijk om de cellen te combineren en te proberen om een gevasculariseerd skeletspierweefsel te genereren. In hoofdstuk 4 hebben we het vascularisatieproces vanuit endotheelcellen geëvalueerd bovenop en tezamen met

uitgelijnde myotubes op de topografieën. Het resultaat is dat de uitgelijnde myotubes een netwerk van collageen en laminine fibers produceren die de vroege vasculaire netwerkvorming vanuit endotheelcellen ondersteund.

Hoofdstuk 5 geeft de discussie weer over onze bevindingen dat humane myoblast celdeling, fusie en differentiatie plaatsvindt op de topografieën die we hebben onderzocht en dat dit gebeurt ongeacht de topografiedimensies. Hoewel alle topografieën de ontwikkeling stimuleerden, bestond er een voorkeur voor microstructuren omdat celaanhechting op nanostructuren minder stabiel was. Verder hebben we laten zien dat topografie en topografie-gestructureerde myoblasten – myotubes – capillairvorming kunnen sturen maar dat hiervoor hulpcellen voor nodig zijn zoals pericyten (ASC) om het vascularisatieproces volledig te maken in vervaardigd skeletspierweefsel. In conclusie, onze resultaten illustreren het grote belang van topografie op de ontwikkeling van in vitro vervaardigde weefsels. Topografie geeft een sterkere stimulans dan chemische stimulatie en topografie bleef leidend in de reactie van endotheelcellen en myoblasten. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen hoe sterk de invloeden daadwerkelijk zijn omdat dit sterk kan variëren tussen celtypes maar ook de bron van de cellen.

