

Stem cells in plastic and regenerative surgery

Citation for published version (APA):

Beugels, J. (2020). *Stem cells in plastic and regenerative surgery: immunomodulation and angiogenesis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken. <https://doi.org/10.26481/dis.20200916jb>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20200916jb](https://doi.org/10.26481/dis.20200916jb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

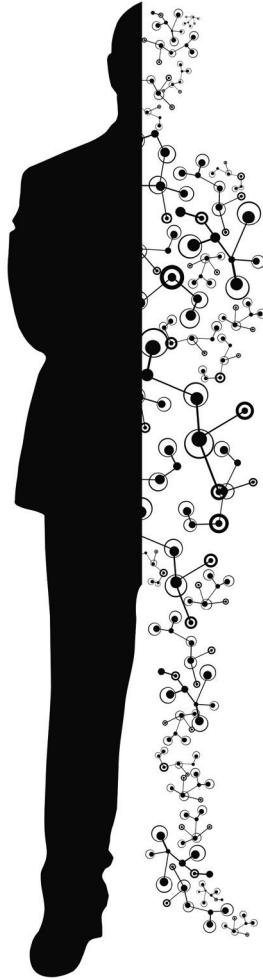
Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 8



8

Summary

Summary

Chapter 1. General introduction

In plastic and reconstructive surgery many surgical procedures have been developed to restore form and/or function. Autologous fat transfer (AFT), in which adipose tissue is relocated from one place to the other is a recent example that is safe and versatile. An important aspect in the final outcome for the patient is the state of the local microenvironment in the regenerating tissue. However great the surgeon or surgical technique may be, they have no direct way of modifying the local microenvironment to promote healing. Great potential herein lies with the use of (adult) stem cells. This thesis investigated the effect of stem cells on two important cellular processes, occurring after (surgical) tissue trauma: inflammation and angiogenesis. Ideally we would have a technique to directly “activate” tissue resident stem cells and guide them towards promoting angiogenesis or modulating inflammation. A technique called electrical stimulation is promising in this area.

Chapter 2. Efficacy and safety of autologous fat transfer in facial reconstructive surgery: a systematic review and meta-analysis.

In chapter 2, we focused specifically on AFT through analysis of the efficacy and safety of performing AFT in plastic surgery. We compiled the available clinical data from 52 relevant studies consisting of 1568 unique patients in a systematic review and meta-analysis. It showed a very high overall satisfaction rate of 91.1% in patients, together with a 88.6% satisfaction rate in surgeons. In facial reconstructive surgery the mean number of sessions to achieve the desired end result was 1.5, with a retention rate of 50-60% of the grafted material. Less than 5% of the procedures resulted in minor complications, deeming it a safe procedure.

Chapter 3. Autologous fat transfer as a treatment for peripheral neuropathic pain without apparent cause.

In chapter 3, we tested in a clinical trial whether patients in a chronic neuropathic pain setting without a cause such as a neuroma, and who had exhausted all other treatment options, would benefit from AFT with respect to their pain perception. Fourteen patients received AFT in the area of the affected nerve. Outcome parameters included patient satisfaction, pain scored on a visual analogue scale (VAS) and quality of sleep. Patient satisfaction was 93% at the follow-up after two weeks and 86% after a follow-up of more than one year. The mean VAS score decreased significantly from 7.4 before surgery to 3.8 directly after AFT and 4.3 at long-term follow-up visit. The quality of sleep improved in 50% of the patients, whereas the remainder indicated no difference. No complications were registered. This study shows that AFT can be a suitable option for patients suffering from debilitating neuropathic pain that is refractory to other treatments. A potential mechanism of action lies in the regenerative capabilities of cells within the transplant.

Chapter 4. Standardized human bone marrow-derived stem cells infusion improves survival and recovery in a rat model of spinal cord injury.

In chapter 4, we set out to investigate the immunomodulatory properties of a refined bone-marrow derived preparation of mesenchymal and hematopoietic stem cells in an acute model of spinal cord injury. Our focus lay towards researching the anti-inflammatory properties and the effect on nerve regeneration in the context of improved functional outcome. To this end T-cell deficient rats, in which a spinal cord lesion (SCI) was induced by balloon-compression of the spinal cord, received an intrathecal injection of bone marrow-derived stem cells (called Neuro-Cells; NC) the day after SCI. During the first 5 weeks after this intervention, NC significantly improved locomotor recovery and induced less injury-associated adverse events compared to the vehicle-treated control group. Histological analyses showed that NC reduced astrogliosis and apoptosis primarily in the first days after administration. Proteomic studies of the sampled spinal cords at the study endpoint (56 days) pointed to the release of paracrine factors and identified proteins involved in regenerative processes.

Chapter 5. Efficacy of different doses of human adult bone marrow stem cell transplantation on angiogenesis in a rat model with hind limb ischemia.

In chapter 5, we surgically ligated the external iliac artery of T-cell deficient rats to develop a hind limb ischemia model. The surgical ligation of arterial blood vessels lead to an acute-onset moderate to severe traumatic ischemia in the affected hind limbs. After 7 days a baseline digital subtraction angiography (DSA) was made. Then, different doses of human bone marrow-derived stem cells, or vehicle alone were administered intramuscularly and intra-arterially. At day 35, DSA was repeated and images were compared between the groups at the different time points to directly visualize the angiogenic effects of the administered stem cells. Comparison of DSA Mean Gray Values at day 35 versus day 7 showed a significant increase in the low and medium dose groups, pointing towards improved vascularization, whereas the vehicle group displayed a natural decrease. Surprisingly, the high dose stem cell group also had a decreased Mean Gray Value at day 35 and more tissue damage, possibly due to hyperviscosity. A dose response could not be detected.

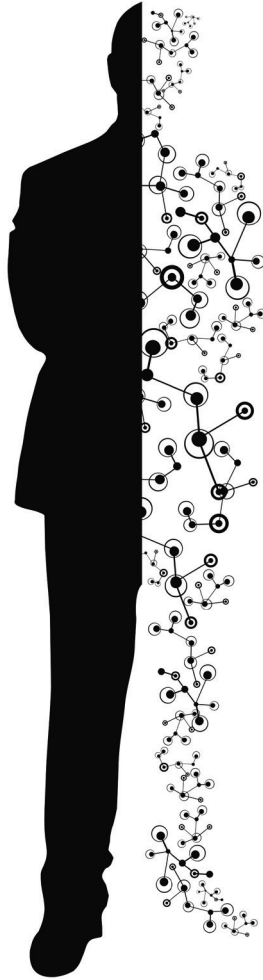
Chapter 6. Electrical stimulation promotes the angiogenic potential of adipose-derived stem cells.

In chapter 6, we electrically stimulated adipose tissue-derived stem cells (ASC) *in vitro* to determine the effects of electrical stimulation (ES) on the angiogenic potential of ASC. Cultured human ASC were electrically stimulated for 72 hours after which the medium of stimulated (ES) and non-stimulated (control) ASC was analyzed for angiogenesis-related proteins by protein array and ELISA. Nine angiogenesis-related proteins were detected in the medium of electrically stimulated ASC. The pro-angiogenic proteins VEGF and MCP-1 were significantly increased following ES compared to controls, while the anti-angiogenic factor Serpin E1/PAI-1 was significantly decreased. Despite increased levels of anti-angiogenic TSP-1 and TIMP-1, medium of ES-treated ASC significantly increased vessel density, total vessel network length and branching points in a functional *in vivo* model of angiogenesis, called a chorio-allantoic membrane assay. This proof-of-concept study showed that ES increased the angiogenic potential of ASC both *in vitro* and *in vivo* and lays the foundation for further translational studies.

Chapter 7. General discussion

The general discussion reflects on the findings of the individual studies included in this thesis, starting with autologous fat transfer. Next chapters 4 through 6 were discussed in light of the topics immunomodulation and angiogenesis. Gaps in current knowledge are identified and proposals for future studies are provided.

CHAPTER 9



9

Summary in dutch

Nederlandse samenvatting

Summary in Dutch - Nederlandse samenvatting

Hoofdstuk 1. Algemene introductie

In plastische en reconstructieve chirurgie zijn een groot aantal chirurgische procedures ontwikkeld om vorm en/of functie te herstellen. Autologe vet transfer (AFT), waarbij vet van de ene locatie naar de andere wordt gebracht is een recent voorbeeld dat zowel veilig als veelzijdig is. Een belangrijk aspect voor het uiteindelijke resultaat is de status van het lokale micromilieu in het regenererende weefsel. Hoe fantastisch de chirurg of de chirurgische techniek ook is, zij hebben geen directe mogelijkheid om het lokale micromilieu zodanig te beïnvloeden dat het de genezing bevordert. Het inzetten van stamcellen vertoont op dit vlak grote potentie. Deze thesis onderzoekt het effect van stamcellen op twee belangrijke cellulaire processen die optreden na (chirurgisch) trauma: inflammatie en angiogenese. Idealiter zouden we een techniek wensen om direct de reeds aanwezige stamcellen in het weefsel te “activeren” en ze te stimuleren om angiogenese te bevorderen of inflammatie te moduleren. Een techniek genaamd elektrische stimulatie is veelbelovend voor deze indicatie.

Hoofdstuk 2. Effectiviteit en veiligheid van autologe vet transfer in faciale plastische chirurgie: een systematische review en meta-analyse.

In hoofdstuk 2 focusten we specifiek op AFT door een grondige analyse van de effectiviteit en veiligheid van AFT in plastische chirurgie. We compileerden de beschikbare klinische data van 52 relevante studies die in totaal bestonden uit 1568 unieke patiënten in een systematische review en meta-analyse. Het tevredenheidsniveau bleek algemeen erg hoog te zijn met 91.1% in de patiëntengroep en 88.6% bij de chirurgen. Het gemiddeld aantal sessies om het gewenste eindresultaat te bereiken was 1.5, met een retentiepercentage van 50-60% van het ingebrachte vetweefsel. Lichte complicaties traden op in minder dan 5% van de gevallen, waaruit geconcludeerd werd dat AFT in het gelaat een veilige ingreep is.

Hoofdstuk 3. Autologe vet transfer als een behandeling voor perifere neuropathische pijn zonder duidelijke oorzaak.

In hoofdstuk 3 onderzochten we in een klinische trial of patiënten met chronische neuropathische pijn zonder oorzaak zoals een neuroom, en die reeds alle andere

mogelijkheden voor behandeling hadden geprobeerd, effect zouden hebben van AFT op het verminderen van de pijn. Veertien patiënten ontvingen AFT in het gebied van de aangedane zenuw. Tot de uitkomstparameters behoorden patiënttevredenheid, pijn gescoord op een visuele analoge schaal (VAS) en de kwaliteit van slaap. De patiënttevredenheid bedroeg 93% bij de controle na 2 weken en 86% na een follow-up van meer dan één jaar. De gemiddelde VAS score daalde significant van 7.4 voor de ingreep tot 3.8 direct na AFT en 4.3 bij de controle op lange termijn. De kwaliteit van slaap verbeterde in 50% van de patiënten, waarbij de rest aangaf geen verschil te merken. Er werden geen complicaties geregistreerd. Deze studie toont dat AFT een mogelijke optie kan zijn in de behandeling van patiënten die lijden aan therapieresistente neuropathische pijn. Een potentieel werkingsmechanisme hiervan kan liggen in de regeneratieve eigenschappen van cellen in het vettransplantaat.

Hoofdstuk 4. Infusie met gestandaardiseerde uit beenmerg verkregen stamcellen verbetert de overleving en het herstel in een ratmodel van dwarslaesie.

In hoofdstuk 4 hebben we de immunomodulaire eigenschappen van een geraffineerd preparaat met mesenchymale en hematopoïetische stamcellen uit beenmerg onderzocht in een acuut model van dwarslaesie. Onze focus lag bij het onderzoeken van de anti-inflammatoire eigenschappen en het effect op zenuwregeneratie in de context van een verbeterde functionele uitkomst. Hiervoor kregen T-cel deficiënte ratten, bij wie een dwarslaesie was aangebracht door middel van balloncompressie, een intrathecale injectie met uit beenmerg verkregen stamcellen (genaamd Neuro-Cells; NC) de dag na de dwarslaesie. Gedurende de eerste 5 weken na de interventie verbeterden NC het motorische herstel significant en veroorzaakten zij minder trauma gerelateerde complicaties in vergelijking met de controle groep die behandeld was met alleen oplosvloeistof. Histologische analyses toonden aan dat NC astrogliose en apoptose vooral in de eerste dagen na toediening verminderden. Proteomisch onderzoek van het verzamelde ruggenmerg aan het einde van de studie (na 56 dagen) wees op vrijgelaten paracrine factoren en identificeerde eiwitten betrokken bij regeneratieve processen.

Hoofdstuk 5. Effectiviteit van de transplantatie van verschillende doseringen van humane uit beenmerg verkregen stamcellen op angiogenese in een ratmodel met ischemie van de achterpoot.

In hoofdstuk 5 werd bij T-cel deficiënte ratten operatief de a. iliaca externa geligeerd om een diermodel met ischemie van de achterpoot te ontwikkelen. De chirurgische ligatie van arteriële bloedvaten leidde tot de acute ontwikkeling van middelmatige tot ernstige traumatische ischemie van de betrokken achterpoten. Na 7 dagen werd er een baseline digitale subtractie angiografie (DSA) gemaakt. Daarna werden er verschillende doseringen van humane uit beenmerg verkregen stamcellen, of alleen oplosvloeistof intramusculair en intra-arterieel toegediend. Op dag 35 werd de DSA herhaald en werden afbeeldingen vergeleken tussen de groepen op de verschillende tijdpunten om direct de angiogene effecten van de toegediende stamcellen te visualiseren. Vergelijking van de DSA Mean Gray Values op dag 35 versus dag 7 toonde een significante stijging in de lage en medium dosis groep, wijzende op verbeterde vascularisatie, terwijl de groep met alleen oplosvloeistof een natuurlijke daling liet zien. Verassend was dat de groep met een hoge dosis stamcellen ook een verminderde Mean Gray Value had op dag 35 met meer weefselschade, mogelijk door hyperviscositeit van het toegediende product. Een dosis-responscurve kon niet worden gedetecteerd.

Hoofdstuk 6. Elektrische stimulatie bevordert de angiogene potentie van stamcellen uit vetweefsel.

In hoofdstuk 6 hebben we stamcellen uit vetweefsel (adipose tissue-derived stem cells; ASC) *in vitro* gestimuleerd met elektrische stroom (ES) om het effect hiervan op de angiogene potentie van ASC te testen. Gekweekte humane ASC werden 72 uur elektrisch gestimuleerd waarna het kweekmedium van gestimuleerde en niet-gestimuleerde ASC werd onderzocht op angiogenese-gerelateerde eiwitten middels proteïn array en ELISA. Negen angiogenese-gerelateerde eiwitten werden gedetecteerd in het medium van elektrisch gestimuleerde ASC. De proangiogene factoren VEGF en MCP-1 waren significant verhoogd na ES in vergelijking met de controlegroep, terwijl de anti-angiogene factor Serpin E1/PAI-1 significant was gedaald. Ondanks verhoogde niveaus van de anti-angiogene factoren TSP-1 en TIMP-1, vergrootte medium van gestimuleerde ASC significant de vaatdichtheid, totale

lengte van het vaatnetwerk en het aantal vaatvertakkingen in een functioneel *in vivo* model van angiogenese, genaamd een chorioallantoïsch membraan onderzoek. Deze proof-of-concept studie toonde aan dat ES de angiogene potentie van ASC zowel *in vitro* als *in vivo* bevordert en legt hiermee het fundament voor toekomstige translationele studies.

Hoofdstuk 7. Algemene discussie

In de algemene discussie worden de bevindingen van de individuele studies in deze thesis besproken, beginnend met autologe vet transfer. Daarna worden hoofdstukken 4 tot en met 6 besproken in het kader van de onderwerpen immunomodulatie en angiogenese. Hiaten in de huidige kennis worden geïdentificeerd en er worden voorstellen voor toekomstige studies gegeven.