

Biom mineralized collagen for bone regeneration

Citation for published version (APA):

De Melo Pereira, D. (2022). *Biom mineralized collagen for bone regeneration: Insights into cell-material interactions*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken. <https://doi.org/10.26481/dis.20220124dp>

Document status and date:

Published: 01/01/2022

DOI:

[10.26481/dis.20220124dp](https://doi.org/10.26481/dis.20220124dp)

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.

Summary

Synthetic bone graft substitutes are used in the clinic as alternatives to natural bone grafts, for repairing large bone defects. Currently, large, clinically challenging bone defects are predominantly treated by bone grafts from the patient undergoing surgery (autograft), or from a donor (allograft). Both solutions have inherent drawbacks, such as scarcity and complications associated with donor site surgery. Moreover, in the case of allografts, a risk of immune reaction exists. Synthetic bone graft substitutes avoid these drawbacks, and their continued development suggests that they will in the future replace autografts as the standard of care for regeneration of large bone defects. Most commercially available synthetic bone graft substitutes are composed of calcium phosphates and/or collagen, the two main components of the extracellular matrix (ECM) of bone. Biomimicry in general has been a common guiding principle behind biomaterials design for use as bone graft substitutes, as similarity with the native tissue underpins their performance. As reviewed in **Chapter 2**, the state-of-the-art bone biomimetic material is biomineralized collagen, recreating both the composition and structural architecture of bone's ECM, especially at the sub-micron scale. This thesis explores the potential of biomineralized collagen in bone regeneration and related regenerative medicine applications, by studying its interactions with two cell types from the bone environment, osteoclasts, and human mesenchymal stromal cells (hMSCs).

The formation and resorptive activity of osteoclasts on biomineralized collagen membranes were investigated in **Chapter 3**. Human monocytes/macrophages from peripheral blood were stimulated to differentiate into osteoclasts on collagen membranes with and without intrafibrillar mineral, as well as on cortical bone slices. Formation of osteoclasts occurred similarly on all substrates, but actin rings were observed only on the cortical bone control. Resorption pits and higher concentration of calcium ions in the cell culture medium confirmed that osteoclasts were actively resorbing cortical bone slices. In contrast, biomineralized and pure collagen membranes were not resorbed, likely due to the mesh-like surface structure of these substrates, accompanying mechanical properties, and possibly also due to a lack of RGD ligands to the vitronectin receptor. In the follow-up study, a calcium phosphate layer containing cobalt was added to the biomineralized collagen membranes (**Chapter 4**). As a result, two modifications of the membrane were achieved: an increase in mineral content of $\approx 4\%$ (w/w) and introduction of cobalt ions, previously shown to stimulate resorption by osteoclasts. Because of the additional mineral, the

stiffness of the coated biomineralized collagen membranes increased from 1 to 10 MPa, and the cobalt ions were slowly released in cell culture medium, reaching a concentration of 7 nM after 2 days. Osteoclasts with actin rings were sporadically observed on the coated membranes, as well as the corresponding resorption lacunae. Moreover, a small increase in calcium ion concentration in cell culture medium was measured. It was suggested that the increase in membrane stiffness, as well as the presence of cobalt ions, resulted in osteoclasts being able to resorb the coated biomineralized collagen membrane, though to a limited extent, unlike biomineralized collagen membrane without additional calcium phosphate coating. Resorption by osteoclasts is one half of the process of bone remodeling, while the other half includes bone deposition by osteoblasts, which differentiate from progenitors residing in the mesenchymal stromal cell pool. To address this second part, in **Chapter 5** the extent to which biomineralized collagen triggers osteogenic and osteoclast-related gene expression in hMSCs was investigated. Markers of osteogenic differentiation RUNX2, SPP1, ENPP1, and OCN showed increased expression after 3 days, and COL1A1 after 14 days of cell culture on biomineralized collagen as compared to culture on tissue culture plastic. OPG expression was upregulated in cells cultured on biomineralized collagen, and RANK-L was below detection limit, resulting in a low RANK-L/OPG ratio, which is indicative of a resorption-inhibiting hMSC phenotype. Overall, the results obtained showed that biomineralized collagen supports hMSCs growth and osteogenic differentiation, and could play a role in modulating the (pre)osteoblast/osteoclast communication. **Chapter 6** offers a description of some optimization experiments and technical considerations, which may be useful for replication of the experiments performed in this thesis, as well as guidelines for future studies.

To conclude, this thesis illustrates the potential applicability of biomineralized collagen in regenerative medicine applications that require the micro-environment of bone to be mimicked. It does so by exploring the interactions between biomineralized collagen and the two fundamental cellular components of the bone environment, namely osteoclasts and hMSCs, and lays the ground for future improvements on this promising biomaterial.

Samenvatting

Grote, complexe, beschadigingen van bot worden voornamelijk behandeld door middel van transplantatie van bot van de patiënt zelf, of van een donor. Beide oplossingen hebben belangrijke nadelen, zoals een beperkte hoeveelheid beschikbaar bot, complicaties van de benodigde ingreep en, in het geval van donormateriaal, de kans op afstoting van het getransplanteerde bot. Om deze nadelen te adresseren worden synthetische botvervangers in de kliniek gebruikt als alternatief voor natuurlijke bot transplantaties. De continue ontwikkeling van synthetische materialen suggereert dat synthetische botvervangers uiteindelijk de standaard behandeling van grote botdefecten zullen worden.

De meeste commercieel beschikbare synthetische botvervangers zijn gemaakt van calciumfosfaten en/of collageen, de twee hoofdcomponenten van de extracellulaire matrix (ECM) van bot. Naast de chemische samenstelling speelt ook de natuurlijke structuur van bot een belangrijke rol. Deze structuur wordt hierom bij deze synthetische botvervangers vaak nagebootst. Zoals samengevat in het literatuuronderzoek van **Hoofdstuk 2**, is de huidige state-of-the-art binnen de synthetische botvervangers biologisch gemineraliseerd collageen, dat zowel de structuur als de samenstelling van de ECM van bot imiteert, voornamelijk op sub-micrometer schaal. Dit proefschrift onderzoekt de potentie van biologisch gemineraliseerd collageen als botvervanger, door de interacties met twee menselijke botceltypen te bestuderen: osteoclasten en mesenchymale stromale cellen (MSC's). De ontwikkeling en resorptie-activiteit van osteoclasten op biologisch gemineraliseerde collageen membranen zijn onderzocht in **Hoofdstuk 3**. Menselijke monocyt/macrofagen uit het perifere bloed werden gestimuleerd om te differentiëren tot osteoclasten op membranen van collageen met en zonder intrafibrillair mineraal, en op corticale bot schijfjes. Osteoclasten werden gevormd op alle substraten in vergelijkbare hoeveelheden, maar actine ringen werden alleen geobserveerd op de corticale bot controle. Resorptiekuiltjes en een hogere concentratie calcium ionen in het celkweek medium bevestigden dat de osteoclasten actief de corticale bot schijfjes resorbeerden. Biologisch gemineraliseerd collageen membranen en collageen membranen zonder mineraal werden niet geresorbeerd, waarschijnlijk door de poreuze, gaasachtige structuur van het oppervlakte van deze substraten. De mechanische eigenschappen en de afwezigheid van RGD liganden van de vitronectine receptor speelden mogelijk ook een. In de vervolgstudie is er een calciumfosfaat laag met kobalt toegevoegd aan de gemineraliseerde collageen

membranen (**Hoofdstuk 4**). Hierdoor zijn er twee veranderingen aan de membranen bewerkstelligd: een toename in de hoeveelheid mineraal van ongeveer 4 gewichtsprocent en de introductie van kobalt ionen, waarvoor voorheen is bewezen resorptie door osteoclasten te stimuleren. Door de toename in de hoeveelheid mineraal nam ook de stijfheid van de membranen toe van 1 MPa naar 10 MPa. De kobalt ionen kwamen langzaam vrij in het celkweek medium, tot een concentratie van 7 nM na 2 dagen. Op deze membranen met extra calciumfosfaat coating werden sporadisch osteoclasten met actine ringen waargenomen, en de bijbehorende resorptiekuiltjes. Er werd ook een kleine toename in de concentratie calcium ionen waargenomen in het celkweek medium. Deze resultaten suggereren dat de toename in de stijfheid van de membranen en de aanwezigheid van kobalt ionen resulteerde in resorptie van het biologisch gemineraliseerd collageen door osteoclasten, al was het in kleine hoeveelheden.

Resorptie door osteoclasten is de helft van het botremodeleringproces. De andere helft is de aanmaak van nieuw bot door osteoblasten, die differentiëren uit voorgangers in de mesenchymale stroma. Om dit tweede deel te onderzoeken is in **Hoofdstuk 5** het effect van biologisch gemineraliseerd collageen op osteoblast en osteoclast gerelateerde genexpressie in MSC's bestudeerd. Markers voor osteoblast differentiatie RUNX2, SPP1, ENPP1 en OCN kwamen meer tot expressie na 3 dagen, en COL1A1 na 14 dagen celkweek op biologisch gemineraliseerd collageen, in vergelijking met een plastic celkweek oppervlakte. OPG expressie was hoger in cellen die werden gekweekt op biologisch gemineraliseerd collageen en RANK-L was onder de detectielimiet, wat resulteerde in een lage RANK-L/OPG ratio, een indicatie van een resorptie-remmend MSC fenotype. Deze resultaten laten zien dat gemineraliseerd collageen de groei en differentiatie van MSC's ondersteunt en mogelijk een rol speelt in het reguleren van (pre)osteoblast/osteoclast communicatie. In **Hoofdstuk 6** staan een aantal optimalisatie experimenten en technische details beschreven, die kunnen helpen bij het reproduceren van de experimenten in dit proefschrift, en het uitvoeren van nieuwe studies.

Samengevat beschrijft dit proefschrift de mogelijke toepassing van biologisch gemineraliseerd collageen in de regeneratieve geneeskunde waarbij de micro-omgeving van bot nagebootst moet worden. Dit werd onderzocht door de interacties te bestuderen tussen gemineraliseerd collageen en de twee fundamentele cellulaire componenten van bot, osteoclasten en MSC's. Met dit onderzoek wordt een basis gelegd voor toekomstige verbeteringen aan dit veelbelovende materiaal.