

Frank Baaijens, TU Eindhoven

Hartkleppen en bloedvaten uit de bioreactor

Defecte en niet goed sluitende hartkleppen kunnen al decennialang worden vervangen. Er zijn mechanische kleppen en biologische exemplaren die zijn gemaakt uit varkenshartkleppen. Beide typen hebben voor- en nadelen. Zo heeft een patiënt met een mechanische klep middelen die bloedstolling voorkomen nodig, terwijl biologische kleppen een beperkte levensduur hebben. Bovendien kunnen ze niet meegroeien met het groter wordende hart, waardoor ze niet zo geschikt zijn voor kleine kinderen. Het liefst zouden artsen daarom slecht werkende hartkleppen vervangen door levend weefsel uit de patiënt zelf. Prof. dr. ir. Frank Baaijens hoogleraar Soft Tissue Biomechanics and Tissue Engineering aan de Technische Universiteit Eindhoven heeft inmiddels een systeem ontwikkeld om zulke hartkleppen in het laboratorium te kweken. Zijn methode is overgenomen door een bedrijfje dat de techniek verder ontwikkelt. Een vergelijkbare aanpak heeft Baaijens met succes beproefd voor het groeien van bloedvaten met een kleine diameter.

Hartkleppen moeten van een bijzonder kaliber zijn. Elk jaar moeten ze ruim dertig miljoen keer open en dicht gaan en dat een heel leven lang zonder problemen. Datzelfde geldt voor bloedvaten die met elke hartslag uitzetten en in hun oorspronkelijke vorm terugkomen. Tissue

engineers hebben al geruime tijd gezocht naar manieren om dit soort weefsel in het laboratorium te kweken en te modelleren naar de natuur zodat er kleppen en bloedvaten van kunnen worden gemaakt. Aanvankelijk zonder succes. Tot onderzoekers, zoals Baaijens, bedachten dat de mechanische belasting niet alleen de randvoorwaarden schept voor de eigenschappen waaraan bijvoorbeeld de kleppen naar de aorta moeten voldoen, maar ook belangrijk is voor de tissue engineering. 'Rond de eeuwwisseling kwamen we er achter dat mechanische stimulering tijdens de weefselkweek essentieel is om te bewerkstelligen dat de steuncellen en endotheelcellen de juiste componenten voor een geschikte extracellulaire matrix vormen', zegt Baaijens. 'Zo'n speciaal toegeruste extra cellulaire matrix is onontbeerlijk om het weefsel de juiste mechanische sterkte te geven voor gebruik als hartkleppen.'

Tussen droom en daad liggen vele jaren. Ook al is een decennium ongebruikelijk kort voor het toepassen van een idee in een diemodel dat slechts één stap is verwijderd van de mens. De grote uitdaging voor de medewerkers van de faculteit Biomedische

Technologie was het bouwen van een bioreactor die de truc zou kunnen doen. Baaijens: 'We zagen dat weefsels die onder een pulserende mechanische belasting zijn gekweekt veel sterker zijn dan weefsels die onder statische omstandigheden zijn gegroeid. Bovendien lijkt hun morfologie heel sterk op de structuur van de hartkleppen van pasgeborenen. Dat kun je alleen bereiken als je de mechanische krachten heel gecontroleerd kunt aanbrengen op het weefsel. Zet je bijvoorbeeld direct de volle belasting op de biologische matrix waarin de juiste cellen zijn gezaaid, dan is dat teveel van het goede. Je moet de kracht in de tijd laten toenemen. Dat luistert heel nauw.'

Minimaal invasief

Na veel sleutelen en experimenteren zijn Baaijens en zijn collega's erin geslaagd patent te verkrijgen op een goedwerkende bioreactor voor de productie van hartkleppen. Het is een complexe opstelling waarin veel wordt gemeten en waaraan veel kan worden geregeld, zoals het drukverschil over de klep en de vervorming op diverse plaatsen in het zich ontwikkelende weefsel. 'Die zijn bepalend voor de uiteindelijke



kwaliteit van de hartkleppen', zegt Baaijens, die begint met een drager van biologisch afbreekbaar polyglycolzuur (PGA) waarin cellen uit veneuze bloedvaatjes met behulp van fibrine worden gezaaid. 'PGA is een standaard bio-afbreekbaar polymeer dat in de chirurgie veel wordt gebruikt voor hechtdraad en al eerder in de tissue engineering is toegepast. Na twee weken verliest het zijn mechanische sterkte en na acht weken is het bijna helemaal verdwenen. Wij laten de kleppen vier weken in de bioreactor vormen, waarna ze in het hart worden geïmplantieerd. Dan moet het weefsel de mechanische sterkte van het dragermateriaal hebben overgenomen.'

De experimenten in proefdieren, die in nauwe samenwerking met het universiteitsziekenhuis in Zürich worden uitgevoerd, zijn een uitdaging, vindt Baaijens. 'We kunnen de kleppen op een minimaal invasieve wijze via de apex - de punt van het hart - implanteren. Op deze manier kunnen we relatief

eenvoudig bestuderen hoe de klep zich na implantatie verder ontwikkelt. Schapen zijn voor dit soort onderzoek hét proefdier omdat ze relatief veel last hebben van kalkvorming op hun hartkleppen. Als het implantaat in schapen niet leidt tot toegenomen verkalking, is de kans groot dat er wat dat betreft ook in mensen geen problemen ontstaan. De eerste resultaten zien er veelbelovend uit, maar er is nog veel vervolgonderzoek nodig voordat klinische toepassing in zicht komt'.

Bloedvaatjes

Behalve aortakleppen laat Baaijens nu ook bloedvaten in een bioreactor groeien. Daarbij gaat het om kleine vaatjes met een inwendige diameter van minder dan vijf millimeter. Die zijn geschikt voor toepassing als coronairvaten in het hart, als vat voor de aansluiting van dialysepatiënten en ter vervanging van dichtgeslibde slagaderen in de onderbenen. Baaijens: 'We gebruiken dezelfde matrix en dragermateriaal met cellen en

fibrine, maar dan in de vorm van een buisje. De binnenkant van het buisje kunnen we een beetje oppompen om de hartslag te simuleren. Bloedvaten staan permanent onder druk, en mogen door deze druk niet langzaam groter worden, zoals de binnenband van een fiets zou doen. Om voldoende sterk te zijn en weerstand te bieden tegen de inwendige druk, moeten we de vaatjes langer kweken dan hartkleppen. Bovendien heeft de reactie van het gekweekte weefsel na implantatie grotere gevolgen bij bloedvaatjes omdat ze zo klein zijn. Ze hebben daardoor de neiging te verstopen. Daarvoor zoeken we nog een oplossing.'



Bioreactor opstelling waarin de hartkleppen gekweekt worden

Clemens van Blitterswijk, Universiteit Twente

Bloedvaatjes in de bioreactor

Voor het herstellen van een beschadigd bot is al gauw een kunstmatig implantaat van één kubieke centimeter nodig. Een dergelijk groot stuk dragermateriaal inzaaien met levende cellen en implanteren, is vragen om moeilijkheden. De afstanden in het construct zijn te groot om de cellen te kunnen voorzien van voldoende zuurstof en voedsel en de afvalstoffen adequaat af te voeren. Diffusie alleen is daarvoor onvoldoende. Bloedvaatjes of andere trucs zijn nodig als de cellen in bijvoorbeeld een bioreactor worden opgekweekt. Prof. dr. Clemens van Blitterswijk werkt in Enschede aan manieren om voldoende zuurstof en voedingsstoffen in botimplantaten te krijgen.

Van Blitterswijk, hoogleraar Weefselgeneratie aan de Universiteit Twente, is één van de tissue engineers van het eerste uur. Sinds het eind van de jaren '80, bestudeert hij implantaten die de hechting aan bot en de vorming van nieuw botweefsel bevorderen. Hij heeft het allemaal zien langs komen: de speciale keramieken en biomoleculen die botvorming stimuleren, de hausse van de alles kunnende stamcellen, de groeibevorderende factoren en nu de combinatie van al die technieken. 'De benadering is ver-

anderd', zegt Van Blitterswijk. 'Zes jaar geleden was het idee nog om stamcellen een bepaalde richting in te dwingen en deze dan te gebruiken voor de regeneratie van specifieke weefsels. Ook wij hebben geconstateerd dat dit wel kan, maar dat het in de praktijk niet zeer succesvol is. Nu beschouwen we stamcellen meer als fabriekjes van allerlei actieve factoren, die de cellen in de omgeving stimuleren, maar niet zelf nieuw weefsel maken.'

Ook ten aanzien van de toepassing van groeifactoren, zoals de botstimulerende BMP-eiwitten (*bone morphogenetic protein*), is de houding veranderd, stelt Van Blitterswijk. 'Steeds meer onderzoekers vragen zich af of je die wel afzonderlijk en kunstmatig moet toepassen. In het lichaam zijn een stuk of twintig verschillende BMPs, die samen veel krachtiger werken dan de individuele factoren. Er is minder de neiging om de werking van al die factoren te ontrafelen, maar meer om de cellen zelf te gebruiken. Want de systemen zijn erg complex.'

Inductieve eigenschappen

Van Blitterswijk en zijn collega's concentreren zich nu op de productie van materialen met

zogeheten 'inductieve eigenschappen'. Deze zetten de omgeving aan tot de vorming van botweefsel. 'Daarbij kijken we naar de toepassing van cellen die andere cellen stimuleren en naar simpeler oplossingen in het gebruik van materialen, waarmee we hetzelfde kunnen bereiken als met meer ingewikkelde constructen.'

Een van de vraagstukken waar Van Blitterswijk voor staat, is hoe in een bioreactor kan worden gevolgd wat er precies gebeurt. Bijvoorbeeld tijdens de weken durende kweek van een stukje bot van een kubieke centimeter met behulp van botvormende cellen. 'Een bioreactor is feitelijk een *black box*. Je kunt niet goed volgen hoe de cellen zich in het dragermateriaal gedragen. Hoe deze zich, al dan niet, in de juiste richting ontwikkelen en vermeerderen. Daarvoor hebben we een truc bedacht, die in elk geval werkt voor kleine volumes onder de kubieke millimeter.'

Door het groeiende construct het lokaal met licht te bestralen en een gevoelige fotondetectie, meten de onderzoekers hoe het ingestraalde licht wordt verstrooid. Een analyse van het

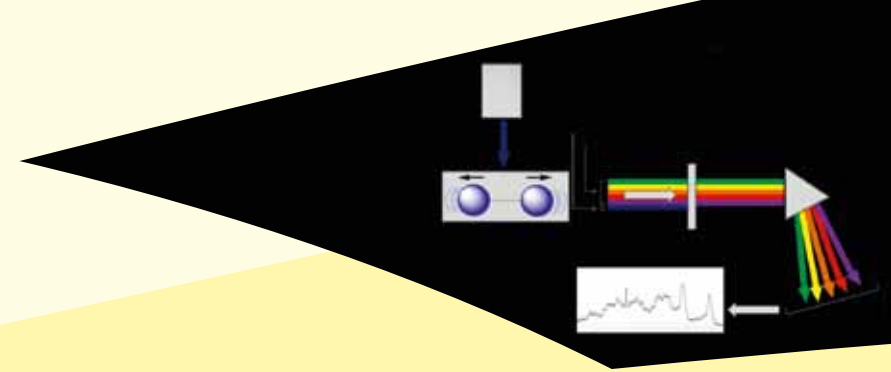
patroon van die weerkaatsing levert een soort vingerafdruk van de cellen wat betreft hun DNA, eiwitten en RNA. Dit geschiedt met een variatie op een techniek die al in de jaren '20 werd ontdekt (de Raman-spectroscopie). Die gegevens kunnen worden geclusterd tot een beeld van wat er in het zich ontwikkelende weefsel afspeelt: waar is bot, waar zit kraakbeen, in welke richting liggen de botstructuren? 'Dat is uniek', zegt van Blitterswijk. 'Doordat het spectrogram karakteristiek is, kunnen we live een beeld krijgen op millimeterschaal, de doordringbaarheid van het licht. Met nieuwe technieken kunnen we misschien verder komen, maar aan die grotere structuren zijn we nog niet toegekomen.'

Sonic hedgehoc

De cellen die zich dieper in het botweefsel bevinden, hebben voedsel en zuurstof nodig. In een bioreactor kan die aanvoer nog wel worden bewerkstelligd, maar in het levende weefsel is dat andere koek. Het duurt na een implantatie

vaak een week of twee voor er vanuit het omringende weefsel bloedvaten in het construct zijn gevormd. Dat is veel te lang, constateert Van Blitterswijk. 'De cellen zullen sterven en al je inspanningen tijdens de kweekfase in de bioreactor zullen vergeefs zijn geweest.' De onderzoekers experimenteren met kunstmatige vaatjes in het dragermateriaal. Tijdens de kweek in de bioreactor moeten die ervoor zorgen dat ook de cellen in het midden van de drager van voedsel en zuurstof worden voorzien. Deze kunstmatige vaatjes combineren ze met het inzaaien van bloedvatcellen die tenslotte levende vaatjes moeten vormen. Deze moeten, als het construct eenmaal in het proefdier is geplant, de binnenste cellen kunnen bevoorraden. 'Bij spieren is dat gelukt, de vaatjes sluiten keurig aan op de bloedvatjes van de gastheer', herinnert Van Blitterswijk zich eerdere experimenten. 'Maar bij bot werkt het niet. Er blijkt een negatieve communicatie tussen de bloedvatjes en de botcellen te zijn.

We hebben wel kunnen aantonen dat de vaatjes aansluiten op de capillairen van de gastheer en dat er meer bot wordt gevormd, maar de vaatjes zelf worden onvoldoende volwassen. Dat lijkt te maken te hebben met de staat waarin de bloedvatjes verkeren en we zoeken nu naar de factoren die daar invloed op hebben. We concentreren ons daarbij nu op *Sonic hedgehog*, een signaleringseiwit dat in het embryo en op latere leeftijd is betrokken bij de ontwikkeling van bloedvatjes. Daar hebben we nu succes mee.'



Schematic representation of the confocal Raman microscope setup

Harrie Weinans, Erasmus MC Rotterdam

Bioreactor voor kraakbeencellen

Betere mogelijkheden voor het herstellen van kraakbeen staan hoog op het verlanglijstje van orthopedisch chirurgen. Daarbij gaat het vaak om mensen die op relatief jonge leeftijd een trauma aan, vooral, de kniegewrichten opliepen en artrose ontwikkelen. Kraakbeen herstelt slecht en nieuwe technieken om nieuw kraakbeen te maken, zijn maar matig succesvol, zoals het via een kijkoperatie stimuleren van het onderliggende merg. Biomedisch ingenieur prof. dr. ir. Harrie Weinans zoekt bij de afdeling Orthopedie van het Erasmus MC naar manieren om kraakbeencellen in speciale bioreactoren te programmeren zodat ze het juiste kraakbeen gaan maken.

Er zijn vele vormen van kraakbeen. Het kraakbeen in de oorschelp en neus bijvoorbeeld heeft andere eigenschappen dan het kraakbeen in een kniegewricht of een tussenwervelschijf. Kraakbeen bestaat uit relatief weinig cellen die zich in een matrix van het eiwit collageen en de suikerhoudende glycosaminoglycanen bevinden. Zowel het collageen als de glycosaminoglycanen komen in verschillende typen voor en in het gewrichtskraakbeen is de samenstelling zodanig dat dit het water opneemt, waardoor het opzwellt. Zo

ontstaat een stevig waterhoudend verend kussen, dat de krachten in het gewricht goed kan opvangen. Weinans: 'Je kunt met een kijkoperatie een gaatje boren in het beschadigde kraakbeen tot in het onderliggende bot. Dan komen er cellen uit het beenmerg die nieuw kraakbeen aanmaken. Het vervelende is dat dit kraakbeen wel de beschadigingen opvult, maar van een geheel andere samenstelling is dan het kraakbeen dat er eerst zat. Het heeft lang niet de dempende functie als het zogeheten hyaline kraakbeen.'

Dat is ook het geval als eerst chondrocyten, de kraakbeencellen, uit een biopst van de patiënt worden gewonnen en buiten het lichaam worden vermenigvuldigd en teruggeplaatst in het gewricht. Dat is een ingewikkeld en duur karwei en deze operatie is wereldwijd inmiddels ruim twintigduizend keer uitgevoerd. Maar het werkt nog lang niet perfect, constateert Weinans. 'De cellen vormen nog steeds niet het gewenste type kraakbeen met het vereiste krachtdempende vermogen. Als je de cellen wat beter voorbereidt tijdens het kweken, kun je ze misschien zo voorprogrammeren dat ze wel het juiste

collageen en glycosamineglycaan maken, dat water vast houdt. Wij denken dat dit mogelijk is door de cellen te kweken onder omstandigheden die de fysiologische condities van een gewricht nabootsen. Daartoe is een bioreactor ontworpen waarin de chemische condities lijken op die in een gewricht, zoals een milieu met weinig zuurstof en veel zout. Ook hebben we de fysische condities nagebootst door mechanische belasting op de cellen uit te oefenen.'

Zuurstofarm

Er moest flink worden geëxperimenteerd voor de condities zo waren als de onderzoekers hoopten. Het aanbrengen van mechanische belasting op de cellen in kweek deed wel iets, maar onvoldoende. Pas toen de onderzoekers een verhoogde osmotische druk, via een zout milieu, aanbrachten, gebeurde er echt iets. 'Dat was bingo!', herinnert Weinans zich. 'De cellen reageerden uitstekend. Ze gingen bij een bepaalde osmotische druk wel 50 keer meer van het door ons gewenste collageen type II maken. Ook het gen voor een essentieel transporteiwit, het tonEBP, dat een rol speelt bij het waarnemen van de osmoti-

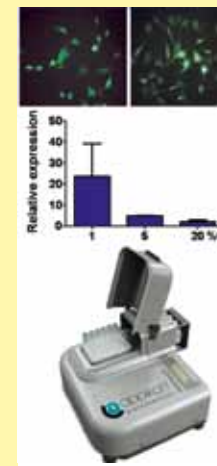
sche druk (de toniciteit), kwam in deze cellen veel meer tot expressie. Een teken dat we goed zaten.' Daarnaast brachten de onderzoekers de zuurstofspanning in de bioreactor omlaag. Meestal worden cellen gekweekt onder de zuurstofcondities van de buitenlucht, ruim 20 procent. Maar kraakbeen is niet doorbloed en de zuurstof en voedingsstoffen moeten zich via diffusie een weg naar de kraakbeencellen banen. Weinans: 'We hebben de zuurstofspanning in de bioreactor verlaagd tot minder dan 1 procent. We zien nu dat de kraakbeencellen niet alleen type II collageen en glycosaminoglycanen maken. Ook produceren de chondrocyten minder negatieve stoffen, zoals enzymen die het kraakbeen kapot maken.' De kraakbeencellen reageren op stressvolle omstandigheden door enzymen te maken die de matrix in het losmazige weefsel oplossen. Zo knippen ze zich als het ware zelf uit het kraakbeen. Een proces dat kan worden tegengegaan door de omstandigheden van het kraakbeen na te bootsen.

De bioreactor wordt verder geperfectioneerd en de onderzoekers willen de invloed van mechanische belasting nader bestuderen. Weinans: 'We richten ons bij de kweek van kraakbeencellen nu verder op de tonische aspecten, de osmotische druk. Bij chronische patiënten zie je dikwijls een geleidelijke aftakeling van het kraakbeen vanaf hun zestigste levensjaar. Speelt een mogelijk afnemende toniciteit in de gewrichten daarbij een rol? In zieke gewrichten heeft het kraakbeen meer moeite om osmotische druk op te bouwen dan in gezond weefsel. In zowel weefselkweek als in aftakelende gewrichten gaan we de toniciteit verder onderzoeken en de cellulaire mechanismen erachter proberen te ontrafelen.'

Chronische patiënten

Weinans en zijn collega's hebben hun aandacht enigszins verlegd van de acute patiënt die kraakbeenschade oploopt door een trauma naar de chronische patiënt. 'Die zuivere tissue engineering van kraakbeen bij trauma, waarbij cellen

uit een biop worden opgekweekt en teruggeplaatst in het gewricht, is een heel commerciële business. Daar kom je op dit moment alleen verder door samenwerking met bedrijven en het opzetten van klinisch onderzoek. Die stap hebben wij niet gemaakt. We concentreren ons nu eerst op de echte artrosepatiënten.'



Top: lentiviral transduced human chondrocytes cultured under different oxygen levels.
Middle: TGFβ mRNA expression in these cells under different oxygen levels
Bottom: The bioreactor we used for these experiments