

Carlijn Voermans, Sanquin Amsterdam

Zoeken naar subsets van mesenchymale stamcellen

De toepassing van mesenchymale stromale cellen (MSCs) is veelbelovend in celtherapie vanwege hun vermogen om het immuunsysteem te beïnvloeden en omdat ze kunnen differentiëren tot andere celtypen waarmee weefsels hersteld kunnen worden. Een belangrijk onopgelost probleem is de vraag hoe ze dat doen en of de voor therapie gebruikte MSCs wel de plaats van bestemming bereiken. Er zijn aanwijzingen dat dit voor slechts 10 tot 20 procent van de cellen het geval is. Onduidelijk is welke verschillen tussen de cellen bepalen welke cel wel en welke niet het beschadigde orgaan waar ze het steunweefsel zouden moeten herstellen, bereikt. Medisch bioloog dr. Carlijn Voermans, hoofd van het laboratorium voor Stamceltransplantatie van Sanquin in Amsterdam, ging op zoek naar de verschillen die het lot van de diverse mesenchymale stamcellen bepalen.

‘Er zijn aantoonbare verschillen tussen de MSCs’, zegt Voermans. ‘Bied je gekweekte MSCs een groeifactor aan, dan migreert een deel daar wel heen en een ander deel niet. De cellen in die laatste groep reageren wel, maar ze gaan er niet heen. Zulke onderlinge verschillen zijn ook bekend uit experimenten met andere stamcellen. De bloedvormende

hematopoïetische stamcellen (HSCs) bijvoorbeeld. Maar deze reageren alleen op de factor SDF-1 (de *stromal cell derived factor*), terwijl MSCs ook op andere factoren reageren. Wij hebben naar drie verschillende subsets van MSCs uit het beenmerg gekeken en met micro-arrays onderzocht of er verschillen zijn te vinden in de expressie van hun genen.’

Dat blijkt inderdaad het geval te zijn. In de cellen die wel migreren is de activiteit van een klein groepje van negen genen veranderd. Helaas hebben deze genen geen relatie met de eiwitten die zich bevinden op het celoppervlak en als marker voor deze specifieke groep van cellen zouden kunnen dienen. Voermans: ‘Dat we geen verschillende oppervlaktekenmerken tussen die cellen vinden, maakt het lastig ze te onderscheiden.

De traditionele kenmerken waarmee we MSCs onderscheiden van de bloedvormende HSCs zijn heel algemeen. Ze hebben twee eiwitten niet op hun celoppervlak die HSCs wel hebben en drie andere wel. Ook hechten MSCs zich aan plastic, iets dat HSCs niet doen. Maar erg specifieke verschillen zijn dat niet.’

Immunologische eigenschappen

Twee van de genen springen eruit wat betreft hun reactie op migratie-bevorderende stoffen. Het Nur77 en het Nur11 gen die beide zijn betrokken bij de vroege reactie van cellen op groeifactoren in de omgeving. Voermans: ‘We zijn met die genen gaan spelen en als we ze via genetische modificatie extra tot expressie brengen, vertonen de cellen meer doelgerichte migratie in de richting van de groeifactor SDF-1. Althans in kweekbakjes. Ook blijkt de celcyclus te veranderen. Door het opreguleren van deze twee genen komen relatief meer cellen in de rustfase in plaats van in de delingsfase. Wij denken dat dit komt doordat de delende cellen hun energie voor dat delen nodig hebben en niet gemakkelijk ook doelgericht kunnen bewegen. We gaan nu onderzoeken of deze twee genen ook invloed hebben op andere eigenschappen van de cellen, zoals hun immunologische eigenschappen en de productie van cytokines - de signaalstoffen van het immuunsysteem.’ De onderzoeksgroep van Voermans probeert via de techniek van de micro-arrays en het bepalen van genetische activiteit, ook te achterhalen of er ook subsets bestaan binnen

de primaire MSCs. Bijvoorbeeld onrijpe MSCs die kolonies vormen in weefselkweek of juist meer uitgerijpte exemplaren die wat minder mogelijkheden hebben om uit te groeien tot andere weefseltypen.

Voermans en haar collega's hebben ook andere voorlopercellen bekeken, zoals de EPCs, de voorlopers van het endotheel van de bloedvaten en de BOECs, de *blood outgrowth endothelial cells*. Die laatste kunnen worden gewonnen uit navelstrengbloed en perifere bloed. De verschillen tussen die cellen lijken vooral voor de fijnproevers, en daartoe behoort Voermans zeker. 'De BOECs zijn net iets verder in hun ontwikkeling dan de EPCs. We willen weten welke capaciteit de EPCs en BOECs hebben, welke subgroepen er zijn en hoe ze in het laboratorium kunnen worden gekweekt en geactiveerd. Maar we bestuderen ook hun reilen en zeilen in vivo. Met de zogeheten *time lapse video microscopy*, die we in het kader van het DPTE-

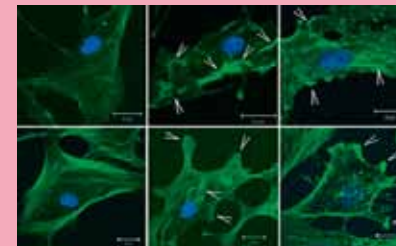
programma hebben ontwikkeld, kunnen we in bijvoorbeeld een muizenpootje in beeld brengen hoe de EPCs over het bloedvat-endotheel rollen en bijdragen aan het herstel van bloedvatbeschadigingen.' Het zal inmiddels niemand verbazen dat ook de BOECs weer verschillende subgroepen vormen en bijvoorbeeld andere eigenschappen hebben als ze uit navelstrengbloed komen dan als ze uit perifere bloed zijn gewonnen. De cellen uit navelstrengbloed lijken iets gemakkelijker bloedvaten te kunnen vormen.

Niet eenvoudiger

Langzamerhand lijkt door al die soorten stamcellen, subgroepen en celtypen het zicht op het bos langzaam achter de bomen te verdwijnen. 'Het wordt er niet eenvoudiger op', erkent Voermans. 'En we hebben nog geen inzicht in de relevantie van veel van de gevonden verschillen. Van andere bevindingen overigens wel. Zo zijn we er trots op dat we hebben ontdekt dat je specifiek MSCs kunt isoleren die bepaalde eigenschap-

pen van migratie hebben. En ook dat we dat hebben kunnen doen met primaire beenmergcellen, die we niet eerst in het laboratorium hebben hoeven op te kweken. Het zou grote consequenties voor de kliniek kunnen hebben, als zou blijken dat je voor het bereiken van een immunologisch effect een andere subset van MSCs moet gebruiken dan als je gebruik wilt maken van de regeneratieve eigenschappen van MSCs.'

PDGF-BB and SDF-1a induced morphological changes in the actin cytoskeleton of BMSC. The upper panel depicts cell morphology after 5 min stimulation with control serum-free medium (left), PDGF-BB (middle) or SDF-1a (right). PDGF-BB and SDF-1a stimulation induced top ruffle formation (arrowheads). The lower panel depicts cell morphology after 30 min stimulation with control serum-free medium (left), PDGF-BB (middle) or SDF-1a (right), showing lateral membrane ruffles (arrowheads). Green: F-Actin, blue: Nuclei.



Toin van Kuppevelt, UMC St Radboud Nijmegen

Huidweefsel en bloedvaten uit een zakje

Biochemicus dr. Toin van Kuppevelt is op zoek naar praktische technieken voor tissue engineering, die aansluiten bij de dagelijkse gang van zaken in de kliniek. In feite naar *off the shelf* technologie. Kun je, zo vraagt hij zich af, verschillende typen dragermateriaal op de plank hebben liggen en er één van kiezen, afhankelijk van of de arts in het lichaam huid, lever of kraakbeen nodig heeft. 'Mijn insteek is de matrixchemie. Cellen liggen ingebed in een extracellulaire matrix en we weten dat die matrix bepaalt wat er met de cellen gebeurt. Of ze differentiëren, groeien, in rust gaan, migreren of allerlei stoffen afgeven. De heilige graal in de regeneratieve geneeskunde is het maken van matrixen die dat kunnen regelen.' Van Kuppevelt is nog niet zo ver dat de chirurg alleen maar het juiste zakje hoeft open scheuren en de inhoud ervan in de patiënt te naaien. Maar dat gaat komen, verzekert hij.

Van Kuppevelt richt zich voornamelijk op huid en bloedvaten. In samenwerking met de kliniek kwam hij erachter dat klinici, technici en onderzoekers veel meer van elkaar moeten begrijpen om te komen tot praktisch bruikbare producten. 'Ik had een prachtige matrix gemaakt die blaasweefsel kan vervangen. Maar de uroloog die hem toepaste, vond het

niks omdat het materiaal scheurde als hij het in de blaas naaide. Daar had ik onvoldoende aandacht aan geschonken. Het voordeel van het DPTE-programma was dat het mensen van verschillende pluimage bijeen heeft gebracht, waardoor men elkaars wereld beter heeft leren begrijpen. Als je op je eigen eilandje blijft zitten, wordt het niks.'

Bij de sectie Matrixbiochemie van het Nijmeegse UMC St Radboud, houden ze niet van gokken. 'Wij willen niet een of andere constructie maken, die in een proefdier zetten en dan maar zien wat er gebeurt. Wij zijn juist sterk geïnteresseerd in oorzaak en gevolg', zegt Van Kuppevelt. 'Wij ontwerpen een matrix op de tekentafel en willen dan kunnen voorspellen wat er in een proefdier zal gebeuren. Er is veel *trial and error* geweest. Zo wordt er in de dermatologie veel met gespoelde varkenshuid gewerkt. De effecten daarvan verschillen echter van batch tot batch door de aanwezige verontreiniging in dit biologische materiaal. Als je de ontwikkelingen van cellen met een extracellulaire matrix wilt sturen, dan kun je niet de ene dag een andere drager maken dan de andere. Wij

werken met matrixen van collageen, elastine, glycosaminoglycanen en zuivere groeifactoren. Alle door ons gebruikte componenten zijn zuiver, waardoor de drager als het ware moleculair is gedefinieerd.'

Opper- en lederhuid

Voor de analyse van de reacties van de cellen op de matrix zijn de onderzoekers niet over één nacht ijs gegaan. Ze hebben meettechnieken ontwikkeld die heel veel informatie tegelijkertijd opleveren. Het weefsel dat zich in de matrix heeft gevormd na hun implantatie in proefdieren, wordt 'tot op het bot' geanalyseerd. De activiteit van het volledige genoom van de cellen wordt in kaart gebracht door middel van micro-arrays en de histologie van het weefsel wordt minutieus bestudeerd onder de microscoop. Daarnaast worden de dragermaterialen in kweekbakjes getest met verschillende soorten cellen. Van Kuppevelt: 'Er blijken matrixen te zijn waarop cellen nauwelijks tot proliferatie komen en andere waarop ze zich juist heel sterk ontwikkelen. We hebben ook een matrix gemaakt waarop de keratinocyten uit de opperhuid allerlei stoffen produceren die ze



ook in de natuurlijke huid maken en ook een hoornlaag vormen. We hebben nu een construct gemaakt dat uit twee lagen bestaat: de onderste drager stimuleert de vorming van een lederhuid-achtig weefsel, terwijl de bovenste matrix, die andere eigenschappen heeft, aanzet tot de vorming van een opperhuid. Het interessante is dat je daarbij geen cellen hoeft in te zaaien, maar dat de juiste celtypen vanzelf vanuit het omringende weefsel in de matrix groeien.'

Een vergelijkbare aanpak hebben de onderzoekers gekozen voor de productie van bloedvatjes op een buisvormige matrix. Deze sandwich van elastine en collageen is geïmplanteerd in varkens. 'Dat bloedvat heeft het een paar weken goed gedaan, maar is vervolgens dichtgeslibd', zegt Van Kuppevelt. 'Het is nog zeker niet perfect, maar in ons huidconstruct zien we wel de juiste cellen ontstaan: keratinocyten, fibroblasten en bloedvatcellen en er wordt elastine geproduceerd, dat in de extracellulaire matrix van de huid belangrijk is voor de

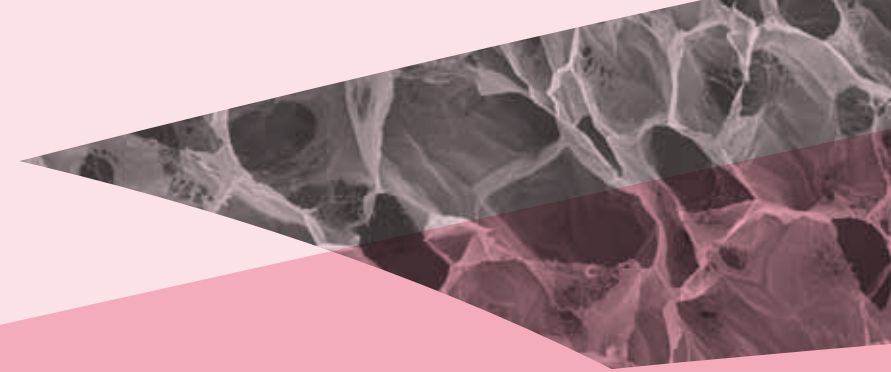
flexibiliteit. Het dragermateriaal wordt langzaam afgebroken en de cellen moeten het dan overnemen en de structuur van het weefsel behouden.'

Minder proefdieren

Van Kuppevelt en zijn collega's zijn ook terug gegaan naar het embryo. Is het mogelijk, zo vroegen zij zich af, om een dragermateriaal te creëren dat lijkt op de omgeving zoals die aanwezig is in het embryo? 'We proberen de zogeheten embryogenese na te bootsen in een volwassen muis. Daartoe hebben we de groeifactoren en eiwitten geïdentificeerd die een rol spelen bij de huidvorming in het embryo en die hebben we op een matrix aangebracht. Nu onderzoeken we of met zo'n embryonale matrix de huid beter geneest met minder contracties en littekenvorming.'

Van Kuppevelt is blij dat het mogelijk is gebleken om moleculair gedefinieerd dragermateriaal te maken en daarmee op een reproduceerbare en voorspelbare wijze bloedvaten en huid te maken.

'Daarbij hebben we nieuwe technieken, via het genetische expressiepatroon, ontwikkeld waarmee we precies kunnen waarnemen wat er in cellen en weefsels gebeurt. Omdat we zoveel in één keer tegelijkertijd kunnen meten, vermindert dat ook het aantal benodigde proefdieren. Dat vind ik een belangrijk aspect van ons onderzoek. Hoe minder proefdieren, hoe beter!'



Collageenscaffold (scanning-electronmicroscopie)

Pieter Doevendans, UMC Utrecht

Implanteren van een ring van hartcellen

Hartfalen is een ernstig invaliderende ziekte, die jaarlijks in Nederland ongeveer 200.000 mensen treft, vaak als gevolg van een eerder doorgemaakt hartinfarct. Helaas is deze aandoening, waarbij de hartspier het langzaam maar zeker opgeeft, ook dodelijk. Ongeveer de helft van de patiënten overlijdt binnen twee jaar nadat de eerste symptomen zijn herkend als hartfalen. Net als velen, stortte prof. dr. Pieter Doevendans, hoogleraar Cardiologie aan het UMCU, zich bijna een decennium geleden enthousiast op de inzet van die wonderbaarlijke stamcellen in het lichaam die het hart spontaan kunnen doen genezen. Het bleek een stuk gecompliceerder te zijn. 'Ik ben de afgelopen jaren wel wat nederiger geworden', zegt Doevendans. 'We passen de techniek wel toe in de kliniek, maar in alle eerlijkheid moet ik erkennen dat ik niet precies weet wat we doen. Dat zijn we nu verder aan het uitzoeken.'

De lotgevallen van de bij de regeneratie van de hartspier gebruikte cellen, is nog vergaand onduidelijk, vindt Doevendans. 'De uit het beenmerg gehaalde cellen die in de kliniek worden gebruikt voor het herstel van de hartspier zijn geen zuivere mesenchymale stamcellen, maar een veel bredere groep van *bone marrow derived cells*. Ze worden uit het

beenmerg van de patiënt gehaald en na een uur of twee filteren teruggeplaatst in de beschadigde hartspier. Dat is veel werk voor een relatief geringe winst.' In een kweekbakje lukt het heel goed om foetale stamcellen en stamcellen uit het hart van volwassenen te kweken en ritmisch te laten samentrekken, alsof ze een kloppend hart vormen. Wellicht zijn dat voorlopercellen van de hartspier, de *Cardiomyocyte Progenitor Cells* (CMPCs). In het menselijk lichaam zijn dit soort cellen ook gevonden.

'Daar is echter nog nooit aangetoond dat dit soort cellen een directe functie hebben bij de regeneratie van de hartspier', zegt Doevendans. 'Wij werken met humane cellen in proefdieren, die we daar kunnen terugvinden doordat ze zijn gemerkt. Je kunt ze uit hartweefsel isoleren, met veel moeite laten differentiëren tot cardiomyocyten en in muizen en varkens injecteren om de functie van een beschadigde linker hartkamer te herstellen. Maar je kunt ze ook direct als voorlopercellen inspuiten in de linker kamer, die daardoor herstelt. Het maakt niet uit of ze eerst zijn gedifferentieerd of niet. Die

techniek werkt goed in proefdieren, maar in de mens zijn de resultaten teleurstellend. Het blijkt dat in het lichaam minder dan één procent van de voorlopercellen differentieert tot hartspiercellen en slechts een fractie meer van deze cellen is überhaupt terug te vinden in of rond het aangedane weefsel.' De cellen overleven overigens wel in het proefdier, maar vormen niet zelf spierweefsel. 'Deze cellen leveren wel een bijdrage aan het herstel van de beschadigde hartspier, maar niet door zelf spiercellen te worden, constateert Doevendans. 'Waarschijnlijk doen ze dat door het produceren van factoren die andere cellen aanzetten tot herstel van het weefsel.'

Trouwring met cellen

Doevendans en zijn collega's hebben de CMPCs gebruikt voor tissue engineering. Ze hebben de cellen gezaaid in een ringvormige drager van collageen. Zo ontstaat een zeer dun ringetje van hartspiercellen in een eiwitlaag. Een soort trouwring van een millimeter dik, dun genoeg zodat geen bloedvatjes nodig zijn om het weefsel in stand te houden. 'We hebben de ringetjes zelf nog niet voldoende kunnen testen in het hart.'



Collega's van ons hebben zulke studies wel gedaan met een netje van zulke ringetjes en dat als een soort korfje op het hart geplakt. Daarmee is herstel van de beschadigde spierfunctie aangetoond. We verwachten dat dit ook zal geschieden met de door ons ontworpen ringetjes. Er ontstaat geen werkelijke integratie van ons construct en de hartspier zelf. Het ringetje ondersteunt echter wel de verminderde pompfunctie van het hart.' Er ontstaat ook een elektrische integratie, waardoor de spiercellen in het ringetje in het zelfde ritme samen-trekken als het hart. Wordt het hart stil gezet met specifieke medicijnen, dan blijft het ringetje doorkloppen. Doevendans: 'We hebben de celtechniek gepatenteerd en een bedrijf in Den Bosch gaat het toepassen als model om middelen te onderzoeken die het degenereren van de hartspier, zoals bij hartfalen, zouden kunnen tegen gaan.'

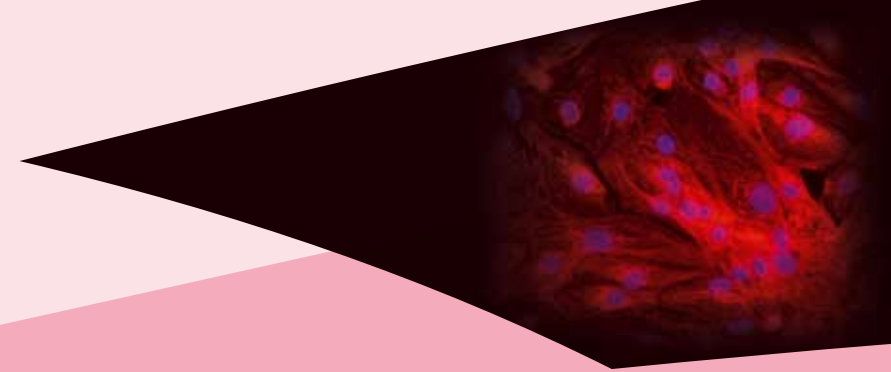
In een Leids collega lab zijn ook de zogeheten *epicardiale* cellen van het hart

bestudeerd. Deze cellen zijn afkomstig van de buitenkant van het hart en vormen een soort tussenvorm tussen stamcellen van het hart en hartspiercellen. Het lukt echter niet om van deze epicardiale cellen hartspiercellen te maken in een kweekbakje. Wel blijken ze, als ze worden toegevoegd aan een celkweek van voorlopers van hartspiercellen (de CMPCs), die cellen zeer sterk te kunnen stimuleren om uit te groeien tot volwassen hartspiercellen.

Doevendans: 'Hoe dat precies werkt, is onduidelijk. We onderzoeken nu de rol van allerlei cellulaire factoren die zulke cellen uitscheiden. Ook bestuderen we de betekenis van de onderlinge contacten tussen deze epicardiale cellen en de CMPCs.'

Doevendans weet nog steeds niet wat de beste aanpak is om het klinische resultaat van de toepassing van stamcellen bij het herstel van de hartspier te verbeteren. Ook heeft hij bedenkingen bij het kweken van de voorlopercellen omdat de

eigenschappen daarvan veranderen tijdens die laboratoriumkweek. Misschien biedt het samen opkweken van deze cellen met de epicardiale cellen perspectief. 'Alles overziende, denk ik dat een combinatie van een drager, zoals collageen, en ingezaaide cellen het beste resultaat zal geven. Zo maak je een kunstmatig stukje spier dat je in het hart van de patiënt kunt planten.'



CMPC differentiated,
alpha actinin staining

Victor van Hinsbergh, VUmc Amsterdam

Nieuwe bloedvaatjes door chronisch zuurstofgebrek

Een weefsel dat dikker is dan drie lagen cellen, kan alleen goed functioneren als het bloedvaatjes bevat. Anders krijgen de cellen onvoldoende zuurstof en sterven ze. Hypoxie, een te geringe hoeveelheid zuurstof in het weefsel, stimuleert het ontstaan van bloedvaatjes. Dat is bijvoorbeeld een van de redenen waarom er in nieuw weefsel, maar ook in tumorweefsel bloedvaten groeien. Dat laatste is feitelijk ongewenst omdat tumoren zich zo in leven kunnen houden. Omgekeerd komt het ook voor dat er op plekken in het lichaam met weinig zuurstof, zoals hartspierweefsel na een hartinfarct of bij mensen met een slechte doorbloeding van de benen, toch geen nieuwe bloedvaatjes ontstaan. Prof. dr. Victor van Hinsbergh, hoogleraar Pathofysiologie van de Vaatwand bij het VUmc Amsterdam, bestudeert de relatie tussen het ontstaan van bloedvaatjes, een chronisch gebrek aan zuurstof en de betrokkenheid van specifieke bloedvatstimulerende factoren.

‘De kennis die we over hypoxie hebben, is vooral gebaseerd op acuut zuurstoftekort, zoals die ontstaat bij ischemie na een hartinfarct. Wij willen juist graag weten wat er gebeurt als weefsels langduriger onder zuurstofarme omstandigheden verkeren’, zegt Van Hinsbergh. De pathofysioloog en

zijn collega’s bootsten die situatie na in het laboratorium en in proefdieren. Hun doel was te onderzoeken of cellen en weefsels kunnen worden voorbereid op een situatie met weinig zuurstof, zoals deze ontstaat na transplantatie bij tissue engineering. Van Hinsbergh: ‘Implantaten met weefsel of cellen zijn vaak moeilijk te transplanteren vanwege een tekort aan zuurstof in het weefsel. Wellicht kunnen we weefsels en cellen daarop voorbereiden door ze vlak voor de transplantatie enige tijd onder zuurstofarme omstandigheden te kweken.’ Dat blijkt inderdaad zo te zijn. De cellen reageren met een beschermende reactie, waardoor ze langer toe kunnen met minder zuurstof. Worden die cellen overgeplant in het weefsel van een gastheer dan overleven ze niet twee dagen, maar 3,5 dag. Zo krijgen bloedvaatjes meer tijd om het weefsel in te groeien en de cellen van zuurstof en voedingsstoffen te voorzien.

De endotheelcellen, cellen die de binnenbekleding van bloedvaten vormen, staan bekend om hun vermogen nieuwe bloedvaatjes te vormen. Van Hinsbergh en zijn collega’s ontdekten dat ook voorlopercellen

(de endotheel progenitor cellen, EPCs en de endotheel kolonievormende cellen, ECFCs) daarbij een rol spelen. ‘Er blijken twee soorten voorlopercellen te zijn. De witte bloedcel die zich vormt als een endotheelcel en de voorlopercel die uitgroeit tot een echte endotheelcel. Die “echte” endotheelcellen vormen de buisjes in het lichaam. De andere cellen ondersteunen dat proces. Dat kunnen we ze ook in het laboratorium laten doen, bijvoorbeeld op dragermateriaal.’ De onderzoekers hebben de genetische activiteit van de diverse typen cellen geanalyseerd en de verschillende celtypen gekarakteriseerd.

Cellen in rust

‘Door onze experimenten hebben we ook ontdekt dat de cellen in het weefsel anders reageren onder zuurstofarme omstandigheden dan de endotheelcellen. Aanvankelijk dachten we dat de endotheelcellen onder zuurstofarme omstandigheden uitgroeien tot bloedvaatjes. Dat blijkt veel gecompliceerder te zijn’, zet Van Hinsbergh uiteen. ‘Als er weinig zuurstof beschikbaar is, gaan de endotheelcellen aanvankelijk in rust. Ze proberen zo weinig mogelijk om de zuurstof te concurreren met de voorlopercellen.’



renen met de andere cellen in het weefsel. Maar komen ze in de buurt van zuurstof, dan worden ze juist actief en gaan ze helpen bij het maken van bloedvaatjes. Hun reactie hangt dus af van de gradiënt van zuurstof en van de plaats die deze cellen in het weefsel innemen. Die bevinding proberen we nu te gebruiken om cellen zo te geleiden dat ze een soort spoor vormen van de buitenkant van het implantaat naar het centrum ervan en dat ze daarbij aansluiting houden op het bloedvaatstelsel. Dat kunnen we doen door het toepassen van specifiek bio-actief materiaal in de drager waarin de cellen zich bevinden.'

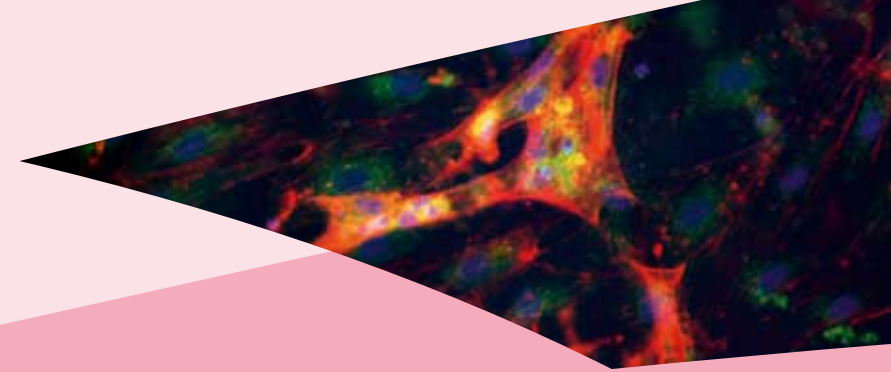
Fibrinogeen, een bij de bloedstolling en het herstellen van beschadigingen in bloedvaten betrokken eiwit, vormt een van de componenten van zo'n bio-actieve drager. Het fibrinogeen komt in diverse vormen voor en de onderzoekers bestuderen de invloed van die verschillende eiwitvormen op de vorming van bloedvaatjes.

Nieuwe bloedvaatjes alleen zijn echter niet voldoende voor het verbeteren van de bloedvoorziening in de constructen die worden gebruikt voor tissue engineering of voor het verbeteren van de bloedvoorziening in weefsels van mensen met doorbloedingsproblemen, zoals in de benen. Van Hinsbergh: 'Je kunt wel nieuwe vaatjes maken, maar daar moet dan ook bloed in kunnen komen. Je moet dus meer bloed aanvoeren en daarvoor zijn grotere bloedvaten nodig, de bestaande aanvoerkanalen moeten dus worden verwijd. Het lichaam kent daarvoor adaptatiemechanismen, waarbij de vaatwand door afbraak en opbouw wordt omgevormd tot een ruimer vat terwijl het ondertussen goed blijft functioneren. Ook daarbij zijn verschillende klassen van witte bloedcellen betrokken. Naast de macrofagen van het immuunsysteem bijvoorbeeld ook de *natural killer*-cellen.'

Chronische ziekten

Het proces van adaptatie van de bloedvaten blijkt lastiger te verlopen als er

chronische ziekten in het spel zijn. Die komen veel voor bij ouderen en kunnen mede verklaren waarom zij vaak ook chronische problemen met hun bloedvoorziening krijgen. Van Hinsbergh: 'Een hoog cholesterol in het bloed bijvoorbeeld, verstoort waarschijnlijk de wisselwerking tussen de diverse witte bloedcellen die zijn betrokken bij de bloedvatvorming en beperkt de beweeglijkheid van endotheelcellen. Daardoor vertraagt de bloedvat-adaptatie en het ontstaan van kleine arteriën. Een hogere glucosespiegel, zoals wel wordt gezien bij diabetes, lijkt veel minder invloed te hebben. Maar weer wel de hogere vetspiegels die dikwijls gepaard gaan met ouderdomdiabetes.'



Sprouting endothelial cells at an early stage of the formation of a new microvascular tubule. The cells that are invading a biological matrix display a reorganization of their cytoskeleton with many filopodia (both visible as red F-actin staining). In the background other flat endothelial cells covering the matrix are visible. (nuclei are stained blue, membrane proteins green).

Anton Jan van Zonneveld, LUMC Leiden

Rollende bloedcellen tegen etalagebenen

Voorlopercellen van de binnenbekleding van bloedvaten, de endotheel progenitor cellen (EPCs), zijn in het lichaam verantwoordelijk voor het op peil houden van hart en bloedvaten. Is er iets mis mee, dan kunnen hart- en vaatziekten ontstaan. Deze EPCs kunnen ook behulpzaam zijn bij het laten ingroeien van bloedvaatjes in implantaten voor tissue engineering, zoals stukjes bot. Hoogleraar Vasculaire Geneeskunde, prof dr. Anton Jan van Zonneveld, bestudeerde bij het LUMC Leiden de fundamentele van die bloedvatvorming. Hij verwierf inzichten in de moleculaire basis van die nieuwvorming van bloedvaten, die uiteindelijk van nut kunnen zijn bij de behandeling van patiënten met een slechte bloedvoorziening van de benen, zoals bij etalagebenen.

Het was maar een relatief klein project binnen het DPTE-programma waarop Van Zonneveld de afgelopen jaren zijn hersens liet kraken. De moleculair bioloog, die gespecialiseerd is in de studie van endotheelcellen, doet dat bij de afdeling Nierziekten van het LUMC. 'Als je de uitgroei van endotheelcellen en de vorming van bloedvaatjes in weefsels wilt stimuleren, moet je kijken naar de manier waarop nieuwe bloedvaatjes in het

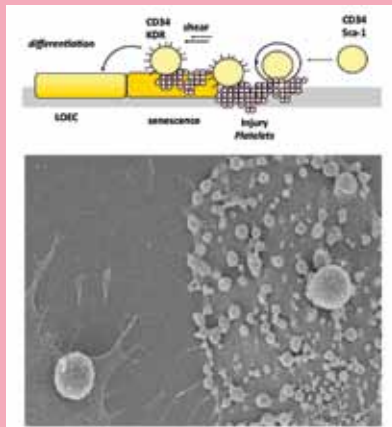
lichaam worden gevormd en naar de moleculen die daarbij betrokken zijn. We weten dat een bepaalde categorie EPCs, de zogeheten CD34+ cellen, daarbij een rol spelen. Die kenmerken zich doordat ze specifieke CD34-receptoren op hun celoppervlak hebben. Ze zijn nauw verwant aan voorlopercellen van de rode en witte bloedcellen. Ze circuleren door het bloed en hechten zich op een bepaald moment aan de binnenbekleding van de vaatwand (het endotheel) op plekken waar nieuwe bloedvaatjes moeten komen.'

De grote vraag daarbij is natuurlijk hoe die CD34+ cellen weten waar ze moeten zijn. Het blijkt dat op plaatsen waar de binnenbekleding van het bloedvat is beschadigd een soort plakkerige structuur ontstaat. Die remt specifiek de CD34+ cellen in de bloedbaan af. Van Zonneveld: 'De cellen rollen als het ware al plakkend over het weefsel tot ze blijven kleven. Dat gebeurt op plekken waar veel bloedplaatjes aan de binnenbekleding van het bloedvat zitten.' Bloedplaatjes zijn cruciaal voor de bloedstolling en het dichten van lekkages in de vaatwand. Ze zijn uitermate gevoelig voor een beschadiging van het

endotheel. Op hun beurt dienen zij als het klittenband voor de EPCs doordat ze specifieke adhesiemoleculen bezitten. Zijn de CD34+ cellen eenmaal geland op het bedje van bloedplaatjes, dan veranderen ze in endotheelcellen, die de beschadiging van de vaatwand kunnen herstellen. Daarbij heeft ook het bij de stolling betrokken eiwit fibrine een functie.

Spons

Van Zonneveld: 'De bloedplaatjes zuigen als een spons allerlei factoren uit de bloedbaan op en brengen die naar de beschadigde plek. Daar geven ze deze factoren af, die betrokken zijn bij de angiogenese, de vorming van nieuwe bloedvaten. Ze werken dus lokaal en stimuleren zo de aangehechte EPCs zich te ontwikkelen tot vaatwandcellen. Dankzij de bloedplaatjes en diens factoren remt de CD34+ cel af bij een beschadiging, rolt er overheen, hecht zich en groeit uit tot een endotheelcel.' Van Zonneveld en zijn onderzoekers gebruikten ook een model om het wel en wee van de EPCs te kunnen volgen, via de inzet van transgene muizen. Deze kregen een reporter-gen ingebouwd dat hun cellen



Above: schematic representation of the putative role of platelets in the differentiation of CD34-positive progenitor cell towards endothelial cells. MicroRNAs play a main role in the differentiation of progenitor cells towards an endothelial cell fate. Below: scanning electron microscopical picture of CD34 cells arrested on platelets on activated endothelial cells. De Boer et al. ATVB 2006.

groen doet fluoresceren als het specifieke CD34 receptor-gen tot expressie wordt gebracht. Zo kleuren de CD34+ cellen groen en zijn ze goed te volgen in kweekbakjes en diermodellen.

De constatering dat het rollen en de hechting van CD34+ cellen over de bloedplaatjes de differentiatie van deze cellen in gang zet, stimuleerde de onderzoekers om te bestuderen wat er dan precies in de cellen gebeurt. Zijn er bijvoorbeeld specifieke stukjes micro-RNA verantwoordelijk voor de veranderingen in de cellen? Die micro-RNAs kunnen in de cel de aanmaak van eiwitten activeren of remmen. Analyse van de verschillen tussen de cellen leverde een specifiek micro-RNA (het miRNA-126) op dat duidelijk meer aanwezig is in geactiveerde CD34+ cellen dan in niet-geactiveerde CD34+ cellen. En dat micro-RNA blijkt betrokken te zijn bij de overdracht van signalen die te maken hebben met VEGF, een belangrijke groeifactor die endotheelcellen stimuleert (de *vascular endothelial growth factor*).

Etalagebenen

Van Zonneveld: 'We hebben kunnen constateren dat de VEGF-receptor aan staat als de cellen over de bloedplaatjes rollen en dat de cellen dan ook gevoelig zijn voor het signaal van deze groeifactor. We zijn nu bezig om cellen te creëren die voortdurend veel van dit micro-RNA-126 maken. Daarmee hopen we de vorming van bloedvaatjes te kunnen stimuleren in speciaal daarvoor gefokte muizen. Wellicht kunnen we deze kennis ook gebruiken om bloedvaatjes te vormen in implantaten die gebruikt worden voor tissue engineering. We weten nu beter hoe de neovascularisatie daardoor kunnen gaan versnellen en toepassen bij mensen met perifere vaatlijden, zoals een slechte doorbloeding van vingers en tenen en voorstadiën van etalagebenen. Als je er bij bent voordat de arteriën in hun benen volledig zijn dichtgeslibd, kun je misschien hun been redden met een therapie die de vorming

van nieuwe bloedvaten stimuleert. Tenminste, als ze stoppen met roken. Want dat is een belangrijke oorzaak van de slagaderverkalking die ten grondslag ligt aan etalagebenen.' Mensen met etalagebenen krijgen tijdens het lopen zo'n pijn in hun benen dat ze moeten stilstaan tot het over is - ze kunnen dan in een winkelstraat net doen of ze een etalage bekijken. Door de haperende bloedtoevoer naar de benen krijgen de spieren te weinig zuurstof.