

John Jansen, UMC St Radboud Nijmegen

## Zonnecellen tegen bot-erosie

**Prof. dr. John Jansen van de afdeling Biomaterialen van het Nijmeegse**

**St Radboud UMC zoekt naar manieren om het bot in de kaak te versterken zodat er tandheelkundige implantaten ingezet kunnen worden. Vooral de bovenkaak heeft van nature relatief weinig bot om implantaten voldoende houvast te geven en ook het kaakbot van oude mensen is vaak te fragiel voor het plaatsen van implantaten vanwege osteoporose en ziekten van de mond die tot bot-erosie leiden. Daarvoor gebruikt Jansens onderzoeksgroep technieken die ook worden toegepast bij het vervaardigen van zonnecellen.**

De heilige graal voor tandheelkundigen die zich bezig houden met weefselregeneratie is het doen groeien van volledig nieuwe tanden en kiezen. Maar dat zal nog wel een paar decennia duren, verwacht Jansen. 'Vooralsnog is daarom het alternatief om verbeterde implantaten te maken en de hoeveelheid beschikbaar bot in de kaak te vergroten. Daarvoor proberen we materiaal te maken dat zo veel mogelijk op echt bot lijkt.' Dat is geen sinecure, want hoewel bot ruwweg bestaat uit 30 procent collageen (een eiwit) en voor 70 procent uit calciumfosfaat

(keramiek), bevat natuurlijk bot een heel scala aan biologisch actieve moleculen in relatief kleine hoeveelheden, zoals alkalische fosfatase en groeifactoren.

En botweefsel bevat ook cellen. Die cellen zijn essentieel voor het functioneren van het botweefsel en voor de hechting van implantaten in het bot. Jansen en zijn collega's hebben zich gericht op het bespuiten van titanium implantaten met een bio-actieve laag. Het belangrijkste bestanddeel van die laag is het enzym alkalische fosfatase dat de omzetting van anorganisch fosfor tot hydroxyapatiet bevordert. Dat laatste is essentieel voor een goede hechting van het bot. Andere technieken behelzen het bespuiten van implantaten met nanodeeltjes van calciumfosfaat en collageen, opgelost in ethanol. Jansen: 'Op een oppervlak van nanodeeltjes bestaande uit collageen, alkalische fosfatase en calciumfosfaat, zien we al na vier dagen een invasie van cellen en het ontstaan van botachtige structuren. Dat wijst op de mineralisatie van bot. Laagjes met een dikte van 200 nanometer werken het best. Interessant is dat als je lang spuit met

alkalische fosfatase de laag wel dikker wordt, maar de enzymactiviteit niet toeneemt.'

### **Nanoporositeit**

Jansen en zijn collega's zoeken, behalve naar het verbeteren van de hechting van implantaten in het bot, ook naar praktisch toepasbare pasta's die kunnen dienen als vervangers van natuurlijk bot. 'Wij werken aan pasta's van calciumfosfaat die in het bot kunnen worden geïnjecteerd. In die pasta brengen we ook kleine bolletjes van polymeer materiaal dat in het lichaam wordt afgebroken. Daarin kunnen groeifactoren worden ingesloten die langzaam vrijkomen. *Release on demand*, zoals dat wordt genoemd. In proeven met dieren zien we dat dit keramiek van calciumfosfaat langzaam maar zeker volledig wordt vervangen door bot. Nu zijn we toe aan klinisch onderzoek bij mensen.'

Jansen probeert technieken uit andere vakgebieden te gebruiken. Het elektrostatisch *sprayen* is een manier van het deponeren van materiaal die wordt toegepast bij het vervaardigen van zonnecellen. Jansen: 'Dat is een eenvoudige en goedkope techniek die ook

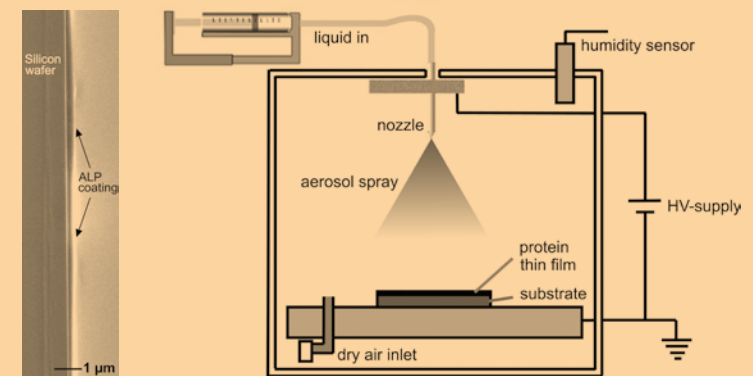
geschikt is om proteïnen en andere kwetsbare moleculen te verwerken. Daarbij gaan we uit van een vloeistof op alcoholbasis die bij kamertemperatuur kan worden toegepast. Bij het verwerken van kwetsbare moleculen, kun je geen hitte of organische oplosmiddelen toevoegen.' Hoewel botcement op het eerste gezicht relatief eenvoudig van samenstelling lijkt, is het systeem dat Jansen gebruikt toch complex. Zo bevat het cement een zekere nanoporositeit door minuscule gaatjes. Maar door blootstelling aan de vloeistoffen in het lichaam slaat calciumfosfaat neer, waardoor de minuscule poriën verstopt raken. Jansen: 'Dat was een nieuw element in ons cement, waarvoor we een oplossing hebben moeten vinden. Zo loop je voortdurend aan tegen nieuwe problemen. Dit werk betekent taai doorgaan. Je hebt het dan niet over het ene *Nature*-artikel na het andere *Science*-stuk, maar over kleine - technische - stapjes vooruit. Nu, na vele jaren van voorbereidend werk in proefdieren,

zijn we toe aan een kleine studie met mensen bij wie, met behulp van onze technieken, een implantaat in de kaak wordt aangebracht.'

#### Elektrospray depositie

Biologische moleculen, zoals eiwitten en enzymen, kunnen worden aangebracht door het spuiten van zeer fijne druppeltjes vloeistof waarin ze zijn opgelost. Het Japanse bedrijf Fuenche levert een apparaat dat onder invloed van een hoge elektrische spanning nanodruppeltjes spuit op een geladen oppervlak. De techniek wordt gebruikt bij de productie van zonnecellen en van chips voor de detectie van eiwitten. Jansen gebruikt het apparaat om nanodeeltjes van bij de botvorming betrokken enzymen, zoals alkalische fosfatase, te maken. Zo kan hij biologisch actieve oppervlakken op titanium implantaten aanbrengen. Hoe deze nanodruppeltjes onder invloed van de hoge spanning van 10 kilovolt ontstaan uit een capillair met een eiwitoplossing is niet volledig bekend. In de

praktijk zijn de resultaten echter goed en ook is de grootte van de druppeltjes, en daarmee de grootte van de nanodeeltjes, te variëren. Het grote voordeel van deze spray-techniek is dat deze plaatsvindt bij kamertemperatuur en normale luchtdruk. Belangrijk voor het resultaat is wel dat de luchtvochtigheid stabiel wordt gehouden.



Osteotropic Biomolecule Spraying (subproject 1)

Tina Vermonden, Universiteit Utrecht

## Hydrogels uit de kleurenprinter

**Hydrogels bestaan al vele decennia, maar worden pas relatief recent toegepast in de tissue engineering. Deze netwerken van polymeren bevatten veel water en kunnen stijver en vloeibaarder worden onder invloed van temperatuurveranderingen. De bekendste toepassing van hydrogels zijn de zachte contactlenzen die zich door het aanwezige traanvocht vormen naar de oogbol. Maar ze worden ook gebruikt om geneesmiddelen gedoseerd af te geven in het lichaam. Polymeerchemicus dr. ir. Tina Vermonden van de Universiteit Utrecht onderzoekt de toepassing van afbreekbare hydrogels als matrix bij het herstel van weefsels en als dragermateriaal voor gekweekte cellen.**

De afdeling Biofarmacie en Farmaceutische Technologie van de Universiteit Utrecht heeft een traditie van hydrogels voor de afgifte van geneesmiddelen. De hydrogels waaraan Vermonden werkt zijn bijzonder omdat ze zowel binnen een aantal weken biologisch afbreekbaar zijn als dat ze *thermosensitief* zijn. Ze zijn bijvoorbeeld vloeibaar bij kamertemperatuur en worden gelei-achtig bij lichaamstemperatuur. 'Dat betekent dus dat je er driedimensionale constructen mee kunt maken die in het lichaam eiwitten en cellen kunnen vasthouden',

zegt Vermonden. 'We kunnen het traject van de overgang tussen vloeibaar en vast instellen tussen 4 en 60 graden Celsius. Wij hebben ons gericht op hydrogels die vloeibaar zijn bij 18 graden en vast bij 37 graden Celsius.'

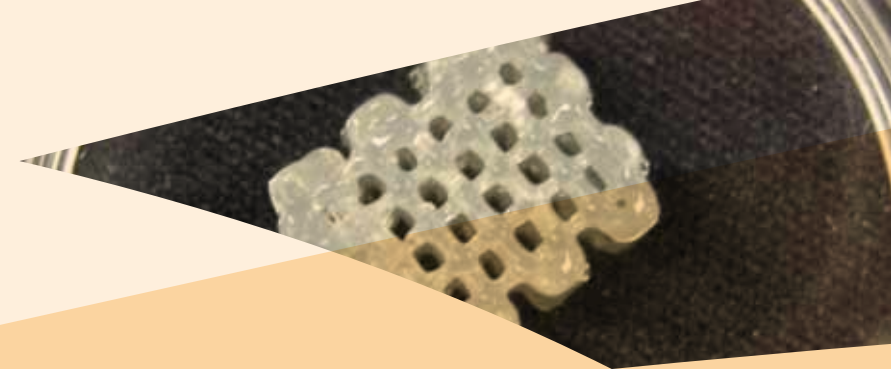
Trots is Vermonden erop dat bij haar afdeling hydrogels zijn uitgevonden die zowel bio-afbreekbaar zijn als thermosensitief. In samenwerking met orthopedische tissue engineers van het UMC Utrecht is onderzocht of de betreffende hydrogels geschikt zijn om er cellen in te laten groeien, zoals de menselijke multipotente stromale cellen, MSCs. Deze kunnen worden gebruikt voor het herstellen van beschadigd kraakbeen. Vermonden: 'We wilden niet alleen zien of de cellen overleven in de hydrogel, maar ook of we de hydrogels met cellen kunnen gebruiken als voeding voor een driedimensionale printer. Het idee is dat we de gel met cellen koud printen op een wat warmere plaat, waar deze dan gelei-achtige laagjes vormen en zo een driedimensionale structuur vormen.'

### Natuurlijk polysaccharide

Het grote voordeel daarvan is dat er constructen kunnen worden gemaakt die wat de vorm

betreft, goed passen in de beschadigingen van het kraakbeen. Bovendien kunnen de laagjes verschillend van samenstelling zijn. Met meer of minder cellen, meer of minder groeifactoren of zelfs met verschillende cellen op de diverse plekken in het construct. Vermonden: 'Het werkt perfect. In het lichaam is de bovenkant van het gewrichtskraakbeen anders van samenstelling dan in dieper liggende lagen. De concentratie van cellen is er bijvoorbeeld anders. Die verloop in celdichtheid kunnen wij nu aanbrengen in het construct dat we willen inbrengen om kraakbeendefecten te herstellen. We kunnen de gel ook extra stabiliseren door het gebruik van een geringe dosis UV-straling met een spectrum dat zich vlakbij het zichtbare licht bevindt. Daardoor tast de sraling de cellen niet aan.'

Het blijkt dat de cellen en de polymeren uit de Utrechtse hydrogels heel goed samengaan. Bij menging oriënteren de lange moleculen, die deels waterminnend en deels waterafstotend zijn, zich om de cellen heen. 'We maken nu een volgende stap, zegt Vermonden. 'De polymeren die we nu voor onze gels gebruiken zijn volledig synthetisch.



*Fotoillustratie van een geprinte hydrogel*

Maar we willen dat de cellen die in de gel zitten zich ook kunnen differentiëren. Dat lukt nu wel een beetje, maar dat zou beter kunnen. Daarom hebben we nieuwe gels gemaakt waarin ook hyaluronzuur voorkomt. Dat is een natuurlijk polysaccharide dat veel in kraakbeen en bindweefsel zit. We willen onderzoeken of de MSCs zich in een omgeving met hyaluronzuur beter ontwikkelen, dan in de oorspronkelijke hydrogels.' Deze nieuwe polymeren zijn wel met menselijke cellen getest, maar klinische studies zijn nog ver weg omdat eerst in dieren hun geschiktheid en effectiviteit moeten worden aangetoond. Vermonden: 'Het lastige is dat wij met een volledig nieuw product komen.'

Dat is nog niet geaccepteerd door de gezondheidsautoriteiten, zoals de Amerikaanse FDA. Dat vinden bedrijven lastig bij het eventueel toepassen van producten op basis van die polymeren.'

### **Elektro-spinning**

Daarom hebben de onderzoekers, naast

deze nieuwe vormen van polymeren, ook gewerkt met de reeds bestaande polyesters, die al langer door de autoriteiten zijn goedgekeurd voor toepassing in mensen. De Utrechters namen het veelgebruikte polycaprolacton bij de kop en brachten daarin een aantal wijzigingen aan zodat het polymeer wat meer water vasthoudt en sneller afbreekt in het lichaam. Vermonden: 'Daarvan hebben we nu mooie matrixen kunnen bouwen. De cellen blijven er niet alleen in leven, maar groeien ook en differentiëren heel snel. Ons "polycaprolacton" kan ook worden verwerkt bij 50 graden Celsius in plaats van bij 130 graden, wat gebruikelijk is. Daardoor kunnen we het materiaal mogelijk ook met cellen gebruiken in een 3D-printer. Dat printen willen we nu gaan toepassen in combinatie met specifieke groeifactoren.' Het ontwerpen van de specifieke monomeren die als bouwsteentjes in de nieuwe bioplastics gebruikt kunnen worden en de gewenste eigenschappen hebben, was veel werk, benadrukt Vermonden.

'Maar we kunnen ze nu ook gebruiken voor elektro-spinning. Daarmee kunnen we ultradunne draadjes maken. De structuren die met deze fibers ontstaan, lijken sterk op de extracellulaire matrix die alle cellen in natuurlijk weefsel maken. We kunnen er nog niet heel hoge constructen mee maken, maar ze wel gebruiken als een laagje om weefsel mee af te sluiten.'

Jan Feijen, Universiteit Twente

## Ontwerpen van flexibele biopolymeren

**Biologisch afbreekbare macromoleculen zijn een must voor de tissue engineers. Ze zijn er inmiddels in allerlei soorten en maten, maar één algemeen toepasbaar biopolymeer is er niet. En dat zal ook niet gebeuren omdat elke afzonderlijke toepassing specifieke eisen stelt aan het polymeer. Een polymeer dat het lichaam moet helpen een bloedvat te herstellen, behoeft andere eigenschappen dan een polymeer dat dient als matrix voor botherstel. Hoogleraar Polymeerchemie en Biomaterialen prof. dr. Jan Feijen, kan met zijn collega's bij de Universiteit Twente putten uit een rijke voorraadkast van geschikte moleculen. Dit dankzij een decennia lange ervaring. 'We hebben enorme stappen gemaakt. We kunnen nu flexibele afbreekbare netwerken maken, waarmee je van alles kunt doen. Van de restauratie van de hartspier tot het herstel van bloedvaatjes.'**

PolyTMC is op dit moment een van de favoriete biomaterialen van Feijen. Dit polytrimethyleencarbonaat biedt niet alleen mogelijkheden voor het maken van flexibele afbreekbare materialen, maar ook voor de aanhechting van bioactieve stoffen, zoals groeifactoren en factoren die de bloedstolling tegengaan. De macromoleculen kunnen aaneen worden

gesmeed door het toepassen van gammastraling, UV straling of chemische toevoegingen. 'PolyTMC zelf is niet nieuw', zegt Feijen. 'Maar wel de gecontroleerde constructie en afbraak van hoog-moleculair polyTMC. We hebben de afbraak van dit polymere netwerk door macrofagen in het lichaam onderzocht en ontdekt hoe deze samenhangt met de aard van de dwarsverbindingen in het netwerk. Onder de microscoop kunnen we in het materiaal de putjes zien waar de cellen in het polymeer aan het werk zijn met afbreken. We hebben dit materiaal onderzocht op mogelijkheden het toe te passen bij het vervangen van beschadigde bloedvaten.'

Daarvoor zijn gladde spiercellen in de polymere matrix gebracht en in een bioreactor gekweekt. Nu geschiedt dat ook met *induced pluripotent stem cells* (iPSCs). Deze iPSCs zijn voorlopercellen die uit patiënten zijn betrokken. Ze worden kunstmatig teruggedifferentieerd tot cellen die de basis kunnen vormen voor verschillende weefsels. Feijen: 'In een bioreactor kun je dan een construct maken, waarin de iPSCs zich ontwikkelen tot gladde spiercellen van de

patiënt. Als je voldoende gladde spiercellen en endotheelcellen direct van de patiënt kunt betrekken, zouden we die in het dragermateriaal voor het bloedvat kunnen gebruiken en opkweken. Maar die zijn moeilijker beschikbaar.' De betreffende buisjes van polyTMC zijn geschikt gemaakt voor het inzaaien van zulke cellen door tijdens het proces van polymerisatie zoutdeeltjes toe te voegen en nadien te verwijderen door ze op te lossen.

### Temperatuurafhankelijk

Feijen en zijn groep hebben ook een flexibel afbreekbaar rubber gemaakt dat goed bestand is tegen vervorming. Feijen: 'Bloedvaten zetten uit bij elke hartslag, maar moeten ook weer in hun oorspronkelijke vorm terugkomen. Het geïmplanteerde systeem dat een bloedvat moet vervangen, moet in tact blijven tot de cellen de functie ervan hebben overgenomen. Daarvoor hebben wij een product gevonden. In een kweekbakje met toegevoegde macrofagen duurt de afbraak nu een week of vijf. In het lichaam moet je daarbij eerder aan maanden denken.' Erg in de belangstelling staan op dit moment de temperatuur afhankelijke hydrogels.



*A: een poly(TMC) scaffold (links) vegeleken met een varkensarterie (rechts). B: flexibel en elastisch poly(TMC) scaffold. C: proefopstelling met laser micrometer om het gedrag van deze poly(TMC) scaffolds te bestuderen onder langdurige perfusiecondities.*

Daarvan bestaan inmiddels verschillende systemen die bij een lage temperatuur een waterige oplossing vormen en bij hogere temperatuur overgaan in een gel. De vastere toestand ontstaat dan bij lichaamstemperatuur. De eerste toepassingen van deze injecteerbare hydrogels, die zijn beladen met geneesmiddelen en nanopartikels, zal liggen in het lokaal afleveren van geneesmiddelen en bioactieve stoffen. 'In principe kunnen er ook cellen in deze hydrogels worden gebracht', zegt Feijen. 'Zo richten wij ons op injecteerbare hydrogels ter vervanging van kraakbeen. In een oplossing van gemodificeerd dextraan brengen we een suspensie van kraakbeencellen en dat spuiten we in. In het lichaam ontstaat vervolgens een netwerk van dextraan polymeren met kraakbeencellen. Behalve met dextraan, experimenteren we nu met netwerken die bestaan uit componenten die van nature in het kraakbeen voorkomen, zoals hyaluronzuur, glycosaminoglycanen en heparine. Dat doen we nu nog in vitro, in kweek-

bakjes. Brengen we gels in contact met dierlijk kraakbeen, dan ontstaat een fantastische hechting. Nu zijn we bezig met de "vermenselijking" van de biomoleculen.' Er wordt ook gewerkt aan een temperatuur gevoelig netwerk van Feijens troetelkind polyTMC. Gecombineerd met een flinke dosis polyethyleenglycol (PEG), vormt dat netwerken van waterminnende (hydrofiele) en waterafstotende (hydrofobe) elementen. Afhankelijk van de verhouding van de twee componenten kan de temperatuur worden ingesteld waarop het polymeer verandert van een vloeibare in een vaste vorm.

#### **Stereolithografie**

De onderzoekers uit de groep van Feijen zijn voortdurend bezig nieuwe moleculen te maken, evenals netwerken van nieuwe combinaties van bestaande macromoleculen. Ook geven ze de netwerken bio-actieve eigenschappen, bijvoorbeeld het vermogen om de bloedvatvorming, de angiogenese, te stimuleren. Feijen: 'We hebben een truc bedacht

waarmee we aan het polymeer een eenheid kunnen hangen die goed bindt aan de receptor op het oppervlak van de endotheelcellen van de bloedvaatjes. Ik ben er heel trots op dat we zoiets hebben kunnen ontwikkelen.' Een uitdaging voor Feijen is het maken van een bio-abbrekbaar capillair netwerk dat in het lichaamswefsel de arteriën en venen met elkaar verbindt en dat vaak is aangedaan bij ziekten als diabetes. 'Door toepassing van stereolithografie kunnen we goed gedefinieerde driedimensionale structuren van afbrekbare polymeren maken. Met de toepassing van polyTMC en UV-polymerisatie kunnen we een oplossend vermogen van 30 micrometer bereiken. Dat is voldoende voor capillairen. Er zijn maar weinig andere groepen die dat kunnen. Nu proberen we die microvaatjes bloedvriendelijker te maken, zodat er geen stolsels in ontstaan.'

Moniek de Maat, Erasmus MC Rotterdam

## Tunnels graven in fibrine

Het gedrag van cellen hangt in hoge mate af van hun omgeving. Gaan ze delen, differentiëren ze tot een ander celtype, scheiden ze signaalstoffen uit, of gaan ze andere cellen te lijf? Net als in de menselijke samenleving, wordt dat in grote mate bepaald door omstandigheden buiten henzelf. Bijvoorbeeld door interacties met andere cellen of met de zogeheten extracellulaire matrix waarin zij zich bevinden. Dit netwerk van macromoleculen, zoals eiwitten en suikers, stimuleert of remt de activiteiten van de meeste cellen. Daarmee moeten tissue engineers rekening houden, zegt dr. Moniek de Maat van het Erasmus MC, omdat daarbij cellen uit hun natuurlijke omgeving worden gehaald. De biochemicus onderzoekt de invloed van fibrine, een van de componenten van de extracellulaire matrix, op de endotheelcellen van de bloedvaten. Ze concludeert dat ook kleine veranderingen daarin het gedrag van deze cellen dramatisch kunnen veranderen.

Fibrine is een veel voorkomend macromolecuul dat in het lichaam een matrix kan vormen. De moleculen vormen netwerken in vele vormen en met verschillende eigenschappen doordat ze op diverse wijzen vertakt kunnen zijn en met elkaar verbonden. De Maat, werkzaam bij de afdeling

Hematologie van het Erasmus MC, concentreert zich op fibrinogeen, een molecuul dat is betrokken bij de stolling van bloed. Fibrinogeen is groot, langwerpig en oplosbaar en bevat suikerstaarten. Om een gaatje in een bloedvat te stoppen is er een flinke prop nodig die ontstaat door de combinatie van een dicht netwerk van fibrine en bloedplaatjes. Bij de laatste stap van de stollingsketen wordt het in bloed oplosbare fibrinogeen omgezet in fibrine doordat kleine stukjes van het molecuul worden afgeknipt door enzymen. Dat fibrine polymeriseert vervolgens tot lange draden met vertakkingen, waardoor het een driedimensionaal netwerk vormt. Doordat er diverse vormen van fibrinogeen bestaan, kunnen er ook verschillende typen fibrine-netwerken worden gevormd. 'Er zijn allerlei genetische varianten in de samenstelling van het fibrinogeen molecuul. Ook bevinden zich vormen van fibrinogeen in het bloed die zijn ontstaan doordat het molecuul in het bloed langzaam wordt afgebroken – de levensduur van fibrinogeen is ongeveer twee-en-een-halve dag.', zegt De Maat. 'Daarom verschilt de exacte samenstelling van het fibrinogeen tussen individuen.' Uit

deze varianten van fibrinogeen ontstaan uiteindelijk ook verschillende typen netwerken van fibrine. Sommige varianten van fibrine binden veel cellen, andere weinig. Het maakt ook uit hoe snel het fibrinogeen wordt omgezet in fibrine. Gaat dat langzaam, dan ontstaan er dikke draden fibrine. Gaat het snel dan zijn de draden dunner.' De Maat en collega's van het VUmc hebben deze verschillende vormen van fibrinogeen geïsoleerd en laten polymeriseren tot fibrine. Daarop onderzochten ze de manier waarop de verschillende vormen fibrine endotheelcellen beïnvloeden en de wondgenezing bevorderen. Ze deden studies van het gedrag in weefselkweek en in proefdiermodellen met ratten naar het effect van fibrine op de wondgenezing. Ook maakten de onderzoekers verschillende vormen recombinant fibrinogeen.

### Fibrine ontwerpen

'Een van de opvallendste ontdekkingen is dat endotheelcellen zich snel hechten aan het fibrine dat is ontstaan uit de grootste variant van fibrinogeen en dat zij vervolgens vaatachtige structuren vormen', constateert De Maat. Voor de vorming van nieuwe bloed-



vaatjes zijn endotheelcellen in de fibrinematrice noodzakelijk. Uit het gedeeltelijk afgebroken fibrinogeen ontstaat een dichter en compacter fibrine met dunne draden dan uit de intacte vorm van fibrinogeen. De Maat: 'Dit bindt de endotheelcellen minder goed en ook kunnen de cellen minder goed het netwerk binnendringen. Het gevolg daarvan is dat we na een week nog geen spoor van bloedvatvorming zien in weefselkweek.' Fibrinogeen speelt niet alleen een rol bij de bloedstolling, maar ook bij de genezing van wonden. De Maat en haar collega's ontdekten afwijkende varianten van fibrinogeen die de genezing van huidwonden bij ratten versnellen of juist vertragen. 'Op deze wijze hebben we veel geleerd over het proces van wondgenezing.'

De Maats collega dr. Pieter Koolwijk heeft bij het VUmc ook de gen-expressie van endotheelcellen onderzocht als ze aan de verschillende typen fibrinematrices hechten. Door het intacte fibrinogeen blijkt een aantal genen te worden

aangezet die de cellen richten en klaar maken om de matrix in te groeien vaatjes te maken. De Maat: 'Door de hechting aan dit intacte fibrine krijgen de cellen een signaal om vaatjes te gaan maken. Dat doen ze door het fibrine voor zich af te breken en naar voren te kruipen. Ze graven tunnels en vullen de wanden met migrerende en delende cellen, waardoor vaatachtige structuren ontstaan. Overigens hebben we in de kweekbakjes wel de bloedvatstimulerende factor VEGF en een andere groeifactor toegevoegd anders gebeurt er niets.' Het lijkt een beetje op het graven van de tunnel voor de Amsterdamse Noord-Zuidlijn, waar achter de boorkop de wand direct worden bekleed met betonnen buissegmenten. 'Voor mensen met een slechte wondgenezing zou je misschien een laagje van het goede fibrine met endotheelcellen kunnen inbrengen, zodat de wondgenezing een oppepper krijgt', denkt De Maat. Een andere mogelijkheid is het goede fibrinogeen uit het bloed van patiënten

te halen en dat in gezuiverde vorm in de wond teruggeven. Maar de droom van De maat is om verschillende typen fibrinogeen met meer en minder bindingplaatsen voor cellen en andere factoren te ontwerpen en via recombinant technieken te produceren. 'Dan zouden we de wondgenezing flink kunnen verbeteren.'



*Endotheelcel (rood) in een fibrine matrix (groen)*

Ruud Bank, UMC Groningen

## Kraakbeenherstel met een nieuw type cellen

Degeneratie van het kraakbeen in de tussenwervelschijven is een belangrijke oorzaak van rugklachten, in het bijzonder van hernia. Slijtage door zwaar werk en ouderdom zijn veel voorkomende oorzaken van deze invaliderende beknelling van de zenuwen die langs de wervels uit het ruggenmerg ontspruiten. Er bestaat geen therapie die de tussenwervelschijven definitief herstelt, wel kan de beknelling worden opgeheven door het aan elkaar vast zetten van de twee wervels waartussen de zenuwen bekneld zijn geraakt. 'Die spinal fusion geldt als de gouden standaard, maar er bestaat het risico dat het probleem zich verplaatst naar de naastgelegen wervels. Bovendien verliest de ruggengraat een beetje van haar flexibiliteit. Het zou beter zijn als we het kraakbeen van de tussenwervelschijf zouden kunnen herstellen', zegt prof. dr. Ruud Bank, voorheen van het VUmc, nu van het UMC Groningen. In zijn speurtocht naar een oplossing daarvoor stuitte de hoogleraar Matrixbiologie en Weefselherstel op een cel die wellicht geschikter is voor kraakbeenregeneratie dan de cellen die nu worden ingezet.

'Wij zijn begonnen met het inspuiten van kraakbeencellen in aangedane tussenwervelschijven', zegt Bank. 'De tussenwervelschijf vormt een afgesloten compartiment, een soort doosje dat aan de boven- en onderkant met bot is afgesloten. De beschadigde inhoud kun je door de kraakbeenwand heen bereiken. Wij zochten naar injecteerbaar matrixmateriaal en probeerden te ontdekken welke cellen je daar het beste bij kunt doen; stamcellen of cellen die al meer in de richting van kraakbeen zijn gedifferentieerd. Daarbij was ook belangrijk of we wel het juiste kraakbeen krijgen, want uit de literatuur is bekend dat tissue engineering heel verschillende soorten kraakbeen kan opleveren. Alleen al van het collageen dat veel in kraakbeen voorkomt, kennen we zeven verschillende soorten.'

Daarnaast wilde Bank weten welk type kraakbeencellen (chondrocyten) zich uit de voorlopercellen ontwikkelen, als deze in de restanten van het kraakbeen worden gespoten. En vooral ook hoe deze zijn te herkennen. Bank: 'Het blijkt dat nog niet goed is uitgezocht of er verschillen zijn tussen de chondrocyten in het ene type kraakbeen of in het andere. Dat is

merkwaardig, want de karakterisering van de cellen die je voor je weefselherstel gebruikt, is wezenlijk voor tissue engineering. Wij hebben de genetische expressie van chondrocyten uit vijf typen kraakbeen onderzocht. En die blijkt verschillend. In het bijzonder wat vijf genen betreft, waarmee we vier verschillende typen cellen kunnen herkennen. Die genen blijken allemaal te zijn betrokken bij de opbouw en de afbraak van de extracellulaire matrix. Van het kraakbeen dus.'

### Hoesje om de cellen

De onderzoekers hebben kweekexperimenten gedaan met diverse cellen: met stamcellen, de vier typen chondrocyten en met een speciaal type chondrocyt dat in het kraakbeen zit, de chondronen. Bank: 'Chondronen lijken op chondrocyten, maar zijn omringd door een hoesje van suikerachtige moleculen. Door deze *pericellulaire matrix* komen de cellen niet in direct contact met het kraakbeen. Het lijkt erop dat dit hoesje een belangrijke rol speelt bij de vorming van kwalitatief goed kraakbeen.' Als de onderzoekers naakte chondrocyten in kweek brengen, vormen deze wel kraakbeen, maar van slechte kwaliteit. Dat



komt doordat de cellen te weinig collageen afgeven. Dat verbaasden Bank en zijn medewerkers omdat de genen die verantwoordelijk zijn voor de aanmaak van collageen in die cellen wel voluit aanstaan. Blijkbaar wordt het betreffende eiwit niet echt in de cellen geproduceerd of wordt het direct na de aanmaak weer afgebroken. Dat laatste blijkt het geval. Ook de genen voor een enzym dat collageen afbreekt (het MMP-13) staan voluit aan in de gekweekte chondrocyten. En die genen worden geactiveerd door een receptor, een antenne, op het oppervlak van de cellen die de aanwezigheid van collageen herkent, de *DDR-2 receptor*.

‘Dat vonden we gek’, zegt Bank. ‘Chondrocyten liggen midden in kraakbeen, in het collageen. Wat moeten ze met zo’n receptor die er toe leidt dat ze collageen gaan afbreken? Dat raadsel hebben we nog niet opgelost, maar we weten wel dat de DDR-2 receptor in de normale situatie niet in aanraking komt met collageen omdat de chondrocyten

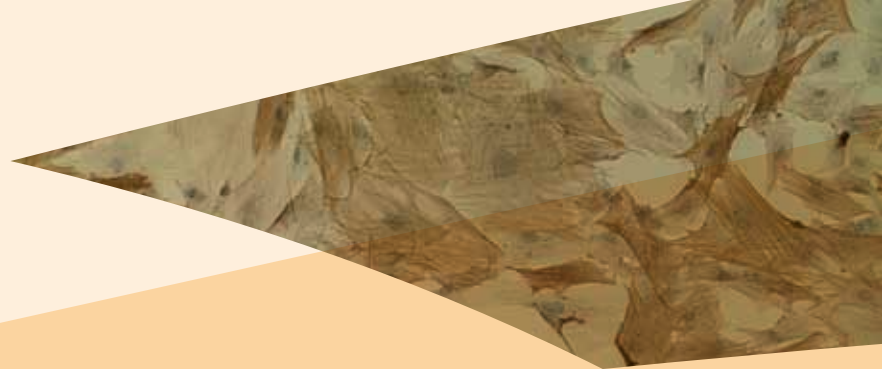
in het kraakbeen dat ondoordringbare hoesje hebben. Op een of andere manier weten de cellen het collageen dat ze produceren wel naar buiten, voorbij dat hoesje, te werken. De door ons in kweek gebrachte chondronen blijken weldegelijk veel collageen neer te leggen.’ De conclusie is dat het omringende hoesje van levensbelang is voor een goed kraakbeen.

#### **Geitenmodel**

Bank: ‘Tissue engineers moeten voor het maken van kraakbeen dus chondronen in hun matrixen inzaaien en niet de chondrocyten zelf. Overigens is nog onduidelijk welke factoren bepalen dat naakte chondrocyten veranderen in chondronen met een hoesje. Interessant is dat je de kraakbeenvorming wellicht ook kunt stimuleren door de DDR-2 receptor uit te schakelen, zodat de chondrocyten niet worden gestimuleerd om collageen af te breken. Wellicht kunnen stoffen die de DDR-2 receptor remmen worden gebruikt voor tissue engineering

van kraakbeen of rechtstreeks voor het tegengaan van kraakbeenafbraak bij patiënten.’

Zover is het nog niet. Vooralsnog zijn de experimenten uitgevoerd in weefselkweek en in een proefdiermodel van geiten. In de ruggengraat van deze viervoeters blijken vergelijkbare krachten op te treden als bij de mensen. Door een enzym in de tussenwervelschijven te spuiten dat kraakbeen langzaam afbreekt, ontstaat in de geiten een situatie die lijkt op die bij mensen met versleten tussenwervelschijven. Bank: ‘We zijn blij dat we een proefdiermodel hebben kunnen ontwikkelen dat zo op de mens lijkt en dat we hebben kunnen aantonen hoe het komt dat chondrocyten die in tissue engineering worden gebruikt, zo weinig collageen maken. Dat betekent een geheel nieuwe insteek.’



*Aankleuring van het cytoskelet van fibroblasten*