



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Stem cell therapy for cardiovascular disease : answering basic questions regarding cell behavior

Bogt, K.E.A. van der

Citation

Bogt, K. E. A. van der. (2010, December 16). *Stem cell therapy for cardiovascular disease : answering basic questions regarding cell behavior*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16249>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16249>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

CHAPTER 11

Summary in Dutch

STAMCELLEN VOOR HART- EN VAATZIEKTEN

Hart- en vaatziekten zijn de belangrijkste doodsoorzaak in de westerse wereld en kosten de Nederlandse samenleving in 2005 5,5 miljard euro aan ziektekosten (8% van het totaal). Met de huidige trend naar een verouderende en adipeuzere samenleving zullen deze getallen naar verwachting de komende jaren nog flink toenemen.

Ondanks een variëteit aan behandelingen is er nog een grote groep patiënten die niet goed reageert op bestaande therapie en zodoende aangewezen is op harttransplantatie in het geval van hartfalen of amputatie van een been wanneer het perifeer arterieel vaatlijden (PAV, gevorderde aderverkalking in ledematen) betreft. Echter, harttransplantatie is, onder andere door een schrijnend tekort aan donororganen, slechts in een select aantal gevallen mogelijk en zodoende is er behoefte aan nieuwe therapeutische opties.

Stamceltherapie heeft de afgelopen jaren veel enthousiaste en hoopvolle reacties teweeg gebracht. Een stamcel is een cel die aan het begin van de ontwikkeling staat en kan uitgroeien tot verschillende soorten meer gespecialiseerde celtypen. Bovendien heeft een stamcel de capaciteit om zichzelf te vermenigvuldigen. Door deze twee eigenschappen biedt een stamcel theoretisch de mogelijkheid voor het kweken van een onuitputbare hoeveelheid weefsel-specifieke cellen om bijvoorbeeld cardiomyocyten (hartspiercellen) te vervangen of bloedvaten te vernieuwen. Omdat het lichaam dat aan hart- en vaatziekten lijdt zelf niet of zeer beperkt de mogelijkheid heeft tot regeneratie van deze weefsels, zou het inspuiten van stamcellen een oplossing kunnen zijn voor een groot maatschappelijk gezondheidsprobleem.

Er zijn verschillende soorten stamcellen, die grofweg verdeeld kunnen worden in drie soorten: Embryonale stamcellen (ESC), volwassen stamcellen en de recent ontdekte geïnduceerd-pluripotente stamcellen. De studies in dit proefschrift zijn gericht op de eerste twee groepen.

ESC vormen de binnenste celmassa van de blastocyst, het embryo in een zeer vroeg ontwikkelingsstadium 5 dagen na bevruchting. Na isolatie kunnen ESC onder strikt gehandhaafde condities op een onderlaag van bindweefselcellen oneindig delen. ESC zijn pluripotent en kunnen zich differentiëren naar alle kiemlagen (endo-, ecto-, en mesoderm, een soort tussenstation in celdeling) en verder naar iedere cel van het menselijk lichaam.

In tegenstelling tot ESC zijn volwassen stamcellen multipotente cellen. Dat wil zeggen dat zij al een stap in de ontwikkeling hebben ondergaan en zich reeds in een bepaalde kiemlaag bevinden. Volwassen stamcellen kunnen zich nog wel verder specialiseren naar een variëteit aan weefsel-specifieke cellen, maar binnen de grenzen van de kiemlaag. Volwassen stamcellen zijn

aanwezig in het volgroeide menselijk lichaam in onder andere het beenmerg, de huid, en de darm en zijn verantwoordelijk voor de constante vernieuwing van deze weefsels.

Sinds wetenschappers aan het begin van dit millennium beschreven dat beenmergcellen na het inspuiten in de beschadigde hartspier differentiëren naar cardiomyocyten is het veld van stamceltherapie voor hart- en vaatziekten in een stroomversnelling geraakt. Ondanks het feit dat deze observatie controversieel is gebleken, werden binnen afzienbare tijd klinische trials gestart waarin de effectiviteit van beenmergcellen voor de behandeling van myocardinfarct en PAV werd onderzocht. De resultaten van deze trials zijn wisselend positief maar vertonen onderling verschillende uitkomsten. Dit onderstreept het gebrek aan kennis over wat er met de cellen gebeurt na transplantatie en op welke manier deze cellen al dan niet bijdragen aan herstel of preservatie van hart- of spierfunctie.

IN VIVO MOLECULAR IMAGING VAN GETRANSPLANTEERDE STAMCELLEN

Om het mechanisme te bestuderen waarmee getransplanteerde cellen wel of niet aan functioneel herstel bijdragen is het van groot belang om inzicht te verkrijgen in het gedrag van stamcellen na transplantatie. Dit wordt meestal gedaan door in experimentele modellen de stamcellen te markeren met conventionele reporter genen zoals Green Fluorescent Protein (GFP). GFP wordt geïsoleerd uit lichtgevende kwallen. Om GFP (en daarmee de gemarkeerde stamcellen) in beeld te brengen is het nodig om met een uitwendige lichtbron de GFP van energie te voorzien. Dit heeft tot gevolg dat er een hoog achtergrondsignaal ontstaat. Bovendien wordt een deel van het signaal geabsorbeerd door het omliggende weefsel waardoor het moeilijk is gemarkeerde stamcellen in dieper gelegen locaties te identificeren wat deze methode minder geschikt maakt voor beeldvorming in een levend dier (*in vivo*). Om deze reden wordt GFP beeldvorming meestal verricht op geëxplanteerde plakjes weefsel met behulp van histologie. Omdat dit het opofferen van het proefdier vergt ontstaat er met histologie echter slechts een beeld van een bepaald moment in plaats van een serie van gebeurtenissen over een langere periode. Echter, om het ware gedrag van getransplanteerde stamcellen in beeld te brengen is het van belang om de cellen herhaaldelijk over een langere periode, *in vivo* te kunnen volgen. Om dit te bewerkstelligen heeft onze onderzoeksgroep nieuwe, moleculaire beeldvormingstechnieken ontwikkeld.

Molecular Imaging wordt gedefinieerd als de *in vivo* karakterisatie van cellulaire en moleculaire processen. Dit staat of valt bij het ontwerpen van een geschikt reporter construct, dat bestaat uit een reporter gen gelinkt aan een promoter. Deze promoter kan altijd "aan" staan, geïnduceerd ingeschakeld worden, of weefselspecifiek zijn. In de studies die in dit proefschrift worden beschreven is bioluminescence imaging (BLI) met het reporter gen Firefly Luciferase (Fluc,

dat geïsoleerd wordt uit vuurvliegjes) gebruikt achter een β -actine promotor die in iedere cel tot expressie komt. Na het inbouwen van het reporter construct in de cel leidt transcriptie en translatie tot de productie van intracellulair Fluc eiwit. Op het moment dat de cellen in beeld gebracht dienen te worden wordt er een reporter probe (luciferin) in het proefdier gespoten, dat reageert met het reporter eiwit en een signaal afgeeft dat met een gevoelige CCD-camera opgevangen kan worden.

Bovengenoemde methode heeft een aantal voordelen: Ten eerste blijft het proefdier leven wat het mogelijk maakt een situatie op meerdere tijdstippen te bekijken; ten tweede zal het Fluc eiwit slechts geproduceerd worden door levende cellen waardoor een beeld ontstaat van de celoverleving; Ten derde is het een methode waarbij het gehele dier in beeld komt zodat de celdistributie duidelijk wordt; en ten slotte is het niet nodig extensiek excitatielicht te gebruiken zodat er relatief weinig achtergrondsignaal ontstaat.

BEELDVORMING VAN EMBRYONALE STAMCEL THERAPIE VOOR HART- EN VAATZIEKTEN

Het doel van dit proefschrift was om duidelijkheid te verkrijgen op het gebied van stamcel-overleving, -groei, en -migratie, en onbedoelde bijwerkingen van stamceltherapie.

Het eerste deel van het proefschrift is gericht op de voor- en nadelen van ESC therapie. In **hoofdstuk 2** werd onderzocht wat er gebeurt als ongedifferentieerde ESC in het geïnfarc-teerde muizenhart worden ingespoten. De functionele effecten op de korte termijn werden gevolgd met MRI en getest met invasieve drukmetingen. Er leek een functioneel voordeel te bestaan van het gebruik van ESC ten opzichte van de controletherapiën. Het belang van gevoelige *in vivo* beeldvorming van ESC werd onderstreept door snel stijgende signalen in de eerste week na transplantatie. Deze stijgende signalen bleken representatief voor groei van tumoren die uit verschillende soorten cellen bestonden (teratomen) met dezelfde achtergrond (ESC). Post-mortem histologie bevestigde de aanwezigheid van tumor en liet daarnaast zien dat een klein deel van de ESC daadwerkelijk hartcellen vormde.

Om meer inzicht te verkrijgen in de kwaadaardige aspecten van ESC therapie werd de studie uit **hoofdstuk 3** uitgevoerd. De experimenten illustreren de voordelen van BLI en laten zien dat slechts 100-1000 ongedifferentieerde ESC met BLI al zichtbaar zijn en dat diezelfde hoeveelheid al genoeg is om teratomen te vormen. Bovendien werd het belang van beeldvorming van het gehele dier duidelijk omdat er niet alleen tumoren ontstonden ter plaatse van de injectie, maar ook op afstand in andere organen. Ten slotte konden ESC in het hart tot 10 maanden gevolgd worden en werd zo duidelijk dat de integratie en expressie van de reporter genen zeer stabiel is.

Hoofdstuk 4 biedt een overzicht van de voor- en nadelen van verschillende beeldvormingstechnieken voor het volgen van ESC therapie. Bovendien beschrijft dit hoofdstuk de grote variëteit aan ziekten waar ESC therapie mogelijk een nieuwe behandeling voor kan vormen. **Hoofdstuk 5** richt zich vervolgens meer specifiek op de mogelijkheid van het kweken van hartcellen uit ESC. Bovendien wordt hier bediscussieerd wat er gedaan dient te worden voordat ESC therapie veilig in klinische studies gebruikt kunnen worden. Het gevaar van teratoomvorming blijft aanwezig indien de ESC voor transplantatie niet voldoende uitgekweekt worden naar meer gespecialiseerde celtypen en ontdaan worden van ongedifferentieerde cellen. Bovendien zijn ESC nooit van de patiënt zelf en leidt ESC transplantatie, net als orgaantransplantatie, onherroepelijk tot een afstotingsreactie. Tenslotte bestaat er het probleem dat getransplanteerde ESC wellicht niet goed integreren in het hartweefsel en op een andere manier reageren op signalen waardoor de getransplanteerde cellen mogelijk een ander ritme aannemen dan het omliggende spierweefsel.

BEELDVORMING VAN VOLWASSEN STAMCEL THERAPIE VOOR HART- EN VAATZIEKTEN

Een belangrijke vraag die uit de grote hoeveelheid studies met verschillende soorten volwassen stamcellen naar voren kwam is: Welke volwassen stamcel kan de functie van het beschadigde hart het beste beschermen of verbeteren? **Hoofdstuk 6** geeft hierop voor het eerst een antwoord. Verschillende soorten stamcellen werden geïsoleerd uit het beenmerg (mononucleaire cellen –MN- en mesenchymale cellen –MSC-), de spieren (skeletmyoblasten –SkMb-), en de huid (fibroblasten –Fibro-) van muizen die in iedere cel van hun lichaam de traceerbare, lichtgevende reporter genen Fluc en GFP tot expressie brachten. Na uitvoerige *in vitro* karakterisatie van reporter gen expressie werden de cellen ingespoten in de hartspier van ongemodificeerde wild-type muizen die een hartinfarct hadden ondergaan. *In vivo* BLI liet vervolgens zien dat van alle celtypen, MN het langst overleefden waarbij er na zes weken nog een marginaal signaal aanwezig was in vergelijking tot maximaal 4 weken in de andere groepen. In overeenstemming met dit overlevingsvoordeel lieten de functionele testen (echocardiografie en invasieve hemodynamische metingen) een significant voordeel van MN transplantatie zien ten opzichte van de controlegroepen. Hierbij moet aangetekend worden dat in alle groepen die celtherapie ontvingen er een trend bestond van een verslechtering van hartfunctie tussen de vierde en zesde week na transplantatie, terwijl de hartfunctie in de controlegroep die slechts zoutoplossing ontving stabiel was. Deze bevinding suggereert dat het effect van celtransplantatie van korte duur is, hetgeen ook uit sommige klinische studies kan worden geconcludeerd.

Een nieuwe groep stamcellen binnen het palet van klinische celkandidaten is aanwezig in het

vet. Er was veel enthousiasme rondom deze adipose-derived stromale cellen (ASC) omdat ze zouden lijken op MSC uit het beenmerg maar makkelijker te isoleren zijn. Na een *in vitro* evaluatie bood **Hoofdstuk 7** voor het eerst een vergelijking van de *in vivo* kinetika en de functionele gevolgen op de beschadigde hartspier van beide celpopulaties. ASC en MSC deelden dezelfde morfologische en groeieigenschappen en lieten een vergelijkbaar patroon van celexpressie zien. Ook *in vivo* gedroegen de cellen zich op eenzelfde manier wat helaas betekende dat zowel ASC als MSC binnen vier weken afstierven. Bovendien was er met echocardiografie en invasieve hemodynamische metingen geen functioneel voordeel te meten van celtransplantatie. In de bovengenoemde studies werd de hartfunctie *in vivo* gemeten met echocardiografie. De metingen waren over het algemeen vergelijkbaar met de invasieve hemodynamische metingen maar het tweedimensionale karakter maakt echocardiografie toch beperkt. In **hoofdstuk 8** werd daarom onderzocht of er wellicht ruimte was voor Micro-CT beeldvorming van het hart. Het muismodel van hartfalen werd gebruikt om te laten zien dat Micro-CT een betrouwbare manier is om *in vivo* de hartdimensies en -functie te meten op een driedimensionale manier. De resultaten van de Micro-CT correleerden met meer conventionele methoden maar bleken preciezer met betrekking tot geometrie en functionele uitkomst. Bovendien bood Micro-CT *in vivo* beelden die vergelijkbaar waren met *post-mortem* histologie.

Ten slotte maakt **hoofdstuk 9** de overstap van hartziekten naar PAV. Er werd onderzocht wat er met getransplanteerde MN gebeurde na injectie in de bovenbeenspier of na systemische introductie bij muizen waarbij de bovenbeenslagader was onderbonden. Na injectie in de spier, zowel eenmalig als herhaald, waren de uitkomsten vergelijkbaar met de resultaten van de eerdere studies in het hart waarbij er marginale celoverleving was zonder effect op de doorbloeding van het ischemische been zoals gemeten met Laser-Doppler Perfusion Imaging. Na intraveneuze injectie gevolgd door regelmatige BLI werd duidelijk dat een deel van de MN naar het aangedane gebied migreert, maar dat een minstens zo groot deel naar de lever, de milt, en het beenmerg afreist. Ex vivo BLI liet vervolgens zien dat het signaal uit het aangedane gebied met name het resultaat was van retentie van de MN in de beschadigde huid en het onderhuidse vet aldaar, meer dan daadwerkelijk in de aangedane spier. Dit migratiepatroon resulteerde in een gebrek aan functioneel effect.

CONCLUSIE

Dit proefschrift beschrijft het gedrag van zowel embryonale als volwassen stamcellen in modellen van hart- en vaatziekten. Terwijl ESC therapie daadwerkelijk regeneratief kan zijn en het beschadigde weefsel zou kunnen vervangen, heeft het de nadelen dat er gevaar is voor teratogeniciteit en dat de cellen bovendien een afstotingsreactie uitlokken. Deze gevaren bestaan niet bij het gebruik van volwassen stamcellen. Echter, deze cellen overleven slecht in het

aangedane gebied en lijken in de gebruikte modellen een marginaal functioneel effect te hebben. Toekomstige studies dienen gericht te zijn op het minimaliseren van de gevaren van ESC transplantatie, de verbetering van celoverleving en functionaliteit van volwassen stamcellen, en de verdere karakterisatie van geïnduceerd-pluripotente stamcellen. Verdere ontwikkeling is nodig om stamceltherapie een waardevolle toevoeging te maken in het arsenaal van behandelingen voor hart- en vaatziekten.