



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unravelling the collagen network of the arterial wall

Beenakker, J.W.M.

Citation

Beenakker, J. W. M. (2012, June 5). *Unravelling the collagen network of the arterial wall*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19050>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/19050>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19050> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Beenakker, Jan Willem Maria

Title: Unravelling the collagen network of the arterial wall

Date: 2012-06-05

Samenvatting

Het menselijk lichaam is opgebouwd uit verschillende typen weefsel, zoals bind-, zenuw- en spierweefsel. In zo'n weefsel zitten cellen met een vergelijkbare functie, die door intercellulaire contacten en een extracellulaire matrix verbonden zijn. Deze extracellulaire matrix bestaat uit verschillende soorten fibers die samen een netwerk vormen. Dit netwerk is niet alleen van belang omdat het de omgeving is waarin de cellen zich bevinden, maar ook omdat het voor een groot deel de structuur en integriteit van het weefsel bepaalt. In dit proefschrift heb ik met een aantal technieken naar de extracellulaire matrix van bloedvaten gekeken om te onderzoeken hoe dit de mechanische eigenschappen van de vaatwand bepaalt en om te zien hoe dit bij verschillende ziektebeelden verstoord is.

In dit onderzoek hebben we onze aandacht vooral gericht op de aorta, ook wel bekend als de grote lichaamsslagader. Deze slagader loopt vanaf het hart door de buik naar beneden en brengt zuurstofrijk bloed naar het grootste deel van het lichaam. De aorta heeft bij een volwassen mens een diameter van twee à drie centimeter en in rust stroomt er gemiddeld vijf liter bloed per minuut doorheen.

De aortawand is opgebouwd uit drie verschillende lagen. De binnenste laag, de intima, bestaat uit een laag endotheel-cellen die in direct contact met het bloed staan. De middelste laag, de media, is opgebouwd uit een netwerk van elastine-fibers. Deze fibers zijn zeer elastisch en kunnen tot wel 150% opgerekt worden zonder te breken. In deze laag zitten ook gladde spiercellen die het weefsel in de goede vorm houden en de extracellulaire matrix produceren. De buitenste laag van de aorta, de adventitia, bestaat uit een losmazig netwerk van collageen-fibers, die in tegenstelling tot elastine zeer stug zijn.

De buitenste twee lagen van de aortawand zorgen voor de bijzondere mechanische eigenschappen van de aorta. Bij kleine vervormingen is het bloedvat flexibel doordat de collageen-fibers dan nog niet op spanning staan en de elastine-fibers meerekken en zorgen dat het bloedvat de goede vorm behoudt. Deze flexibiliteit is cruciaal voor de aorta omdat bij elke hartslag de druk tijdelijk stijgt en het bloedvat dit kan opvangen door een beetje uit te zetten. Bij te grote vervormingen echter, komen de collageen-fibers in de buitenste laag strak te staan, waardoor het bloedvat niet verder kan rekken en scheuren. Dit is te vergelijken met een autoband die opgebouwd is uit het elastische rubber en een metalen karkas. Door het rubber kan de band gemakkelijk kleine oneffenheden in de weg

opvangen, maar het karkas voorkomt dat de band scheurt wanneer er te hard tegen een stoeprand gereden wordt.

Om de mechanische werking van de extracellulaire matrix van de aorta te doorgronden, gebruiken we voornamelijk twee technieken. Door het weefsel onder een optische microscoop te leggen, zien we hoe de verschillende soorten fibers in het weefsel geweven zijn tot een netwerk. Hiervoor maken we enerzijds gebruik van de optische eigenschappen van de fibers; elastine licht bijvoorbeeld op als het met groen licht beschenen wordt. Anderzijds gebruiken we speciale labels om de fibers te kunnen onderscheiden, bijvoorbeeld een antilichaam dat aan een specifiek type collageen plakt en dat onder rood licht zichtbaar wordt. In het bijzonder hebben we veel gebruik gemaakt van een confocale microscoop. Deze microscoop maakt het mogelijk om een drie-dimensionale weergave van het weefsel te maken, waardoor we precies zien hoe de verschillende fibers door elkaar heen geweven zijn. Daarnaast hebben we de optische microscoop ook gebruikt om andere onderdelen van de vaatwand, bijvoorbeeld cellen van het immuunsysteem, te volgen en te kijken hoe zij de extracellulaire matrix beïnvloeden.

De andere techniek die we in dit onderzoek veelvuldig gebruikt hebben, is de atomaire kracht microscoop (AFM). De kern van dit apparaat is een klein hefboompje, zo'n 40µm breed (de dikte van een haar) en 1µm dik, met aan het einde een minuscule scherp puntje. Met deze hefboom kunnen we op individuele fibers van het weefsel drukken om zo te meten hoe stijf zo'n fiber is of hoeveel kracht het netwerk kan hebben voordat het scheurt. Door deze informatie te combineren met de gegevens over de opbouw van het weefsel, proberen we te begrijpen wat de mechanische eigenschappen van de aorta zijn, hoe deze tot stand komen en hoe deze eigenschappen bij sommige ziektebeelden aangetast zijn.

Het eerste ziektebeeld waarbij wij dit gedaan hebben, is een aneurysma van de abdominale aorta. Bij deze aandoening zwelt het onderste deel van de aorta lokaal op tot een ballon totdat hij, indien hij niet geopereerd wordt, uiteindelijk scheurt met de dood als gevolg. Hoewel het een relatief veel voorkomende ziekte is, ongeveer 1 op de 20 personen boven de 60 heeft een aneurysma, en er al tientallen jaren onderzoek naar gedaan wordt, was het tot een paar jaar geleden nog onduidelijk wat de oorzaak van deze lokale verzwakking is. Zo bleek de hoeveelheid collageen-fibers en het aantal verbindingen tussen deze fibers niet noemenswaardig te verschillen tussen een gezonde en een aneurysmatische aorta. Onze drie-dimensionale weergave van de collageen-fibers in het gezonde weefsel, laat zien hoe de individuele fibers samen dikke collageen-bundels vormen en dat deze bundels samen een hecht netwerk vormen. Bij het aneurysmatische weefsel

Samenvatting

echter, blijkt alle organisatie verloren te zijn en zien we een ongestructureerde aggregatie van collageen-fibers. Wanneer we de gezonde weefsels met de AFM indrukken, blijken de fibers in het gezonde weefsel op zo'n manier met elkaar verbonden te zijn, dat ze samen de kracht verdelen waardoor het weefsel intact blijft. Bij het aneurysma is het netwerk van een dusdanig slechte kwaliteit, dat de fibers alle deformatie zelfstandig moeten dragen, waardoor ze breken en het netwerk beschadigd raakt. Deze studie laat hiermee het belang van de netwerkstructuur van de collageen-fibers in de vaatwand zien en toont hoe een verlies in de organisatie van dit netwerk het opzwellen en uiteindelijk scheuren van de aorta tot gevolg kan hebben.

In een vervolgonderzoek hebben we met dezelfde technieken gekeken welke bijdrage de afzonderlijke componenten van de vaatwand leveren aan de mechanische eigenschappen van het geheel. Dit deden we door afzonderlijke bouwstenen met enzymen af te breken. Zo zagen we bijvoorbeeld dat er na het afbreken van al het collageen in de adventitia, de buitenste laag van de aorta, nog steeds een coherent netwerk overblijft, dat ongeveer 50 maal minder stijf is dan het intacte weefsel. Eén van de opmerkelijke resultaten van dit onderzoek is het effect van een neutrofiel extract op het weefsel. Neutrofielen zijn immuuncellen en van dit type cellen is het bekend dat ze in verhoogde aantallen in aneurysma's aanwezig zijn. AFM-metingen op de adventitia lieten zien dat het neutrofiel extract de mechanische eigenschappen van het weefsel binnen 24 uur zodanig verandert dat het grote overeenkomsten vertoont met het aneurysmatische weefsel. Verder onderzoek moet uitwijzen welke specifieke elementen uit het extract hiervoor verantwoordelijk zijn en of dit mogelijkheden voor de behandeling van aneurysma's biedt.

Na de succesvolle metingen op aneurysma's, hebben we deze manier van het bestuderen van weefsels op andere ziektebeelden toegepast. Atherosclerose, ook wel aderverkalking genoemd, is een langzaam voortschrijdende ziekte, die begint met het ophopen van vetten in de vaatwand. Bij de ontsteking die dit tot gevolg heeft, komen veel afbraakstoffen vrij. Om te voorkomen dat deze stoffen in de bloedbaan komen, worden ze afgedekt door een laag collageen. Tijdens de progressie van de ziekte, kan deze laag echter verzwakt raken en uiteindelijk zelfs scheuren. Als de afbraakstoffen vervolgens in de bloedbaan komen, starten zij een stollingsreactie die leidt tot een bloedstolsel. Dit stolsel kan tenslotte de bloedtoevoer tot bijvoorbeeld het hart of de hersenen blokkeren en daardoor een hartinfarct of een beroerte veroorzaken. Recente studies bij muizen hebben aangetoond dat lysyl-oxidase, een eiwit dat bijdraagt aan de verbindingen tussen collageen-fibers (LOX), het collageen-omhulsel van atherosclerotische plaques verstevigt. Wij zijn op deze studie verder gegaan door ten eerste te laten zien dat plaques met meer LOX stabiel zijn dan plaques met minder LOX. Dat deden we

opnieuw door zowel met een optische microscoop te kijken, door bijvoorbeeld de hoeveelheid collageen met de hoeveelheid LOX te vergelijken, alsook door met behulp van de AFM aan te tonen dat binnenin een plaque plekken met meer LOX steviger zijn dan plekken met minder LOX. Vervolgens lieten we zien hoe de hoeveelheid LOX negatief correleert met verschillende tekenen die een verslechterd ziektebeeld geven, zoals bijvoorbeeld de maat waarin het weefsel ontstoken is. Tenslotte toonden we aan dat patiënten die meer LOX produceren minder atherosclerotische complicaties, zoals een hartinfarct, hebben dan patiënten die minder LOX produceren.

In de voorgaande ziektebeelden spelen steeds de interactie tussen immuuncellen en de extracellulaire matrix een belangrijke rol bij de progressie van de ziekte. Door middel van een nieuw diermodel, waarbij menselijke tumorcellen in zebavis embryo's geïnjecteerd worden, hebben we bestudeerd hoe tumorcellen de extracellulaire matrix van tot dan toe nog gezond weefsel binnendringen. Met verschillende optische technieken toonden we aan hoe de neutrofielen, dezelfde immuuncellen die ook bij aneurysma's aanwezig zijn, het collageennetwerk van de zebavis veranderen en dat dit het voor de tumorcellen mogelijk maakt om het nieuwe weefsel binnen te dringen. Wanneer de neutrofielen door medicijnen geïnactiveerd werden, zagen we geen tumorcellen het weefsel binnendringen. Hoewel de resultaten van dit onderzoek nog zeer pril zijn, openbaren ze tot nu toe onbekende processen, die mogelijk ook bij tumorprogressie bij mensen een belangrijke rol spelen.

Met dit onderzoek hebben we laten zien welke belangrijke rol de extracellulaire matrix voor de integriteit van het weefsel heeft, en hoe deze bij verschillende ziektebeelden aangetast is. Hiermee is een heel nieuwe manier om ziektes en processen binnen het menselijk lichaam te bestuderen geopend. Een voorbeeld van een mogelijke vervolgstudie is de verweking, ofwel het zachter worden, van de cervix (baarmoederhals) rond de bevalling. Het cervixweefsel bestaat voornamelijk uit collageen, maar de manier waarop dit initieel stijve weefsel verandert in zacht weefsel, zodat de baby geboren kan worden, is nog onbekend. Dit proces is des te meer interessant, omdat het reversibel is: het collageennetwerk is binnen enkele weken na de bevalling weer in haar oorspronkelijke staat terug.