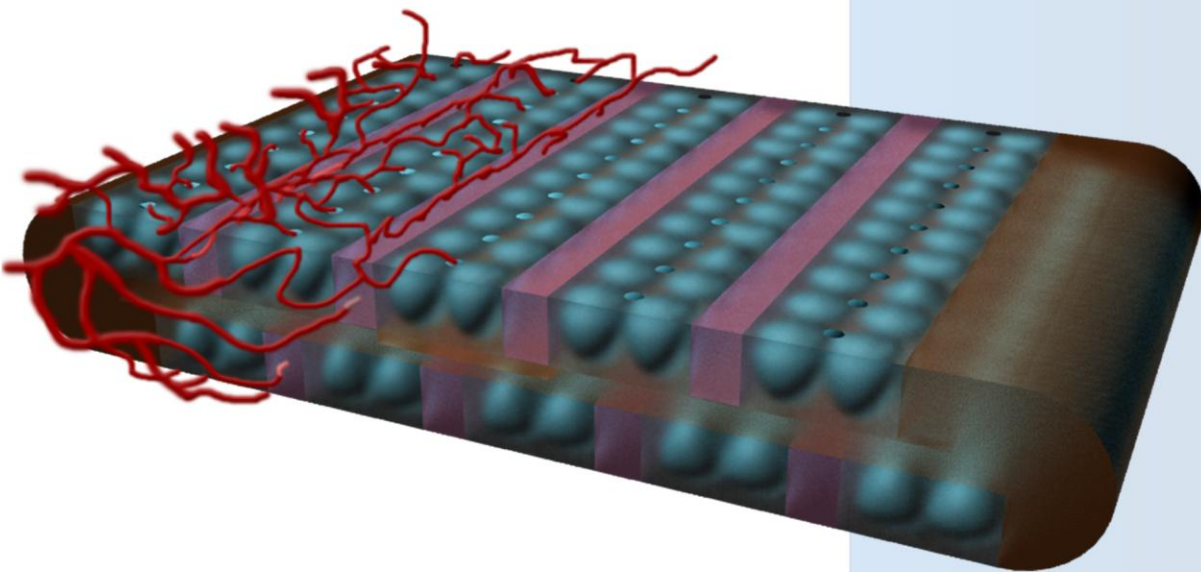


MDO **2010**

Verbetering van de huidige eilandjes van Langerhans transplantatie met behulp van mesenchymale stamcellen.

Verdieping in een mogelijke verbetering van de huidige eilandjes van Langerhans transplantatie behandeling. Waarom mesenchymale stamcellen kunnen helpen en hoe ze gecombineerd met eilandjes van Langerhans, buiten de bloedbaan, getransplanteerd kunnen worden.



**Multidisciplinaire opdracht
Technische Geneeskunde**

**C.L. Dieudonné, R. de Vries,
E. Willemen en L. Zhou**

UNIVERSITEIT TWENTE.

Voorwoord

Ter afsluiting van de Bachelor van de opleiding Technische Geneeskunde aan de Universiteit Twente hebben we een Multi disciplinaire opdracht uitgevoerd. De opdracht die wij hebben gekregen heet: ' Tissue engineered islets of Langerhans for diabetes type I treatment Part 3'. De opdracht is opgezet door dr. Aart van Apeldoorn van de vakgroep Tissue Regeneration van Universiteit Twente en dr. Eelco de Koning van de afdeling nefrologie in het Leids Universitair Medisch Centrum(LUMC).

We willen graag een aantal mensen bedanken voor hun hulp en begeleiding bij het onderzoek. Ten eerste bedanken we onze technische begeleider dr. Aart van Apeldoorn en de medische begeleiders dr. Eelco de Koning en dr. Marten Engelse uit het LUMC. Daarnaast willen we dr. Piet Dijkstra bedanken voor de belangrijke informatie over de hydrogels en dr. Tim Spitters voor zijn hulp bij het diffusieprobleem. Daarnaast bedanken we Mijke Buitinga voor haar hulp vanuit de Technisch Geneeskundige kant bij zowel medische als technologische vragen. Tenslotte willen we onze tutor Kim Dorsman bedanken, voor al haar hulp en adviezen.

Abstract

Bij de huidige Eilandjes van Langerhans (EvL) transplantatie sterft een groot deel van de EvL kort na transplantatie. Op dit moment zijn er meerdere donoren nodig voor de behandeling van een patiënt. Dit onderzoek richt zich op een mogelijke verbetering van de huidige EvL transplantatie. Hierbij is specifiek gekeken naar het gebruik van mesenchymale stamcellen bij een transplantatie buiten de bloedbaan. Na literatuur onderzoek is gebleken dat MSCs een stimulerend effect hebben op de angiogenese en een inhiberend effect op de immuunreactie. Bij EvL transplantatie buiten de bloedbaan moet rekening gehouden worden met de beperkte diffusie afstand en de revascularisatie. In dit onderzoek wordt een dubbelzijdig golfplaatmodel aangedragen als praktische oplossing. Aan het model worden randvoorwaarden gesteld die o.a. betrekking hebben op de diffusiecapaciteit, mogelijkheid voor revascularisatie, veiligheid enz. Strategische plaatsing van de MSCs in het model leidt in theorie tot vorming van een goed vasculair netwerk terwijl tegelijkertijd de immuunreactie gedempt wordt. De oplossing en verzamelde informatie uit dit onderzoek kan gebruikt worden als basis voor praktijk onderzoek naar de co-transplantatie van EvL en MSCs buiten de bloedbaan.

Inhoudsopgave

1	Introductie.....	4
2	Probleemstelling.....	8
Zijn MSCs van toegevoegde waarde bij een EvL transplantatie buiten de bloedbaan?		
3.1	Angiogenese.....	9
3.2	Immuunreactie.....	13
3.3	Reductie van het aantal eilandjes van Langerhans.....	17
Wat zijn de risico's bij het gebruik van MSCs?		
4.1	Veiligheid.....	19
Bestaat er een relatie tussen de plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL en het effect dat de MSCs uitoefenen op de EvL transplantatie buiten de bloedbaan?		
5.1	Bronnen van de mesenchymale stamcellen.....	22
5.2	Ideale plaatsbepaling van de MSCs ten opzichte van de EvL.....	25
Hoe is het mogelijk de MSCs in combinatie met de EvL te transplanteren buiten de bloedbaan?		
6.1	In de praktijk.....	28
6.2	Het concept model.....	43
7	Conclusie.....	47
8	Discussie en aanbevelingen.....	48
Referenties.....		51
Bijlagen		59

Introductie

Type 1 Diabetes Mellitus (t1DM) is een chronische aandoening waarbij het bloedglucose gehalte ontregeld is door een tekort aan insuline. Het tekort aan insuline wordt veroorzaakt door een auto-immuunreactie gericht tegen de insuline producerende bèta-cellen, die in de eilandjes van Langerhans (EvL) aanwezig zijn.[1] t1DM is een multifactoriële aandoening. Dit betekent dat zowel genetische- als omgevingsfactoren een rol spelen bij het ontwikkelen van deze ziekte. Welke genen en omgevingsfactoren er precies voor zorgen dat de T-cellen lichaamseigen bèta-cellen aanvallen, is nog onduidelijk. Wel is duidelijk dat de T-cellen de bèta cellen in apoptose (geprogrammeerde celdood) brengen waardoor t1DM ontstaat.[2]

Eilandjes van Langerhans (EvL)

Ongeveer 1 miljoen EvL vormen samen het endocriene deel van de pancreas dat ongeveer 1-2% van de totale pancreas in beslag neemt. Één EvL (fig. 1) bestaat uit ongeveer 2000 cellen van vier verschillende celtypen: alpha-, bèta-, delta- en pancreaspolypeptidecellen.[3] Alpha cellen produceren glucagon en stimuleren zo de glycogenolyse, het omzetten van glycogeen naar glucose, en de gluconeogenese, het vormen van glucose. De alpha-cellen zorgen dus voor een verhoging van de glucose spiegel. Bèta cellen daarentegen geven insuline en c-peptide af. Insuline bevordert de opslag van glucose in de lever, de spieren en adipose weefsels waardoor de bloedsuikerspiegel daalt. Insuline en glucagon hebben dus een tegenovergestelde werking. C-peptide is een afbraakproduct van pro-insuline dat één op één met insuline wordt afgegeven. De bloedwaarde van C-peptide kan worden gebruikt om de insuline aanmaak te controleren. De delta-cellen kunnen somatostatines aanmaken die een remmende werking op de afscheiding van insuline en glucagon hebben. Pancreaspolypeptide-cellen geven pancreaspolypeptides af waardoor de afgifte van o.a. verteringsenzymen in de pancreas geremd wordt.[5] De hormoonsecretie van de eilandjes wordt gereguleerd door de neurale aanvoer, de microcirculatie en cel-cel interactie. De door de EvL geproduceerde hormoonproducten komen in de portale circulatie terecht.[3] Bij gezonde mensen reageren de cellen in de EvL direct op variaties in hormonale- en voedingsconcentraties waardoor er een glucose homeostase is.

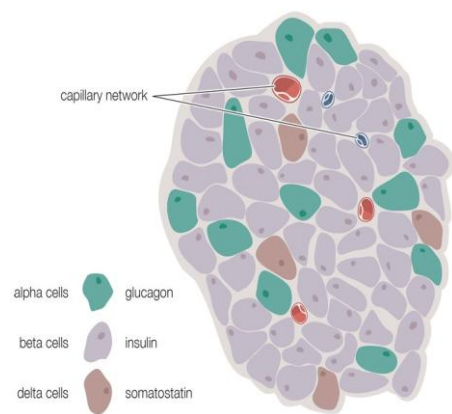


Fig.1 een eilandje van Langerhans [4]

Te weinig bèta cellen

In de normale situatie zorgt een verhoging van de bloedglucose concentratie voor secretie van insuline door de bèta cellen. Dit zorgt voor een vrijwel directe daling van het glucose gehalte in het bloed. Hierdoor ontstaat er een bloedglucose homeostase waarbij de bloedglucose vrijwel altijd tussen de 3,5 en 8,5 mmol/L ligt. Bij t1DM zijn er te weinig of geen bèta cellen door de eerder genoemde auto-immuunreactie. Hierdoor kan er niet genoeg insuline aangemaakt worden bij een stijging van de bloedglucose concentratie waardoor er hyperglycemia ontstaat, een te hoge bloedglucose concentratie (>11 mmol/L). Een te kort aan insuline zal daarnaast leiden tot ketoacidose omdat het lichaam in plaats van glucose vet gaat verbranden, wat een verzuring van

het bloed tot gevolg heeft. Ketoacidose is op zeer korte termijn dodelijk en een snelle diagnose van t1DM is dus belangrijk.

Insulinetherapie

De huidige standaard behandeling bij t1DM is insuline therapie. Hierbij moeten patiënten zelf hun bloedglucose waarde meten en aan de hand hiervan zelf insuline toedienen met een spuit of pomp.[6] Het constante rekening houden met diabetes kan sociale beperkingen opleveren. Diabeten krijgen te maken met zowel hypo- als hyperglycemie, een te lage (<3,0 mmol/L) en een te hoge (>11,0 mmol/L) bloedglucose waarde. Wanneer hypoglycemie niet op tijd wordt opgemerkt kan het leiden tot verlies van het bewustzijn en zelfs dodelijk zijn. Chronische hyperglycemie kan leiden tot vaatschade wat op de lange termijn complicaties op kan leveren. Wanneer hyperglycemie een langere tijd aanhoudt is er tevens een tekort aan insuline waardoor cellen vet in plaats van glucose gaan verbranden.

Bij insulinetherapie zijn onbewuste hypoglycemie en complicaties als gevolg van diabetes de grootste problemen. Er is bij insuline therapie geen automatische en continue regulatie. Wanneer een te lage bloedglucose waarde niet aangevoeld wordt kan dit leiden tot onverwacht bewustzijn verlies waarna glucagon toediening de enige redding is. Verder kunnen er ook complicaties ontstaan door chronische hyperglycemie. Complicaties die langzaam ontstaan door hyperglycemie door de jaren heen zijn onder andere hart- en vaatproblemen, retinopathie, nierfalen en neuropathie.[5] Daarnaast is het ook mogelijk dat er insuline resistentie optreedt, waardoor insuline therapie nog moeilijker of zelfs compleet onmogelijk wordt.[6]

Gecombineerde nier-/pancreastransplantatie

Ongeveer 40% van de t1DM patiënten krijgt nierproblemen, de meeste van deze patiënten hebben al langer dan 10 jaar diabetes.[7] Wanneer de nierproblemen zo ver vorderen dat een niertransplantatie noodzakelijk is, kunnen patiënten in aanmerking komen voor een combinatie van een nier- en pancreastransplantatie. De reden dat er pas aan een pancreastransplantatie gedacht wordt als een niertransplantatie noodzakelijk is, zijn de grote nadelen en risico's van een orgaantransplantatie. De orgaantransplantatie zelf is zeer belastend voor de patiënt en daarnaast moet er immunosuppressiva gebruikt worden om orgaanafstoting te voorkomen, wat veel bijwerkingen met zich meebrengt zoals een verhoogd risico op infectieziekten[8], en andere ernstige bijwerkingen[9].

Een succesvolle pancreastransplantatie zorgt over het algemeen voor normoglycemia, normale bloedglucose waardes, bij de patiënt. Het inbrengen van een donor pancreas is echter een grote buikoperatie, die een grote belasting voor de patiënt op levert. Bij sommige patiënten is het daarom niet mogelijk om een complete pancreas te transplanteren. Om bij deze patiënten, waarbij de standaard insuline therapie vaak niet werkt en een pancreastransplantatie onmogelijk is, toch betere bloedglucose waarden te verkrijgen is een veelbelovend nieuw alternatief ontwikkeld: het (minimaal invasief) transplanteren van de eilandjes van Langerhans volgens het zogenaamd Edmonton Protocol.

Eilandjes van Langerhans transplantatie

In 2000 zijn voor het eerst 7 patiënten succesvol behandeld met een EvL transplantatie door middel van het Edmonton protocol, met als resultaat insuline onafhankelijkheid.[10] Bij dit protocol worden de EvL geïsoleerd uit donor pancreata en getransplanteerd in de vena portae (fig 2), er wordt daarbij gebruik gemaakt van glucocorticoïde vrije immunosuppressiva. Een van de voordelen van een EvL transplantatie ten opzichte van een complete pancreastransplantatie is dat de operatie minimaal invasief gedaan kan worden, waardoor de patiënten minder lang in het ziekenhuis hoeven te verblijven. In de toekomst wordt het misschien ook mogelijk om EvL te gebruiken uit andere bronnen dan humane donor pancreata waardoor de EvL brongrootte toeneemt. Dit is vandaag de dag nog niet van toepassing omdat er nog geen goede manieren zijn om EvL te kweken en xenotransplantatie klinisch ontoelaatbaar is.

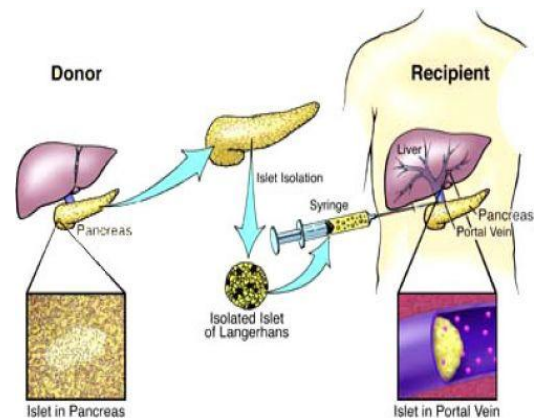


Fig.2 EvL transplantatie

Ondanks de positieve resultaten die mede dankzij het Edmonton protocol bereikt zijn bij een EvL transplantatie, is ook deze behandeling niet optimaal. De zuurstofdruk in de vena portae is te laag voor de eilandjes en door de filterende functie van de lever zijn er te veel schadelijke radicalen in de omgeving aanwezig. Na de transplantatie sterft al snel een groot deel van de getransplanteerde eilandjes af, door een onmiddellijke afstotingsreactie en het gebrek aan zuurstof. Daarnaast zijn er gemiddeld 3 donoren nodig voor de behandeling van een patiënt. Elke extra donor betekent een extra HLA type, wat de afstoting bevordert. Slechts 10% van de ontvangers wereldwijd hebben totale insuline onafhankelijkheid bereikt na een EvL transplantatie.[11] Hieruit kan geconcludeerd worden dat er nog een hoop te verbeteren valt aan de huidige EvL transplantatie.

Mesenchymale stamcellen

Mesenchymale stamcellen (MSCs) werden 42 jaar geleden ontdekt door Friedenstein en zijn collega's.[11] MSCs zijn stamcellen die hematopoïetische stamcellen ondersteunen en voorloper cellen van verschillende mesenchymale weefsels produceren, waaronder bot, kraakbeen, pees, vet en spier.[12] Vergelijkbare volwassen stamcellen zijn gevonden buiten het beenmerg. Deze cellen kunnen, onder invloed van specifieke signalen, differentiëren in een fenotype dat anders is dan de voorlopercel.[13] Voorheen werd gedacht dat volwassen stamcellen helpen bij de groei van één specifieke cellijn.[13] Deze gedachte moest radicaal worden bijgesteld na meerdere onverwachte ontdekkingen. Onderzoeken hebben aangetoond dat er stamcellen zijn, waaronder MSCs, die bijzondere eigenschappen vertonen. Deze stamcellen kunnen aanleiding geven tot een reeks cellen die totaal verschillen van weefsel waar ze in zitten. MSCs blijken aanleiding te kunnen geven voor de vorming van niet-mesenchymale cellen zoals neurale- of epitheel cellen, naast de al eerder genoemde mesenchymale fenotypes zoals bot, kraakbeen, vet en spier.[14, 15] Daarnaast kunnen MSCs, wanneer er vraag naar is, inactieve voorloper cellen uit andere weefsels aantrekken.[16] De afgelopen jaren is er veel onderzoek gedaan naar de therapeutische mogelijkheden van MSCs, bij verschillende medische problemen. Na in vitro en in vivo onderzoek, waarin positieve effecten

werden gevonden, zijn ook de eerste klinische onderzoeken gestart. De eerste resultaten van enkele onderzoeken zijn gepubliceerd en besproken in verschillende reviews.[17] Hieruit blijkt dat op het gebied van botdefecten, myocardiale infarcten, (andere) ischemische problemen, beenmergtransplantaties en chronische huidschade MSCs een positieve rol spelen in het regeneratieve proces. Naast de positieve resultaten op regeneratief gebied kunnen MSCs ook een positief effect hebben bij transplantaties. Dit komt doordat zij zowel een angiogenese stimulerende als immunomodulatoire functie bezitten.

Klinische relevantie van onderzoek naar het gebruik van MSCs bij een EvL transplantatie

De afgelopen jaren is er veel vooruitgang geboekt bij het transplanteren van de EvL. Er zijn echter nog veel problemen. De hoeveelheid eilandjes die getransplanteerd moet worden om insuline onafhankelijkheid te bereiken is op dit moment een groot probleem. Dit probleem wordt voornamelijk veroorzaakt door de slechte overleving en functie van de EvL na de transplantatie. Onderzoek naar een verbeterde overleving van de eilandjes na transplantatie is van belang, omdat op dit moment de eilandjes van 3 donoren in de vena portae van de patiënt worden ingespoten om normoglycemie te bereiken. Een vermindering van de benodigde EvL zou een stap in de goede richting zijn om meer patiënten met t1DM te kunnen behandelen.

Op dit moment wordt de grens tussen een klinisch bruikbaar en onbruikbaar isolaat gesteld op 600.000 EvL. Wanneer de mogelijkheid gecreëerd wordt om met minder EvL gelijkende resultaten te behalen, zou deze grens naar beneden bijgesteld kunnen worden. Waardoor isolaten van bijvoorbeeld 400.000-500.000 eilandjes ook klinisch bruikbaar worden, dit zou al een enorme vooruitgang zijn.

Probleemstelling

Hoofdvraag:

Hoe is het mogelijk om het aantal geïmplanteerde eilandjes van Langerhans te reduceren, met behulp van efficiënte toepassing van mesenchymale stamcellen, in een eilandjes van Langerhans transplantaat buiten de bloedbaan?

Deelvragen

- Heeft het gebruik van MSCs een toegevoegde waarde bij een EvL transplantatie buiten de bloedbaan?
 - Heeft het gebruik van MSCs een toegevoegde waarde op de immunreactie die plaats vind bij een EvL transplantatie buiten de bloedbaan?
 - Heeft het gebruik van MSCs een toegevoegde waarde op de revascularisatie die plaats vind bij een EvL transplantatie buiten de bloedbaan?
- Wat zijn de risico's bij het gebruik van MSCs?
- Bestaat er een relatie tussen de plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL en het effect dat de MSCs uitoefenen op de EvL transplantatie buiten de bloedbaan?
- Hoe is het mogelijk de MSCs in combinatie met de EvL te transplanteren buiten de bloedbaan?

Angiogenese

Angiogenese, het ontstaan en de groei van een capillair netwerk in een voorheen avasculair weefsel, is een complex en dynamisch proces waarbij een belangrijke rol is weggelegd voor de factoren van de extracellulaire matrix (ECM).[22]

Eilandjes van Langerhans (EvL) zijn micro-organen die een dicht capillair netwerk bevatten. De dichtheid van het capillaire netwerk is ongeveer 10 keer zo hoog als het omringende exocriene weefsel.[23, 24] Het vasculaire systeem van de EvL is cruciaal voor de intercellulaire communicatie tussen de endocriene pancreatische cellen, het exocriene pancreatische weefsel en andere ingewanden. De bloedvoorziening van de eilandjes is erg gecompliceerd. Alle eilandjes zijn parallel verbonden aan de arteriële circulatie, waardoor ze simultaan reageren op hetzelfde arteriële milieu. Elk eilandje krijgt de bloedtoevoer van 1 tot 5 arteriolen, die splitsen in een capillairnetwerk met structurele en functionele gelijkenissen aan glomeruli, waarbij ieder EvL tenminste grenst aan een capillaire endotheelcel.[25]

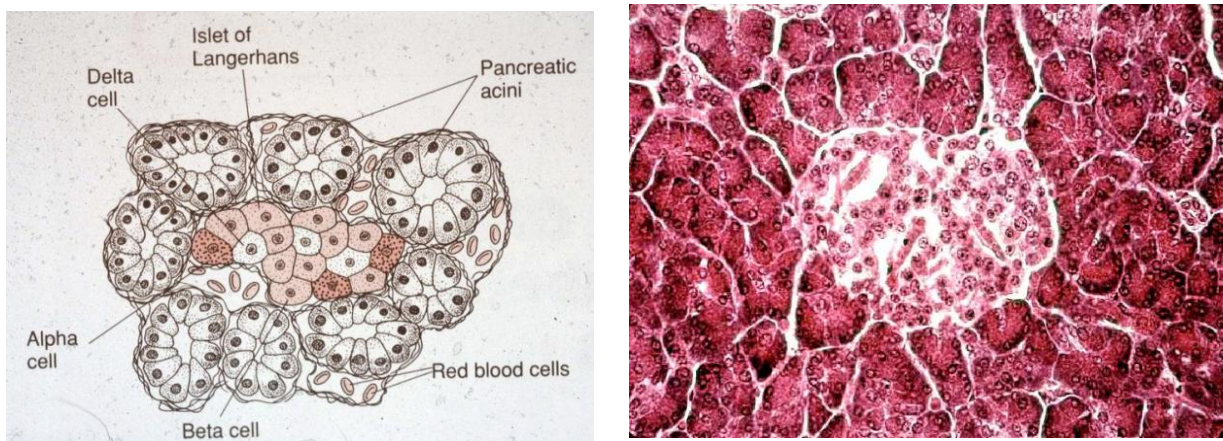


Fig. 3: Eilandje van Langerhans

Een mens bezit ongeveer 1 miljoen EvL. De diameter van een eilandje varieert tussen de 50 en 500 μm waarbij een gemiddeld eilandje een doorsnede heeft van ongeveer 150 μm . [26-28] Ook al bevatten de eilandjes maar 1-2% van de totale pancreas massa, toch ontvangen zij 5-10% van het aangevoerde bloed naar de pancreas.[29] De eilandjes produceren angiogene factoren, zoals vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) en angiopoietin-1, die een belangrijke rol spelen in het creëren van dit sterk gevasculariseerde netwerk.[30] De bloedvaten in de eilandjes zijn omringd door gefenestreerde endotheelcellen (ECs), wat een indicatie is voor een hogere partiële zuurstofdruk. Een verhoogde bloedtoevoer is dus niet alleen noodzakelijk voor de overleving van de EvL maar ook voor het normaal functioneren ervan.[31]

Tijdens het isolatieproces van de EvL, voor de transplantatie, verliezen de ECs in de eilandjes hun externe vasculaire steun. Deze situatie draagt bij aan dedifferentiatie, apoptose en necrose van de ECs.[32] Echter niet alleen het externe vasculaire netwerk wordt vernietigd, ook het interne netwerk wordt aangedaan. In tegenstelling tot een complete orgaantransplantatie, waar het orgaan snel weer verbonden kan worden met zijn arteriële en veneuze bloedvaten, duurt het bij getransplanteerde eilandjes meerdere dagen voordat er een bloedstroom naar toe loopt, wat angiogenese en revascularisatie impliceert. In de eerste fase na de transplantatie zal de zuurstof

en nutriënten aanvoer daarom volledig afhankelijk zijn van passieve diffusie. De maximale diffusie afstand is klein waardoor zelfs in een kweek situatie eilandjes met een grote diameter aan de binnenkant necrotisch zijn.[33] Het grootste probleem hierbij is de diffusie van zuurstof omdat de oplosbaarheid hiervan relatief klein is ten opzichte van glucose (0,2mM tegen 5-10mM) en de EvL relatief gezien heel veel verbruiken.[34]

Angiogenese en revascularisatie brengen zeer complexe processen met zich mee die 2 tot 4 dagen na de EvL transplantatie starten en over het algemeen voltooid zijn na 10 tot 14 dagen.[35] Dit complexe proces impliceert de degradatie van het basale membraan en de onderliggende matrix rondom een bloedvat waarna vervolgens migratie, proliferatie en differentiatie van de EC's optreedt om een functioneel vat te creëren. Dit proces vereist stabilisatie door de aangrenzende pericyten en reformatie van het basale membraan. Matrix metalloproteinasen

(MMPs) speelt een belangrijke rol bij de degradatie van de ECM tijdens de eerste fase van de angiogenese. Uit onderzoek in 2005 is gebleken dat endotheelcellen, waaruit de nieuw gevormde bloedvaten bestaan, voortkomen uit drie verschillende bronnen; de endotheelcellen van de ontvanger, de endotheelcellen in de EvL (deze zijn grote aantallen aanwezig in de geïsoleerde eilandjes) en de endotheelcellen uit het beenmerg.[36, 37] De factoren die geproduceerd worden door de getransplanteerde eilandjes, onder andere VEGF-A en angiopoietin-1, stimuleren en rekruteren deze endotheelcellen. Zowel donor als ontvanger ECs zijn betrokken bij de revascularisatie van de getransplanteerde eilandjes. Uit onderzoek is echter gebleken dat de vasculaire dichtheid en de zuurstofdruk standaard lager liggen in gerevasculariseerde, getransplanteerde eilandjes dan in de normale situatie.[38, 39]

Het verlies van een significant aantal eilandjes in de dagen na de transplantatie en de functie op lange termijn resulteert uit een aantal factoren, maar ischemie en een inadequate bloedtoevoer spelen zeer waarschijnlijk een belangrijke rol hierbij. Verbeteringen op het gebied van revascularisatie zal de overleving van de eilandjes en de functie hiervan doen verbeteren.[40]

Mesenchymale stamcellen en angiogenese

Zoals Brissova en Powers [41] al voorstelde, bij revascularisatie van de getransplanteerde EvL spelen de ECs in de eilandjes en regelgevende factoren, zoals VEGF-A een grote rol. VEGF-A is van belang om EC's van de ontvanger te rekruteren en zo een bijdrage te leveren aan de vorming van een nieuw capillair netwerk.[41] Een mogelijk mechanisme, wat een verbetering van de revascularisatie van de eilandjes impliceert, zijn de mesenchymale stamcellen (MSCs). Uit onderzoek [42] is gebleken dat de MSCs revascularisatie van de getransplanteerde eilandjes stimuleren, wat vervolgens resulteert in een verlaagde celdood van de EvL. MSCs, verworven uit het beenmerg stroma, beslaan 0.001% tot 0.01% van de cellen met een kern binnen het beenmerg en kunnen differentiëren in verschillende celtypen onder andere; osteoblasten, adipocyten,

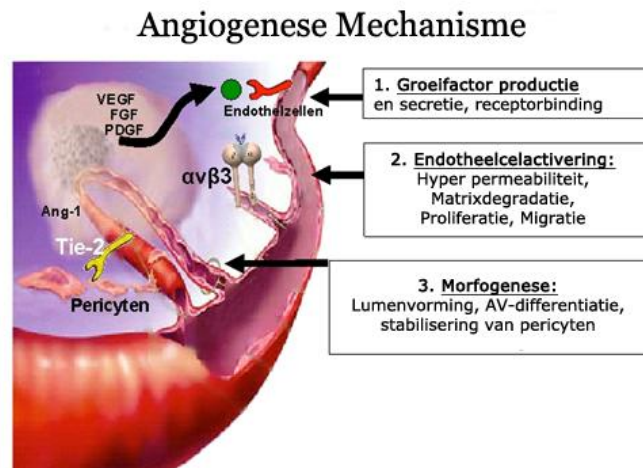


Fig. 4: Het mechanisme van de angiogenese

cardiomyocyten en endotheelcellen. Vooral de differentiatie van de MSCs naar endotheelcellen is van belang voor de revascularisatie. Daarnaast is gerapporteerd dat MSCs ook kunnen differentiëren tot een insuline producerende cel[43], maar andere groepen hebben weinig tot geen differentiatie waargenomen.[44-45]

Schade en hypoxie, van de eilandjes en het omliggende weefsel, leiden tot het afgeven van specifieke signalen die de mesenchymale voorlopercellen uit het beenmerg aanzetten te migreren en te assisteren in de wondheling en/of de angiogenese. MSCs uit het beenmerg, vooral die immunogeselecteerd zijn voor STRO-1 en het vasculaire-cel adhesie molecuul 1 (VCAM1/CD106), produceren VEGF-A en zijn effectief in het ondersteunen van de neovascularisatie in vivo.[46] Brissova et al. demonstreerde dat VEGF-A essentieel is voor de vascularisatie, revascularisatie en de functie van de EvL na de transplantatie. Verder is gebleken dat de MSCs de angiogene factor VEGF-A tijdens de gehele posttransplantatie periode uitscheiden. Dit in tegenstelling tot de EvL, waarbij de productie ervan minimaal is en afneemt in de tijd. Het resultaat van de co-transplantatie, EvL in combinatie met de MSCs, is een continue angiogenese. Deze verhoogde vascularisatie is sterk gecorreleerd met een verbeterde eilandjes functie.[41]

MSCen krijgen net als de EvL te maken met een hypoxische omgeving bij transplantatie. Uit verschillende in vitro onderzoeken blijkt dat MSCs kunnen overleven bij lage zuurstof concentraties [47, 48]. Over de proliferatie en differentiatie van de MSCs onder hypoxische omstandigheden bestaan verschillende onderzoeksresultaten. Bij het ene onderzoek verminderd [47] de proliferatie bij een lage zuurstof concentratie, terwijl bij een ander onderzoek juist een hogere proliferatie plaatsvindt.[48] Hypoxische omstandigheden hebben dus een effect op de differentiatie en proliferatie maar wat dit effect precies is en hoe het beïnvloed kan worden is nog niet duidelijk.

Johansson et al. [49] construeerde in 2005 samengestelde EC-eilandjes om zo de revascularisatie te bevorderen. MSCs werden later toegevoegd omdat gedacht werd dat EC migratie en de expressie van de EC groeifactor op deze manier bevorderd zou worden. De toevoeging van MSCs aan de EC-eilandjes resulteert in een verhoging van de EC proliferatie en bloedvatvorming, niet alleen in het omliggende weefsel maar ook in de EvL. Daarnaast wordt een aanzienlijk hogere capillaire dichtheid gevonden in de eilandjes, wat wederom in verband staat met een verhoogde eilandjes overleving. De reeds genoemde capillairvorming is mede te danken aan de degradatie van de fibrine matrix door proteases, welke geproduceerd worden door de MSCs. Doordat MSCs migratie van de ECs mogelijk maakt in een matrix met een hoge dichtheid, is het mogelijk voor de ECs te migreren naar de EvL. Daarnaast dragen de MSCs zeer waarschijnlijk bij aan de ECM productie, wat een bijdrage levert aan de stabilisatie en maturatie van de EC capillairen.[50]

MSCs differentiatie, zoals eerder al kort genoemd werd, is een belangrijke eigenschap van de MSCs. Deze differentiatie wordt beïnvloed door cel-matrix interacties.[51] MSCs brengen proteases, zoals plasmine en matrix metalloproteinases (MMPs) 2, 3, 9, 10, 11, 13 en 14 tot expressie en kunnen deze ook in hun eigen omgeving uitscheiden. Protease degradatie verandert de biologische activiteit van allerlei matrix moleculen. Deze veranderingen leiden tot het loslaten van bioactieve fragmenten en het vrijkomen van, aan matrix-gebonden en gereguleerde

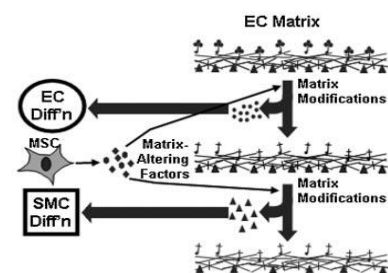


Fig. 5: Voorgesteld mechanisme van de MSC/EC-matrix interacties. [52]

groeifactoren. Onderzoek suggereert dat er in eerste instantie bepaalde factoren aanwezig zijn, na de proteolytische degradatie van de ECM, die nodig zijn voor de EC differentiatie. Zodra deze factoren op zijn daalt de EC differentiatie. Een conclusie die hieruit getrokken kan worden is het feit dat ECM interacties geen fysieke contact nodig hebben, interacties met oplosbare factoren zijn genoeg. Een zekere afstand tussen MSCs en het ECM is mogelijk, zonder dat de interacties verstoord raken.[52] Het zou van belang kunnen zijn om verder te onderzoeken of de MSCs direct van invloed zijn of dat het effect puur en alleen van de angiogene factoren geproduceerd door de MSCs komt. Dit staat namelijk in verband met de ideale plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL. Wanneer het effect van de MSCs voornamelijk komt door de factoren die zij produceren, is een direct contact niet noodzakelijk. Onderzoek naar de mechanismen achter de effecten hierboven beschreven, zou van toegevoegde waarde kunnen zijn.

Samenvattend, Co-transplantatie van EvL en MSCs heeft een positief effect op de overleving van de EvL. Dit komt doordat de MSCs revascularisatie stimuleren door, het uitscheiden van VEGF-A, het stimuleren van de EC migratie, het afbreken van ECM door proteases en doordat MSCs in staat zijn te differentiëren tot vasculaire ECs.

Endotheelcellen en angiogenese

Endotheel voorlopercellen (EPCs), een heterogene groep van endotheel voorlopercellen die hun oorsprong hebben in het hematopoetische deel van het beenmerg, zijn in staat multipotent te differentiëren en spelen een belangrijke rol in de angiogenese. Getransplanteerde EPCs induceren 'hypoxia inducible factor-1' onder hypoxische omstandigheden, wat leidt tot up-regulatie van angiogene factoren, zoals VEGF en stimuleren vascularisatie. Daarbij komt dat EPCs voorkomen dat ischemische weefsel apoptose ondergaat.

EPCs zelf dragen bij aan de angiogenese door middel van migratie, naar het gebied met een tekort aan zuurstof, en differentiatie naar endotheelcellen. Om deze redenen zullen EPCs waarschijnlijk een voordelig effect hebben, op het minimaliseren van de vroegtijdige celdood, na de EvL transplantatie en zullen ze de vascularisatie verbeteren.

Wanneer de bloedvaten gevormd zijn produceren de ECs platelet-derived growth factor (PDGF) wat steuncellen aantrekt. MSCs bezitten PDGF receptoren en zullen mogelijk reageren op de PDGF productie door de ECs, wat zal leiden tot verbeterde cel interacties. MSCs kunnen vervolgens differentiëren naar zogenaamde pericyten, wat bijdraagt aan de stabilisatie van de nieuw gevormde vaten.[53]

Immuunreactie

Bij de huidige EvL transplantatie worden de eilandjes ingespoten in de vena portae. Waarna de eilandjes zich nestelen in de bloedbaan van de lever. Doordat de EvL direct in contact komen met het bloed zal er onmiddellijk een afstotingsreactie plaatsvinden, de zogenaamde instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR). Deze immuunreactie is een van de belangrijkste, zo niet de belangrijkste, factor voor het verlies aan eilandjes na de transplantatie. Uit klinische onderzoek blijkt dat ongeveer 60-90% van het totale aantal eilandjes binnen een paar dagen na transplantatie afsterft, waardoor er slechts een klein deel van de eilandjes overblijft die een jaar na transplantatie in staat zijn normaal te functioneren.[18] Kortom, de IBMIR is op dit moment, met het gebruik van deze huidige techniek, een groot probleem.

Instant blood-mediated inflammatory reaction

In de eerste 15 minuten na de transplantatie is de IBMIR het sterkst. Wanneer de oppervlaktemoleculen van de eilandjes blootgesteld worden aan de bloedcomponenten van de host, zal de IBMIR geactiveerd worden. Deze ontstekingsreactie draagt voor een groot deel bij aan de slechte initiële aanhechting van de EvL in de vena portae.[2] De IBMIR is een bloedstollingreactie die de ontwrichting van de morfologie van de EvL veroorzaakt. Tissue factoren (TF), chemokines en andere ontstekingsmediatoren worden afgegeven tijdens deze eerste fase. Daarnaast speelt de expressie van het monocyte chemoattractant proteïne (MCP)-1 op de getransplanteerde EvL een rol, wanneer deze in contact komen met het bloed. Al deze factoren samen zijn van belang bij het tot stand komen van deze reactie.[19] De belangrijkste rol blijkt echter weggelegd voor de TF, wat geproduceerd wordt in de β -cellen. Men denkt dat β -cellen in hun oorspronkelijke omgeving, de pancreas, geen TF uitscheiden. De oorzaak voor het wel uitscheiden van TF na de transplantatie, zou mogelijk het voorafgaande isolatieproces kunnen zijn.[20]

Normaal gesproken bestaat er een evenwicht tussen coagulatie, het bloedstollingsproces, en fibrinolyse, het proces waarbij een bloedstolsel langzaam wordt afgebroken. Door de activatie van de coagulatie tijdens de IBMIR wordt dit evenwicht ernstig verstoord. Als TF vrijkomt in het bloed, wordt bij het transplantaat een bloedstollingcascade op gang gebracht. De eiwitten van de eindfase van de bloedstollingcascade, FXa en Fva, zorgen samen met trombine voor de vormverandering van de bloedplaatjes. Door een combinatie van vervormde bloedplaatjes en fibrine, ontstaat vervolgens klontvorming, om een bloeding te stoppen of om het onbekende of geïnfecteerde weefsel in te pakken en af te breken. Deze klontvorming vormt een kapsel rondom de eilandjes, met daarin een infiltraat van leukocyten. De diffusie wordt door het gevormde kapsel sterk beperkt, wat uiteindelijk kan leiden tot celdood van de eilandjes.[21] Daarnaast zullen geactiveerde bloedplaatjes de inhoud van hun granulen uitscheiden. Hiermee trekken ze verscheidene neutrofiële granulocyten en macrofagen aan die vervolgens zullen infiltreren in de eilandjes.[20]

Wanneer de EvL buiten de bloedbaan getransplanteerd zouden worden zal er hoogst waarschijnlijk geen IBMIR plaatsvinden, omdat de eilandjes op deze manier niet in direct contact komen met het bloed. Dit neemt niet weg dat de eilandjes alsnog aangevallen zullen worden door de aangeboren en adaptieve immuunreactie, waardoor alsnog EvL zullen afsterven. Om deze immuunreacties te kunnen bestrijden is het van belang om het verloop van deze reacties duidelijk in kaart te brengen.

Aangeboren immuunreactie

Wanneer EvL in het lichaam worden getransplanteerd, ziet het lichaam deze eilandjes als vreemd materiaal. De aangeboren immuunreactie zal meteen na transplantatie optreden. De cellen die hierbij een rol spelen zijn de dendritische cellen (DCs), macrofagen en natural killer (NK) cellen. De mediators die door deze cellen geproduceerd worden veroorzaken de disfunctie en apoptose van de β -cellen. De belangrijkste mediators zijn inflammatoire cytokines, zoals interleukine- 1β (IL- 1β), interferon- γ (INF- γ) en tumor necrose factor- α (TNF- α).

- Dendritische cellen (DCs) produceren o.a. de ontstekingsmediator TNF- α , wat een rol speelt bij het apoptose proces van de β -cellen. Daarnaast produceren DCs antigenen en presenteren die aan de naïeve T cellen (CD4+ en CD8+), waardoor deze naïeve T cellen actief worden en zullen gaan prolifereren tot CD4+ T-helpercellen en CD8+ cytotoxische T-cellen.
- Macrofagen zijn antigeen presenterende cellen (APCs). Ze presenteren de antigenen aan de naïeve CD4+ T-helper cellen. Daarnaast stimuleren macrofagen samen met de DCs de adaptieve immuunreactie. Zowel macrofagen als neutrofiële granulocyten produceren interleukine- 1β (IL- 1β) als ze in contact komen met lichaamsvreemd materiaal. Deze mediator speelt een belangrijke rol in de apoptose en disfunctie van de β -cellen, door middel van up-regulatie van de stikstofmonoxide (NO) en cyclooxygenase-2 synthese. De glucose respons van de β -cellen wordt op deze manier verlaagd wat leidt tot een verminderde insuline productie van de β -cellen.[54-56] Daarnaast kan de verhoogde NO concentratie breuken veroorzaken in het DNA van de β -cellen wat vervolgens kan leiden tot de apoptose van de β -cellen.[57]
- Natural killer cellen produceren de ontstekingsmediators INF- γ en TNF- α . INF- γ is belangrijk bij de stimulatie van de lysosoom activiteit van de macrofagen en stimuleert tevens de iNOS synthese (de productie van de NO), wat wederom bijdraagt aan de apoptose van de β -cellen. De NK cellen leveren een cytotoxische reactie op alle cellen die geen major histocompatibiliteits complex (MHC) klasse I hebben. Granulen van de NK cellen bevatten perforine en granzymen, deze enzymen komen vrij en leiden tot apoptose van de EvL zonder MHC klasse I.

Adaptieve immuunreactie

Naast het aangeboren immuunsysteem is ook het adaptieve immuunsysteem van belang. Deze twee immuunreacties zijn zeer nauw met elkaar verbonden en het EvL transplantaat zal dan ook van beide reacties invloed ondervinden. Het adaptieve immuunsysteem is een combinatie van de T-cel en B-cel activiteit die gericht is tegen de donor MHC klasse II eiwitten. Wanneer de antigenen, gepresenteerd op de APCs, in contact komen met de T-cellen wordt deze immuunreactie gestart. De belangrijkste APCs, zoals hierboven al genoemd, zijn de DCs, macrofagen en de B-cellen.[58]

De cytotoxische (CD8+) T-cellen worden direct en indirect gestimuleerd. Directe stimulatie komt door de eiwitten van de β -cellen en de indirecte stimulatie door antigenen die worden gepresenteerd op de APCs. APCs nemen de eiwitten van de β -cellen op en breken deze af, vervolgens worden deze eiwitstukken gepresenteerd aan de (CD4+) T-helper cellen. Waarna de T-helper cellen op hun beurt de antilichaam producerende B-cellen en de cytotoxische (CD8+) T-cellen stimuleren.[59]

De Cytotoxische T-cellen kunnen op twee manieren schade aan de EvL toebrengen. Ten eerste produceren zij cytotoxines, zoals perforine, granzymen en granulysine. Perforine breekt het celmembraan van de β -cellen af, waardoor er een opening ontstaat voor de granzymen om binnen te dringen tot in het celplasma. Wanneer granzymen eenmaal binnengedrongen zijn veroorzaken zij een apoptotische cel fase van de β -cellen. De tweede manier berust op cel-cel interacties tussen de cytotoxische T-cellen en de β -cellen. Cytotoxische T-cellen produceren het membraan eiwit FAS ligand, wat kan binden aan de FAS moleculen van het β -cel membraan. Deze FAS-FAS interacties impliceren het death-induced silencing complex (DISC), wat wederom leidt tot apoptose van de β -cellen.[60-63]

Mesenchymale stamcellen en de immuunreactie

Uit onderzoek is gebleken dat MSCs een immunomodulatoire functie bezitten en zo een belangrijke rol spelen in de onderdrukking van de immuunreactie.[64] Vergeleken met stamcellen uit de lever, milt en pancreas zijn de MSCs superieur in het bestrijden van de allo-immuunreactie na de transplantatie. Op het celmembraan van de MSCs zijn tot op heden nog geen specifieke markers gedefinieerd, die een rol zouden kunnen spelen bij deze functie. Wel is gevonden dat MSCs naast HLA-I moleculen geen HLA-II moleculen presenteren op het celoppervlak. HLA is bij ieder mens anders (behalve bij eeneïgige tweelingen). Op allelen coderen verschillende delen DNA voor verschillende HLA-eiwitten. Als een donororgaan in een ontvanger terecht komt, is de kans groot dat cellen van het orgaan dat wordt getransplanteerd niet dezelfde HLA-eiwitten heeft als de cellen van de ontvanger. De eiwitten worden door de T-cellen opgemerkt als lichaamsvreemd (antigeen), waardoor het lichaam het orgaan afstoot. Omdat de MSCs deze HLA-II moleculen niet bezit, zullen allogene en autologe immuunreacties waarschijnlijk uitblijven.

MSCs hebben een modulatoire functie op de aangeboren immuunreactie door de DCs, macrofagen en NK cellen te beïnvloeden. DCs produceren, zoals hierboven al genoemd, antigenen en migreren vervolgens naar de naïeve T-cellen, waaraan ze deze antigenen presenteren. Tijdens deze migratie vindt maturatie van de DCs plaats, waardoor de DCs instaat zijn om meer antigenen te presenteren en te binden met de T-cellen. MSCs blokkeren deze maturatie door de down-regulatie van cycline D2, een regulator eiwit wat de celcyclus controleert. Op deze manier blijven de DCs in de G1 fase van de celcyclus, waardoor ze de T-cellen minder goed kunnen activeren.[65] Daarnaast remmen de MSCs ook nog de antigeen presenterende functie van de DCs, wanneer ze in contact komen. De concentratie van de celmembraan moleculen daalt, waardoor ook de antigeen presentatie. Tenslotte belemmeren de MSCs de productie van de ontstekingsmediator TNF- α die door de DCs geproduceerd wordt.[66] Kortom, de MSCs belemmeren de maturatie, pre-antigeen presentatie en de TNF- α productie van de DCs.

De activatie van de NK cellen is afhankelijk van zijn celmembraanreceptoren. Door deze celmembraanreceptoren zijn de NK cellen in staat targetcellen te herkennen en tot apoptose te dwingen. De receptoren NKp30, NKG2D, DNAM-1 en LFA1 bevinden zich op het celmembraan van de NK cellen. Deze receptoren zijn in staat te binden aan de liganden op het celmembraan van de MSCs. Door middel van deze interactie kunnen de NK cellen celdood induceren van de MSCs.[67] NK cellen hebben niet alleen een negatief effect op de MSCs, MSCs hebben ook een negatief effect op de NK cellen. MSCs zijn namelijk verantwoordelijk voor de down-regulatie van de hoeveelheid NKp30 en NKG2D receptoren op het celmembraan van de NK cellen. Hierdoor belemmeren ze de proliferatie en cytokine productie van TNF- α . [68]

Naast de modulatorische functie op de aangeboren immuunreactie hebben de MSCs ook een effect op de adaptieve immuunreactie door de proliferatie van zowel T- als B-cellen te belemmeren. Wanneer T-cellen in direct contact komen met de MSCs worden deze cellen in een STOP-fase, de G0/G1 fase van de celcyclus, gebracht. Hetzelfde gebeurt bij DCs, na contact met MSCs.[65] Verder down-reguleren de MSCs de FAS liganden en receptoren, waarmee de apoptose van de cellen verminderd wordt door de FAS-FAS interactie activiteit van de T-cellen.[69]

IFN- γ , geproduceerd door de NK cellen, stimuleert de MSCs tot de productie van indolamine 2,3 dioxygenase (IDO), wat zorgt voor de catalyse van tryptofaan tot kynuremin. Tryptofaan is een aminozuur dat bijdraagt aan de T-cel proliferatie. Wanneer tryptofaan in verminderde mate aanwezig is, zal de proliferatie van T-cellen belemmert worden.[25] De ontstekingsmediatoren TNF- α , IL-1 α en IL-1 β leiden bij interactie met de MSCs tot een verhoogde iNOS synthese. Een hoge iNOS expressie leidt tot hoge lokale NO-waarden, wat voor remming van T-cel proliferatie zorgt. [44] T-cel proliferatie wordt bovendien belemmerd door het antigeen HLA klasse I molecuul, HLA-G5, wat geproduceerd wordt door de MSCs. Deze productie stimuleert tevens de regulatorische T-cel productie. Regulatorische T-cellen kunnen de T-cel proliferatie belemmeren bij een allogenetisch transplantaat.[70]

De hierboven genoemde vermindering van de T-cel proliferatie beïnvloedt indirect ook de proliferatie van de B-cellen. Want T-cellen die zich in de G0/G1 fase van de celcyclus bevinden zijn van invloed op de B-cel proliferatie en de antilichaam productie, waardoor er minder antilichamen zoals IgM, IgG en IgA worden geproduceerd.[71]

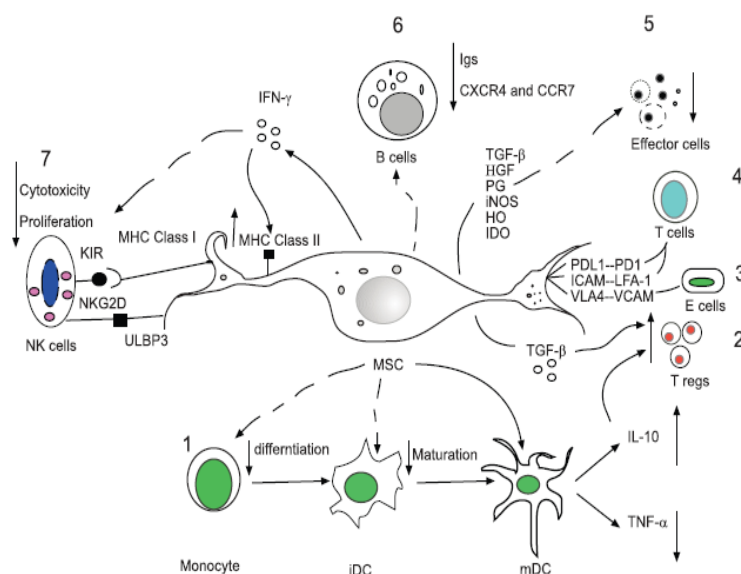


Fig. 6: (1) MSCs belemmeren de proliferatie en de maturatie van DCs. (2) De productie van de ontstekings cytokines TNF- α van de DC wordt verminderd, en de productie van regulator cytokine IL-10 wordt gestimuleerd door MSCs. IL-10 zorgt voor het verhogen van het percentage van regulatorische T-cellen. (3,4) MSCs moduleren de T-cel proliferatie via cel-cel contact.(5) De T-cel suppressie bij MSC kunt via iNOS synthese en de aanwezigheid van IDO. (6) MSCs kunnen de antilichaam productie van B-cellen verminderen. (7) MSCs belemmeren de cytotoxiciteit van de NK cellen.

Samenvattend, de MSCs hebben een immunomodulatorische functie op zowel de aangeboren als de adaptieve immuunreactie. Door de activiteit van de DCs, macrofagen en NK cellen te verlagen spelen de MSCs een belangrijke rol in de onderdrukking van de aangeboren immuunreactie. De adaptieve immuunreactie wordt door vermindering van de T-cel en B-cel proliferatie door de MSCs onderdrukt.

Reductie van het aantal eilandjes van Langerhans

Naast de angiogenese die nog op gang moet komen en de immunoreacties die de EvL het leven zuur maken, is er nog een beperkende factor voor de transplantatie van de EvL, namelijk de infusie van een adequate massa van geprepareerde eilandjes. Op dit moment zijn er 2 tot 4 pancreassen nodig om een genoeg aantal eilandjes (10.000 eilandjes/kg lichaamsgewicht) te verwerven voor transplantatie, met als uiteindelijke doel het bereiken van insuline afhankelijkheid in een persoon. Naast de overduidelijke problemen, zoals de kosten-effectiviteit, ontstaan er ook ethische problemen aangezien deze organen worden verkregen uit het reeds beperkte aantal weefsel wat geschikt is voor een totale pancreas transplantatie. Dit maakt het op grote schaal uitvoeren van deze procedure lastig aangezien er een tekort aan donoren is. Nieuwe ontwikkelingen, waarbij minder EvL getransplanteerd hoeven te worden om normale bloedglucose waarden te verkrijgen, zijn daarom van groot belang.[72]

Met deze achterliggende gedachten is er recent veel onderzoek gedaan naar de co-transplantatie van EvL en de uit het beenmerg verkregen MSCs. In het onderzoek van Solari. M.G. et al. is gekeken naar de invloed van de MSCs op de overleving van de EvL, wanneer zij samen ingespoten werden in het omentum van diabetisch geïnduceerde ratten. In dit onderzoek werd onderscheid gemaakt tussen syngene eilandjes en allogene eilandjes, en tussen syngene MSCs en allogene MSCs. Zoals hieronder in tabel.1 te zien is, lijkt het erop dat de combinatie van allogene EvL samen met autologe MSCs in het bijzijn van een kort durende immunosuppressie, het beste resultaat levert wat betreft de overlevingskansen van de EvL. Deze verhoogde overlevingskans van de eilandjes, door de toevoeging van autologe MSCs, wordt toegeschreven aan de immunomodulatoire functie van deze cellen. Dit onderzoek suggereert dat in de toekomst mogelijk minder EvL getransplanteerd kunnen worden om toch dezelfde resultaten te behalen.[73]

Group	Graft survival (days)	Mean ± sd
A. Syn islets (1200)	69, >80, >80, >80	>77.3 ± 5.5*
B. Syn islets (600)	2, 2, 2, 2, 12, 15, 15, >21	>8.88 ± 7.8
C. Syn islets (600) + SynMSC	7, >21 ×9	>19.6 ± 4.4**
D. Allo islets (600-800) + CsA	2, 2, 5, 8, 8, 8, 12, 12	7.13 ± 3.9
E. Allo islets (600-800) + SynMSC + CsA	5, 8, 15, 21, 21, 35, >103 ×4	>51.7 ± 45†,††
F. Allo islets (600-800) + AlloMSC + CsA	5, 12, 12, 15, 15	11.8 ± 4.1#
G. Allo islets (600-800) + CsA + ALS	2, 2, 2, 8, 15	5.8 ± 5.7
H. Allo islets (600-800) + SynMSC + CsA + ALS	5, 5, 12, 15, 19, 21, 25, >60, >78 ×2	>31.8 ± 29##

Tabel 1: EvL transplantatie met of zonder MSCs (autoloog/allogeen), CsA = een kortdurende immunosuppressie

Een verrassende uitkomst, wat in dit onderzoek naar voren komt, is het geringe effect van de allogene MSCs op de lange termijn overleving van de EvL. Uit meerdere onderzoeken is namelijk gebleken dat MSCs niet-immunogeen zijn.[74-76] Hoewel in 2006 een onderzoek aangetoond heeft dat de allogene MSCs wel immunogeen zijn en de afstoting van het transplantaat bevorderen.[77] In overeenkomst met de laatstgenoemde studie, wordt in dit onderzoek wederom gesuggereerd dat mogelijk de allogene MSCs immunogeen zijn en hun immunomodulatoire functies beïnvloed worden door het immuunsysteem van de host.[73]

M. Figliuzzi et al. hebben eveneens onderzoek verricht naar de rol van MSCs in combinatie met EvL. In dit onderzoek worden alleen 2000 EvL of 2000 EvL in combinatie met MSCs (1×10^6) onder het nierkapsel getransplanteerd bij diabetisch geïnduceerde ratten. De 2000 eilandjes alleen bereiken nooit normoglycemie, terwijl 2000 eilandjes in combinatie met MSCs een geleidelijke daling in glycemie laten zien, met normoglycemie tot aan de nephrectomie.[72]

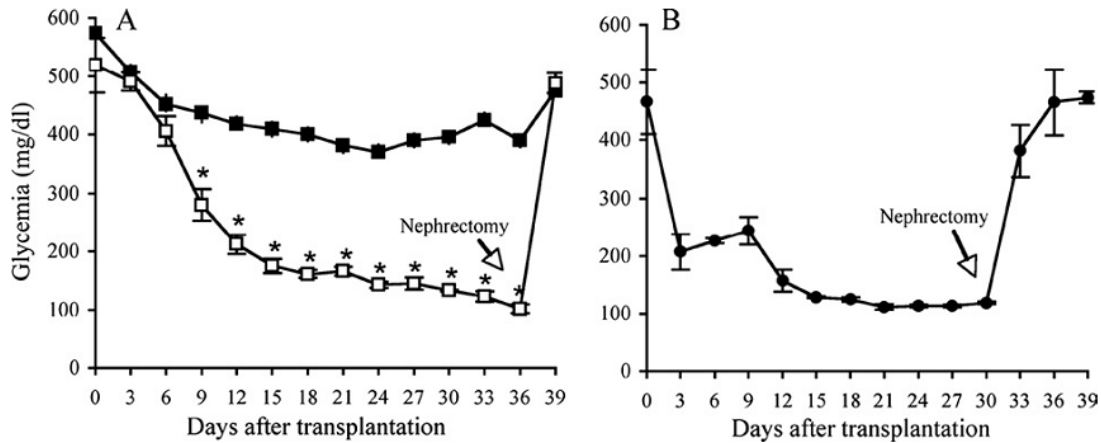


Fig. 7: Bloedglucose waarden na transplantatie van 2000 (A) eilandjes van Langerhans met (witte vierkantjes) en zonder (zwarte vierkantjes) MSCs, of 3000 (B) eilandjes van Langerhans.

Co-transplantatie van 2000 EvL in combinatie met MSCs levert resultaten op die vergelijkbaar zijn met de transplantatie van alleen 3000 EvL. (fig.7) Dit zou betekenen dat MSCs het mogelijk maken om tot 30% minder EvL te transplanteren. In tegenstelling tot het voorgaande onderzoek, wordt er hier van uitgegaan dat de goede resultaten te danken zijn aan de verbeterde vascularisatie in plaats van de verbeterde bescherming tegen de immunoreacties.[72] Zoals eerder al vermeld zijn de MSCs op beide van invloed en is dus kennelijk moeilijk aan te tonen welke eigenschap van de MSCs het zwaarst weegt. Het zal een complexe combinatie zijn van allerlei factoren die hierin een rol spelen.

Desalniettemin, bovenstaande resultaten laten zien dat co-transplantatie van MSCs met EvL goede resultaten leveren en dit een aantrekkelijke strategie zou kunnen zijn om de behandeling van Diabetes type I te verbeteren. Bovendien hebben MSCs in klinische testen goede resultaten laten zien zonder duidelijke toxiciteit voor de patiënten.[78]

Kortom, vergeleken met de huidige procedure, biedt co-transplantatie van MSCs met EvL drie belangrijke voordelen:

- MSCs vergroten de overlevingskans van de EvL, door zowel hun immunomodulatoire als angiogene stimulerende functie.
- MSCs maken het mogelijk om met minder EvL toch normoglycemie te bereiken, wat zou betekenen dat er minder donoren gebruikt hoeven te worden.
- Wanneer er minder donoren nodig zijn zullen er minder donor HLA-typen getransplanteerd worden. Dit leidt hoogstwaarschijnlijk tot een mildere immunreactie.

Veiligheid

Naast alle positieve eigenschappen van de MSCs is het belangrijk niet voorbij te gaan aan de risico's van het gebruik hiervan. Het is van belang dat de veiligheid en de risico's van deze cellen goed in kaart gebracht worden. Een evenwichtssituatie zal gecreëerd moeten worden met aan de ene kant een efficiënte manier om de EvL te transplanteren en aan de andere kant is het belangrijk dat deze behandeling op een langere termijn goed werkt en veilig kan worden aangeboden aan de patiënt. Het is dus belangrijk dat van de MSCs, die mogelijk samen met de EvL worden getransplanteerd, aangenomen mag worden dat deze in de praktijk veilig genoeg zullen zijn.

Globale problemen en gevaren van de MSCs

De problemen die mogelijk op kunnen treden bij het transplanteren van de MSCs kunnen onderverdeeld worden in 3 hoofdproblemen, namelijk:

- 1 Immuunsuppressie: Dit kan leiden tot de vorming van maligne tumoren.
- 2 Differentiatie: MSCs kunnen differentiëren tot maligne tumorcellen. Daarnaast kunnen MSCs differentiëren tot tumorstroma, bij aanwezigheid van een al bestaande latente tumor. Dit kan de tumorgroei stimuleren/versnellen.
- 3 Incapsulaties: Bij het toedienen van grote hoeveelheden MSCs in een klein gebied, kunnen opstapelingen van cellen ontstaan. Deze kunnen vervolgens gaan differentiëren en een eigen micro-omgeving vormen. Zo kunnen bot-nodules en andere ongewenste structuren ontstaan.[79]

Problemen en gevaren van de MSCs bij immuunsuppressie

MSCs zorgen, zoals eerder al vermeld, voor een verminderde respons van zowel het aangeboren als het adaptieve immuunsysteem, wat naar alle waarschijnlijkheid leidt tot een verminderde afstotingsreactie tegen het transplantaat. Deze verminderde immuunreactie kan er echter ook toe leiden dat tumor proliferatie niet wordt tegengehouden, waardoor tumoren kunnen ontstaan. Uit meerdere onderzoeken op diabetisch geïnduceerde ratten is namelijk gebleken dat MSCs tumoren kunnen opwekken, door middel van deze immuunsuppressie.[80, 81]

Het blad Blood publiceerde in 2003 een interessant onderzoek waarbij muizen co-geïnjecteerd werden met MSCs en B12 melanoma tumorcellen. Deze groep ontwikkelde vervolgens tumoren terwijl muizen die alleen MSCs of alleen B12 melanoma tumorcellen kregen toegediend, deze tumoren niet ontwikkelden.[81] Deze resultaten suggereren een mogelijke link tussen MSCs en tumorgroei. De oorzaak van de tumorvorming bleek te danken aan de remming van de CD8+ T-cel proliferatie.[82] Deze remming werd veroorzaakt door de toename van de CD8+ regulatoire T-cellen, wat wordt gestimuleerd door de MSCs. Hiernaast stimuleren de MSCs de proliferatie van de tumorspecifieke CD4+ en CD25+ regulatoire T-cellen.[83, 84] Deze cellen verzwakken de activatie van de T-cellen, waardoor de antitumor-specifieke immuunrespons wordt verzwakt.[85]

Problemen en gevaren van de MSCs bij differentiatie

Behalve de immunomoduloire functie van de MSCs kan ook de differentiatie van deze cellen leiden tot tumorgenese. Dit kan plaatsvinden op twee manieren:

1. De MSCs kunnen direct differentiëren tot tumorcellen.[79]
2. De MSCs kunnen differentiëren tot tumorstroma in aanwezigheid van een ongedetecteerde tumor, waardoor deze nog sneller gaat groeien.[86]

Directe differentiatie tot een tumorcel:

Het in vitro kweken van MSCs is een efficiënte manier om deze cellen snel te laten vermenigvuldigen. MSCs en andere voorlopercellen uit het beenmerg zijn gelimiteerd tot ongeveer 40 tot 50 passages, voordat ze in een stadium van "senescence" treden, oftewel ze zijn volledig uitgerijpt en kunnen niet meer verder delen.[79] Deze "senescence" kan voorkomen worden door bepaalde transgenen toe te voegen, de zogenaamde "immortalizing genes". Voorbeelden van deze transgenen zijn:

"proto-oncogene vmyc" of "human telomerase reverse transcriptase (hTERT)". Zoals de naam al aangeeft worden de MSCs onsterfelijk na toevoeging van deze transgenen en kunnen ze onbeperkt mitotische activiteit leveren.[87] Hoewel er nog enige onzekerheid bestaat of deze "onsterfelijke" humane MSCs kunnen differentiëren tot tumorcellen [87], zijn er enkele studies die karyotype-afwijkingen en het verlies van normale cellcyclus controles, na een veelvoud van celdelingen aantoonde.[88, 89] Daarnaast is aangetoond dat bij langere termijn kweeking [79], rond de 4-5 maanden [87], "onsterfelijke" MSCs genetisch veel instabieler zijn dan 'senescence' MSC. Verder is een onderzoek gedaan bij vetafkomstige MSCs bij kinderen, die na langdurig kweken, spontane abnormaliteiten aantoonde.[90] Ook dierlijke experimenten met murine MSCs hebben aangetoond dat bij langere termijn kweekingen chromosomale afwijkingen en maligne transformaties van het fenotype ontstonden.[91] Deze murine MSCs groeiden daadwerkelijk uit tot bottumoren (osteosarcomas) in het longweefsel.[92]

Uit deze onderzoeken met zowel dierlijke als humane MSCs is een duidelijk risico op het ontstaan van tumorcellen bij het implanteren van de zogenaamde "onsterfelijke" MSCs, aantoonbaar. Over de maximale hoeveelheid proliferatiegeneraties (ook wel "passages" genoemd), voordat een MSC cel genetisch onstabiel wordt, is veel discussie. Sommige onderzoeken tonen aan dat 40 tot 50 passages haalbaar zijn. Andere experimenten daarentegen tonen al bij 9 tot 15 passages [90,94], of zelfs 5 tot 6 passages [91-93] afwijkingen in het karyotype.

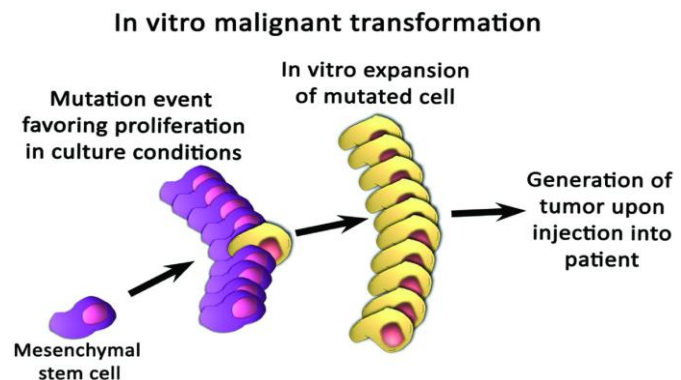


Fig. 8 In vitro transformatie van een mesenchymale stamcel tot gemuteerde cellen

Differentiatie tot tumorstroma

Tumorstroma is een speciaal tumorbindweefsel dat bestaat uit een combinatie van endotheelcellen, immuuncellen en fibroblasten die de tumorgroei ondersteunen.[95] Een heterogene array van maligne cellen die eng verbonden zijn aan tumorstroma, vormen samen een tumor [87]. MSCs zijn, door middel van contact met het tumorstroma in staat te differentiëren tot een zogenaamde carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), aangezien de fenotypes van beide cellen erg op elkaar lijken.[86, 96] Deze CAFs zouden de groei en angiogenese van borsttumoren kunnen stimuleren.[97]

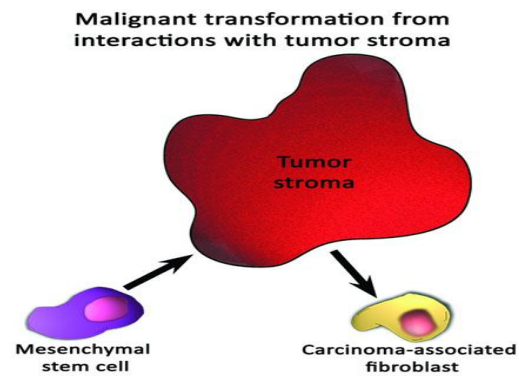


Fig. 9: Maligne transformatie van mesenchymale stamcellen tot 'carcinoma-associated fibroblast'

Problemen en gevaren bij incapsulaties van MSCs

Een mogelijke complicatie bij het implanteren van MSCs is de klontering van deze cellen. Klontering van MSCs kan leiden tot vorming van een nieuwe micro-omgeving waardoor er een ander type weefsel ontstaat. MSCs zijn bekend om hun extreme celhechtingscapaciteit in de kweekomgeving.[79] Als deze verbindingen niet worden verbroken vóór implantatie, kunnen de MSCs gaan clusteren. Er ontstaan dan botnodules of andere ongewenste, afwijkende structuren.[79] Het is dus belangrijk om deze cellen goed met trypsine, te behandelen vóór het transplanteren. Andere stressfactoren zoals het inbrengen van MSCs onder hoge druk, door ze bijvoorbeeld door een lange smalle naald te spuiten, leiden tot dezelfde incapsulatieproblemen.[79]

MSCs bezitten de capaciteit te differentiëren tot endotheelcellen en gladde spierweefselcellen.[98] Bij onderzoek op muizen, met geïnduceerde myocardinfarcten, werden MSCs lokaal ingespoten. In plaats van deze transdifferentiaties, werden ophopingen van gecalcificeerde, botvormige en pathologische abnormaliteiten aan getroffen.[98] Ongedifferentieerde MSCs waren in deze ophopingen aanwezig. De reden achter deze differentiatie afwijkingen is echter nog onduidelijk.

Bronnen van de Mesenchymale stamcellen

Behalve in het volwassen beenmerg komen MSCs ook voor in vele andere volwassen weefsels, zoals het periost, vetweefsel en spierbindweefsel. Het voorkomen van MSCs in (cytokinegemobiliseerd) bloed is nog onderwerp van discussie.[99] In de foetus komen MSCs voor in bloed, lever, beenmerg en in de longen en recent zijn er MSCs geïdentificeerd in vruchtwater en navelstreng bloed [100, 101] Verdunningsexperimenten hebben echter aangetoond dat de frequentie van MSCs aanzienlijk verschilt van weefsel tot weefsel. Naast een weefselafhankelijke frequentie is gebleken dat de frequentie van MSCs ook afhankelijk is van de leeftijd. Geschatte frequenties van MSCs in het beenmerg van een pasgeborene bijvoorbeeld, is 1/10.000 kernhoudende cellen terwijl deze frequentie bij volwassenen 100 keer lager ligt.[102] Maar niet alleen de frequentie van de MSCs verschilt van weefsel tot weefsel, ook de hoeveelheid primair materiaal dat kan worden verkregen en de expansiecapaciteit van de daarin aanwezige MSCs verschilt aanzienlijk. Het gebruik van foetale weefsels is op dit moment nog omgeven door ethische vragen en een wisselend politiek draagvlak. Daarom is op dit moment slechts een beperkt aantal weefsels geschikt voor de klinische toepassing.[102] Misschien zal hier in de toekomst verandering in komen en meer weefsels beschikbaar komen als bron voor de MSCs.

Autogene MSCs verkregen uit het beenmerg

Zoals hierboven al even genoemd, is het beenmerg een goede locatie om de MSCs vandaan te halen voor een mogelijke co-transplantatie met de EvL. MSCs, verworven uit het beenmerg stroma, beslaan 0.001% tot 0.01% van de cellen met een kern binnen het beenmerg.(fig.9)

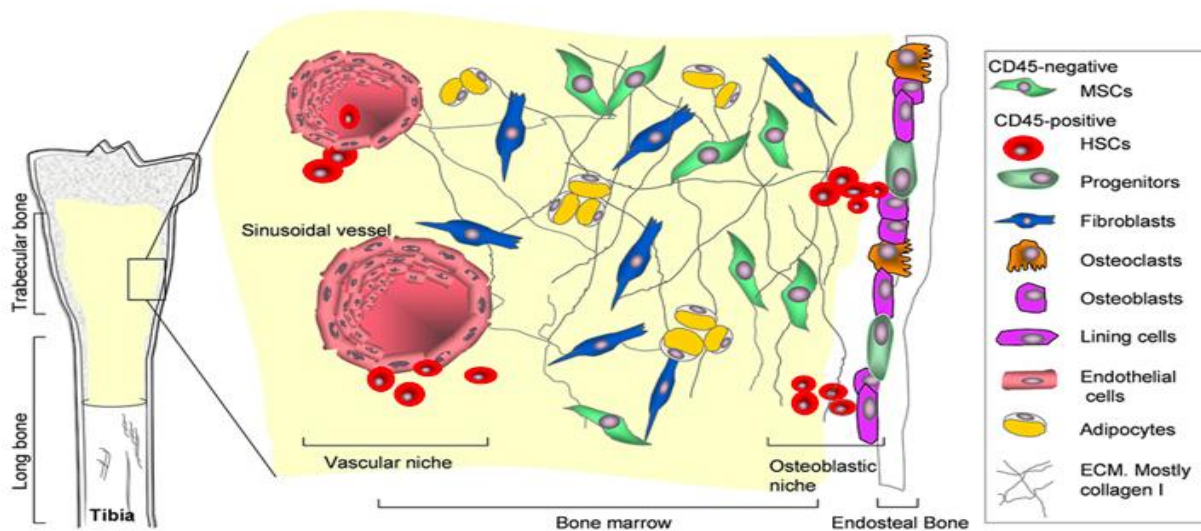


Fig. 9: Het beenmerg

In het LUMC in Leiden wordt het beenmerg al geruime tijd gebruikt als bron voor MSCs en met succes. Een groot voordeel van het gebruik van autogene MSCs is het feit dat het lichaamseigen materiaal is. Daarnaast is uit onderzoek gebleken dat autologe MSC in combinatie met allogene EvL de beste resultaten opleveren wat betreft de overlevingskansen van de EvL. Waarin allogene MSCs in combinatie met de EvL slechts een geringe toename laten zien.[73] Autologe MSCs bieden niet alleen voordelen voor de overleving op langere termijn van de EvL. Ook om logistieke redenen zijn

Kader 1 – Kweek procedure

Bij de huidige kweekprocedure in het LUMC wordt gebruik gemaakt van zogenoemde kweekflessen. Uit een gemiddeld beenmergaspiraats kunnen 700.000 MSCs worden verkregen en opgekweekt tot ongeveer 3,5 miljoen MSCs. Dit is de 0^e passage. In iedere volgende passage wordt elke fles vervolgens verdeelt over 5 nieuwe flessen, waarna deze opnieuw opgekweekt worden tot 3,5 miljoen cellen. Per passage vindt er dus maximaal een vervijfvoudiging van het aantal MSCs plaats.

autologe MSCs verkregen uit het beenmerg erg handig. De MSCs kunnen namelijk verkregen worden van de patiënt al geruime tijd voor transplantatie. MSCs kunnen op deze manier van tevoren opgekweekt (kader.1) worden en worden bewaard. Aangezien niet duidelijk is wanneer de patiënt een transplantatie zal ondergaan, vanwege de wachtlijsten, is dit een handige optie. Helaas biedt deze bron van MSCs niet alleen maar voordelen. Om de MSCs uit het beenmerg te verkrijgen is een extra behandeling noodzakelijk. Een zogenaamd beenmergaspiraats moet verkregen worden van de patiënt. Het bekken net boven de linker of rechter bil wordt hierbij met een dikke holle naald aangeprikt. Deze behandeling is voor de patiënt een zeer pijnlijke ervaring.[103] Daarbij komt dat wanneer er iets mis gaat met de autologe MSCs, mochten ze bijvoorbeeld ongeremd gaan delen, dan zal dit niet herkend worden door het lichaam. Dit zijn twee nadelen waar zeker rekening mee gehouden moet worden.

Allogene MSCs verkregen uit het beenmerg

Het gebruik van allogene MSCs uit het beenmerg is de laatste tijd onderwerp van discussie, want zijn deze MSCs nu immunogeen of niet? Vele onderzoeken hebben aangetoond dat MSCs in het algemeen niet-immunogeen zijn.[74-76] Hoewel, zoals al eerder genoemd, onderzoek uit 2006 en 2009 suggereren dat allogene MSCs wel immunogeen zijn en de afstoting van het transplantaat juist bevorderen.[73, 77] Omdat nog niet duidelijk is of MSCs van de donor nu wel of geen immunoreactie oproepen en de afstoting van het transplantaat bevorderen is dit nu nog geen goede optie voor gebruik. Desalniettemin levert het gebruik van deze allogene MSCs ook voordelen op. Er hoeft namelijk geen beenmergaspiraats van de patiënt verkregen te worden, plus mocht er bij de allogene MSCs wat mis gaan, zoals die ongeremde deling, zal dit herkend worden door het lichaam van de patiënt en in de meeste gevallen worden opgeruimd. Verder onderzoek naar deze optie zal meer helderheid moeten geven over het wel of niet immunogeen zijn van allogene MSCs.

Allogene MSCs verkregen uit vetweefsel

Allogene MSCs verkregen uit vetweefsel zou een goede optie als MSC bron kunnen zijn. Bij een donorpancreas komt over het algemeen een redelijke hoeveelheid vet mee, waaruit deze MSCs verkregen zouden kunnen worden. De MSCs en de EvL kunnen zo uit dezelfde donorpancreas worden verkregen, wat voordelen biedt. De vraag hierbij is echter of er ook daadwerkelijk genoeg massa meekomt om tot een hoeveelheid MSCs te komen die groot genoeg is voor transplantatie.

Hoogstwaarschijnlijk zal een te hoog aantal kweekpassages gepasseerd moeten worden, waardoor de veiligheid niet meer aannemelijk is. Daarnaast worden de EvL, die geïsoleerd worden uit de donorpancreas, na gemiddeld 3,5 dag getransplanteerd. Het kweken van een genoeg aantal MSCs zal in die tijd nog lang niet klaar zijn aangezien dit weken kan duren. Door o.a. logistieke redenen is deze optie dus niet haalbaar. Ook voor deze optie geldt dat nog niet duidelijk is of deze allogene MSCs immunogeen zijn of niet.

Ideale plaatsbepaling van de MSCs ten opzichte van de EvL

Eerder is al gekeken naar de mogelijke effecten van mesenchymale stamcellen (MSCs) op de angiogenese, immuunreactie en de veiligheid. Hierbij is echter niet ingegaan op de plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL. De MSCs kunnen lokaal met de EvL worden ingebracht of intraveneus worden geïnjecteerd, waardoor ze systemisch aanwezig zijn. Bij inbreng op dezelfde locatie kunnen de MSCs en de EvL samen in een oplossing zitten of lokaal op dezelfde plek aanwezig zijn zonder direct cel contact.

Bij de transplantatie van de EvL is nog geen systemische toediening van MSCs gebruikt, maar op vele andere onderzoeksgebieden is dit al wel getest met een positief resultaat.[17] Bij het systemische toedienen van MSCs (1-2 miljoen/per Kg) blijft een groot deel van de MSCs vastzitten in de longen en lever.[104] Slechts een klein deel migreert uiteindelijk naar het doelweefsel. Uit de positieve resultaten die desondanks zijn behaald kan worden afgeleid, dat er waarschijnlijk factoren worden afgegeven door MSCs die zich systemisch kunnen verspreiden en een positief effect hebben op het beschadigde weefsel. Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat maar een klein aantal MSCs lokaal aanwezig hoeft te zijn om tot een goed resultaat te leiden.

Meerdere onderzoeken zijn gedaan naar het inbrengen van MSCs op dezelfde locatie als de EvL. Zoals eerder besproken traden hierbij grote immunologische en angiogene voordelen op. Bij de in vivo onderzoeken is alleen gekeken naar cotransplantatie van MSCs en EvL in een oplossing. Doordat de eilandjes en MSCs in oplossing zijn is er meer en sneller celcontact mogelijk, dan bij het los van elkaar transplanteren naar dezelfde locatie. In vitro onderzoek waarbij eilandjes gecoat werden met ECs alleen en een combinatie van ECs en MSCs liet een duidelijk verbeterde angiogenese zien in deze laatste groep ten opzichte van de eerste. Deze verbetering van de angiogenese toonde zich niet alleen in het omliggende weefsel maar ook de eilandjes in.[49] Daarnaast is echter in vitro aangetoond dat de overleving en functie van de eilandjes verbeterd wordt, ook wanneer MSCs lokaal aanwezig zijn maar geen direct cel contact hebben.[105]

Zowel het systemisch toedienen als het lokaal aanwezig zijn van de MSCs lijken dezelfde voordelen te bieden. Moeilijk is het echter om te bepalen wat nu de ideale plaats van de MSCs is ten opzichte van de EvL. Hiernaar is namelijk nog geen onderzoek verricht en daarom is alleen duidelijk dat beide opties voordelen bieden maar niet welke optie de meeste voordelen. Een conclusie over de ideale plaats kan dus nog niet getrokken worden.

Onderzoeksvoorstel

Een eventueel onderzoek in vivo, waarbij gekeken wordt naar onderstaande groepen, zie tabel 2, zou meer helderheid moeten bieden over de ideale plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL. Eventueel kan ook de combinatie van de groepen B-D en C-D onderzocht worden. Belangrijke parameters waarnaar gekeken moet worden tijdens het onderzoek zijn de overlevingskansen en de functie van de EvL, de angiogene- en immunologische factoren die hierop van invloed zijn en de capillaire concentratie binnen het transplantaat.

Groep A	Alleen EvL buiten de bloedbaan (bb)
Groep B	EvL + MSCs in oplossing bb
Groep C	EvL + MSCs los van elkaar naar dezelfde locatie bb
Groep D	EvL bb + MSCs intraveneus

Tabel.2 Mogelijke onderzoeksgroepen

Hypothese:

De lokale aanwezigheid van de MSCs bieden een aantal voordelen ten opzichte van systemische toediening. Wanneer de MSCs al ter plaatste zijn hoeven ze er niet naartoe te migreren. Zoals eerder vermeld, blijft een groot deel van de MSCs in de longen vastzitten. De MSCs die in de longen blijven vastzitten kunnen hemodynamische veranderingen veroorzaken.[104] Bij gecombineerde transplantatie naar dezelfde locatie hoeft deze migratie van MSCs niet meer plaats te vinden. Hierdoor zal er lokaal een hogere concentratie angiogene- en immuunfactoren aanwezig zijn en is de hoeveelheid direct celcontact groter. Dit zal waarschijnlijk tot betere resultaten leiden en, om niet te vergeten, ook minder risico's. Als een van de eerder genoemde risico's tot uiting komt zal dit systemisch eerder tot problemen leiden, doordat MSCs eerder in contact komen met een risico trigger. Verwacht wordt dan ook dat het bevorderen van vaat in- en uitgroei door middel van direct celcontact een groter effect heeft. De hypothese die uit deze beredenering afgeleid kan worden is dat groep B een iets beter resultaat geeft dan groep C, het resultaat van C is weer beter dan D, het slechtste resultaat geeft naar verwachting groep A.

immunosuppressiva

In de praktijk gaat een EvL transplantatie vaak samen met een niertransplantatie. De patiënt zal daarom al immunosuppressiva krijgen toegediend. Corticosteroiden is de belangrijkste familie van de immunosuppressiva. De werking van immunosuppressiva berust op transplantatie tolerantie. Deze tolerantie wordt bepaald door de balans tussen de agressieve alloreactieve T-cellen en de alloreactieve regulatoire T-cellen. Een grote hoeveelheid regulatoire T-cellen verhoogd de kans op tolerantie van het transplantaat, terwijl een te hoog aantal T-cellen juist tot afstoting kan leiden. Immunosuppressiva hebben nare bijwerkingen zoals, nierschade, bloeddruk problemen, toxiciteit van de EvL, vochtophopingen en een verhoogd risico op het ontwikkelen van tumoren. Een langdurig gebruik van deze medicatie moet dan ook proberen vermeden te worden. Daarom zou er voor gekozen kunnen worden om toch (ook) systemisch gebruik te maken van de MSCs.[28] Door de immuun werende werking van MSCs kan de hoeveelheid immunosuppressiva, die een negatief

effect op de EvL transplantatie en de algemene gezondheid heeft, verlaagd worden. Daarbij komt dat MSCs, net als immunosuppressiva, tot immuuntolerantie kunnen leiden.[106]

In de Praktijk

Uit voorgaande hoofdstukken is gebleken dat co-transplantatie van de EvL en MSCs waarschijnlijk veel voordelen biedt voor de behandeling van Diabetes type I. De manier van transplanteren is echter nog niet besproken. Hieronder zal dan ook dieper worden ingegaan op hoe de EvL samen met de MSCs, op de meest effectieve manier, getransplanteerd kunnen worden. We hebben gekozen om gebruik te maken van een scaffold, om de EvL op een gecontroleerde manier samen met de MSCs te kunnen transplanteren. Deze controle is van belang om grote clusters van EvL te voorkomen, die vooral in het begin, necrotisch aan de binnenkant zullen worden aangezien er een diffusielimiet van nutriënten en zuurstof bestaat. Daarnaast biedt een scaffold stabiliteit aan de eilandjes en de mogelijkheid om op gecontroleerde wijze de revascularisatie te stimuleren.

Huidige scaffold ontwerpen bevatten nog veel beperkingen. In het model wat hieronder besproken wordt, wordt geprobeerd deze beperkingen te minimaliseren. Voor het goed functioneren van de EvL en de MSCs is het belangrijk dat de scaffold aan bepaalde randvoorwaarden voldoet. De randvoorwaarden voor het ontwerp zijn:

1. een hoge diffusie capaciteit
2. een goede onderlinge communicatie tussen de Eilandjes van Langerhans
3. de morfologie van de Eilandjes van Langerhans moet behouden worden
4. een optimale mechanische stabiliteit, porositeit en degradatietijd van de scaffold
5. het op locatie houden van de Eilandjes van Langerhans
6. de mesenchymale stamcellen moeten aan het scaffold kunnen worden toegevoegd
7. de scaffold moet genoeg plaats bieden voor de EvL en de MSCs maar tevens niet te groot worden
8. een goede en snelle revascularisatie, van alle kanten, moet mogelijk zijn
9. Fabricatie mogelijk in de klinische praktijk
10. lokaliseerbaar zijn
11. Veilig zijn

Deze randvoorwaarden en wat deze randvoorwaarden voor het scaffold ontwerp betekenen, zullen hieronder besproken worden.

1. Hoge diffusiecapaciteit

De toevoer van nutriënten en zuurstof naar de EvL is een groot probleem, zeker bij transplantatie buiten de bloedbaan. Hier moet dus rekening mee gehouden worden in het 3D ontwerp. De meeste in vivo weefsels bevatten een complex netwerk van bloedvaten en capillairen, die een maximale nutriënten diffusie afstand van ongeveer 200 μm hebben.[107-109] Over het algemeen wordt deze diffusieafstand overschreden tijdens het ontwerpen van een scaffold in vitro. Terwijl deze verhoogde diffusielimiet leidt tot een verlaagde of zelfs geen nutriënten- en zuurstofafgifte aan weefsels en cellen, die verder van een directe nutriënten- en zuurstofbron zijn verwijderd. Dit kan uiteindelijk lijden tot necrose.

Het is dus belangrijk om een zo hoog mogelijke diffusiecapaciteit te creëren. Een van de mogelijkheden om de diffusiecapaciteit te verhogen binnen een scaffold is de vorm. Een vergroting van het oppervlak zal tevens een vergroting van de diffusiecapaciteit opleveren. Onderstaand figuur toont een golfplaat structuur, waarbij aan de ene kant de eilandjes kunnen worden gepipetteerd en aan de andere kant zogenaamde kanalen ontstaan. Deze kanalen zorgen voor een vergroot

diffusieoppervlak, wat theoretisch zou moeten leiden tot een verhoogde diffusie/nutriënten voorziening per eilandje.

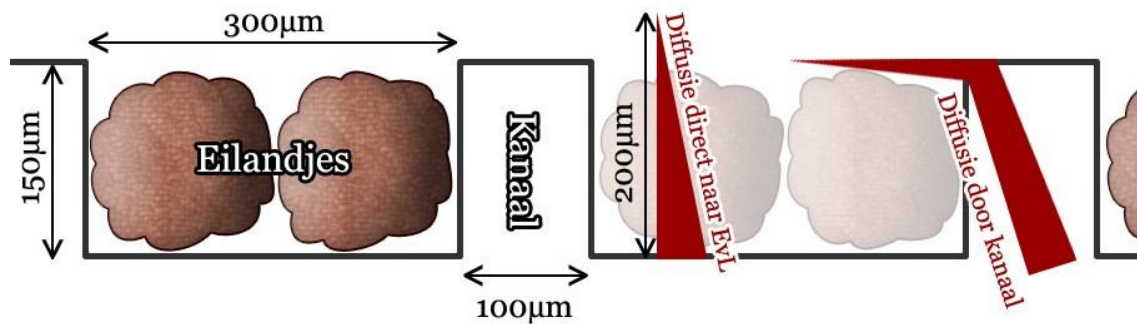


Fig. 10: Het golfplaat model met afmetingen en maximale diffusieafstanden

Er is gekozen voor een breedte van 300 μm en een hoogte van 150 μm voor de lange bakken, om zo de maximale diffusielimiet van 200 μm niet te overschrijden. Dat deze limiet niet overschreden wordt is zeer belangrijk, aangezien de EvL een hoge metabole activiteit hebben. Daarnaast zal direct na de transplantatie een 'kapsel' van fibrine en andere bloedstollingscomponenten om het transplantaat heen worden gevormd, wat tevens de diffusie limiteerd. Vanwege het hoge zuurstof gebruik van de eilandjes en het mogelijke weefsel rond het transplantaat is het verstandig de diffusieafstand te verkleinen, tot onder de 200 μm , zoals hier gedaan is naar ongeveer 150 μm . Een andere factor die de diffusiecapaciteit beïnvloed is de porositeit van het materiaal waaruit de scaffold gemaakt is. Deze zal echter later besproken worden.

2. Onderlinge communicatie van de eilandjes van Langerhans

Geclusterde eilandjes functioneren, na transplantatie, beter dan eilandjes die geen onderling contact hebben. Deze clustering leidt tot een verhoogde insuline productie.[110] In de pancreas communiceren de eilandjes echter niet met elkaar. Ze liggen voornamelijk verspreid en de bloedafvoer van het ene eilandjes maakt geen contact met een ander eilandje. Na transplantatie is er echter wel te verwachten dat enige vorm van communicatie optreedt. Bloedvaten moeten nog opnieuw gevormd worden en de endotheelcellen en MSCs liggen in de buurt. Heel gek is het niet om te bedenken dat er tussen de eilandjes in communicatie zal gaan plaatsvinden, wat redelijkerwijs de functie van de eilandjes zal verbeteren. Johansson, U., et al., hebben onderzoek gedaan naar EvL gecoat met MSCs en ECs en hun functie op de angiogenese. Hieruit bleek dat wanneer eilandjes nauw contact met elkaar hadden, er bloedvatvorming tussen de EC-MSC eilandjes ontstond, wat paracrine stimulatie impliceert. Een nadeel van een grote clustering van eilandjes is de verhoogde diffusieafstand die zo ontstaat. De binnenste eilandjes zullen in het begin, wanneer de toevoer van nutriënten en zuurstof minimaal is, niet genoeg ontvangen. Het resultaat is een necrotische kern in de eilandophoping, terwijl de eilandjes aan de buitenkant waarschijnlijk voldoende zuurstof en nutriënten ontvangen om te overleven. Er moet dus gezocht worden naar een evenwicht tussen aan de ene kant een optimale insuline productie en aan de andere kant een diffusieafstand die te overbruggen is.

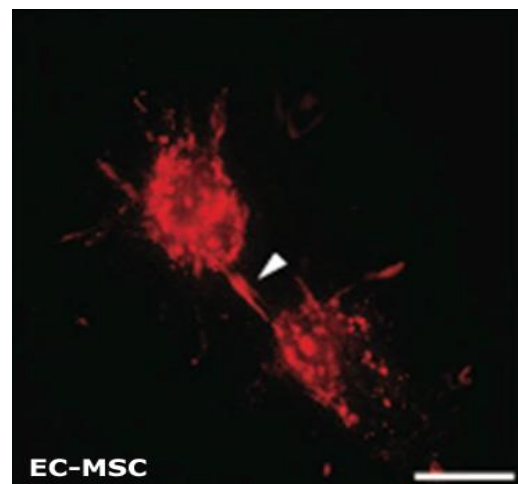


Fig. 11: onderlinge communicatie tussen twee eilandjes van Langerhans. Pijl = bloedvatvorming

Wij gaan er in ons model vanuit dat een onderlinge communicatie van belang is voor de functionaliteit van de eilandjes en willen dit contact dan ook realiseren door lange bakken met

eilandjes te creëren, waarin onderling contact mogelijk is maar de beperkte ruimte de grote bolvormige clustering tegengaat. Dit in tegenstelling tot het 'eierdoosmodel' uit 2009 [111] waarbij door middel van kleine bakjes het onderlinge celcontact van de eilandjes juist vermeden wordt.

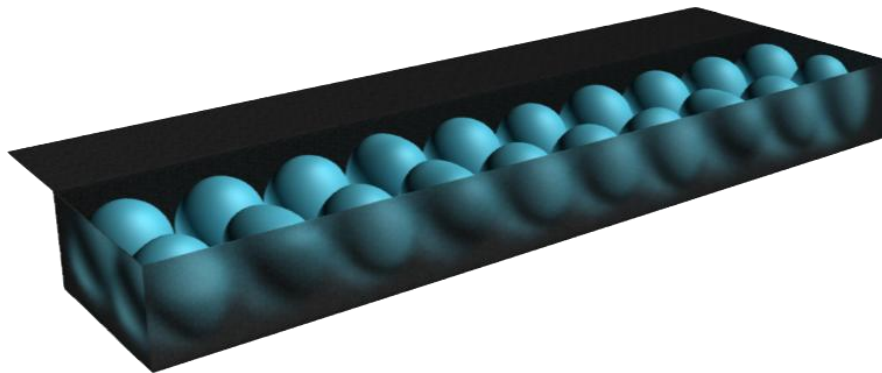


Fig. 12: Een lange bak, onderdeel van het golfplaatmodel, gevuld met eilandjes van Langerhans

Clustering is op deze manier nog steeds een mogelijkheid, maar omdat de eilandjes in bakken zitten van 300 μm breed en 150 μm hoog, worden de clusters nooit groter dan de maximale diffusieafstand. Op deze manier blijft het mogelijk de eilandjes van nutriënten en zuurstof te voorzien en wordt onderlinge communicatie, wat waarschijnlijk leidt tot een verhoogde insuline productie, gestimuleerd. Een nadeel is echter dat tijdens de clustering eilandjes hun natuurlijke vorm kunnen verliezen wat mogelijk leidt tot dedifferentiatie, waardoor de functie van de EvL juist vermindert. Desalniettemin wordt er aangenomen dat ondanks dit risico een lange bak een positieve werking zal hebben op de eilandjes.

3. Een goede eilandjes van Langerhans morfologie

De originele vorm van de EvL, een sferische vorm, zal hoogst waarschijnlijk de meest geschikte vorm zijn voor de eilandjes. Daarom is het van belang dat de scaffold hierop geen uitoefening heeft en de vorm van de eilandjes veranderd. Contact tussen de EvL en het polymeer aan de oppervlakte van de scaffold moet dus vermeden worden. Op het moment dat de eilandjes namelijk gaan hechten aan het polymeer, verliezen ze hun morfologische structuur, oftewel ze vervormen tot een platte structuur. Dit kan vervolgens leiden tot dedifferentiatie en dus een verminderde eilandjes functie.[111] Om dit probleem te vermijden zal er gekozen moeten worden voor een materiaal, waaruit de scaffold wordt gemaakt, wat een zwakke hydrofiele aantrekkingskracht heeft. Aangezien de EvL sterk hydrofiel zijn, zullen ze minder interacties aangaan met het materiaal. Zoals hierboven al beschreven werd, kan er tevens clustering tussen de EvL plaatsvinden. De morfologie van de eilandjes zullen hierdoor veranderen, maar in lichtere mate.

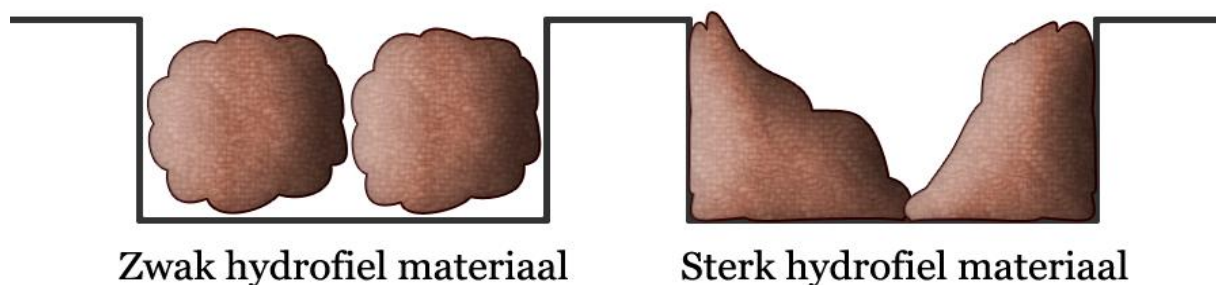


Fig. 13: Hydrofiele eilandjes van Langerhans binden aan een hydrofiele oppervlakte. Hierbij is mogelijke eiland clustering niet weergegeven.

Om het probleem van celhechting tussen het scaffoldmateriaal en de EvL te vermijden is gekozen als materiaal het copolymeer polyactive 4000PEOT30PBT70. Deze copolymeer is gebaseerd op de hierboven genoemde PEOT/PBT moleculen. Door zijn zwakke hydrofiele aantrekkingskracht zullen er minder interacties met de EvL plaatsvinden. Kortom het copolymeer polyactive 4000PEOT30PBT70 is een elastisch, diffusie stimulerend, langzaam degraderend materiaal met een zwakke hydrofiele aantrekkingskracht, en daarom geschikt als materiaal voor het golfplaat model.

5. Het op locatie houden van de Eilandjes van Langerhans

De kanalen voor de eilandjes hebben aan een kant een open structuur. De kans dat de eilandjes op deze manier eruit zullen vallen tijdens het transplantatie proces is groot. Dit zou betekenen dat de eilandjes ongecontroleerd in het weefsel terechtkomen waardoor het nut van de scaffold verloren gaat. Om dit te vermijden wordt de open structuur bedekt met een laag hydrogel. Te verwachten valt dat deze hydrogel laag in verloop van tijd vervangen zal worden door gevasculariseerd bindweefsel. Aangezien de revascularisatie zich herstelt binnen gemiddeld 10 tot 14 dagen[35] na transplantatie, is het van belang een hydrogel te kiezen die binnen deze 10-14 dagen (deels) degradeert om zo bloedvat ingroei mogelijk te maken. Daarnaast moet de hydrogel stabiel genoeg zijn om de lange bakken met eilandjes te kunnen afdekken.

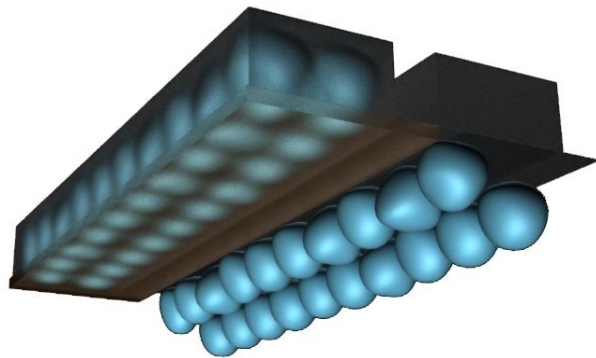


Fig. 15: Laag hydrogel om eilandjes op locatie te houden

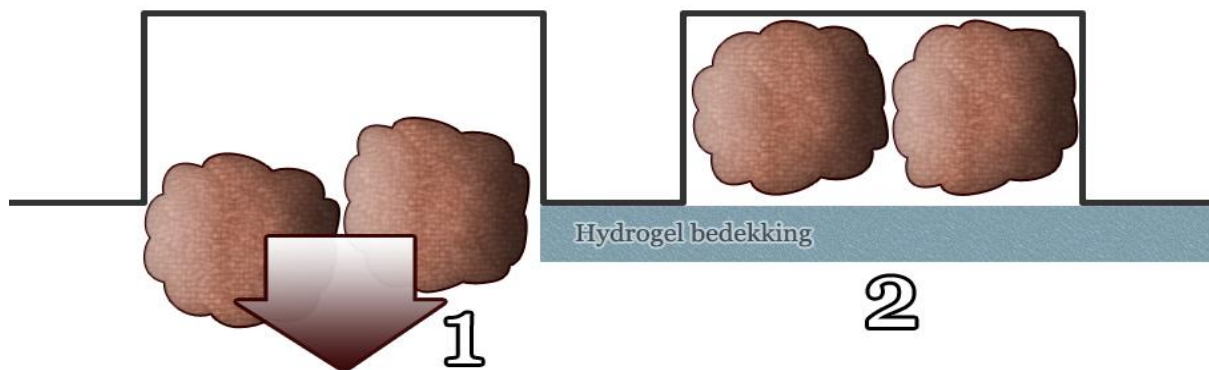


Fig. 16: Laag hydrogel om eilandjes op locatie te houden

5.1 hydrogel

Hydrogel staat bekend als een materiaal met een relatief snelle degradatietijd vergeleken met andere materialen. Het wordt veel toegepast in de tissue engineering op het niveau van scaffolddesign, doordat het het transport van nutriënten, zuurstof en afvalstoffen vrijwel niet belemmert. Hydrogel biedt namelijk een goede diffusie mogelijkheid, omdat het voor een groot deel uit water bestaat. Daarnaast bestaat de mogelijkheid om verschillende biologische componenten in de hydrogel te verwerken. Meestal zijn dit hydrofiele stoffen die zich prettig voelen in deze hydrofiele omgeving en zich in de poriën gaan nestelen. Wanneer de hydrogel vervolgens degradeert zullen deze componenten geleidelijk vrijkomen. Om de diffusie optimaal te houden is het belangrijk niet te veel componenten aan de hydrogel toe te voegen. Een zo 'clean'

mogelijke hydrogel levert in dit model het beste resultaat vanwege de verminderde diffusieweerstand en de lagere afgifte van groeifactoren en cytokines die eventueel tot tumorgroei zouden kunnen leiden.

5.1.1 hydrogel samenstelling

Hydrogel bestaat voornamelijk uit water met daarin een netwerk van polymeren. Zowel synthetische als natuurlijk polymeren kunnen gebruikt worden bij de creatie van een hydrogel. Polyethyleen oxide (PEO) is een veelgebruikte polymeer die gemakkelijk waterstofmoleculen kan binden. Doordat deze polymeer omringd is door veel waterstofmoleculen zal het door het lichaam niet herkend worden als lichaamsvreemd materiaal. Daarnaast is het klein genoeg om door de nieren uitgescheiden te worden wanneer het vrijkomt bij degradatie.[112] PEO is door de Food and Drug Administration (FDA) goed gekeurd, aangezien het geen schade in het lichaam veroorzaakt.[113] Samen met de natuurlijke hydrofobe polymeer, polylactide (PLA), kan PEO copolymeren vormen. Dit geldt voor zowel de D- als de L- stereo isomeer van PLA. Deze stereo-copolymeren kunnen gemixt worden waardoor een stereocomplex ontstaat, de hydrogel. (fig. 17)

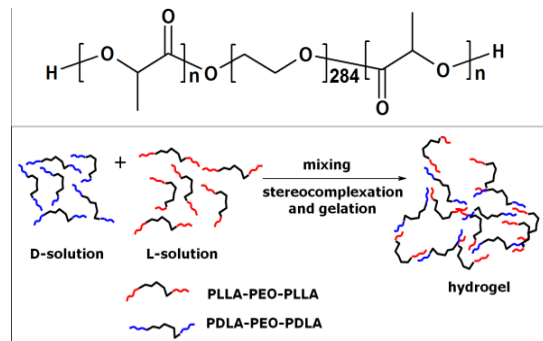


Fig. 17: Simpele hydrogel mix.

PLA is net als PEO afbreekbaar. Tijdens de degradatie van PLA komen melkzuurdeeltjes (lactide zuur) vrij.[114] Deze melkzuurdeeltjes zullen de pH waarden van het omliggende weefsel verlagen. EvL zijn gevoelig voor deze pH verandering, een te hoge concentratie aan melkzuur kan dan ook schadelijk zijn. Deze schadelijke melkzuur deeltjes worden echter grotendeel door het omliggende weefsel opgenomen en stromen weg of er vindt compensatie plaats door basische moleculen in ons lichaam. De netto pH daling zal tijdens de degradatie van de hydrogel niet significant zijn.[112] Hoe complexer het polymeer netwerk, hoe meer fysische bindingen aanwezig zijn. Wat vervolgens leidt tot een sterkere, langzamer te degraderen hydrogel. Een voorbeeld hiervan is weergegeven in figuur 18.

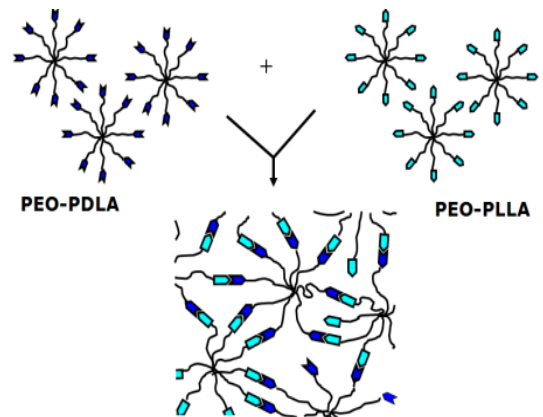


Fig. 18: Complexe hydrogel

De bindingen binnen het stereocomplex zijn fysische bindingen. Om de eilandjes bakken af te dekken is een mechanisch stabiele vorm nodig waarbij alleen de fysische bindingen waarschijnlijk niet voldoende zijn. Door het toevoegen van chemische bindingen zal de mechanische stabiliteit wel groot genoeg zijn. De hydrogel wordt dan harder en daarmee moeilijker te degraderen. Deze chemische binding kan gemaakt worden met behulp van UV straling, waardoor dubbele bindingen radicaliseren, of door het toevoegen van een tussencomponent met zogenoemde thiol armen, waarbij deze component gebonden wordt aan de dubbele bindingen. Omdat UV straling mogelijk negatieve effecten kan hebben op de EvL en de MSCs is er gekozen voor een tussen component: 4-armpolyethyleenoxide-thiol (4-PEO-SH).

Hoe meer aanknopingspunten, hoe stabiel en poreuzer, maar hoe kleiner de poriën van de hydrogel zijn. De grootte van de poriën is direct gecorreleerd met de degradatietijd. Hoe groter de poriën, hoe sneller de hydrogel degradeert. Tijdens degradatie van de hydrogel worden de copolymeerketens afgebroken waardoor de poriën groter worden. Bloedvaten kunnen op deze manier door de vergrootte poriën heen gaan groeien. In principe kan door middel van meer of minder 4-PEO-SH toevoegen, de stabiliteit, porositeit en de degradatietijd van de hydrogel gemanipuleerd worden.

6. toevoeging van de MSCs aan de scaffold

Doordat MSCs een belangrijke rol bij de revascularisatie spelen is de plaats van de MSCs binnen de scaffold van groot belang. Wanneer deze op strategisch gekozen plaatsen worden toegevoegd zou op een gecontroleerde manier revascularisatie gestimuleerd kunnen worden in de richting die gewenst is. Ook zou de plaats van invloed kunnen zijn op de mate waarin de MSCs de immuunreactie beïnvloeden. Eerder in het verslag is al genoemd dat er onderzoek nodig is om met zekerheid te kunnen zeggen wat de ideale plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL is.

In het golfplaatmodel zijn er 3 locaties waar de MSCs aanwezig kunnen zijn:

1. Samen met de EvL in de lange bakken van het golfplaatmodel
 - a. In de zelfde oplossing als de EvL
 - b. Gecoat op de EvL
2. In de hydrogel laag die de lange bakken afdekt
3. In een hydrogel laag binnen de kanalen

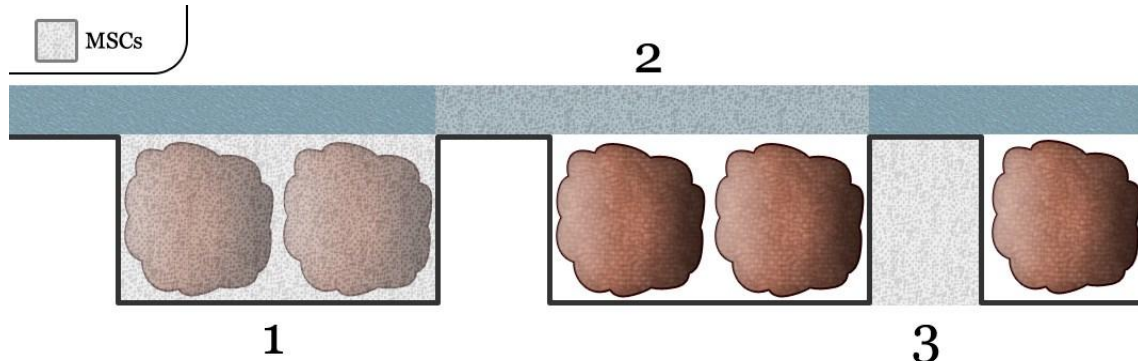


Fig. 20: Mogelijkheden voor toevoeging van de MSCs aan het golfplaatmodel

6.1 MSCs samen met de EvL in de lange bakken van het golfplaatmodel

Eerder is beschreven dat een groot deel van de weefselstructuur rondom de EvL, inclusief de vascularisatie, verloren gaat in het isolatieproces van de EvL. De bloedvaten en endotheelcellen (ECs) die binnen de EvL zitten blijven echter wel voor een deel aanwezig. Na onderzoek wordt verwacht dat celcontact tussen de MSCs en de EvL voor de beste resultaten zorgt op het gebied van de angiogenese en de immuunreactie. Om dit celcontact te verwezenlijken kunnen de MSCs gemakkelijk met de EvL in een oplossing worden toegevoegd aan de lange bakken. Als de MSCs en EvL in eenzelfde oplossing zitten is cel-cel interactie mogelijk. Een andere optie is het coaten van de EvL met zowel ECs als MSCs. Hierbij worden de MSCs en ECs al voor de transplantatie samen met de EvL in kweek gebracht waardoor een coating gevormd kan worden. Deze vorm van MSC toediening verzekert de hoogste MSC-EvL interactie. De vraag is echter of de EvL hierbij niet

beschadigd worden, aangezien bekend is dat MSCs proteolytische enzymen kunnen uitscheiden. Het reeds voorgestelde onderzoek zal uit moeten wijzen welke optie het beste is.

6.2 MSCs in de hydrogel die de lange bakken afdekt

MSCs toevoegen in de hydrogellaag stimuleert de angiogenese richting de EvL, aangezien deze laag hydrogel de lange bakken van het golfplaatmodel afdekt. De MSCs kunnen worden toegevoegd wanneer de hydrogel zich in de vloeibare fase bevindt. Wanneer de hydrogel geleidelijk minder vloeibaar wordt, door een verhoging van de temperatuur, kunnen de MSCs zich in de poriën van de hydrogel nestelen. Deze hydrogel met MSCs zorgt voor zowel angiogenese stimulatie richting het midden van de scaffold als afdekking van de lange bakken met EvL.

Toevoeging van MSCs aan deze hydrogellaag stimuleert op een gestructureerde manier de angiogenese. Deze tussenlaag bestaat namelijk uit een langzaam degraderende hydrogel, wat inhoudt dat de MSC gedurende een vrij lange periode op dezelfde plaats blijven zitten. Gedurende deze periode wordt verwacht dat de MSCs angiogene factoren uitscheiden. Door een hoge concentratie angiogene factoren zoals VEGF, in het midden van de scaffold, zal ervoor zorgen dat bloedvaten, zowel in de bakken als in de kanalen, richting het midden van de scaffold groeien. Dit is ideaal voor een snelle revascularisatie vanuit alle kanten.

6.3 MSCs in de kanalen

De laatste optie is de toevoeging van de MSCs aan de kanalen. Dit kan gerealiseerd worden op minstens 3 manieren:

1. Door middel van een coating op het oppervlak van de kanaalwand
2. Door middel van een sterke celhechting van de kanaalwand
3. Opvulling van de kanalen met een hydrogel met hierin de MSCs verwerkt.

In tegenstelling tot de EvL is een sterke celhechting van MSCs aan de scaffold wenselijk wanneer deze toegevoegd worden aan de scaffold kanalen. MSCs binden over het algemeen slecht aan polymeren[115], waardoor het belangrijk is een polymeer te kiezen dat voor een zo groot mogelijke celhechting zorgt, dus heel hydrofiel is.

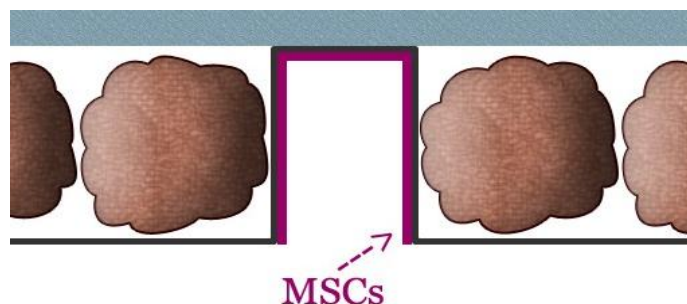


Fig. 21: MSCs d.m.v. coating/adhesie polymeer toegevoegd aan de kanalen.

6.3.1 Coating van de kanaalwand

Coatings zijn heel effectief voor een verbetering van de adhesie met de MSCs. Binnen één uur kunnen de MSCs tot 6x beter binden aan polymeren met een L-arginine coating, dan zonder deze coating.[115] Hier treden echter een aantal problemen op. De fabricatiemethode voor het inleggen van een L-arginine coating wordt m.b.v een spraytechniek gedaan. Deze coating mag alleen aan de binnenkant van de kanalen komen, zodat de MSCs vast kunnen gaan zitten. Het is niet wenselijk om deze coating aan de binnenkant van de bakjes te krijgen, aangezien de EvL zich zouden kunnen vasthechten, wat tot morfologische problemen zou kunnen leiden. Het is echter zeer moeilijk om met deze fabricatietechniek ervoor te zorgen dat de ene kant van de poreuze wand met coating bedekt wordt, maar de andere kant niet, aangezien de partikels door de poriën heen kunnen. Een tweede probleem is dat de poriën van de kanalen dicht komen te zitten, waardoor de diffusiecapaciteit afneemt.

6.3.2 Adhesie van de kanaalwand

Om celhechting in de kanalen te verkrijgen, waardoor MSCs zullen binden aan de kanaalwand, is een polymeer met goede bindingseigenschappen nodig. De celhechtende eigenschappen van het copolymeer PEOT/PBT zullen verhoogd moeten worden om celhechting met de MSCs te verkrijgen. Dit kan gebeuren door de verhouding van de hydrofiele (PEOT) en hydrofobe (PBT) moleculen aan te passen. Polymeer 300PEOT55PBT45 heeft een veel lagere concentratie PBT [111], waardoor het materiaal minder hydrofoob is en dus sterkere hydrofiele interacties aangaat dan copolymeer 4000PEOT30PBT70. Copolymeer 300PEOT55PBT45 zou dus een goede materiaalkeuze voor de binnenkant van de kanalen zijn. Met behulp van elektrospinning is het mogelijk om twee verschillende dunne polymere meshes over elkaar heen te maken, zodat het materiaal hydrofoob aan een kant en hydrofiel aan de andere kant wordt. Deze techniek is echter nog niet getest, het is dan ook de vraag of de kanaalwand wel stabiel is en of deze twee lagen polymeer überhaupt aan elkaar hechten, aangezien ze beide verschillende eigenschappen bezitten.

6.3.3 hydrogel in de kanalen

Een totaal andere optie voor de toevoeging van MSCs aan de kanalen is door gebruik te maken van een hydrogel. Wanneer met een hydrogel de kanalen opgevuld worden, kunnen in deze hydrogel gemakkelijk de MSCs worden verwerkt. Omdat het oorspronkelijke idee, een goede revascularisatie door de kanalen is, moet ervoor gezorgd worden dat deze hydrogel dit proces niet tegenwerkt. Een simpele, makkelijk degradeerbare hydrogel is dus een goede optie. De kanalen functioneren tevens als een vergroting van het diffusieoppervlak. Wanneer deze kanalen opgevuld worden met een hydrogel moet er gelet worden op het feit dat deze diffusie alsnog plaatsvinden kan.

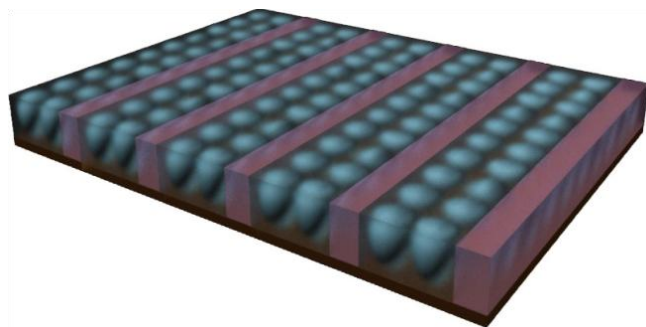


Fig. 22: Toevoeging van de hydrogel (met MSCs) in de kanalen van het model

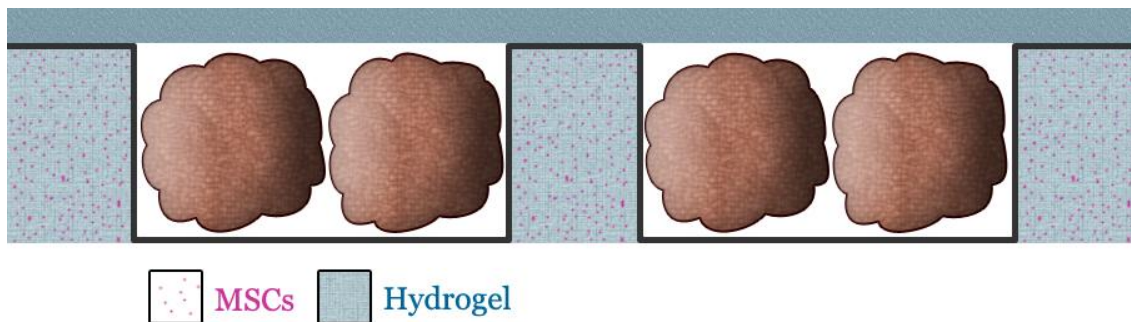


Fig. 23: Kanalen van het golfplaatmodel opgevuld met mesenchymale stamcellen in een hydrogel

Door geen chemische bindingen toe te voegen zullen poriën waarschijnlijk groter zijn. Een groter deel zal uit water bestaan waardoor de diffusie door deze hydrogel (zachte hydrogel) makkelijker wordt. Bij een lage temperatuur (rond het vriespunt) is de zachte hydrogel vloeibaar. De kanalen zouden op een eenvoudige wijze opgevuld kunnen worden met deze vloeibare vorm. Bij kamertemperatuur verandert de vloeibare hydrogel in een gelachtige vorm.[112] Bij lichaamstemperatuur is een nog viskeuzere vorm te verwachten, waardoor de zachte hydrogel gegarandeerd in de kanalen vast blijft zitten. Deze binding tussen het scaffoldmateriaal en de hydrogel berust op de interactie tussen de hydrofiele componenten PEO en PEOT van de hydrogel en het scaffoldmateriaal. De celhechting van de MSCs aan deze zachte hydrogel is, vergeleken met de celhechting aan de wanden van de kanalen, veel beter. Aangezien de hydrogel heel hydrofiel is kunnen de MSCs zich als het ware innestelen in de poriën van de hydrogel. De poriën moeten dan wel groot genoeg zijn, maar dit is in de praktijk mogelijk.

Aangezien de kanalen kort na de transplantatie waarschijnlijk worden opgevuld door fibrine en andere bloedstollingcomponenten, kunnen nutriënten en zuurstof moeilijker door deze kanalen diffunderen. Ook de groei van de bloedvaten door de kanalen wordt hierdoor belemmerd. Om deze problemen voor te zijn en de kanalen vrij te houden voor diffusie en bloedvatvorming zal een zachte hydrogel in de kanalen gegoten worden.

7. De scaffold moet genoeg ruimte bieden voor de EvL en de MSCs

Tijdens een EvL transplantatie wordt gemiddeld 4ml oplossing, met daarin de eilandjes, getransplanteerd. Van belang is dan ook dat deze 4ml in de scaffold past, maar er tevens voor gezorgd wordt dat de scaffold niet te groot wordt. Om de scaffold te kunnen transplanteren in het lichaam van de patiënt biedt een kleine scaffold in de praktijk vanzelfsprekend meer voordelen dan een grote scaffold. Chirurgische hanteerbaarheid speelt hierbij zeker een rol. Het zogenaamde 'eierdoosmodel', wat vorig jaar is beschreven door een mede student van de UT Twente, heeft een oppervlakte van 20cm bij 20cm, wat een grote beperking vormt bij het implanteren in de praktijk. Door het golfplaten model dubbel te klappen ontstaat een dubbelzijdige golfplaat die 2x zo weinig oppervlakte in neemt. Om ervoor te zorgen dat de 2 zijden verbonden blijven kan

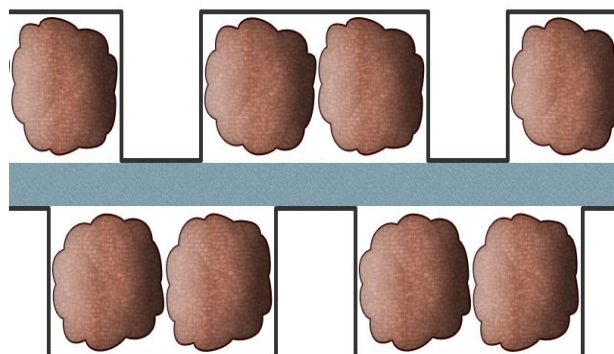


Fig. 24: De dubbele golfplaat.

gebruikt worden gemaakt van eenzelfde soort hydrogel dat gebruikt wordt om te voorkomen dat de EvL uit de bakjes vallen.

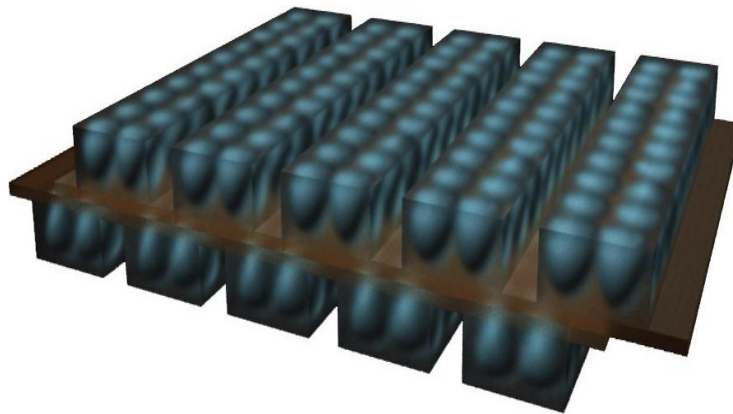


Fig. 25: De dubbele golfplaat.

8. Een goede en snelle revascularisatie van alle kanten

De ingroei van bloedvaten de scaffold in is zeer belangrijk voor de overleving van de EvL. Deze ingroei moet zo snel mogelijk het diffusietransport ondersteunen en uiteindelijk overnemen, omdat deze gelimiteerd is. De ideale situatie op langere termijn is een gerevasculariseerd eilandje dat omsingeld wordt door bloedvaatjes van alle kanten. Deze situatie is ideaal omdat dit vergelijkbaar is met de natuurlijke omgeving van de eilandjes. Om een goede vascularisatie te verkrijgen in en om de scaffold wordt er gebruik gemaakt van de angiogenetische functie van MSCs.

Het gekozen scaffoldmateriaal is poreus genoeg voor het diffusietransport van zuurstof en nutriënten. Bloedvat ingroei is echter niet mogelijk door deze poriën, aangezien ze gemiddeld... μm groot zijn. Om toch bloedvat ingroei te verkrijgen zijn zogenaamde macroporiën van ongeveer 40 μm van belang. Hoe meer macroporiën de scaffold bevat hoe beter de bloedvatgroei richting de eilandjes. Een oneindig aantal macroporiën is echter niet haalbaar, omdat deze poriën ten koste gaan van de mechanische stabiliteit van de scaffold. Daarnaast is niet duidelijk of met de huidige fabricagetechnieken de mogelijkheid bestaat om deze macroporiën zo dicht op elkaar te maken. Maar hier wordt later verder op in gegaan. Een balans vinden tussen genoeg macroporiën voor de revascularisatie en het behouden van de mechanische stabiliteit is dus van belang. Om die reden is in dit model ervoor gekozen macroporiën te creëren in het midden van de kanalen en de bakken.

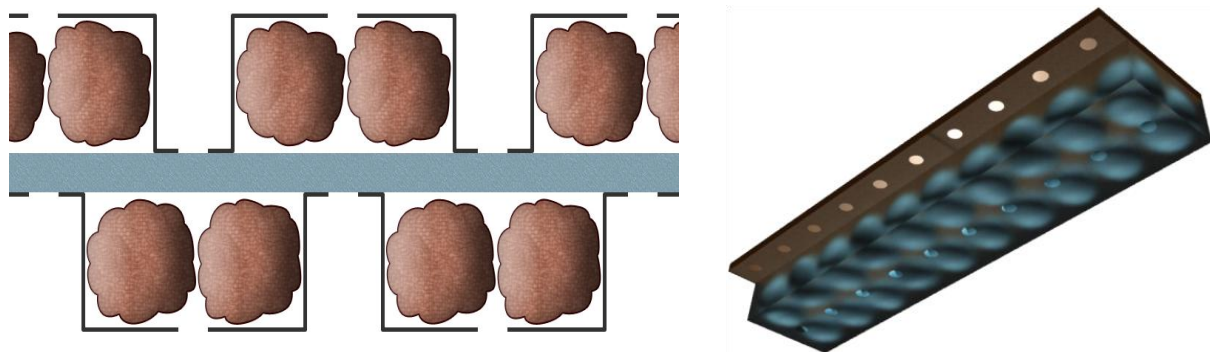


Fig. 26 Macroporien in de kanalen en de lange bakken met EvL.

Door de ingenieuze architectuur van de kanalen die opgevuld zijn met hydrogel en MSCs wordt de angiogenese in de kanalen gestimuleerd. De bedoeling is stimulatie van de angiogenese richting de gevormde macroporiën, zodat er bloedvaten de stabiele tussenlaag (hydrogel) ingroeien. Vanuit deze tussenlaag kunnen de gevormde bloedvaten naar de eilandjes in de verschillende bakken doorgroeien.

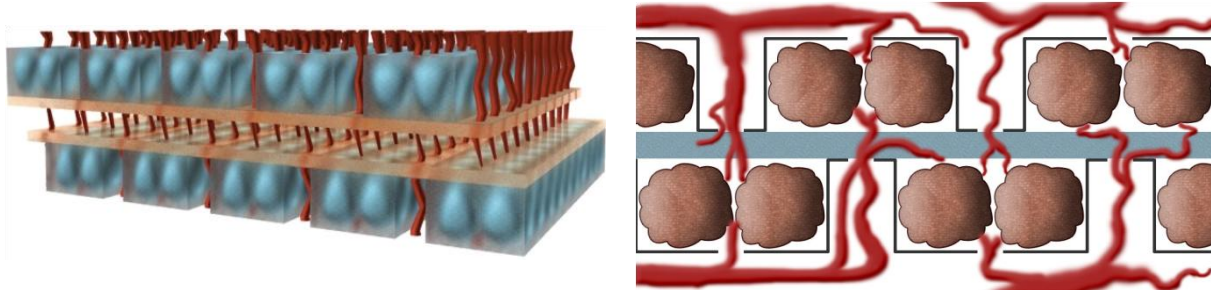


Fig. 27: Gerevasculariseerde dubbele golfplaat met macroporien in de kanalen en bakken.

Op deze manier kunnen bloedvaten indirect, via de kanalen en de tussenlaag, en direct, via de macroporiën in de bakken, de EvL bereiken. Om dit proces nog extra te stimuleren wordt er tevens voor gekozen om de MSCs in de lange bakken samen met de EvL aan te brengen. Dit alles zorgt voor een gecontroleerde stimulatie van de angiogenese op die plekken waar bloedvatvorming gewenst is.

9. Fabricatietechnieken

Voor de fabricage van het golfplaatmodel zijn slechts een aantal fabricatie technieken gebruikt. De traditionele fabricatietechnieken voor een scaffold zijn: Fiber bonding, solvent casting, particulate leaching, membrane lamination, melt molding en gas foaming. Deze technieken zijn echter niet geschikt voor de fabricatie van polymeren, wegens een aantal beperkingen, zoals een lange fabricatie procedure, slechte controle over de poriegrootte en dikte van het polymeer en het gebruik van toxische oplosmiddelen tijdens de procedure.[116]

Een van de meest gebruikte fabricatiemethodes op dit moment voor het maken van een polymeer is electrospinning. Electrospinning maakt gebruik van een elektrische lading om zo een heel fijne polymeerfiber (tussen de micrometers en nanometers) te creëren.[117] De positief geladen polymeer en de negatieve verzamelingplaat bevinden zich binnen een elektrisch veld. Door de elektrostatische aantrekkingskracht, ontstaat een polymeerdruppel aan het uiteinde van de "Taylor Cone". Deze druppel wordt vervolgens, door de grote aantrekkingskracht, tot een fiber vervormd. Deze fiber valt onregelmatig op de verzamelingplaat, waardoor een poreuze polymeerfilm ontstaat.

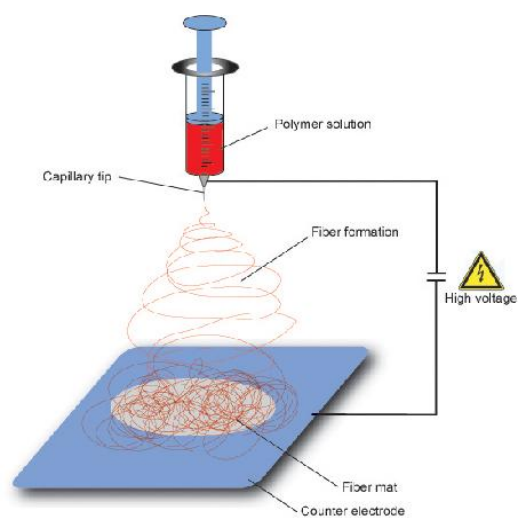


Fig. 28: Fabricatietechniek electrospinning.

De poreuze polymeerfilm, bevordert de diffusie van zuurstof, nutriënten van en naar de EvL. De door de electrospinning gevormde poriën zijn onregelmatig in grootte maar kunnen echter niet de benodigde grootte halen, die nodig is om een bloedvat door het materiaal heen te laten groeien. Om toch de macroporiën voor de revascularisatie te creëren kan gebruik worden gemaakt van een zogenoemde 'mould' met daarop kleine naaldjes. Om macroporiën te creëren worden deze naaldje door de polymeerfilm gedrukt. Onduidelijk is echter hoe klein de afstand tussen deze macroporiën kan zijn, zodat voldoende mechanische stabiliteit behouden blijft.

Onderzoeksvoorstel

Deze minimale afstand zal getest moeten worden. Om de minimale afstand tussen de macroporiën te bepalen voor een mechanisch stabiele scaffold, kunnen er 3 scaffoldprototypes worden gemaakt, die allen getest worden op mechanische stabiliteit:

- Type A: Poriënaafstand van 400 μm
- Type B: Poriënaafstand van 200 μm
- Type C: Poriënaafstand van 150 μm

Hypothese: Type A, B en C zijn mechanisch stabiel.

Het resultaat van een dergelijk onderzoek moet uitsluitsel geven over of het wel of niet mogelijk is om de macroporiën, zoals voorgesteld in het golfplaatmodel, op deze manier te creëren. Omdat nu echter nog niet bekend is wat deze minimale afstand tussen de macroporiën is, wordt in het golfplaatmodel aangenomen dat een afstand van 200 μm mogelijk is en niet leidt tot een mechanisch instabiel product.

De laatste stap in het fabricatieproces is de vorming van de golfplaat structuur door middel van microthermoforming. Voor deze techniek moet de polymeerfilm ongeveer 30-40 μm dik zijn. De thermoplastische polymeerfilm wordt eerst opgewarmd en in een vorm geperst. Daarna sterk afgekoeld en uit de vorm verwijderd. Deze techniek garandeert een vormgeving binnen een korte duur en is daarom heel geschikt voor de productie van het golfplaatmodel.

10. Opsporen en verwijderen van scaffold

Zodra duidelijk wordt dat de gehele scaffold niet naar verwachting werkt of onverwachte reacties in het lichaam oproept, moet zo snel mogelijk gehandeld worden om zo weinig mogelijk complicaties te veroorzaken. Localisatie van de scaffold is daarom van belang. Dit kan bij voorbeeld geschieden met behulp van een röntgenfoto (X-ray). Metalen zijn normaal gesproken goed zichtbaar op X-rays, dus zou de scaffold met een nietje aan het omliggende weefsel kunnen worden vastgezet, wat tevens een markering van de scaffold betekend. De nietjes moeten gemaakt zijn uit een metaal dat niet snel corrosie ondergaat. Een veel gebruikt corrosie-resistent metaal bij heup- en knie implantaten is titanium.[118] Dit zou een ideaal materiaal voor de nietjes kunnen zijn. Na het lokaliseren van de scaffold kan overwogen worden om de scaffold uit het lichaam te verwijderen. Behalve als lokalisatie hulpmiddel, dienen de nietjes ook als markers bij een eventuele chirurgische ingreep.

11. Veiligheid

Het veilig kunnen aanbieden van dit model aan de patiënt is zeer belangrijk. Hiervoor moeten niet alleen de MSCs maar ook het materiaal waaruit de scaffold is gemaakt en de EvL veilig gekeurd zijn. EvL worden al enkele jaren getransplanteerd dus hiervan mag aangenomen worden dat deze veilig zijn voor transplantatie. Het materiaal wat voor de scaffold gebruikt wordt, het copolymeer polyactive 4000PEOT30PBT70 is door de FDA goedgekeurd. De MSCs is de enige factor die onzeker is. Desalniettemin kunnen we veel doen om dit veiligheidsrisico te minimaliseren.

11.1 Gevaren en Problemen van de MSCs in combinatie met een scaffold

Uit recent onderzoek, in vitro, is naar voren gekomen dat MSCs in combinatie met driedimensionale scaffolds bepaalde risico's tot gevolg hebben. Groeiende cellen (zoals MSCs) produceren een micro-omgeving binnen deze scaffolds, wat tot tumorgenese kan leiden.[85] Dit gebeurt doordat de MSCs het omliggende weefsel stimuleert tot differentiatie naar tumorstromacellen.[119,120] Deze stimulatie komt voort uit de interactie tussen de MSCs en de bioscaffold en de chemische en fysische eigenschappen van deze scaffolds. Poreuze keramische scaffolds of collageenrijke scaffolds hebben namelijk een grotere invloed op het vormen van sarcomas.[85]

MSCs hebben de capaciteit om de stijfheid van de stroma matrix te "voelen" en interacties hierop uit te voeren, die tot het vrijkomen van bepaalde cytokines en andere factoren kan leiden.[121,122] Stijfheid van het materiaal speelt hierbij een belangrijke rol. Een stijver en dus minder biodegradeerbaar materiaal is moeilijker te vervormen door de MSCs, waardoor minder cytokines en groeifactoren vrijkomen. De kans op het ontstaan van een tumor is daarom kleiner dan bij slappere, reactievere biomaterialen, gebaseerd op collageen.[85] Collageen is de natuurlijke component van tumorstroma.[123] Het is dan ook niet verwonderlijk dat een collageenrijke scaffold sneller tot tumorgroei zal leiden.

11.2 Waar houden we rekening mee

Zoals eerder vermeld, is het gebruik van MSCs voor de klinische toepassing niet risico vrij. Het is daarom van belang deze risico's tot een minimum te verlagen om zo op een aannemelijke manier de veiligheid te kunnen garanderen.

- In de literatuur is te vinden dat MSCs 40 kweekpassages kunnen ondergaan zonder dat er zich problemen voor doen. In het LUMC in Leiden hebben ze 21 kweekpassages getest met een goed resultaat. Echter ander onderzoek toont aan dat er maximaal 5 tot 6 kweekpassages gedaan kunnen worden voordat er karyotypische afwijkingen ontstaan.[19, 20, 28] Om een aannemelijke veiligheid in te bouwen is het van belang dat MSCs een zo laag mogelijk, en daarom veiliger, aantal kweekpassages ondergaan. Voor dit onderzoek wordt dan ook uitgegaan van een maximum aantal van 2 kweekpassages.
- Tumorstrooming gebaseerd op de immunomodulatorische functie van de MSCs is moeilijk te controleren. Maar aangezien dit probleem een probleem op langere termijn is, zou de immunosuppressiva dosering verlaagd kunnen worden. Deze medicatie onderdrukt net als de MSCs het immuunsysteem, maar levert daarnaast vervelende bijwerkingen, zoals toxiciteit voor de EvL, infecties en tumorgroei.[111, 85] Het is echter belangrijk dat de dosering op de langere termijn pas verlaagd wordt, aangezien de immunosuppressie op de

korte termijn, vooral net na de transplantatie, heel belangrijk is om de afstotingreactie tegen te gaan.

- Om tumorstroma-differentiaties te voorkomen, zoals CAFs, is het van belang het weefsel waar de scaffold geplaatst wordt goed te onderzoeken op de aanwezigheid van (latente) tumoren.
- Aangetoond is dat MSCs zich kunnen differentiëren tot ongewenst weefsel en onder bepaalde fysiologische omstandigheden, zoals hoge druk en een grote MSC-MSC celhechting, weefselencapsulaties of cystes kunnen vormen. Om deze omstandigheden zoveel mogelijk te vermijden zullen de MSCs onder lage druk worden toegevoegd aan het scaffold, bijvoorbeeld door middel van pipetteren. Daarnaast zullen de MSCs vóór de transplantatie behandeld worden met trypsine om zo de MSC-MSC celhechting te verminderen en klontering te voorkomen.
- Tenslotte is het van belang dat de interacties tussen de MSCs en het scaffold, die tot tumorgroei zouden kunnen leiden, voorkomen worden. Dit houdt een correcte keuze van materialen in. Zo is een degradeerbaar biomateriaal dat niet zeer poreus is, maar vooral niet te snel degradeert, ideaal. De keuze van een poreuze, onstabiele hydrogel om de kanalen mee op te vullen levert dus een verhoogd risico. Maar omdat een hydrogel gebruikt wordt met zo weinig mogelijk verschillende polymeren, zal dit verhoogde risico mee vallen. Van belang is dat er niet al te veel cytokines en andere factoren los komen te zitten bij het degradatie proces. Daarnaast is het vermijden van een grote hoeveelheid aan collageen in de scaffold van belang. Het totaal uitsluiten van collageen is geen optie omdat collageen goed is voor de angiogenese. Een evenwicht hiertussen vinden is dus noodzakelijk.

Het concept model

Uit de randvoorwaarden hiervoor beschreven is het volgende dubbele golfplaatmodel ontstaan:

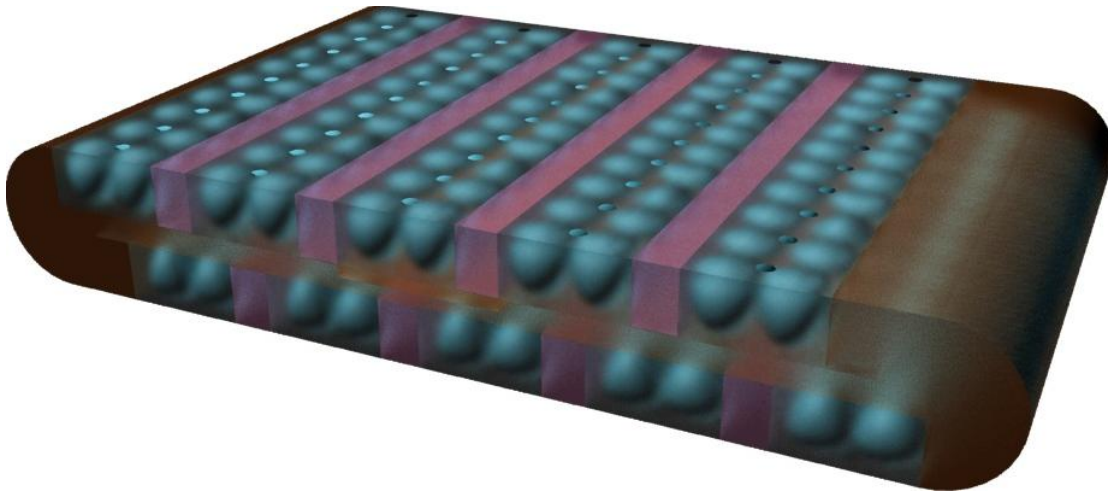


Fig. 29 eindconcept golfplaatmodel.

Materialen die gebruikt worden:

- De golfplaat structuur wordt gevormd uit een dunne polyactieve 4000PEOT30PBT70 film, die na het stretchen in 3D een gemiddelde dikte zal hebben van ongeveer 15 μm .
- De hydrogel tussen de golfplaten in en aan de zijkanten van het model bestaat uit twee componenten PLA (hydrofoob) en PEO (hydrofiel). Aan deze hydrogel wordt 4-PEO-SH toegevoegd wat zal gaan reageren. Na een paar minuten zal dit hard worden, binnen die paar minuten kan de scaffold worden dubbel geklapt zodat deze aan elkaar vast komen te zitten.
- Ook de hydrogel in de kanalen wordt gevormd uit de componenten PLA en PEO. Hieraan wordt echter geen 4-PEO-SH of radicalen toegevoegd waardoor een onstabiele, makkelijk te degraderen hydrogel ontstaat.

Poriën:

- Het copolymeer polyactieve 4000PEOT30PBT70 is een poreus materiaal met microporiën die variërend in grote zijn. De gemiddelde microporie grootte is niet bekend
- Om de revascularisatie mogelijk te maken zijn er zowel in de kanalen als in de lange bakken met eilandjes macroporiën van 40 μm gevormd.

Afstanden:

- De lange bakken met de eilandjes hebben een breedte van 300 μm en een hoogte van 150 μm de lengte ervan kan naar eigen wens bepaald worden, aangezien je de lengte zou kunnen verkorten door meer bakken naast elkaar te doen enz.
- De kanalen hebben een breedte van 100 μm en een hoogte van 150 μm . Hierin zou ruimte zijn voor ongeveer twee capillairen naast elkaar.
- De diffusielimiet van zuurstof is gemiddeld 200 μm , maar dit verschilt per medium. Door de hoge zuurstof opname door de EvL en andere diffusielimiterende omstandigheden is ervoor gekozen de diffusieafstand, die gehaald moet worden, te verlagen tot 150 μm .

Werking + Voordelen:

Dit golfplaatmodel biedt voordelen op een tal van gebieden. Zo stimuleert dit ontwerp op een gecontroleerde manier de revascularisatie. Doordat de MSCs zowel in de hydrogel tussen de kanalen als in de hydrogel tussen de twee golfplaten in zitten, zal de bloedvatgroei hierheen gestimuleerd worden. Door middel van de macroporiën in de kanalen zullen deze bloedvaten tot in de scaffold kunnen doordringen. Daarnaast is ervoor gekozen MSCs toe te voegen aan de lange bakken met EvL. Op deze manier zal niet alleen bloedvatgroei naar de EvL toe gestimuleerd worden, maar ook de bloedvatgroei binnen en vanuit de eilandjes. Door de macroporiën in de lange bakken is directe bloedvatgroei naar de EvL ook een mogelijkheid. Daarnaast biedt dit ontwerp een vergroot diffusieoppervlak per eilandje. Wat er toe zal leiden dat meer nutriënten en zuurstof het EvL zullen bereiken. Voor de afwerking van het model is gekozen voor een toevoeging van een afgeronde hydrogel laag aan de zijkanten. Aangezien dit ontwerp in het menselijk lichaam getransplanteerd zal worden moeten zoveel mogelijk geometrische vormen, die mogelijk irritatie of schade kunnen aanrichten, vermeden worden. Op dit moment zijn slechts de linker en rechter zijkant afgerond door een laag hydrogel, maar aan alle zijkanten is dit natuurlijk een mogelijkheid. (fig.30)

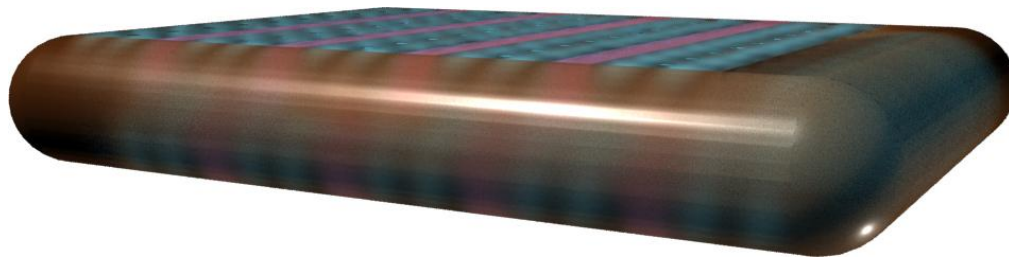


Fig. 30: eindconcept golfplaatmodel afronding aan alle zijkanten.

Grootte van het dubbele golfplaat model

De minimale hoeveelheid EvL die ingebracht moet worden om insuline onafhankelijkheid te verkrijgen bij een injectie in de poortader is 10.000 eilandjes per kilogram (IEQ/kg).[124-126] Wanneer wordt uitgegaan van een persoon van 100kg zijn er 1×10^6 eilandjes nodig die geïmplanteerd moeten worden. In de praktijk heeft het eilandjes transplantaat gemiddeld een volume van 4ml. Wanneer met de eerder gekozen afmetingen ($B=300\mu\text{m}$, $D=150\mu\text{m}$, $K=100\mu\text{m}$ en $Z=2$) de versimpelde formule gegeven in bijlage 1 wordt ingevuld, komt er een scaffold oppervlakte van 178 cm^2 uit. Eerder is al aangegeven dat met het gebruik van MSCs tot 30% minder eilandjes nodig zouden kunnen zijn om vergelijkbare resultaten te bereiken. Dit zou voor de scaffold grootte in theorie betekenen dat een oppervlakte van 125 cm^2 voldoende zou zijn om insuline afhankelijkheid te verkrijgen. In de praktijk zal de grootte van het implantaat altijd bepaald worden door de hoeveelheid beschikbare EvL, aangezien deze veel groter zijn dan de andere structuren binnen de scaffold. Aan de hand van de hier boven genoemde redeneringen kan er vanuit worden gegaan dat het dubbele golfplaten ontwerp in de praktijk een oppervlak zal hebben van $125\text{-}180 \text{ cm}^2$. Dit komt neer op een grootte van 10cm bij 12,5-18cm bij 0,4cm.

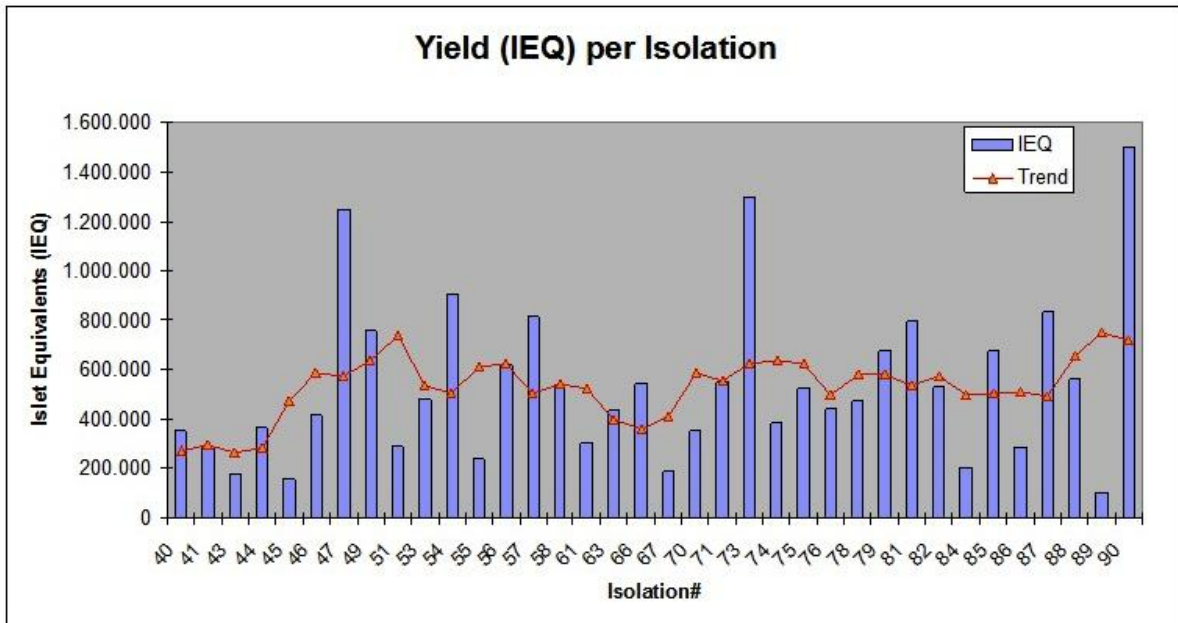


Fig. 31: Hoeveelheid verkregen EvL per isolaat.

Op dit moment is het gebruikelijk complete transplantaten weg te gooien wanneer er minder dan 600.000 bruikbare eilandjes uit verkregen kunnen worden. Dit wordt gedaan omdat elk los implantaat zorgt voor een extra HLA-type waardoor de kans op afstoting toeneemt en omdat de kwaliteit van zo'n implantaat waarschijnlijk laag is. Het grootste voordeel van het golfplaatmodel in combinatie met de EvL en de MSCs is dan ook de reductie van de benodigde EvL. Hierdoor zullen in de toekomst meer patiënten geholpen kunnen worden. Door MSCs toe te voegen in dit ontwerp is het, zoals eerder genoemd, een mogelijkheid om minder EvL te transplanteren voor een vergelijkend effect. Wanneer tot 30% minder eilandjes getransplanteerd zouden kunnen worden voor een gelijkend resultaat, kan de grens tussen een klinisch bruikbaar en onbruikbaar isolaat naar beneden worden geschoven. Wat zou betekenen dat een isolaat van bijvoorbeeld 450.000 eilandjes klinisch bruikbaar wordt.

Locatie

Het vaten systeem binnen de lever wordt als huidige behandelpaats gebruikt, deze blijkt echter verre van ideaal vanwege de sterke immunoreactie tegen de eilandjes en een grote hoeveelheid toxische stoffen in de omgeving. Ondanks een dubbele bloedtoevoer naar de lever, namelijk via de arteria hepatica en de vena portae, is de zuurstofdruk in de lever aanzienlijk lager dan die van de pancreas.[127]

In dit onderzoek wordt verder niet in gegaan op wat de beste plaats zou kunnen zijn voor een scaffold. Het advies in het MDO uit 2009 wordt overgenomen. Daarin wordt gesteld dat de spier, het omentum en de voorste oogkamer het beste voldoen aan de ideale omgevingsomstandigheden voor de optimalisatie van de overleving van de EvL. Alle drie de plaatsen zijn voorzien van een goede vascularisatie en de scaffold zou minimaal invasief ingebracht kunnen worden. Omdat het hierboven voorgestelde scaffold gemiddeld een grootte heeft van 10 x 15 x 0,4 cm, vallen het oog en de spier af als implantatie locatie. Het omentum zou eventueel een optie kunnen zijn.

Het omentum

Het omentum bestaat uit een dubbele laag peritoneum en heeft een mobiele structuur die aan de grote curvatuur van de maag en het colon transversum hangt. Het omentum is rijk gevasculariseerd, biedt goede omstandigheden voor revascularisatie en heeft een sterke weerstand tegen infecties. De bloedvoorziening komt voornamelijk vanuit de linker en rechter arteria gastro-epiploica, die samen een arcade vormen langs de grote curvatuur van de maag. De grote vaten in het omentum komen uit de gastro-epiploische arcade, deze splitsen zich op en komen aan de onderrand van het omentum weer samen in een arcade. Naast de goede vascularisatie, insuline afgifte in de vena portae en de weerstand tegen infecties is de hoeveelheid ruimte in het omentum natuurlijk een groot voordeel.[128]

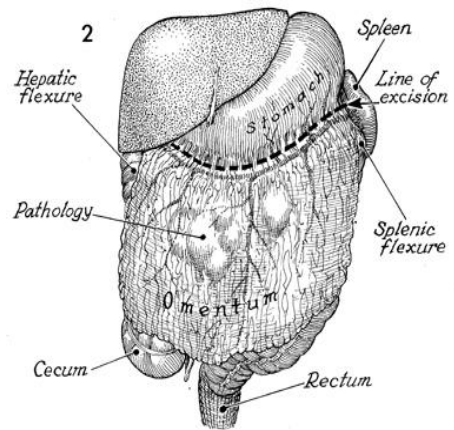


Fig. 31 het omentum

Onder de huid

De mogelijkheid bestaat om de scaffold in meerdere stukken op te delen en op verschillende plaatsen onderhuids te transplanteren. Onderhuidse transplantatie zal naar verwachting beter functioneren wanneer de scaffold niet dubbel is. Dit komt vanwege de vascularisatie die onderhuids voornamelijk van een kant komt. Het nadeel hiervan is echter dat de scaffold op die manier twee keer zo groot wordt. Plaatsen onder de huid waar aan gedacht kan worden zijn, de rug, de billen, de benen, de borst en de armen.

Conclusie

Dit onderzoek is gericht op het gebruik van MSCs bij een EvL transplantatie buiten de bloedbaan. Hierbij is ingegaan op de voordelen die MSCs kunnen bieden en hoe deze voordelen in de praktijk te brengen zijn. De eerste conclusie die uit het onderzoek volgt is dat het mogelijk is om met MSCs de EvL transplantatie, buiten de bloedbaan, te verbeteren.

Over de voordelen die MSCs kunnen bieden kan specifiek geconcludeerd worden dat MSCs de revascularisatie kunnen stimuleren en de immuunreactie moduleren. MSCs stimuleren revascularisatie door: het uitscheiden van VEGF-A, het stimuleren van de EC migratie, het afbreken van ECM door proteases en doordat MSCs in staat zijn te differentiëren tot vasculaire ECs. Door de activiteit van de DCs, macrofagen en NK cellen te verlagen spelen de MSCs een belangrijke rol in de onderdrukking van de aangeboren immuunreactie. De adaptieve immuunreactie wordt door vermindering van de T-cel en B-cel proliferatie door de MSCs onderdrukt. Uit literatuur onderzoek en praktijk ervaringen blijkt echter dat het gebruik van MSCs risico's met zich mee brengt, maar mits een aantal veiligheidsvoorwaarden in acht worden genomen mag het gebruik hiervan als veilig worden beschouwd.

Het gebruik van een dubbele golfplaat scaffold biedt een goede en praktische oplossing voor transplantatie van de EvL en de MSCs buiten de bloedbaan. In het model wordt rekening gehouden met de beperkte diffusie, zeker buiten de bloedbaan, door de afstand tot de bloedbaan klein te houden. Verder zitten in het golfplaatmodel kanalen waardoor zowel de diffusie als de revascularisatie van meerdere kanten mogelijk is. Het model biedt tevens de mogelijkheid om op meerdere plaatsen, ten opzichte van de EvL, MSCs toe te voegen. Doordat de gekozen materialen op het moment al gebruikt worden en ze goedgekeurd zijn voor gebruik in mensen, zullen deze geen belemmering opleveren voor het gebruik in onderzoek en in de kliniek. Met de gekozen materialen kan een structuur gemaakt worden waarin zowel microporiën (voor diffusie) als macroporiën (voor revascularisatie) aanwezig zijn.

In het verslag zijn twee onderzoeksvoorstellen gedaan. Ten eerste wordt er voorgesteld onderzoek te doen naar de minimale afstand die aanwezig moet zijn tussen de macroporiën om een mechanisch stabiel product te behouden. Als dit onderzoek gedaan is kan er een scaffold gemaakt worden waarmee het mogelijk is te onderzoeken wat de beste plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL is en welke verdelingsverhouding het beste resultaat oplevert.

Als eindconclusie kan gegeven worden dat door het toevoegen van MSCs en gebruik van het dubbele golfplaatmodel de overleving van de EvL, na transplantatie buiten de bloedbaan, bevorderd zou kunnen worden. Wanneer de preklinische onderzoeken voltooid zijn en het golfplaat model in de kliniek toegepast kan worden zullen er minder EvL nodig zijn per patiënt om normoglycemie te bereiken. Hierdoor wordt het mogelijk om meer pancreata te gebruiken doordat verlaging van de bruikbaarheids limiet (op dit moment 600.000 functionele EvL) mogelijk wordt. Ook zijn er wellicht minder donor pancreata per patiënt nodig. Dit alles zou ertoe leiden dat er meer patiënten geholpen kunnen worden bij een EvL transplantatie.

Discussie en Aanbevelingen

Extracellulaire matrix (ECM)

In het golfplaatmodel is er bewust voor gekozen het model zo 'clean' en simpel mogelijk te houden. Zodat de positieve eigenschappen van de MSCs goed tot hun recht kunnen komen. Er zijn echter een hoop extra toevoegingen die gedaan zouden kunnen worden ter verbetering van het ontwerp. Denk bijvoorbeeld aan de toevoeging van ECM, uit meerdere onderzoeken blijkt namelijk dat de afbraak hiervan door de MSCs een positief effect heeft op de angiogenese. En zo kunnen er nog veel meer mogelijke toevoegingen genoemd worden. Dit zijn allemaal leuke extra's die later kunnen worden toegevoegd. In dit onderzoek hebben we ons gericht tot de basis, zoals o.a. goede diffusie en revascularisatie mogelijkheden, veiligheid en de plaatsbepaling van de MSCs binnen dit model.

Instant Blood Mediated Immune Response (IBMIR)

De IBMIR is een van de grootste problemen bij de transplantatie binnen de bloedbaan, maar omdat er in dit onderzoek sprake is van transplantatie buiten de bloedbaan, kunnen we niet van een IBMIR spreken. Ook buiten de bloedbaan vindt echter een soortgelijke reactie plaats. Er wordt vanuit gegaan dat het hierbij zal gaan om een veel mildere immunoreactie omdat de immunologische cellen en componenten niet direct en in grote getallen aanwezig zullen zijn. Bij het onderzoek is van deze mildere immunoreactie uitgegaan, maar of dit ook werkelijk het geval is, en hoe mild deze reactie is, zal alleen na praktijk onderzoek duidelijk worden.

Immuunsuppressiva

De huidige doelgroep die in aanmerking komt voor een EvL transplantatie zijn mensen die al een niertransplantatie hebben gehad of ervoor in aanmerking komen. Deze groep mensen zullen daarom al immuunsuppressiva gebruiken om de afstoting van de nier tegen te gaan. Zoals eerder besproken hebben immuunsuppressiva grote nadelen. Eerder is besproken dat MSCs mogelijk kunnen leiden tot immuuntolerantie van het transplantaat. Hierdoor zou eventueel in de toekomst overwogen kunnen worden om alleen in het begin immuunsuppressiva te gebruiken. Wanneer er echter sprake is van een niertransplantatie zal dit moeilijk blijven. Wel zou er in dat geval makkelijker overwogen kunnen worden om een EvL transplantatie uit te voeren, bij mensen die een verhoogd risico lopen in de toekomst een niertransplantatie te moeten ondergaan. Dit zou voorkomen kunnen worden door middel van een EvL transplantatie.

Veiligheid van het gebruik van MSCs bij de transplantatie

In ons onderzoek wordt er vanuit gegaan dat het gebruik van MSCs, onder bepaalde voorwaarden, als veilig mag worden aangenomen. Maar omdat het gebruik van MSCs in de klinische praktijk nog vrij nieuw is, is er nog een hoop mysterie rond deze cellen. In de toekomst zou daarom alsnog kunnen blijken dat het gebruik van MSCs te grote risico's met zich mee brengt voor het gebruik in de klinische praktijk. Op dit moment wordt er echter vanuit gegaan dat de mogelijke voordelen, zwaarder wegen dan de mogelijke nadelen.

Gebruikte referenties

Alle onderzoeken waarbij EvL en MSCs tezamen getransplanteerd zijn, zijn getest op dieren. Het valt daarom te bediscussiëren of soortgelijke resultaten ook bij mensen bereikt zullen worden. Aangezien dieren bijvoorbeeld een afwijkende immunoreactie hebben vergeleken met de mens.

Desalniettemin zijn er wel positieve resultaten gevonden voor transplantatie van EvL buiten de bloedbaan. Ook is er een angiogene en immunologische werking van MSCs aangetoond bij mensen.

Prevascularisatie:

Prevascularisatie betekent dat angiogenese wordt toegepast voordat de scaffold met EvL in het lichaam wordt getransplanteerd. Er valt over te twisten welke type prevascularisatie het meest effectief is. Men onderscheidt 2 vormen van prevascularisatie: in vivo en in vitro. Bij in vitro prevascularisatie wordt bij de scaffold in kweekmedium vaatgroei gestimuleerd. Een netwerk van bloedvaten groeit dan langzaam om en door de scaffold heen. Daarna wordt het geheel in het lichaam geïmplant. Het idee is dat lichaamseigen bloedvaten met deze bloedvaten gaan vergroeien. Een andere mogelijkheid is prevascularisatie in het lichaam, oftewel in vivo prevascularisatie. In dit geval wordt een materiaal van ongeveer dezelfde grootte als de scaffold in het lichaam gebracht. Hier zullen vervolgens bloedvaten en capillairen omheen gaan groeien. Later wordt het materiaal verwijderd en wordt de scaffold hiervoor in de plaats geschoven. Beide mogelijkheden bieden voordelen op het gebied van revascularisatie. In het onderzoek is echter weinig aandacht besteed aan dit onderwerp. Wij raden dan ook aan deze optie tijdens een vervolgonderzoek verder uit te diepen.

Plaatsbepaling van MSCs:

In het onderzoek wordt een onderzoeksvoorstel gedaan om de ideale plaats van de MSCs ten opzichte van de EvL te bepalen. Er wordt verwacht dat de immunoreactie in vergelijkbare mate gedempt zal worden bij zowel systemische als lokale toediening van de MSCs. De angiogene stimulerende functie van de MSCs zal bij lokale aanwezigheid beter tot zijn recht komen dan tijdens systemische toediening. Er valt dan ook te betwijfelen of het systemisch toedienen van de MSCs een verstandige keuze is. Aan de ene kant is het natuurlijk minimaal invasief, maar aan de andere kant kunnen MSCs die systemisch worden toegediend beginnende of latente tumoren tot versnelde tumorgroei stimuleren. Er zitten dus wel enige risico's aan verbonden. Desalniettemin zijn er in onderzoeken goede resultaten behaald door middel van het systemisch toedienen van MSCs. Daarnaast speelt de invasiviteit van de toediening van de MSCs in dit geval geen rol. Aangezien de MSCs in de scaffold mee getransplanteerd worden. Vanwege de grote onduidelijkheid omtrent dit onderwerp, zal onderzoek hiernaar uitkomst moeten bieden.

Hydrogel en de PH waarde

De hydrogel die wordt toegepast bezit polylactide wat tijdens de degradatie tot afgifte van melkzuur deeltjes leidt. Een daling van de PH waarde, in de scaffold en het omliggende weefsel, is hiervan het gevolg. Deze PH daling kan schade aan de EvL veroorzaken. Aangezien de hydrogel in de kanalen redelijk snel degradeert, binnen een week, is het mogelijk dat er een ophoping van melkzuur ontstaat wat tot problemen kan leiden. Echter is er toch voor gekozen gebruik te maken van deze hydrogel aangezien de kanalen in direct contact liggen met het omringende weefsel, waardoor er een goede stofwisseling plaatsvindt en de melkzuur deeltjes gemakkelijk weg kunnen bij de scaffold.

Hoeveelheid MSC:

Naast de optimale locatie, is de verhouding van de MSCs ten opzichte van de EvL ook een belangrijke variabele. Een tekort aan MSCs zou tot verminderde resultaten kunnen leiden. Daarentegen zou een overschot aan MSCs de besproken risico's bij MSC gebruik juist kunnen

verhogen. Bij systemisch toediening wordt gemiddeld 1-2 miljoen MSCs/Kg gebruikt. In dit onderzoek wordt verder weinig aandacht besteed aan de exacte hoeveelheid die noodzakelijk is bij locale toediening. Wel is er geconcludeerd dat met een gering aantal MSCs lokaal aanwezig toch goede resultaten behaald kunnen worden. Dit volgt uit de positieve resultaten bij systemische toediening, waarbij slechts een klein deel van de MSCs migreert naar het doelweefsel.

In vitro en vivo onderzoek:

In de praktijk zijn er altijd nog meer factoren aanwezig die een effect hebben op het model, waar in eerste instantie niet meteen aan gedacht is. Het is daarom belangrijk dat het golfplaatmodel allereerst in vitro getest wordt zodat met enige zekerheid kan worden gesteld dat het ontwerp veilig genoeg is en de overleving en functie van de EvL inderdaad bevordert en niet belemmert wordt. Wanneer het model optimaal functioneert in vitro, kan de overstap gemaakt worden naar een in vivo onderzoek. Tijdens dit onderzoek zal blijken of de conclusies, die door ons getrokken zijn op basis van literatuur onderzoek, ook daadwerkelijk in de praktijk gebeuren. Naar aanleiding van het in vivo onderzoek kunnen eventuele aanpassingen gedaan worden..

Referenties

- [1] Rubin, E., et al., Rubin's Pathology, in Clinicopathologic Foundations of Medicine. 2005, Lipincott Williams and Wilkins. P. 1174-1177.
- [2] Parham, P., The immune system 2005, Garland Science Publishing. P. 30-3,343-345, 350-351
- [3] Moldovan, S. and F.C. Brunicardi, Endocrine Pancreas: summary of observations generated by surgical fellows. World of Journal Surgery, 2001(25): p. 468-473.
- [4]<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/329670/islets-of-Langerhans>
- [5] Boron, W.F. and E.L. Boulpaep, Medical Physiology. 2005, Elsevier Saunders. P. 1066-1068.
- [6] Kumar and Clark, Clinical Medicine. 2002, W.B. Saunders. P. 1084, 1093.
- [7] Gevolgen van diabetes, Diabetes Fonds, versie d.d. 2008
- [8] Mueller N.J., New immunosuppressive strategies and the risk of infection. 2008 Dec; 10(6): 379- 384.
- [9] Scherer M.N., Banas B., Mantouwalou K., Schnitzbauer A., Obed A., Krämer B.K., Schlitt H.J., Current concepts and perspectives of immunosuppression in organ transplantation. 2007 Sep;392(5):511-23.
- [10] Shapiro J., M.B., Lakey J.R.T., PH.D., Ryan E.A., M.D., Korbitt G.S., PH.D., Toth E., M.D., Warnock G.L., M.D., Kneteman N.M., M.D., Rajotte R.V., PH.D., Islet Transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. The New England Journal of Medicine, 2000. 343(4).
- [11] Maria Ester Bernardo, Franco Locatelli, and Willem E. Fibbe, Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Treatment Modality for Tissue Repair, 2009.
- [12] Caplan A I, The mesengenic process *Clin. Plast. Surg.* 1994, 21 429–35
- [13] SuK-Kee Tae, SeoK-Hyn Lee, Jae-SiK Park and Gun-Il Im, Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine, 2006.
- [14] Kopen G C, Prockop D J and Phinney D G, Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, 1999, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 10711–6.
- [15] Reyes M and Verfaillie, Turning marrow into brain: generation of glial and neuronal cells from adult bone marrow mesenchymal stem cells, 1999 *Blood* 94 377a.
- [16] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G and Mavilio, Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, 1998 *Science* 279 1528–30.
- [17] Y. Li, S. Chen, J. Yuan, Y. Yang, J. Li, J. Ma, X. Wu, M. Freund, K. Pollok, H. Hanenberg, W. S. Goebel, F.-C. Yang. Mesenchymal stem/progenitor cells promote the reconstitution of exogenous hematopoietic stem cells in Fancg^{-/-} mice in vivo. 2009 *Blood* 113:10, 2342-2351.

- [18] London, N. J., Robertson, G. S., Chadwick, D. R., Johnson, P. R., James, R. F., Bell, P. R. Human pancreatic islet isolation and transplantation. 1994 *Clin. Transplant.* 8, 421–459.
- [19] Van der Windt, D. J., Bottino, R., Casu, A., Campanile, N., and Cooper, D. K. Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. 2007 *Xenotransplantation* 14, 288–297.
- [20] Moberg, L., the role of the innate immunity in islet transplantation. *Upsala Journal of Medical Science*, 2005(110): p.17–56.
- [21] MOBERG Lisa, The role of the instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) in clinical islet transplantation : Identification of possible inhibitors for clinical use, 2004.
- [22] Ingber, D.E., and Folkman, J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* 58, 803, 1989.
- [23] Henderson JR, Moss MC. A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas. *Q J Exp Physiol* 1985; 70: 347.
- [24] Kuroda M, Oka T, Oka Y, et al. Colocalization of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) and insulin in pancreatic islet cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3196.
- [25] Konstantinova I, Lammert E: Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays* 2004, 26:1069–1075.
- [26] Konstantinova I, Lammert E: Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays* 2004, 26:1069–1075.
- [27] Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A: The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:2334–2339.
- [28] Suckale J, Solimena M: Pancreas islets in metabolic signaling focus on the beta-cell. *Front Biosci* 2008, 13:7156–7171.
- [29] Mattsson G, Carlsson PO, Olausson K, et al. Histological markers for endothelial cells in endogenous and transplanted rodent pancreatic islets. *Pancreatology* 2002; 2: 155.
- [30] Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC: Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor—a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* 55:2974–2985, 2006.
- [31] Carlsson PO, Liss P, Andersson A, et al. Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes* 1998; 47: 1027.
- [32] Giuliani M, Moritz W, Bodmer E, Dindo D, Kugelmeier P, Lehmann R, Gassmann M, Groscurth P, Weber M: Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia. *Cell Transplant* 14:67–76, 2005.
- [33] Olsson R, Carlsson PO. Oxygenation of cultured pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol* 2006; 578:263–268.
- [34] Martin Y, Vermette P: Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 2005, 26:7481–7503.
- [35] Jansson L, Carlsson PO. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* 2002; 45: 749.

[36] Contreras JL, Smyth CA, Eckstein C, Bilbao G, Thompson JA, Young CJ, Eckhoff DE: Peripheral mobilization of recipient bone marrow-derived endothelial progenitor cells enhances pancreatic islet revascularization and engraftment after intraportal transplantation. *Surgery* 134:390–398, 2003.

[37] Miller R, Cirulli V, Diaferia GR, Ninniri S, Hardiman G, Torbett BE, Benezra R, Crisa L: Switching-on survival and repair response programs in islet transplants by bone marrow-derived vasculogenic cells. *Diabetes* 57:2402–2412, 2008.

[38] Carlsson PO, Mattsson G. Oxygen tension and blood flow in relation to revascularization in transplanted adult and fetal rat pancreatic islets. *Cell Transplant* 2002; 11: 813.

[39] Mattsson G, Carlsson PO, Olausson K, et al. Histological markers for endothelial cells in endogenous and transplanted rodent pancreatic islets. *Pancreatology* 2002; 2: 155.

[40] Marcela Brissova¹ and Alvin C. Powers, Revascularization of Transplanted Islets: Can It Be Improved?.

[41]Brissova M, Powers AC. Revascularization of transplanted islets: Can it be improved? *Diabetes* 2008; 57: 2269.

[42]Taihei Ito, Shin Itakura, Ivan Todorov, et al. Mesenchymal Stem Cell and Islet Co-Transplantation Promotes Graft Revascularization and Function. *Transplantation* • Volume XX, Number XX, Month XX, 2010.

[43]Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, et al. Bone marrow (BM) transplantation promotes beta-cell regeneration after acute injury through BM cell mobilization. *Endocrinology* 2007; 148: 2006. 11.

[44] Choi JB, Uchino H, Azuma K, et al. Little evidence of transdifferentiation of bone

marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003; 46: 1366. 12.

[45] Lechner A, Yang YG, Blacken RA, et al. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes* 2004; 53: 616.

[46] Martens TP, See F, Schuster MD, et al. Mesenchymal lineage precursor cells induce vascular network formation in ischemic myocardium. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3(suppl 1): S18.

[47] Ingber, D.E., and Folkman, J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* 58, 803, 1989.

[48]Brunt KR, Hall SR, Ward CA, et al. Endothelial progenitor cell and mesenchymal stem cell isolation, characterization, viral transduction. *Methods Mol Med* 2007; 139: 197.

[49] Johansson U, Elgue G, Nilsson B, et al. Composite islet-endothelial cell grafts: A novel approach to counteract innate immunity in islet transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 2632.

[50] Zacharek A, Chen J, Cui X, Li A, Li Y, Roberts C, Feng Y, Gao Q, Chopp M: Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/FIk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1684–1691, 2007.

[51] Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. 2006. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells* 24:2346–2354.

[52] Thomas P. Lozito, Juan M. Taboas, Catherine K. Kuo, and Rocky S. Tuan, Mesenchymal Stem Cell Modification of Endothelial Matrix Regulates Their Vascular

Differentiation, 2009; Journal of Cellular Biochemistry 107: 706-713.

[53] Ulrika Johansson, Ida Rasmusson, Simone P. Niclou, Naomi Forslund, Linda Gustavsson, Formation of Composite Endothelial Cell-Mesenchymal Stem Cell Islets, 2008; diabetes, vol 57.

[54] Bottino, R., Fernandez, L. A., Ricordi, C., Lehmann, R., Tsan, M. F., Oliver, R., Inverardi, L. Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. 1998 *Diabetes* 47, 316–323.

[55] Mandrup-Poulsen, T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. 1996 *Diabetologia* 39, 1005–1029.

[56] Bendtzen, K., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Nielsen, J. H., Dinarello, C. A., Svenson, M. Cytotoxicity of human p17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. 1986 *Science* 232, 1545–1547.

[57] Delaney, C. A., Green, M. H., Lowe, J. E., Green, I. C. Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the 'comet' assay. 1993 *FEBS Lett.* 333, 291–295.

[58] June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. & Thompson, C. B., *Immunol. Today* 15, 1998, 321-331.

[59] Freedman, A. S., Freeman, G. J., Rhyndhart, K & Nadler, L. M. *Cell. Immunol.* 137,1991, 429-437.

[60] Kennedy, M. K., Mohler, K. M., Shanebeck, K. D., Baum, P. R. Picha, K S., Otten-Evans, C. A., Janeway, C. A., Jr., & Grabstein, K. H. *Eur. J. Immunol.* 24, 1994,116-123.

[61] Damle, N. K., Klussman, K, Leytze, G. & Linsley, P. S. *J. Immunol.* 150, 1993, 726-735.

[62]. Nickloff, B. J. & Turka, L. A., *Immunol. Today* 15,1994,464-469.

[63] David C.Parker. Dale L. Greinert, Nancy E. Phillips, Michael c. Appelt, Alan W. Steele, Survival of Mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand, 1995.

[64] Sale GE, Storb R: Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog: evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 11:961–966, 1983.

[65] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821–2827.

[66] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–1822.

[67] Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006;107:1484–1490.

[68] Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006;24:74–85.

[69] Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassonni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells* 2007;25:1753–1760.

[70] Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516–525.

[71] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Riso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006;107:367–372

[72] M. Figliuzzi, R. Cornolti, N. Perico, C. Rota, M. Morigi, G. Remuzzi, A. Remuzzi, and A. Benigni, Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Islet Graft Function in Diabetic Rats, 2009; Transplantation proceedings 41, 1797-1800.

[73] Mario G. Solari, Suganya Srinivasan, Imene Boumaza, Jignesh Unadkat, George Harb, Adolfo Garcia-Ocana, Maryam Feili-Hariri, Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet allograft survival and sustained normoglycemia, 2009; *Journal of autoimmunity* 32, 116-124.

[74] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6: 1282–6.

[75] Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001;29: 244–55.

[76] Pochampally RR, Neville BT, Schwartz EJ, Li MM, Prockop DJ. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9282–5.

[77] Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006;108:2114–20.

[78] Picinich SC, Mishra PJ, Glod J, et al: The therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell- & tissue-based therapy. Expert Opin Biol Ther* 7:965, 2007.

[79] Darwin J. Prockop and Scott D. Olson, Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions, 2007; by The American Society of Hematology.

[80] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 2002;62:3603-3608.

[81] Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* 2003; 102:3837-3844.

[83] Li, J. et al. Functional inactivation of EBV-specific T-lymphocytes in nasopharyngeal carcinoma: implications for tumor immunotherapy. 2007 *PloS ONE*, 2, e1122.

[84] Vence, L. et al. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. 2007 *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 20884–20889.

- [85] Roberta Tasso, Andrea Augello, Michela Carida, Fabio Postiglione, Maria Grazia, Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stem cells seeded onto Bioscaffolds, 2009; *Carcinogenesis* vol, 30.1 pp. 150-157.
- [86] Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 2009;69:1255–1258.
- [87] Eric N. Momin, B.A., Guillermo Vela, B.A. Hasan A. Zaidi, B.S., and Alfredo Quinones Hinojosa, M.S., The Oncogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Cancer: Directions for Future Research, 2010; *Curr Immunol Rev.* 6(2): 137-148.
- [88] Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 1999;21:115–118.
- [89] Vaziri H, Squire JA, Pandita TK, Bradley G, Kuba RM, Zhang H, Gulyas S, Hill RP, Nolan GP, Benchimol S. Analysis of genomic integrity and p53-dependent G1 checkpoint in telomerase-induced extended-life-span human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999;19:2373–2379.
- [90] Rubio, D. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. 2005, *Cancer Res.*, 65, 3035–3039.
- [91] Zhou, Y.F., Bosch-Marce, M., Okuyama, H., Krishnamachary, B., Kimura, H., Zhang, L., Huso, D.L., Semenza, G.L., Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. 2006, *Cancer Res.* 66, 10849–10854.
- [92] Aguilar, S., Nye, E., Chan, J., Loebinger, M., Spencer-Dene, B., Fisk, N., Stamp, G., Bonnet, D., Janes, S.M., Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. 2007, *Stem cells* 25, 1586–1594.
- [93] Tolar, J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. 2007, *Stem Cells*, 25, 371–379.
- [94] Miura, M. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. 2006, *Stem Cells*, 24, 1095–1103
- [95] Tlsty TD. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol* 2001;11:97–104.
- [96] Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008;68:4331–4339.
- [97] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335–348.
- [98] Martin Breitbach, Toktam Bostami, Wilhelm Roell, Ying Xia, Oliver Dewald, Jens M. Nygren, Jochen W.U. Fries, Klaus Tiemann, Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts.
- [99] Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36: 585-97.
- [100] Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-75.
- [101] In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-Van der Keur C, Kruisselbrink AB,

Van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;88:845-52.

[102] H. Roelofs en W.E. Fibbe, *Ned Tijdschr Hematol*, Klinische toepassingen van mesenchymale stamcellen bij hematopoëtische stamceltransplantatie, 2005;2(1): 3-7

[103]<http://www.lumc.nl/home/0001/12556/19997/1004270324043257>

[104] Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H *et al.* Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc* 2007; 39: 573–576.

[105] Ki-Soo Park, Young-Seok Kim, Jae-Hyeon Kim, Bongkum Choi, Sa-Hyun Kim, Alice Hyun-Kyung Tan, Trophic Molecules Derived From Human Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival, Function, and Angiogenesis of Isolated Islets After Transplantation, 2010.

[106] S.Itakura, S. Asari, J.Rawson, T. Ito, I.Todorov, C.-P. Liu, N.Sasaki, F. Kandeel and Y. Mullen, Mesenchymal Stem Cells Facilitate the Induction of Mixed Hematopoietic Chimerism and Islet Allograft Tolerance without GVHD in the Rat, 2006

[107] Dunn JCY, Chan W-Y, Cristini V, Kim JS, Lowengrub J, Singh S, et al. Analysis of Cell Growth in Three-Dimensional Scaffolds. *Tissue Engineering* 2006;12(4):705-716.

[108] Ko HCH, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues - The vascularisation problem. *Eur Cells Mater* 2007 Jul-Dec;14:1-18.

[109] Malda J, Klein TJ, Upton Z. The roles of hypoxia in the In vitro engineering of tissues. *Tissue Engineering* 2007 Sep;13(9):2153-2162.

[110] Mijke Buitinga, Interview: eierdoos model, zie bijlag 3. 17-06-2010: Zuidhorst Universiteit Twente

[111] Mijke Buitinga, master eind opdracht: Nano-engineered microchips for extrahepatic islet of Langerhans transplantatie. Universiteit Twente 2009; 34-35

[112] Dr. Dijkstra, P.J., Interview: hydrogel, zie bijlag 2. 17-06-2010: docent van het vak

Biomaterialen studie Technische Geneeskunde, werkzaam op de afdeling polymer chemistry and biomaterials Universiteit Twente.

[113] Kuen Yong Lee and David J. Mooney. *Hydrogels for Tissue Engineering*. Volume 101, number 7 July 2001.

[114] Sachlos E, Czernuszka JT. Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds *European Cells & Materials Journal* 2003;5:29-40.

[115] Jin Woo Lee, Yun Hee Kim, Ki Dong Park, Kyung Soo Jee, Jung Woog Shin, Soo Bong Hahn, Importance of integrin b1-mediated cell adhesion on biodegradable polymers under serum depletion in mesenchymal stem cells and chondrocytes, 2004.

[116] C.X.F. Lam, X.M. Mo, S.H. Teoh, D.W. Hutmacher, Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer, 2002.

[117]<http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning>

[118] Buddy D. Ratner, Ph.D., *Biomaterials Science*, 2nd edition 2004.

[119] Yamada, K.M. et al. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, 2007,130, 601–610.

- [120] Fischbach, C. et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat. Methods*, 2007,4, 855–860.
- [121] Pelham, R.J. Jr et al. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 13661–13665.
- [122] Paszek, M.J. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. 2005. *Cancer Cell*, 8, 241–254.
- [123] Tomkiewicz, B. et al. Interaction of endosialin/TEM1 with extracellular matrix proteins mediates cell adhesion and migration. 2007, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 17965–17970.
- [124] Berney, T., et al., Immunosuppression for Pancreatic Islet Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 2004(36): p. 362S-366S.
- [125] Narang, A.S. and R.I. Mahato, Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. *Pharmacol. Rev.*, 2006(58): p. 194-243.
- [126] Reffet, S. and C. Thivolet, Immunology of pancreatic islet transplantation. *Diabetes Metab*, 2006(32): p. 523-5
- [127] Merani, S., et al., Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *British Journal of Surgery*, 2008(95): p. 1449-1461
- [128] K. Huisman, J.H.F. Schutten, P.L. Stegehuis en J. Boijmans, MDO opdracht 'Een nieuwe behandeling voor Diabetes Mellitus type 1' 2009, Universiteit Utrecht.

Bijlagen

1. Formule voor het berekenen van de scaffold grootte
2. Samenvatting interview Piet Dijkstra
3. Samenvatting interview Mijke Buitinga
4. Begrippenlijst
5. Methode

Bijlage 1. Formule voor het berekenen van de scaffold grootte

De oppervlakte van het scaffold is te berekenen met de volgende formule:

$$(siB + skB) * \frac{V}{iB * iD} * \frac{1}{Z}$$

V = Het volume dat in de scaffold moet passen

iB = Breedte van het inhoudscompartiment

iD = Diepte van inhoudscompartiment

sD = scaffold diepte

siB = Breedte van scaffold rondom inhoudscompartiment

skB = Breedte van scaffold van het kanaal deel

sL = minimale lengte scaffold, wanneer er 1 rij zou zijn

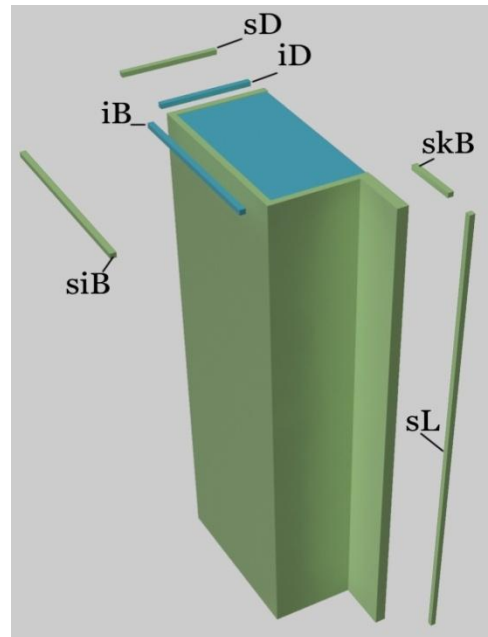
Z = het aantal zijden (1 of 2)

In de berekening wordt er van uitgegaan dat er sprake is van 1 hele lange kolom. In werkelijkheid zullen er meerdere kolommen naast elkaar zitten.

Wanneer de dikte van de polymeer waarvan het scaffold gemaakt wordt onbekend is kan ervoor gekozen worden om deze afstand te verwaarlozen. De waarde siB kan dan gelijkgesteld worden aan iB. Wanneer de dikte van de polymeerlaag wel bekend is: $siB = iB + (2 * \text{dikte polymeerlaag})$.

Een versimpelde versie van deze formule, waarbij alleen rekening gehouden wordt met het aantal zijden ($Z = 1$ of 2), de diepte (D) en breedte (B) van het EvL compartiment, het volume (V) EvL dat erin moet passen en de kanaal breedte (K), staat hieronder gegeven:

$$(B + K) * \frac{V}{B * D} * \frac{1}{Z}$$



Bijlage 2. Samenvatting interview met Piet Dijkstra

Interview met Piet Dijkstra: Master of Science [Organic and clinical chemistry], March 1982; Ph.D. in Supramolecular Chemistry, September 1987; Doet onderzoek naar “Macromoleculaire engineering of synthetic and natural biodegradable materials for biomedical applications”.

Vrijdag 18/6/2010 om 15:00 en dinsdag 22/6/2010 om 11:00

Aanwezige 18/6: Piet Dijkstra; Carel Dieudonné; Linde Zhou;

Aanwezige 22/6: Piet Dijkstra; Carel Dieudonné; Linde Zhou; Rianne de Vries; Erik Willemen

De simpelste vorm van Hydrogel bestaat uit 2 soorten polymeren: Polylactide (PLA) en PEO (poly ethyleen oxide). Polylactide is het deel van de hydrogel dat afbreekt (hydrofoob). PEO is het deel dat water vasthoudt (hydrofiel). Polylactide en PEO vormen lange block-copolymeerketens. Er zijn 4 bindingsvormen uitgelegd waarmee de ketens een hydrogel kunnen vormen:

- 1) Fysische lineaire bindingen: Deze relatief zwakke binding zijn gebaseerd op inter-moleculaire aantrekkingskrachten tussen de hydrofobe delen en de hydrofiële delen van de copolymeerketens. Deze vorm van hydrogel is heel zwak en degradeert binnen ongeveer 1 week.
- 2) Fysische binding in complexe vorm: In deze vorm zijn de copolymeerketens in een circulaire en complexere vorm gerangschikt, waardoor globaal een grotere hoeveelheid intermoleculaire aantrekkingskrachten aanwezig zijn. Dit leidt tot een hogere stabiliteit van de hydrogel. Deze hydrogel degradeert binnen enkele weken.
- 3) Toevoeging van chemische binding door middel van UV straling: Door middel van UV straling worden de dubbele binding van de etheen groep verbroken, waardoor de copolymeerketens met elkaar chemische bindingen aan kunnen gaan. Chemische bindingen verhogen de stabiliteit van de hydrogel.
- 4) Toevoeging van chemische binding door middel van 4-armspolyethyleenoxide-thiol moleculen: 4-armspolyethyleenoxide-thiol moleculen kunnen de dubbele bindingen van de etheen groep verbreken, en zo een chemische binding met de copolymeerketens vormen. Ook dit leidt tot een hogere stabiliteit van de hydrogel.

Door de verschillende bindingen wordt als het ware een “net” gevormd uit allemaal copolymeerketens. Hoe meer aanknopingspunten, hoe stabiel de hydrogel en hoe kleiner de poriën. Een snelle degradatie van de hydrogel is afhankelijk van het aantal Polylactide polymeren in de ketens en van het aantal aanknopingspunten. Dit is in de fabricatiemethode te manipuleren. Tussen de twee golfplaten is een stabiele vorm van hydrogel nodig die de twee lagen bij elkaar houdt. Dit is mogelijk door de 2^{de} hydrogelvorm tussen de lagen te smeren en vervolgens de scaffold met UV licht te behandelen. Hierdoor wordt de hydrogel hard en stabiel en houdt de twee lagen aan elkaar vast (3^{de} hydrogelvorm). Het probleem hierbij is dat de EvL van te voren geplaatst moeten worden in de scaffold. Hierdoor zouden ook de EvL mee bestraald worden wat kan leiden tot schade of zelfs sterfte van de EvL. De vergelijkbare 4^{de} hydrogel bindingsvorm heeft dit nadeel niet. De 4-

armpolyethyleenoxide-thiol moleculen zouden een goed alternatief zijn, aangezien een vergelijkbare stabiliteit en degradatietijd behouden wordt, maar zonder directe beschadiging.

In de kanalen zou een zachte, snel degradeerbare hydrogel ideaal zijn. We vroegen ons af of het überhaupt wel realistisch was om dit soort hydrogel in de kanaal te doen, aangezien we niet zeker wisten of hij wel in de kanalen zou blijven zitten. Piet Dijkstra was hier niet bezorgd over en liet ons de reden, met behulp van een experimentje, zien. Uit het experiment werd duidelijk dat de hydrogel bij lage temperaturen (rond 0°C) heel vloeibaar was. Bij temperaturen rond de 20 graden was hij veel viskeuzer een soort gel vorm. In lichaamstemperaturen zou hij nog viskeuzer moeten zijn, waardoor de stabilisatie vrijwel zeker is. Aangezien hydrogel heel hydrofiel is, zou een aanhechting aan een hydrofiele kanaalwand extra voordelen bieden.

Het synthetisch en schadelijke stofje dat vrijkomt bij de degradatie van de hydrogel, is het hydrofiele PEO polymeer. Aangezien dit stofje extreem hydrofiel is, vormt het er een waterkapsel om dit molecuul. Het immuunsysteem kan dus de oppervlakte van dit molecuul niet herkennen, het wordt als een vochtophoping gezien. Het 4-armpolyethyleenoxide-thiol complex, dat ook een degradatieproduct is, is niet schadelijk zolang alle SH groepen met copolymeerketens reageren. Hier gaan we ook vanuit, aangezien deze groepen heel reactief zijn. Bovendien zijn deze moleculen veel kleiner dan 6000 dalton (Albumine), en kunnen ze dus makkelijk door de nier worden uitgescheiden.

De degradatie van de hydrogel is gebaseerd op het breken van het polylactide component van de copolymeerketens. De overige ondegradeerbare molecuulbrokken zijn het eindafvalproduct. Het vrijkomen van polylactide deeltjes bij de degradatie zou de PH waarde rond de scaffold kunnen verlagen. Deze polylactide deeltjes worden echter naar omliggend weefsel en bloedvaten gediffundeerd, waardoor de netto PH waarde weinig zal dalen.

Bijlage 3. Samenvatting interview Mijke Buitinga

Interview met Mijke Buitinga, Master Opdracht: Nano-engineered microchips for extrahepatic islet of Langerhans transplantation. A first step towards cell-based therapy in type 1 diabetes?

Aanwezigen: Linde Zhou, Carel Dieudonné

Het gesprek met Mijke ging over de fabricatiemethode van de macroporiën en over de consequenties van de adhesie van EvL aan hydrofiele polymeren.

Ons eerste probleem was het bepalen van de afstand tussen de macroporiën. Dit bleek niet bekend te zijn. De stabiliteit en fabricatiemogelijkheid zijn wel aandachtspunten waar op gelet moet worden. Als de afstanden te klein zijn, kan de stabiliteit tekort komen.

Ingewikkelder wordt het als we naar de fabricatiemethode kijken. Macroporiën kunnen in principe met behulp van electrospinning gemaakt worden. Er is echter een minimale afstand, waarbij dit nog kan. In ons model wilden we een afstand in de breedte van maximaal $150+50 = 200 \mu\text{m}$, oftewel macroporiën zowel in de bakken als in de kanalen. Als dit niet zou lukken, dan was een afstand van $150 + 200 + 150$ ook nog wel te overbruggen, oftewel macroporiën alleen in de bakjes. Mijke twijfelde zeer of het überhaupt wel mogelijk was om deze kleine afstanden te krijgen met behulp van electrospinning.

Ze stelde het volgende voor:

Met behulp van electrospinning wordt de polymeerfilm gemaakt. Deze zal ongeveer $50 \mu\text{m}$ dik zijn. Vervolgens wordt de film in een stempel met naaldjes gedrukt, waardoor de macroporiën ontstaan. Het risico bij het stempelen is, dat deze naaldjes makkelijk kunnen afbreken.

De afstand tussen de macroporiën in de lengte hebben vooral consequenties voor de stabiliteit van de scaffold. Ze stelde voor dat we hiervoor een onderzoeksvorstel bedachten. Drie scaffold prototypes met verschillende afstanden tussen de macroporiën zouden op stabiliteit getest kunnen worden. Het prototype met de kleinste afstand, maar met voldoende mechanische stabiliteit, zou aan onze criteria voldoen.

Bijlage. 4 Begrippenlijst

- Aangeborene immuunrespons:** Alle vormen van immuunrespons die aspecifiek werken. Meestal treedt deze respons vooral in het begin op
- Adaptieve immuunrespons:** Alle vormen van immuunrespons die specifiek werken, door middel van antilichamen
- Adhesie:** Aanhechting van cellen aan een bepaald materiaal of andere cellen
- Adipocyten:** vetweefselcellen
- Allogeen:** lichaamsvreemd
- Alloreactief:** Dat meestal beschadigend werkt op lichaamsvreemd weefsel
- Angiogene factoren:** De vorming van nieuwe bloedvaten wordt geïnduceerd door de afscheiding van zogenaamde angiogene factoren.
- Angiogenese:** Het vormen/groeien van bloedvaten
- Apoptose:** Is het proces van geprogrammeerde celdood. De cel wordt dan netjes opgeruimd zonder dat er verder ontstekingsreacties ontstaan.
- Autogeen:** lichaamseigen
- Biocompatibel:** Een materiaal is biocompatibel als het een bepaalde functie van een lichamelijke weefsel overneemt, zonder dat er een immuunreactie optreedt.
- Biodegradeerbaar:** Een materiaal is biodegradeerbaar als het lichaam in staat is dit materiaal volledig te degraderen op een natuurlijke wijze.
- Bot nodule:** ophoping van botcellen
- CD4, CD8:** bepaalde oppervlakte markers
- CAF (carcinoma associated fibroblast):** Typische fibroblast die in tumorstroma gevonden wordt
- Celcyclus:** Cyclische proces van celdeling, groei, tot de volgende celdeling
- Chemokines:** Ook wel chemotactische cytokines genoemd, zijn stoffjes die witte bloedcellen kunnen aantrekken.
- Cluster:** ophoping van cellen
- Co-transplantatie:** Tegelijk transplanteren van meerdere organen/weefsels
- Coagulatie:** klontering
- Coating:** Omhullende laag, die bepaalde functies heeft.
- Copolymeer:** Macromolecuul dat uit 2 polymeren bestaat
- Corrosie:** het proces waarbij metalen roesten
- Cytokine:** Eiwitten of enzymen die bepaalde reacties in het lichaam veroorzaken/stimuleren
- Cytotoxisch:** giftig voor een bepaalde cel
- Cytotoxische T cellen:** Cellen, die gespecialiseerd zijn in het vernietigen van viruscellen en tumorcellen
- Dedifferentiatie:** De cellen veranderen hun structuur, waardoor ze hun functie verliezen/ slechter uitvoeren.
- Dendritische cellen:** Antigeen presenterende cellen. Belangrijk voor de maturatie van T cellen
- Diffusie:** inactieve transportmethode van deeltjes gebaseerd op een electrochemische- of/en concentratiegradient
- Diffusielimiet:** Maximaale afstand, waarbij de diffusie nog voldoende is.
- Down-regulatie:** Vermindering van receptor/eiwit activiteit van een cel.
- Eilandjes van Langerhans (EvL):** endocriene celophoppingen
- Electrospinning:** Fabricatiemethode waarbij pure polymeer-crystallenen in polymeerfilms worden vervormd.
- Endocrien weefsel:** Endocriene klieren scheiden stoffen direct in de bloedbaan af.
- Endotheelcellen:** Oppervlaktecellen aan de binnenkant van de bloedvaten
- Exocrine weefsel:** Exocriene klieren scheiden stoffen af, die via afvoerbuizen gescheiden worden.

Fenotype: Uiting van een bepaald gen

Fibrinolyse: Proces waarbij bloedstolsel langzaam opgelost wordt.

Fibroblast: Bindweefsel- en bloedvat producerende cel

G0 fase: Fase in de celcyclus, waarin de cel (tijdelijk) stopt met het delingsproces.

Glomerulus: Groepje capillairen omgeven door kapsel van Bowman in de nefronen van nieren.

Glucose: Belangrijke brandstof voor het menselijke lichaam → energieproductie

Hematopoëtisch: Bloedvormend

Hemodynamische verandering: verandering in eigenschap/omloop van bloed

Homeostase: Evenwicht

Hydrofiel: betekend letterlijk wat van water houdt

Hydrogel: Gelvormig tot vast materiaal, dat zeer hydrofiel en poreus is en redelijk snel degradeert

Hydrofoob: watervrezend

Hypoxie of hypoxia: Conditie waarbij weefsels in het lichaam als geheel of in een bepaald deel van het lichaam niet voorzien worden van voldoende zuurstof.

IBMIR (instant blood mediated immune response): Eerste, heftigste immuunrespons binnen de eerste 15 min

Immortalizing genes: genen die een onbeperkte celdeling van bepaalde cellen permitteren. **Immunogeen:** bovordering van immuunreacties

Immunosuppressivum: Bepaalde stof of medicament, dat een bepaald immuunrespons tegenhoudt.

Immuuntolerantie: Een staat waarin het immuunsysteem of een deel hiervan niet goed meer functioneert.

In vitro onderzoek: Onderzoek buiten een organisme

In vivo onderzoek: Onderzoek binnen een organisme

Insuline: Eiwit, dat verantwoordelijk is voor de glucose opname van de lever en spieren.

Intraveneus: Door de aders

Ischemie: Is medische jargon voor 'onvoldoende doorbloeding', wat tot zuurstof tekort leidt. Deze zuurstof tekort hoeft echter niet tot schade te leiden.

Karyotypische afwijking: chromosomale afwijking, oftewel een genetische afwijking dat ontstaan is door een delingsfout. Gerelateerd aan tumoren

Kweekpassage: Een voorbepaalde vermenigvuldiging van kweekcellen.

Macrofagen en granulocyten: Spelen een belangrijke rol bij de aangeboren immuunrespons

Matrix metalloproteinases (MMPs): Is een groep enzymen die in staat zijn bindweefsel te degraderen en moduleren.

Maturatie: volledige differentiatie van een cel, waardoor de functie

Melanoma: kwaadaardige huidtumor

Mesenchymale stamcellen (MSCs): Afkomstig van progenitor stamcellen. Hebben de capaciteit om in meerdere types cellen te differentiëren.

MHC (major histocompatibility complex): Dit zijn bepaalde unieke lichaamseigen markers die op cellen zitten. De menselijke variant heet HLA.

Monocyt: Type witte bloedcel, dat bloedvoorkomende ziekte verwekkers tegenhoudt. Verder speelt kunnen ze zich zeer snel verplaatsen naar geïnfecteerde weefsels.

Morfologisch: bepaalde vorm

Multifactoriële aandoening: Ziekte die bepaald wordt door zowel genetische- als omgevingsfactoren.

Necrose: Het niet-geprogrammeerde afsterven van weefsel door welke oorzaak dan ook, zoals tekort van voedingsstoffen.

Neovascularisatie: Nieuwgroei van de kleine bloedvaten

Nephrectomie: operatief verwijderen van de nier(en)

Neuropathie: Aandoening van het zenuwstelsel.

Nierkapsel: bepaald anatomisch deel van de nier

Normoglycemie of euglycemie: normale bloedglucose waardes

Nutriënten: voedingsstoffen

Ontstekingsmediatoren: Stofjes of eiwitten die een belangrijke rol spelen bij het aantrekken van leucocyten.

Osteoblast: Is een cel dat botweefsel opbouwt door osteoid en mineraliserende enzymen af te scheiden in de extracellulaire matrix. Bovendien scheiden ze ook stoffen uit die de osteoclastfunctie reguleren.

Osteosarcoma: kwaadaardige bottumor

Pancreas: alveesklier

Parasympathische innervatie: Het deel van de autonome (niet bewuste) zenuwstelsel, dat het lichaam in een toestand van herstel en rust kan voeren.

Passieve diffusie: Een spontaan proces, waarbij stoffen zich kunnen verplaatsen zonder dat het energie kost

PDGF (platelet-derived growth factor): Een van de velen groeifactoren die de celgroei en proliferatie stimuleren.

Pericyten: Langgerekte contractiele cellen tegen de buitenwand van de capillairen.

Periost: beenvlies, buitenlaag van bot

Polymeer: Een macromolecuul dat uit meerdere kleinere moleculen in een gerangschikte volgorde bestaat.

Polymeerfilm: Laagje polymeer wat door electrospinning geproduceerd kan worden. Deze film kan gebruikt worden om een vorm te stampen

Poreus: Een poreusmateriaal is een materiaal waar kleine gaatjes in zitten.

Portale circulatie: Hiermee wordt de poortader of vena porta bedoeld. Deze stuurt het bloed van de abdomen naar de lever toe.

Prevascularisatie: Het stimuleren van revascularisatie voordat het orgaan wordt ingeplanteerd.

Proteasen of peptidasen: Enzymen die eiwitten en andere ketens van aminozuren afbreken.

Regulatoire T cellen of T regs: Remmen de functie vermenigvuldiging van T cellen

Retinopathie: Niet-inflammatoire beschadiging van het netvlies, wat tot blindheid kan voeren.

Revascularisatie: Na het transplanteren van een orgaan moeten opnieuw bloedvaten hierheen gevormd worden. Dit proces noemt men revascularisatie

STRO-1: Celoppervlakteeiwit, dat door beenmergstromacellen en MSCs tot expressie wordt.

Scaffold: regelmatige matrixruimte, dat stabiliteit en optimale functie van cellen garandeert.

Syngene: lichaamseigen

Systemische toediening: toedienen via de bloedbaan in het hele lichaam.

T-cellen: Cellen die een belangrijke rol spelen in het adaptieve immuunsysteem.

T-helper cellen: Geven bepaalde cytokines af die van belang zijn voor de activiteit van cytotoxische T cellen.

Tissue factoren (TF): eiwit dat een belangrijke rol speelt bij de klontering

Transdifferentiatie: Differentiatie van weefsel naar een ander weefseltype

Trombine: Belangrijke eiwit dat een cruciale rol in de bloedstolsel speelt.

Tumorstroma: Tumorspecifiek bindweefsel

Up-regulatie: Verhoging van receptor/ eiwit expressie van een cel

UV licht: electromagnetische straling, net buiten de waarneming van het menselijk oog

VGEFs: Groeifactoren die bloedvatengroei stimuleren

Xenotransplantatie: Transplantaties van organen of weefsels tussen verschillende (dier)soorten.

Bijlage 5. Proces verloop

In de voorbereiding van het onderzoek is gebruik gemaakt van voorgaande MDO's en gesprekken met begeleiders. Het onderwerp is in de onderzoeksfase verder gespecificeerd door middel van bevindingen bij literatuur onderzoek en gesprekken met begeleiders en andere deskundigen. In deze onderzoeksfase werd duidelijk dat de overleving van de EvL na transplantatie een groot probleem is en dat MSCs hier mogelijk een verbetering in zouden kunnen brengen.

In de probleemstelling is er voor gekozen te focussen op de EvL transplantatie buiten de bloedbaan. Uit voorgaande MDO's werd duidelijk dat transplantatie binnen de bloedbaan, specifiek in de poortader, nogal wat nadelen met zich mee brengt. Hoewel transplantatie buiten de bloedbaan ook specifieke nadelen heeft is vroeg in het onderzoeksproces de beslissing genomen hier op te focussen.

Voor literatuuronderzoek hebben we gebruik gemaakt van scopus, pubmed en google om relevante wetenschappelijke artikelen te vinden. Daarnaast is er gebruik gemaakt van studieboeken en semiwetenschappelijke websites om algemene achtergrondinformatie te vinden. Verder is er gebruik gemaakt van de ervaring en kennis van deskundige op verschillende gebieden. Voor onze technische vragen konden we terecht bij onze begeleider en andere deskundigen op de Universiteit Twente. Voor klinische, biologische en medische vragen konden we terecht bij onze klinische begeleider en andere deskundigen in het LUMC in Leiden.

Tijdens het literatuuronderzoek is uitgediept wat de voordelen zijn die MSCs kunnen bieden en wat het effect hiervan op de EvL transplantatie zou kunnen zijn. Daarnaast is gekeken naar eventuele risico's die het gebruik van MSCs met zich mee brengt. In deze fase van het onderzoek zijn meerdere ideeën en oplossingen voorbij gekomen die later totaal onmogelijk of onrealistisch bleken te zijn. Hierdoor is een beter beeld ontstaan over wat op dit moment realistisch is en wat nog niet.

Het eindproduct van dit onderzoek zal in eerste instantie ingaan op 'waarom' zou deze toepassing handig zijn en vervolgens gekeken worden naar 'hoe' dit kan worden verwezenlijkt. Hierbij wordt een technisch geneeskundige eindoplossing aangeboden.