

Chapter 11

Nederlandse Samenvatting

List of Publications

Dankwoord

Curriculum Vitae

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Introductie

Bloedvaten zijn verantwoordelijk voor transport van zuurstof en voedingsstoffen door het hele lichaam. De inhoud van het bloedvat is gescheiden van de omliggende weefsels door een monolaag van dicht aaneenliggende cellen, de endotheelcellen. Deze endotheelmonolaag zorgt dat plasma en circulerende cellen in de bloedbaan blijven en niet weglekken naar omliggende weefsels. Voor een goede barrièrefunctie is het belangrijk dat endotheelcellen goed vastzitten aan de ondergrond (cel-matrix interactie) en aan omliggende endotheelcellen (cel-cel interactie). Bij een intacte endotheellaag blijft lekkage van vocht, zelfs bij hoge druk in het vaatstelsel, tot een minimum beperkt. Het belang van de barrièrefunctie van het endotheel wordt geïllustreerd door ziekten waarbij deze functie verstoord is. Voorbeelden hiervan zijn sepsis, acute respiratory distress syndrome (ARDS) en systemic capillary leak syndrome (Clarkson's syndroom). Een beschrijving van sepsis en ARDS volgt later in dit hoofdstuk; de gemene deler van deze aandoeningen is een ontstekingsreactie, die leidt tot vaatlekkage op lokaal of systemisch niveau.

Bij ernstige ontsteking komen mediators (cytokines, groeihormonen, trombine, histamine) vrij die circuleren in het bloed en binden aan de endotheelcellen. Binnen in de endotheelcellen worden daardoor mechanismen in werking gezet die leiden tot samentrekken van endotheelcellen. Na verlies van cel-matrix en cel-cel interactie ontstaan gaten in de endotheellaag, waarbij de laag endotheelcellen de barrièrefunctie verliest. Het gevolg is uittreding van vocht uit de bloedvaten naar de omliggende weefsels (vaatlekkage). Wanneer dit plaatsvindt op orgaaniveau, heeft dit grote gevolgen voor het functioneren van organen. Zo wordt de gaswisseling ernstig belemmerd wanneer vocht uittreedt in de longen tijdens een longontsteking. De vaatlekkage in het hele lichaam, die plaatsvindt tijdens sepsis, leidt tot verlies van bloeddruk en hypoperfusie van alle delen van het lichaam.

Het proces van vaatlekkage is in de kliniek moeilijk te voorspellen en te behandelen. Herkenning gebeurt vaak in vergevorderde stadia van vaatlekkage, wat tijdige behandeling bemoeilijkt. Ook is momenteel geen directe behandeling van vaatlekkage voorhanden – er zijn geen medicijnen die lekkage van het endotheel kunnen voorkomen of remmen. Behandeling van vaatlekkage is doorgaans beperkt tot ondersteunende maatregelen, zoals extra vochttoediening om de bloeddruk op peil te houden. Beide factoren (late herkenning en gebrek aan adequate interventies) dragen bij aan hoge mortaliteitscijfers van de ziekten waarbij vaatlekkage centraal staat. De mortaliteit van sepsis is 40-70% (septische shock), terwijl de mortaliteit van ARDS wordt geschat op 22-35%.

In het huidige promotieonderzoek is gezocht naar manieren om de herkenning en behandeling van inflammatoire vaatlekkage te verbeteren. Het eerste deel van dit proefschrift is gericht op het ophelderen van processen in de endotheelcel die bijdragen aan barrièreverlies, en op het ontwikkelen van medicijnen die deze processen remmen. Het tweede deel van het proefschrift is gericht op het verbeteren van de herkenning van vaatlekkage in ernstig zieke patiënten. Hierbij is vooral gezocht naar klinische parameters die de bestaande klinische criteria voor vaatlekkage zouden kunnen verbeteren.

Behandeling van vaatlekkage

Zoals eerder vermeld zijn er momenteel geen medicijnen om vaatlekkage te behandelen. Een belangrijke stap in de ontwikkeling van medicijnen tegen vaatlekkage, is het begrijpen hoe vaatlekkage, en in het bijzonder hoe verlies van endotheelbarrière ontstaat. In **Hoofdstuk 2** is daarom een literatuuroverzicht gegeven van structuren en processen in het endotheel die bijdragen aan een goede barrière. Hierbij is in het bijzonder gekeken naar de bijdrage van cel-matrix interactie aan een goede barrièrefunctie. Integrines spelen een belangrijke rol in cel-matrix interactie. Integrines zijn heterodimere eiwitcomplexen, die als een tentharing de koppeling vormen tussen de cel en de extracellulaire matrix. Een belangrijke conclusie van Hoofdstuk 2 is dat sommige integrines ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) noodzakelijk zijn voor de instandhouding van de endotheel monolaag, terwijl andere integrines bijdragen aan verstoring van de barrière. Een vraag die onbeantwoord blijft in de literatuur is of integrines actief bijdragen aan endotheelbarrièreverlies. Met andere woorden, leiden de door cytokines geactiveerde signaaltransductieroutes tot verandering in vorm en functie van integrines, waardoor de barrièrefunctie toe- of afneemt?

In **Hoofdstuk 3** is gekeken naar het effect van het anti-leukemie medicijn imatinib op de endotheelbarrièrefunctie. De aanleiding voor onderzoek naar dit effect was de klinische observatie dat start van imatinib behandeling leidde tot zeer snel verdwijnen van longoedeem [1]. Hoofdstuk 3 laat zien dat voorbehandeling van gekweekte humane endotheelcellen met imatinib de barrièrefunctie beschermt tijdens stimulatie van endotheelcellen met ontstekingsstoffen (trombine en histamine). Hetzelfde resultaat werd bereikt in diverse diermodellen van vaatlekkage en sepsis. De beschermende werking van imatinib was ook waarneembaar wanneer imatinib werd toegediend na inductie van vaatlekkage. Deze observatie heeft belangrijke klinische implicaties, omdat behandeling doorgaans gestart wordt na diagnose van de ziekte. Ook is van belang dat de concentraties waarbij de beschermende effecten werden waargenomen, overeenkomen met imatinib concentraties in het bloed van patiënten die behandeld zijn met imatinib. Na het aantonen van de beschermende effecten van imatinib in preklinische modellen van vaatlekkage, hebben wij ook laten zien dat imatinib beschermt tegen vaatlekkage in een patiënt met een

ernstige en langdurige vorm van vaatlekkage (**Hoofdstuk 9**). Samen laten deze onderzoeken zien dat imatinib een krachtig middel is voor de behandeling van vaatlekkage.

Imatinib is een chemische stof die binnen in de cel een aantal tyrosine kinases remt. Tyrosine kinases zijn eiwitten die betrokken zijn bij het overbrengen van signalen in de cel. Deze signaaltransductieroutes zorgen er bijvoorbeeld voor dat binding van ontstekingsstoffen aan het oppervlakte van de endotheelcel wordt gevolgd door contractie van de cel of het loslaten van de cel van de ondergrond (verlies van cel-matrix interactie). In **Hoofdstuk 4** is onderzocht hoe imatinib de endotheellaag beschermt tegen barrièreverlies tijdens ontsteking. Door alle imatinib-gevoelige tyrosine kinases afzonderlijk genetisch uit te schakelen in endotheelcellen, hebben wij laten zien dat de beschermende werking van imatinib berust op de remming van de tyrosine kinase Abl-related gene (ARG). Muizen die door genetische modificatie geen ARG kinase aanmaken lieten significant minder vaatlekkage zien na het inspuiten van ontstekingsstoffen in de huid. Ook hebben we aangetoond dat ARG actief wordt kort na stimuleren van endotheelcellen met ontstekingsstoffen. Dit wijst erop dat ARG bijdraagt aan het ontstaan van gaten in de endotheel. Daarmee is deze studie de eerste die de rol van ARG in het ontstaan van vaatlekkage aantoont. De klinische relevantie van dit eiwit voor het ontstaan van vaatlekkage bleek uit de bevinding dat ARG activiteit verhoogd is in longweefsel van patiënten met sepsis.

In de zoektocht naar aangrijpingspunten voor behandeling van vaatlekkage is, naast ARG, ook gekeken naar het kinase Adenosine MonoPhosphate-activated Kinase (AMPK). AMPK is als kinase betrokken bij de energiehuishouding in de cel. In **Hoofdstuk 5** laten wij zien dat remming van dit kinase met Compound C – een remmer van AMPK – endotheelbarrièreverlies tijdens ontsteking remt. Activering van AMPK daarentegen geeft een milde versterking van barrièreverlies. Wanneer endotheelcellen worden blootgesteld aan ontstekingsstoffen als trombine, vindt snelle activatie van AMPK plaats. Dit wijst op activatie van AMPK tijdens ontsteking. Hoewel het huidige onderzoek suggereert dat AMPK actief bijdraagt aan het ontstaan van vaatlekkage, moeten experimenten met genetische modificatie van AMPK uitwijzen wat de precieze rol van AMPK in endotheelbarrière regulatie is.

De preklinische studies in het eerste deel van dit proefschrift werpen licht op het ontstaan van vaatlekkage. De identificatie van ARG en AMPK als mediators van vaatlekkage kan bijdragen aan de ontwikkeling van medicijnen tegen vaatlekkage. Met de beschikbaarheid van imatinib is remming van ARG in een vergevorderd stadium. Een belangrijk voordeel van imatinib is de ruime klinische ervaring met dit middel. Verdere ontwikkeling van imatinib als medicijn tegen vaatlekkage zal plaatsvinden in fase III onderzoek in ernstig zieke patiënten.

Vroegtijdige herkenning van vaatlekkage

Aandoeningen als sepsis en ARDS worden gekenmerkt door ernstige vormen van vaatlekkage. Sepsis is een systemische ontstekingsreactie op de aanwezigheid van micro-organismen in het lichaam [2]. Hierbij komen grote hoeveelheden cytokines en groeifactoren vrij, die door het hele lichaam binden aan endotheel en leiden tot vaatlekkage in weefsels en organen. Dit komt klinisch tot uiting in massieve vaatlekkage, oedeemvorming en bloeddrukdaling. Klinische criteria voor de diagnose van sepsis zijn: a) de aanwezigheid van infectie (op basis van klinische verdenking of microbiologische diagnostiek) en b) de aanwezigheid van twee of meer SIRS criteria⁶. ARDS is een vergelijkbare aandoening, maar specifiek beschreven voor de long [3]. Karakteristiek voor ARDS is respiratoire insufficiëntie op basis van schade aan de alveolo-capillaire membraan. Dit is barrièreverlies van zowel het alveolaire epitheel als de longcapillairen. In de afgelopen decennia is ARDS vooral gediagnosticeerd volgens de American-European Consensus Conference (AECC) criteria⁷. In 2010 zijn de AECC criteria echter vervangen door de 'Berlijn Criteria'⁸. Ondanks de centrale rol van vaatlekkage in de pathofysiologie van sepsis en ARDS, komt vaatlekkage niet terug in de klinische criteria die worden gehanteerd voor diagnose van deze aandoeningen (zie voetnoten). In het tweede deel van dit promotieonderzoek hebben wij gekeken naar directe en indirecte parameters van vaatlekkage in ernstig zieke patiënten (Intensive Care populatie). De centrale vraag bij deze onderzoeken is hoe parameters van vaatlekkage kunnen bijdragen aan een snellere herkenning van met name ARDS in acuut zieke patiënten. Voor de beantwoording van deze vraag is gekeken naar circulerende stoffen in het bloed en naar hemodynamische parameters.

Tijdens ontsteking kan de endotheelbarrière functie zodanig afnemen dat grote plasma eiwitten de endotheellaag kunnen passeren en weglekken naar de omliggende weefsels. Bekende voorbeelden zijn albumine en transferrine, transporteiwitten met een grootte van 50-60kDa die in hoge concentraties in het bloed voorkomen. In **Hoofdstuk 6** hebben we onderzocht of de concentratie van deze eiwitten de aanwezigheid van vaatlekkage en de diagnose ARDS kan voorspellen. Hiervoor werd de albumine en transferrine concentratie gemeten in het bloed van acuut zieke patiënten met en acuut zieke patiënten zonder de diagnose ARDS. Ook werd in deze

⁶ Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) criteria [4]: a) Afwijkende lichaamstemperatuur (<36 °C of >38 °C), b) afwijkende leucocytgetallen (<4 or >12 x10⁹/L), c) tachycardie (>90/min) en d) tachypnoe (>20/min of een P_aCO₂ <32 mmHg).

⁷ American-European Consensus Conference criteria [5]: a) acuut ontstaan van de ziekte, b) 200 mmHg <P_aO₂/FiO₂ ratio< 300 mmHg voor de diagnose van acute lung injury, of <200 mmHg voor de diagnose van acute respiratory distress syndrome, c) bilaterale infiltraten op anteroposterieure thorax radiografie, en d) een pulmonale wiggedruk <18 mmHg of klinische afwezigheid van links decompensatie.

⁸ Berlijn criteria [6]: a) Acuut ontstaan (< 1 week), b) bilaterale infiltraten op beeldvorming van de thorax, c) uitsluiting van hydrostatisch oedeem en/of hartfalen, en d) gestoorde oxygenatie: 200 mmHg <P_aO₂/FiO₂ ratio< 300 mmHg (milde ARDS), 100 mmHg <P_aO₂/FiO₂ ratio< 200 mmHg (moderate ARDS), P_aO₂/FiO₂ ratio < 100 mmHg (ernstige ARDS).

patiënten de vaatlekkage in het longbed gemeten met behulp van radioactief gelabeld eiwit. Daarbij hebben we laten zien dat de plasma concentraties van albumine en transferrine significant lager zijn in patiënten met ARDS en dat de concentratie van deze eiwitten een directe relatie laat zien met de mate van vaatlekkage in de longen. In lijn met de hypothese dat eiwit wegglekt uit de vaten bij endotheelbarrièreverlies hebben we laten zien dat de diagnose ARDS en de aanwezigheid van vaatlekkage in de long gepaard gaan met lage eiwitconcentraties. Het meten van de directe gevolgen van vaatlekkage (eiwitverlies) kan zo bijdragen aan het diagnosticeren van ARDS.

Naast het meten van de gevolgen van vaatlekkage, kunnen ook de oorzaken van endotheelbarrièreverlies gemeten worden. In de afgelopen decennia is veel onderzoek gedaan naar de voorspellende waarde van circulerende cytokines en groeifactoren in de diagnose van ARDS. Omdat cytokines bijdragen aan endotheelbarrièreverlies, is de onderliggende hypothese dat de plasmaconcentratie van deze cytokines een indicator is voor de mate van vaatlekkage (biomarker). Circulerende cytokines en groeifactoren kunnen zo bijdragen aan de diagnose van ARDS. Deze gedachtegang heeft een stroom van wetenschappelijke publicaties opgeleverd, met een veelvoud aan biomarkers voor vaatlekkage en ARDS. Onderling vergelijk van biomarkers voor ARDS is echter schaars en het is niet duidelijk welke biomarkers de hoogst voorspellende waarde hebben voor ARDS en vaatlekkage. **Hoofdstuk 7** beschrijft de resultaten van een systematische review en meta-analyse, waarin de bestaande literatuur over plasmabiomarkers voor ARDS is samengevat. Het resultaat van deze meta-analyse is een rangschikking van plasmabiomarkers op basis van voorspellende waarde voor de diagnose van ARDS en sterfte ten gevolge van ARDS. Een algemene conclusie op basis van deze rangschikking is dat de diagnose ARDS vooral is geassocieerd met plasmabiomarkers van schade aan het alveolo-capillaire membraan (Krebs von der Lungen-6, von Willebrand Factor, Angiopoietine-2), terwijl sterfte ten gevolge van ARDS ook is geassocieerd met plasmabiomarkers van ontsteking (IL-4, IL-2, and IL-1 β).

Vochttoediening vormt een belangrijk onderdeel van de ondersteunende behandeling van sepsis en ARDS. Hoewel bekend is dat overmatige vochttoediening kan leiden tot extra oedeemvorming, is de bovengrens voor vochttoediening per patiënt verschillend. Op dit moment is niet duidelijk welke factoren bijdragen aan oedeemontwikkeling tijdens vochttoediening. Om voorspellers van oedeemvorming tijdens vochttoediening te identificeren, is in **Hoofdstuk 8** gekeken naar hemodynamische parameters voor en na vochttoediening in een cohort acuut zieke patiënten. Gelijktijdig is oedeemvorming gemeten met behulp van double indicator (thermal-dye) dilution techniek. De resultaten van dit onderzoek laten zien dat het pompvermogen van het hart (cardiac index) en de vullingstatus van het longvaatbed (pulmonary blood volume index) belangrijker voorspellers zijn van oedeemvorming tijdens vochttoediening dan parameters van vaatlekkage of

hydrostatische druk. Patiënten met goede pompfunctie en/of hoge vulling van het longvaatbed voor aanvang van de vochttoediening hebben een verhoogde kans op het ontwikkelen van longoedeem tijdens vochttoediening.

De criteria die momenteel gebruikt worden voor de herkenning van ARDS schieten in een aantal opzichten tekort. Zo heeft vaatlekkage een beperkte rol in deze criteria en bestaat er een discrepantie tussen de klinische criteria enerzijds en autopsie bevindingen als gouden standaard anderzijds. De resultaten van het tweede deel van dit proefschrift kunnen bijdragen aan verbeterde herkenning van ARDS en in het bijzonder de herkenning van vaatlekkage tijdens ARDS. Parameters van vaatlekkage zoals voorgesteld in het tweede deel van dit proefschrift kunnen bestaande klinische criteria aanvullen. De toegevoegde waarde van deze parameters voor de herkenning van ARDS en het voorspellen van uitkomsten als mortaliteit moet echter bewezen worden in prospectieve studies.

Onderzoek naar vaatlekkage in de toekomst

Het onderzoek naar behandeling van vaatlekkage zal langs verschillende lijnen gecontinueerd worden. Op basis van de parallelle ontwikkeling van enerzijds kennis over pathofysiologie van endotheelbarrièreverlies en anderzijds ontwikkeling van small molecule inhibitors, verwachten wij dat '*drug repurposing*' een belangrijke rol gaat spelen in de ontwikkeling van nieuwe therapieën. In **Hoofdstuk 9** is het concept van drug repurposing uitgewerkt en geïllustreerd aan de hand van een tweetal case reports. De observatie dat imatinib in klinische setting goed verdragen wordt en beschermt tegen vaatlekkage is een eerste en belangrijke basis voor onderzoek naar klinische effecten van imatinib op vaatlekkage. Op dit moment wordt gekeken welke patiëntengroep het meest geschikt is voor het testen van de klinische effecten van imatinib op vaatlekkage. Naar verwachting zal binnen twee jaar gestart worden met een fase I-II studie naar de veiligheid en effectiviteit van imatinib in patiënten met vaatlekkage.

Een tweede onderzoekslijn zal gericht zijn op de bijdrage van ARG aan de ontwikkeling van endotheelbarrièreverlies. Een belangrijk aspect is daarbij het effect van ARG op de hechting van endotheelcellen aan de extracellulaire matrix, en de rol die actieve verandering van cel-matrix heeft in endotheel barrière regulatie. Het effect van ARG op expressie en lokalisatie van $\alpha_5\beta_1$ integrine is hierbij een belangrijk uitgangspunt. Daarnaast is een begin gemaakt met het ontwikkelen van ARG-specifieke remmers. Omdat imatinib naast ARG een groot aantal andere kinases remt, kent imatinib veel bijwerkingen. Met de ontwikkeling van ARG-specifieke remmers kunnen medicijnen tegen vaatlekkage worden ontwikkeld, die de bijwerkingen van imatinib missen. De screening van nieuwe ARG remmers zal op korte termijn starten (0-6 maanden). Een onderzoeksgroep van de Universiteit van Yale heeft geïsoleerd ARG eiwit voor deze screening beschikbaar gesteld.

De screening zal, samen met een computerscreening op basis van de eiwitstructuur van ARG, plaatsvinden aan de Universiteit van Tübingen. Stoffen die in deze screening effectief blijken in het remmen van ARG, zullen in het VUMC worden getest in preklinische modellen van vaatlekkage.

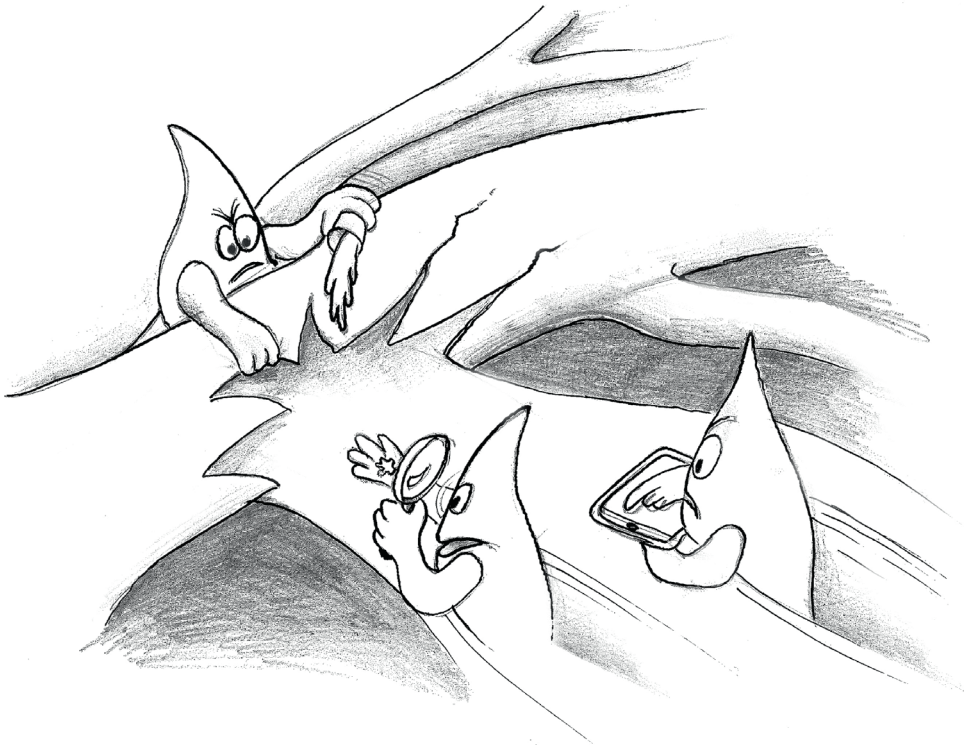
Conclusie

Dit onderzoek laat zien dat inzicht in endotheelbarrièreregulatie bijdraagt aan herkenning en behandeling van aandoeningen gekenmerkt door vaatlekkage. De conclusies hierbij zijn:

- A. Actieve cel-matrix interactie speelt een belangrijke rol in endotheelbarrièreregulatie.
- B. ARG draagt bij aan de ontwikkeling van endotheelbarrièrerverlies, meest waarschijnlijk door actieve regulatie van cel-matrix interactie.
- C. Imatinib remt vaatlekkage door inhibitie van ARG.
- D. Parameters van endotheelbarrièrerverlies zijn geassocieerd met diagnose en uitkomsten van ARDS.
- E. Klinische parameters van vaatlekkage vormen een goede aanvulling op de huidige diagnostische criteria van ARDS.

REFERENTIES

1. Overbeek MJ, van Nieuw Amerongen GP, Boonstra A, Smit EF, Vonk-Noordegraaf A. Possible role of imatinib in clinical pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J.* 2008;32:232-5.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348:138-50.
3. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* 2012;122:2731-40.
4. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008;36:296-327.
5. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med.* 1994;20:225-32.
6. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012;307:2526-33.



LIST OF PUBLICATIONS

Aman J, Nurmohamed SA, Vervloet M, Groeneveld ABJ. Metabolic effects of citrate- vs bicarbonate-based substitution fluid in continuous venovenous hemofiltration: a prospective sequential cohort study. *J Crit Care* 2010; 25:120-7.

Aman J, van der Heijden M, van Lingen A, et al. Plasma protein levels are markers of pulmonary vascular permeability and degree of lung injury in critically ill patients with or at risk for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2011; 39:89-97.

Aman J, Groeneveld ABJ, van Nieuw Amerongen GP. Predictors of pulmonary edema formation during fluid loading in the critically ill. *Crit Care Med* 2012; 40:793-9.

Aman J, Thunnissen E, Paul MA, van Nieuw Amerongen GP, Vonk-Noordegraaf A. Successful treatment of diffuse pulmonary lymphangiomatosis with bevacizumab. *Ann Intern Med.* 2012; 156:839-40. Case Report.

Aman J, van Bezu J, Damanafshan A, et al. Effective treatment of edema and endothelial barrier dysfunction with imatinib. *Circulation.* 2012; 126:2728-38.

Aman J, Van Nieuw Amerongen GP, Van Hinsbergh VWM. Cell-Matrix Adhesion Proteins in the Regulation of Endothelial Permeability. Review. Book Chapter in *Endothelial Cytoskeleton*. Edited by Redondo et al. Published 2012 by CRC Publishers.

Aman J, Terpstra M, van Nieuw Amerongen GP, Groeneveld ABJ. Plasma biomarkers for Acute Respiratory Distress Syndrome: a systematic review and meta-analysis. Accepted for publication in *Crit Care Med* (2013).

Aman J, Peters MJL, Weenink C, van Nieuw Amerongen GP, Vonk Noordegraaf A. Reversal of vascular leak with imatinib. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188:1171-3. Case Report.

Beckers C, Knezevic N, Tauseef M, Krishnan R, Rajendran K, Hardin C, **Aman J**, van Bezu J, van Hinsbergh VWM, Mehta D. ROCK2 primes the endothelium for vascular hyperpermeability responses by raising baseline junctional tension. Ready for submission.

INTELLECTUAL PROPERTY

Intellectual property: Protection against endothelial barrier dysfunction through inhibition of the tyrosine kinase Abl-related gene. Inventors: G.P. van Nieuw Amerongen [NL], A. Vonk Noordegraaf [NL], J. Aman [NL], V.W.M. van Hinsbergh. PCT filed 2 May 2011. Applicant: Legal party of VU University and Medical Center.