

---

## **Nederlandse samenvatting**



In de samenleving is het tekort aan donororganen een algemeen bekend feit. Daarnaast zijn er diverse risico's verbonden aan orgaan- en weefseltransplantaties, waaronder de afstoting van het getransplanteerde weefsel. Tevens zijn er een aantal weefsels die niet geschikt zijn voor transplantatie, waaronder de heup, knieschijf en tussenwervelschijf. Samen leiden deze oorzaken tot een probleem in weefselherstel dat ontstaat na ziekte of letsel. Sinds de jaren 90 is er een nieuwe techniek in opkomst, genaamd tissue engineering of regeneratieve geneeskunde. Bij tissue engineering wordt in het laboratorium een orgaan of weefsel gemaakt met lichaamseigen materialen of cellen. Dit nieuwe weefsel kan vervolgens een ziek of beschadigd weefsel vervangen of herstellen. In de toekomst kunnen met behulp van tissue engineering mogelijk nieuwe huid, bloedvaten, tussenwervelschijven of knieschijven gemaakt worden. Om dit te bewerkstelligen is een unieke combinatie tussen lichaamseigen cellen en een 3-dimensionale structuur (de zgn. matrix) nodig. Deze matrix kan zowel van biologische als van synthetische origine zijn. In deze matrix is de vorming van bloedvaten van belang om de aanwezige cellen van zuurstof en voedingsstoffen te voorzien en afvalproducten af te voeren. Momenteel is de slechte vorming van bloedvaten een limiterende factor voor de grootte van het nieuwe weefsel. Omdat fibrine in ons lichaam een natuurlijke matrix is waarin de vorming van nieuwe bloedvaten plaatsvindt, worden in dit proefschrift diverse aspecten van fibrine bestudeerd. Om de nieuwvorming van bloedvaten te beïnvloeden wordt er gebruik gemaakt van verschillende natuurlijk voorkomende fibrine varianten. Dit wordt gereflecteerd in de titel van dit proefschrift: "Fibrin matrices for tissue engineering, naturally occurring fibrinogen variants alter cellular characteristics". Vertaald naar het Nederlands: "Fibrine matrixen voor het ontwikkelen van nieuwe weefsels, de eigenschappen van cellen worden veranderd door natuurlijk voorkomende fibrinogeen-varianten".

De fibrine matrix wordt in ons lichaam gevormd vanuit het voorloper-eiwit fibrinogeen. In de menselijke bloedcirculatie is 2-4 g/L fibrinogeen aanwezig. De aanmaak van fibrinogeen vindt voornamelijk plaats in de lever, waarna het wordt opgenomen in de bloedcirculatie. Fibrinogeen en fibrine spelen onder andere een belangrijke rol in de bloedstolling. Als laatste stap van de stollingscascade wordt het oplosbare fibrinogeen door trombine (factor IIa) omgezet in fibrine. Vele fibrine moleculen samen vormen een onoplosbaar netwerk van fibrine 'draden'. Dit fibrine netwerk vormt in de bloedstolling een vangnet voor de bloedplaatjes die samen het korstje op de wond vormen om de bloeding te stelpen. Naast zijn taak in de bloedstolling speelt fibrine een belangrijke rol in de wondheling en de nieuwvorming van bloedvaten (dit laatste wordt ook wel angiogenese genoemd). Na beschadiging van een weefsel en bijvoorbeeld bij tumorgroei kan fibrinogeen uit de bloedbaan naar de weefsels lekken en in aanwezigheid van trombine een fibrine matrix vormen. Fibrine vormt plaatselijk de tijdelijke matrix waarin angiogenese en weefselherstel kan plaatsvinden. Na activatie van (endotheel)cellen van een naburig bloedvat zullen deze cellen lokaal de fibrine matrix afbreken om ruimte te maken voor het nieuwe bloedvat en zich in de matrix verplaatsen om hier het nieuwe bloedvat te vormen. Deze eigenschappen van fibrine maken het een potentieel interessant matrix eiwit voor tissue engineering, waarin de nieuwvorming van bloedvaten een belangrijk onderdeel is.

---

In onze bloedbaan komen vele verschillende fibrinogeen-varianten voor die zowel aangeboren kunnen zijn of spontaan gevormd kunnen worden in ons lichaam. Oorzaken van het ontstaan van fibrinogeen-varianten zijn onder andere gewijzigde DNA-sequenties van fibrinogeen-genen, veranderde eiwit-aanmaak (mRNA) en eiwit-afbraak in de bloedcirculatie. Eerdere onderzoeken hebben aangetoond dat de eigenschappen en de structuur van het fibrine netwerk van diverse fibrinogeen-varianten anders is dan van het 'normaal-voorkomende' fibrine netwerk. Om specifieke fibrinogeen-varianten te kunnen bestuderen moeten deze gezuiverd worden, en zo nodig gescheiden van de overige fibrinogeen-varianten. Er zijn in hoofdlijn twee manieren om fibrinogeen-varianten te zuiveren: (I) isolatie van specifieke varianten uit menselijk plasma en (II) de aanmaak van specifieke varianten in cellen (recombinante expressie). In dit proefschrift is gebruik gemaakt van beide opties om zuivere fibrinogeen-varianten te verkrijgen. De intacte vorm van fibrinogeen wordt HMW-fibrinogeen genoemd (HMW, 340 kDa). In de bloedcirculatie ontstaan, na gedeeltelijke afbraak van de zogenaamde alfa-keten(s), specifieke variaties in het moleculair gewicht van fibrinogeen. In dit onderzoek worden naast intact fibrinogeen ook varianten met een verlaagd moleculair gewicht bestudeerd; laag moleculair gewicht (LMW, 305 kDa) en extra laag moleculair gewicht (LMW', 270 kDa) fibrinogeen. Tevens zijn fibrinogeen-varianten bestudeerd die ontstaan zijn door een veranderde eiwit-aanmaak; de gamma( $\gamma$ )-fibrinogeen-varianten.

In dit proefschrift worden de eigenschappen van twee verschillende celtypen op de bovengenoemde fibrinogeen-varianten bestudeerd, namelijk endotheelcellen en stamcellen uit vetweefsel. Endotheelcellen vormen de binnenbekleding van bloedvaten, deze cellen zijn erg belangrijk voor de vorming van nieuwe bloedvaten. Omdat de vorming van nieuwe bloedvaten tekort schiet bij het gebruik van via tissue engineering verkregen stukjes weefsel, en de endotheelcellen hier een hoofdrol in spelen, zijn de eigenschappen van deze cellen bestudeerd in dit proefschrift. Daarnaast is er grote potentie voor vet-stamcellen binnen de tissue engineering en worden deze cellen momenteel veel gebruikt. Wanneer in de toekomst de vorming van nieuwe bloedvaten beïnvloed wordt door het gebruik van fibrine varianten is het van groot belang dat deze vet-stamcellen in de matrix niet plotseling andere eigenschappen krijgen.

In het onderzoek, dat beschreven wordt in dit proefschrift, worden de effecten van diverse fibrine varianten op de eigenschappen van zowel endotheelcellen als vet-stamcellen bestudeerd. De belangrijkste doelen van het onderzoek zijn:

- (I) Het verklaren van het mechanisme waardoor de angiogenese verandert in fibrine matrixen van het 'normale' mengsel en gezuiverd HMW- en LMW-fibrine, met name gericht op de functionele eigenschappen en de genexpressie van endotheelcellen.
- (II) Het bepalen van de eigenschappen van vet-stamcellen op fibrinogeen-varianten met verschillend moleculair gewicht.
- (III) Het uitvoeren van verkennend onderzoek naar het effect van natuurlijk voorkomende  $\gamma$ -fibrinogeen-varianten op angiogenese en wondheling.
- (IV) Het bepalen van de mogelijke verschillen tussen intact plasma-gezuiverd en recombinant-geproduceerd fibrinogeen.

Een korte samenvatting van de hoofdstukken in dit proefschrift:

In **Hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie van dit proefschrift gegeven. Hierin worden de begrippen tissue engineering en angiogenese uitvoerig besproken en de fibrinogeen en fibrine structuren omschreven, tezamen met de veel voorkomende natuurlijke varianten: A $\alpha$ -extended fibrinogeen,  $\gamma$ '-fibrinogeen, HMW-, LMW- en LMW'-fibrinogeen.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de huidige literatuur over tissue engineering in combinatie met fibrine matrixen. Naast de specifieke eigenschappen van fibrine matrixen worden tevens diverse toepassingen van deze matrixen in tissue engineering beschreven. In deze context worden de wond-afdichting, lokale medicijnafgifte, huid tissue engineering en het maken van bloedvaten en hartkleppen toegelicht.

De mate van angiogenese is verschillend in fibrine matrixen met intacte alfa-ketens dan wel één verkorte alfa-keten naast een intacte alfa-keten (respectievelijk HMW en LMW-fibrine). Het ontrafelen van het mechanisme waardoor deze verschillen ontstaan is belangrijk voor het gebruik van HMW- en LMW-fibrine matrixen in tissue engineering. In **Hoofdstuk 3** worden de functionele eigenschappen en genexpressie van microvasculaire endotheelcellen op HMW- en LMW-fibrine beschreven. De endotheelcellen op HMW-fibrine matrixen geven een snellere celgroei en verhoogde vorming van nieuwe bloedvaten, hetgeen samen gaat met een verhoogde fibrine afbraak, allen vergeleken met het 'normaal-voorkomende' mengsel van fibrinogeen-varianten en LMW-fibrine. Tevens zijn duidelijke verschillen in genexpressie gevonden, in het bijzonder binnen de DLL4-Notch signaleringsroute, waarvan bekend is dat het een rol speelt bij angiogenese.

Fibrine kan ook gebruikt worden als dunne coating van een synthetische matrix. In **Hoofdstuk 4A** wordt de vorming van een dichte endotheelcellaag op HMW- en LMW-fibrinogeen coatings bestudeerd. De endotheelcellen op HMW-fibrinogeen coatings geven een dichtere en rustigere cellaag dan de cellen op LMW-fibrinogeen coatings. Dit geeft een goed aanknopingspunt voor het gebruik van HMW-fibrinogeen coatings in tissue engineering van bloedvaten. Deze observaties worden gevolgd door een discussie van de bevindingen van Sahni en collega's, waarbij in tegenstelling tot onze bevindingen, de endotheel permeabiliteit verhoogd wordt na toevoeging van intact fibrinogeen (**Hoofdstuk 4B**).

Stamcellen zijn erg belangrijk bij de ontwikkeling van toepassingen voor tissue engineering, omdat deze zich snel vermenigvuldigen en zich tot verschillende celtypen kunnen ontwikkelen (dit wordt ook wel differentiatie genoemd). **Hoofdstuk 5** beschrijft het effect van HMW- en LMW-fibrine op de groei en differentiatie van mesenchymale vet-stamcellen, in combinatie met diverse zuurstofconcentraties in de omgeving. De vermenigvuldiging en differentiatie van vet-stamcellen is vergelijkbaar op de fibrinogeen-varianten met verschillend moleculair gewicht. De zuurstof-concentratie blijkt echter wel een rol te spelen bij zowel de vermenigvuldiging, als de differentiatie van vet-stamcellen. Deze resultaten benadrukken de rol van zuurstof in de groei en differentiatie van stamcellen.

Eerder heeft men laten zien dat  $\gamma$ '-fibrine matrixen andere structurele eigenschappen hebben dan 'normaal-voorkomende'  $\gamma$ A-fibrine matrixen en dat plasma concentraties van  $\gamma$ '-fibrinogeen geassocieerd zijn met veneuze en arteriële trombose. In **Hoofdstuk 6** worden de effecten van de fibrinogeen  $\gamma$ -varianten op angiogenese en wondheling bestudeerd, zowel in

---

celweek als in diermodellen. De verschillen tussen de fibrinogeen  $\gamma$ -varianten zijn klein, maar er lijkt een verminderde angiogenese en wondheling zichtbaar in fibrine matrixen van  $\gamma'$ -fibrinogeen. Uitbreiding van de resultaten is echter noodzakelijk voordat definitieve conclusies getrokken kunnen worden.

Recombinant geproduceerd fibrinogeen heeft voordelen ten opzichte van plasma-gezuiverd fibrinogeen wat betreft de zuiverheid, veiligheid en continue productie mogelijkheden. In **Hoofdstuk 7** wordt een platform beschreven waarbij grote hoeveelheden recombinant fibrinogeen gegenereerd kunnen worden. Hier worden tevens de endotheelcel eigenschappen op plasma-gezuiverd HMW-fibrinogeen vergeleken met de cel eigenschappen op HMW-fibrinogeen uit de recombinante productie. Hieruit blijkt dat het fibrinogeen uit beide bronnen erg op elkaar lijkt. Deze bevindingen geven nieuwe informatie en de mogelijkheid om in de toekomst recombinant fibrinogeen te gebruiken in plaats van plasma-gezuiverd fibrinogeen.

Als laatste worden in **Hoofdstuk 8** de resultaten bediscussieerd en in een bredere context geplaatst binnen de velden tissue engineering en angiogenese. Hierbij wordt tevens een kort overzicht van de belangrijkste conclusies en de toekomstige onderzoeksrichtingen gegeven.

In dit proefschrift laten we zien dat verschillende natuurlijk voorkomende fibrinogeen-varianten een goede matrix kunnen vormen om angiogenese in tissue engineering te beïnvloeden. Door de keuze van de fibrinogeen-variant in de 3-dimensionale matrix worden de eigenschappen van de endotheelcellen gewijzigd, waardoor de mate van angiogenese in de matrix kan veranderen. De eigenschappen van vet-stamcellen worden echter niet veranderd door de fibrinogeen-varianten. Meer specifiek: HMW-fibrine zorgt voor pro-angiogene eigenschappen van de endotheelcellen, deze eigenschappen zijn zowel in plasma-gezuiverd als in recombinant fibrine aanwezig. Als coating van een synthetische matrix geeft HMW-fibrinogeen een dichte en rustige endotheelcellaag. De fibrinogeen  $\gamma$ -varianten geven mogelijk een veranderde angiogenese en wondheling.

Tot nu toe werden de fibrine matrixen in tissue engineering gemaakt van het 'natuurlijke-voorkomende' mengsel van fibrinogeen-varianten. In dit proefschrift laten we zien dat specifieke natuurlijk voorkomende fibrinogeen-varianten mogelijk meer geschikt zijn om de juiste omgeving te creëren. De keuze van de fibrinogeen-variant kan de vorming van nieuwe bloedvaten en dus de aanvoer van zuurstof en voedingsstoffen in de nieuwe matrix beïnvloeden.