

# VU Research Portal

## New Therapies for Myocardial Infarction

van Dijk, A.

2012

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

van Dijk, A. (2012). *New Therapies for Myocardial Infarction: Inflammation Inhibitors and Adipose Derived Stem Cells*.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)



# Nieuwe therapieën na het hartinfarct: ontstekingsremmers en vetstamcel therapie

## Hoofdstuk 1: Introductie

Het hartinfarct speelt een belangrijke rol met betrekking tot de morbiditeit en mortaliteit in de westerse samenleving. Bestaande therapieën na het hartinfarct richten zich op het herstel van de doorbloeding van de hartspier om op die manier de infarctgrootte te beperken en hartfalen te voorkomen. Een nadeel van deze therapieën is dat zij reeds beschadigde, maar nog niet dode hartspiercellen onvoldoende beschermen, terwijl afgestorven hartspiercellen niet vervangen worden. Hierdoor ontstaat uiteindelijk een litteken in het hart hetgeen er in belangrijke mate toe bij kan dragen dat de patiënt hartfalen ontwikkelt. In dit proefschrift hebben wij verschillende methodes en interventies voor het hartinfarct bestudeerd, welke berusten op het gebruik van ontstekingsremmers en vetstamcellen, die aanknopingspunten kunnen leveren voor nieuwe therapieën na het hartinfarct.

Het doel van de ontstekingsremmers was om beschadigde hartspiercellen te beschermen die door de ontsteking na het infarct alsnog te gronde gaan, zonder hierbij de genezing van het hart negatief te beïnvloeden. We hebben hiervoor de ontstekingsremmers clusterine en PX-18 gebruikt. Clusterine remt niet alleen de ontstekingsmediator complement, maar beschermt hartspiercellen ook tegen veranderingen van de plasmamembraan die een locale ontstekingsreactie kunnen induceren. PX-18 daarentegen remt type IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-IIA), een zogenaamd acute fase eiwit, dat eveneens een belangrijke rol speelt bij de ontsteking in het hart na een infarct.

Met behulp van stamceltherapie is het theoretisch mogelijk om dode hartspiercellen te vervangen en onder andere ook vaatnieuwvorming te stimuleren. Een groot probleem bij stamceltherapie is echter om voldoende stamcellen in het infarctgebied te krijgen, die dan kunnen differentiëren tot hartspiercellen. Alhoewel stamceltherapie in principe veelbelovend is, moet deze methode nog beduidend geoptimaliseerd worden. In dit proefschrift hebben we gebruik gemaakt van stamcellen geïsoleerd uit vetweefsel. Vetweefsel is namelijk een veelbelovende bron van stamcellen omdat het een groot aantal stamcellen per gram vet bevat die gemakkelijk te verkrijgen zijn, en waarvan bewezen is dat ze kunnen differentiëren naar verschillende celtypen waaronder cardiomyocyten. Om deze vetstamcel therapie te optimaliseren hebben we de volgende parameters onderzocht: 1) eigenschappen van de stamcellen die hun functie kunnen beïnvloeden, 2) de rol van de extracellulaire matrix in het infarctgebied op de binding, groei en differentiatie van de stamcellen, 3) het ideale tijdpunt van stamceltransplantatie na het infarct, en 4) vergelijking van het gebruik van verse of gekweekte stamcellen.

## Hoofdstuk 2: Toediening van PX-18 na een hartinfarct beschermt cardiomyocyten en vermindert de hoeveelheid littekenweefsel

Het hartinfarct induceert necrotische gebieden in de hartspier, die weer omgeven zijn door randgebieden met zogenaamd reversibel beschadigde hartspiercellen. Deze reversibel beschadigde

cellen hebben een verandering van de plasmamembraan ondergaan, die ook wel flip-flop genoemd wordt. Tijdens reperfusie van het hart bindt het acute fase eiwit sPLA2-IIA aan deze geflip-flopte cellen, en induceert het vervolgens celdood. In dit hoofdstuk beschrijven we het effect van de remming van sPLA2-IIA met behulp van PX-18 op celdood geïnduceerd door ischemie *in vitro* (gekweekte hartspiercellen) en *in vivo* (hartinfarct model in de rat). We hebben gevonden dat PX-18 de grootte van het infarctgebied met 73 +/- 9% verminderde ( $P < 0,05$ ) zonder dat de wondgenezing in het hart verstoord werd. Verder zagen we dat PX-18 *in vitro* membraan flip-flop en apoptose remde, in afwezigheid van sPLA2-IIA, wat suggereert dat PX-18 ook een celbeschermend effect heeft onafhankelijk van sPLA2-IIA. Derhalve lijkt PX-18 een veelbelovende therapie bij het hartinfarct te zijn.

### **Hoofdstuk 3: Toediening van clusterine na een hartinfarct beschermt cardiomyocyten en vermindert de hoeveelheid littekenweefsel *in vivo***

Clusterine (Apolipoprotein J) is een eiwit dat niet alleen complement remt, maar dat tevens de boven beschreven membraan flip-flop van hartspiercellen kan voorkomen, ook onafhankelijk van complement, zoals in een eerdere studie van onze onderzoeksgroep beschreven is *in vitro*. Derhalve was onze hypothese dat het toedienen van clusterine tijdens de acute fase na het infarct hartspierschade zou moeten verminderen. In dit hoofdstuk beschrijven we een studie waarbij we humaan clusterine intraveneus gegeven hebben aan ratten waarin een hartinfarct geïnduceerd was. Allereerst vonden we dat clusterine het aantal dieren verminderde dat overleed na het infarct (23% in de controle groep versus 0% in de clusterine groep). Daarnaast verminderde clusterine de hoeveelheid littekenweefsel na het infarct met  $75 \pm 5\%$  ( $p < 0,05$ ), zonder hierbij de wondgenezing te verstoren. *In vitro* vonden we dat clusterine co-localiseerde met zijn receptor megaline. Echter, het celbeschermende effect van clusterine was niet gerelateerd aan megaline. Samenvattend konden we concluderen dat ook clusterine theoretisch een veelbelovende therapie is in patiënten met een hartinfarct, omdat het cardiomyocyten beschermt na het hartinfarct, deels door remming van de ontstekingsreactie.

### **Hoofdstuk 4: Het 'multidrug resistance' eiwit BCRP beschermt vetstamcellen tegen ischemische schade**

Vanuit de tumorimmunologie is bekend dat tumorcellen 'multidrug resistance' (MDR) eiwitten tot expressie brengen, die een belangrijke rol spelen bij het uitscheiden van chemotherapeutica en hiermee de tumorcel kunnen beschermen. In verschillende stamcellen is de expressie van meerdere MDR eiwitten beschreven. Er is gehypothetiseerd dat deze eiwitten eveneens een celbeschermd effect hebben in stamcellen. De meest bestudeerde MDR eiwitten in de zogenaamde therapeutische stamcellen zijn het breast cancer resistance proteïn (BCRP, ook bekend als ABCG<sub>2</sub>) en P-glyco proteïn (P-gp, ook bekend als ABCB<sub>1</sub>). Tot nu toe is het onderzoek naar de expressie en de rol van MDR eiwitten in vetstamcellen echter beperkt. In dit hoofdstuk hebben we de expressie en functionele rol van de MDR eiwitten BCRP en P-gp in vetstamcellen nader onderzocht, inclusief de invloed van ischemie hierop. We hebben gevonden dat BCRP, in tegenstelling tot P-gp, tot expressie kwam in vetstamcellen. De expressie

van BCRP was met name hoog in vroege passage vetstamcellen en nam af in de tijd (tijdens het kweken). Blootstelling van vetstamcellen aan ischemie verhoogde deze expressie van BCRP. Tevens vonden we dat blokkade van BCRP met de specifieke remmer KO-143, celdood geïnduceerd door ischemie verhoogde. Samenvattend hebben we in dit hoofdstuk aangetoond dat vetstamcellen actief BCRP tot expressie brengen, dat deze expressie afneemt in de tijd, en dat dit BCRP stamcellen beschermt tegen ischemie. Dit betekent dus dat het celbeschermende effect van BCRP in vetstamcellen het meest optimaal is indien deze stamcellen als lage passage vetstamcellen toegediend worden, wanneer de BCRP expressie het hoogste is.

### **Hoofdstuk 5: Toename van fibronectine in het hart na een infarct: een mogelijke stimulator voor de hechting en groei van vetstamcellen**

Een groot probleem bij de stamceltherapie na een hartinfarct is dat slechts weinig stamcellen overleven in het infarctgebied en hierdoor ook weinig stamcellen kunnen differentiëren naar hartspiercellen. Hierin spelen de veranderde condities van de hartspier na het infarct een belangrijke rol. Fibronectine is een extracellulair matrix molecuul waarvan bekend is dat het toeneemt in het hart na het infarct, en dat het de hechting van stamcellen kan bevorderen. Onbekend was of dit ook het geval is voor de vetstamcel. Evenmin was de precieze lokalisatie van fibronectine in het hart na het infarct bekend. Dit laatste bepaalt namelijk mede of stamcellen op de juiste plaats kunnen hechten. Om dit te onderzoeken hebben wij de kinetiek van de hechting en de groei van vetstamcellen op fibronectine geanalyseerd *in vitro* en hebben we tijdsafhankelijkheid van fibronectine deposities in hartspierweefsel van mensen die overleden zijn na een hartinfarct verder bestudeerd. We hebben gevonden dat vetstamcellen significant beter hechten en groeien op fibronectine gecoate kweekplaten en hartspiercellen, in vergelijking met ongecoate kweekplaten en hartspiercellen. Verder vonden we dat de fibronectine positiviteit in het humane hart toenam zowel in het infarctgebied zelf, als in de randzone bij een hartinfarct tussen 12 uur en 14 dagen oud, in vergelijking met controle harten. Dit betekent dus dat indien we de hechting van stamcellen in het geïnfarceerde hart willen bevorderen door gebruik te maken van fibronectine binding, de stamcel therapie plaats moet vinden minimaal 12 uur na het hartinfarct, wanneer fibronectine tot expressie komt in het hart.

### **Hoofdstuk 6: Laminine bevordert de differentiatie van humane vetstamcellen naar hartspiercellen**

Een groot probleem van de stamceltherapie is dat slechts een gering percentage van humane stamcellen tot hartspiercel differentieert. Onze hypothese was dan ook dat extracellulaire matrix moleculen in de hartspier de differentiatie van vetstamcellen in positieve zin zouden kunnen beïnvloeden. In hoofdstuk 6 hebben we onderzocht of het kweken van humane vetstamcellen op fibronectine of laminine gecoate kweekplaten, de 5-aza-2-deoxycytidine geïnduceerde differentiatie van vetstamcellen richting cardiomyocyten inderdaad kunnen bevorderen. We hebben met behulp van RT-PCR analyse gevonden dat, onafhankelijk van de gebruikte coating, mRNA expressie van een vroege marker in de cardiale

ontwikkeling (myosine light chain-2alpha (MLC-2alpha)), 1 week na stimulatie met 5-aza-2-deoxycytidine toegenomen was ten opzichte van onbehandelde cellen. Daarentegen was 5 weken na stimulatie met 5-aza-2-deoxycytidine mRNA expressie van de late marker SERCA2alpha, alleen maar significant toegenomen als vetstamcellen waren gekweekt op laminine en niet op fibronectine gecoate kweekplaten. Dit hebben we daarna op eiwit niveau verder geanalyseerd. We vonden toen dat zowel na 1 als na 5 weken stimulatie, significant meer cellen MLC-2alpha tot expressie brachten als cellen waren gekweekt op laminine in vergelijking met ongecoate platen. Terwijl 5 weken na behandeling het aantal desmine positieve cellen alleen verhoogd was in laminine gecoate platen. Samenvattend vonden we dat een hoog percentage (61%) humane vetstamcellen differentieerde tot hartspiercel *in vitro*, en dat laminine deze differentiatie bevorderde, en met name de late differentiatie.

### **Hoofdstuk 7: Hartinfarctreductie door ongekweekte stromale cellen uit vet in een ratten hartinfarctmodel is afhankelijk van het tijdstip van toediening.**

Om stamceltherapie verder te optimaliseren hebben we in hoofdstuk 7 in een hartinfarct model in de rat verschillende methodieken geanalyseerd die stamceltherapie kunnen verbeteren, namelijk: 1) het effect van de intraveneuze injectie van vetstamcellen als een relatief beperkt belastende methode om stamcellen in het infarctgebied te krijgen; 2) de vergelijking van ongekweekte 'stromale vasculaire fractie' cellen (SVF cellen) uit vetweefsel met gekweekte vetstamcellen; 3) de vergelijking van de transplantatie van SVF cellen na de acute ontstekingsperiode van het infarct (7 dagen na het infarct) met een vroegere fase (1 dag na het infarct).

We vonden dat intraveneus toegediende SVF cellen en passage 2 vetstamcellen, die 7 dagen na het infarct waren toegediend, beide een significante infarctreductie gaven in vergelijking met onbehandelde dieren. De behandeling met SVF cellen had als belangrijk voordeel dat er geen ongewenste bijeffecten waren terwijl na injectie van gekweekte vetstamcellen 3 ratten ademhalingsproblemen kregen, waarvan er een overleed. Verder vonden we dat, in tegenstelling tot injectie van SVF cellen op dag 7 na het infarct, injectie van SVF cellen op dag 1 na het infarct niet resulteerde in een significante infarctreductie. Dit betekent dus dat intraveneuze toediening van SVF cellen na de acute ontstekingsperiode een veelbelovende methodiek is voor stamceltherapie na een hartinfarct, die meer voordelen heeft dan gekweekte vetstamcellen.

### **Hoofdstuk 8: Algemene discussie**

De theoretisch meest ideale therapie na het hartinfarct stimuleert angiogenese, reduceert het verlies van hartspiercellen en verbetert hartspiercel regeneratie. In dit proefschrift hebben we verschillende nieuwe aangrijpingspunten voor therapieën van het hartinfarct beschreven. Op basis van de vindingen in dit proefschrift kunnen we concluderen dat:

1) De ontstekingsremmers PX-18 (sPLA<sub>2</sub>-IIA remmer) en clusterine (complement remmer) hartspiercellen beschermen tegen ontstekingsreacties na het infarct, zonder de normale remodellering van de hartspier te verstoren, waardoor het uiteindelijke litteken na het infarct kleiner wordt.

2) De zogenaamde 'stromale vasculaire fractie' cellen van vet een ideale bron van stamcellen vormt als therapeuticum na het hartinfarct. Deze cellen gaven in het infarctmodel van de rat namelijk een significante infarctreductie en differentieerden ook tot hartspiercellen. Bovendien zijn deze cellen in grote hoeveelheden en gemakkelijk uit vetweefsel te verkrijgen en hebben ze dezelfde positieve effecten als de gekweekte stamcellen. Dit biedt de mogelijkheid om deze cellen direct na isolatie te gebruiken als therapeuticum, wat klinisch gunstig is. Het gebruik van deze ongekweekte cellen is hierdoor goedkoper, maar ook veiliger omdat het inspuiten van deze cellen in ons ratten hartinfarctmodel geen complicaties veroorzaakte, in tegenstelling tot de gekweekte vetstamcellen. Bovendien hebben we gevonden dat bij het kweken van de stamcellen, intrinsieke beschermde factoren van deze cellen, zoals bijvoorbeeld het MDR eiwit BCRP, verloren gaan.

3) Stamceltherapie na het hartinfarct is het meest gunstig na de acute fase van het infarct, omdat dan de stamcellen minder bedreigd worden door de ontstekingsreactie, en omdat na dag 3 fibronectine en laminine toegenomen zijn in het infarctgebied. Hierdoor kunnen de stamcellen beter hechten, overleven en differentiëren naar hartspiercellen.

