

Kennis van bloedtransfusies als basis voor individu-specifieke spiertransplantaties.

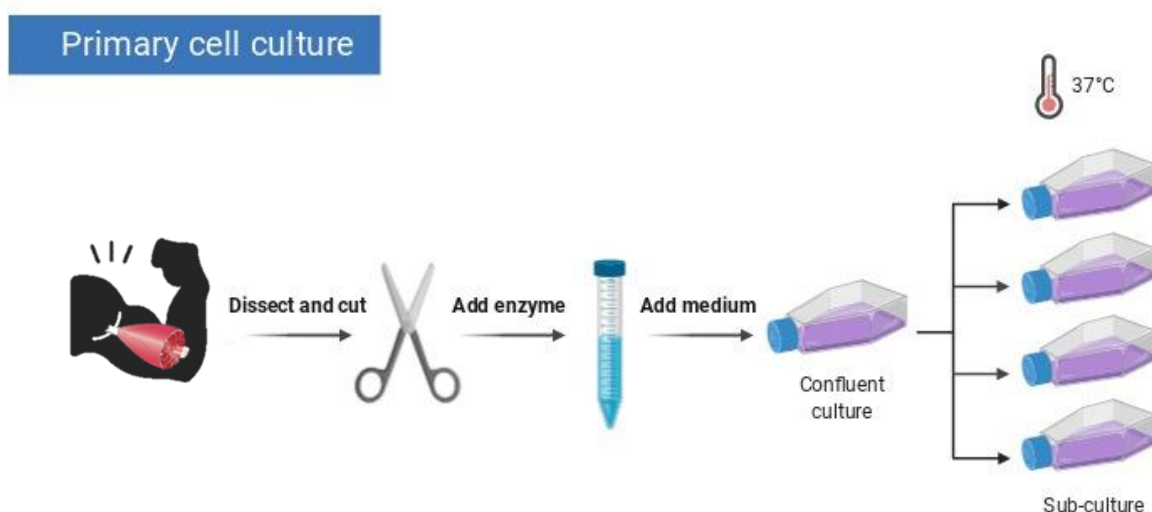
Onder het motto "bloed geven doet leven" zamelt het Rode Kruis bloed in.

Bloedtransfusies zijn sterk ingeburgerd in onze maatschappij en hebben een hoge slaagkans omdat er slechts vier verschillende bloedvarianten zijn. Bloed kan worden beschouwd als een vloeibaar weefsel. Wanneer we die lijn doortrekken van vloeibaar weefsel naar een vast weefsel dan gelden er andere regels. Bij weefseltransplantaties zoals een orgaan, is de kans op slagen veel beperkter, omdat het orgaan lichaamseigen antigenen moet hebben om afstoting te voorkomen. De genetische variatie bij de mens is groot en enkel ééneiige tweelingen hebben 100% kans op een effectieve integratie van het orgaan van de broer of zus.

Skelet spierweefsel heeft een weefselspecifieke regeneratiecapaciteit en kan dus spontaan genezen omdat de volwassen stamcellen, satellietcellen genaamd, vlakbij de spier liggen. Wanneer door een fysiek trauma of spierziekte een te groot deel van het skeletspierweefsel verdwijnt moet er operatief worden ingegrepen. Meestal wordt hiervoor een stuk van de lichaamseigen rugspier (*Latissimus Dorsi*) genomen en getransplanteerd. Op deze manier wordt er een spierdefect gemaakt en geprobeerd om het eerste spierdefect op te lossen. Deze therapie is niet volledig waterdicht, er kunnen complicaties optreden bij het uithalen en implanteren van het stuk spierweefsel.

Bovendien is het niet helemaal zeker of het stuk spier de transplantatie zal overleven. Een bloedtransfusie is de eerste werkende transplantatie van een weefsel en dient als een voorbeeld voor andere weefsels.

Aangespoord door de ontevredenheid van de huidige therapie en de relatief makkelijke toegankelijkheid van de satellietcellen is het veld van *Tissue engineering* hierop verder gaan bouwen met als ultiem doel een functionele bio-artificiële spier te maken. In het labo gaat men vanuit satellietcellen naar volgende stadia in de maturatie (myoblasten, myotubes) en uiteindelijk naar een functionele spiervezel (Figuur 1).



Figuur 1: Overzicht van de manier van werken: isoleren van de cellen uit de spier, dan satellietcellen losmaken uit het weefsel (enzymwerking) en laten opgroeien en vermeerderen.

Ondanks het veelbelovend karakter van *Tissue engineering* zijn er toch nog enkele uitdagingen, namelijk: het verkrijgen van een bio-artificiële spier met bloedvaten en zenuwen en een voldoende getraind weefsel, die een transplantatie kan overleven. Er is al veel gekend rond de humane bio-artificiële spier, maar effectieve testen op mensen zijn nog niet aan bod gekomen. Het regeneratief potentiaal van de bio-artificiële spier zal eerst worden getest op muizen met een beperkte genetische variatie als een *proof-of-concept* en de haalbaarheid na te gaan. Voordat er kan worden gesproken over een bio-artificiële spier zijn er cellen nodig, deze kunnen op verschillende manieren worden verkregen en kunnen via verschillende trajecten worden opgegroeid.

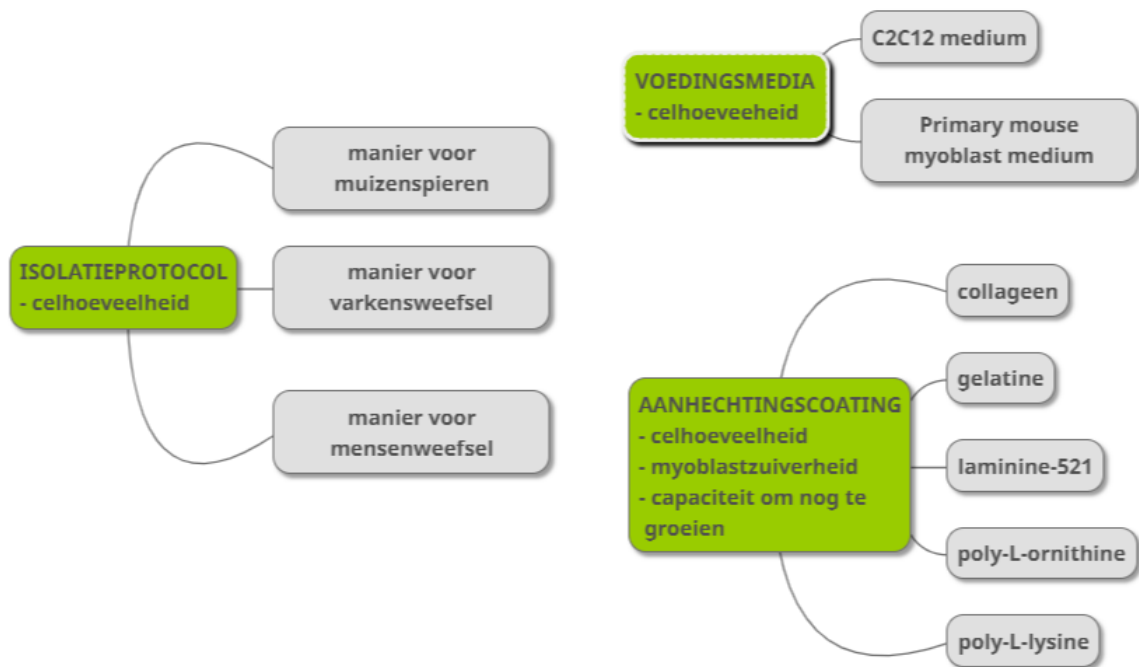
De manier om de satellietcellen te isoleren, te voeden met specifieke voedingsmedia en de ondersteunende componenten rondom de cellen (aanhechtingscoating) zijn de variërende parameters doorheen dit onderzoek. Er worden drie verschillende isolatieprotocollen gekozen, elk is opgesteld voor spierweefsel van een specifiek organisme, namelijk: varken, muis en mens. Na veertien dagen opgroeien (in cultuur) levert het protocol voor mensenweefsel het hoogste aantal cellen. Nu het duidelijk is hoe de cellen kunnen worden geïsoleerd kan er worden nagegaan hoe die cellen best in cultuur worden gehouden. Er worden twee soorten voedingsmedia vergeleken, C2C12 en het *primary mouse myoblast growth* voedingsmedium. Het C2C12 medium wordt normaliter gebruikt voor een robuuste, blijvend-groeiende kankercellijn vanuit muizen en het *primary mouse myoblast growth* voedingsmedium dient voor een primaire cellijn, rechtstreeks geïsoleerd uit de spieren van een muis. Het resultaat is beduidend, het *primary mouse myoblast growth* voedingsmedium slaagt er het best in om de primaire cellen te onderhouden en te vermeerderen. Deze is dan ook ontwikkeld met oog op het opgroeien van fragielere, primaire cellen en bevat meer ondersteunende componenten, zoals insuline, die de groei van de cellen ondersteund.

Een aanhechtingscoating heeft als belangrijkste functie de aanhechting van de cellen te bevorderen door het nabootsen van hun natuurlijke omgeving, in dit geval is dit de oorspronkelijke omgeving van de satellietcellen. Dit bestaat uit verschillende componenten en gecombineerd met een literatuurstudie worden er vijf uitgekozen, namelijk: collageen, gelatine, laminine-521, poly-L-ornithine en poly-L-lysine. Na zes dagen in cultuur is het onbetwistbaar dat laminine-521 de meeste cellen oplevert. Poly-L-ornithine komt dicht in de buurt, maar deze heeft dan ook een grote gelijkenis met de laminine-521 coating.

Daarnaast wordt de coating getest op drie verschillende criteria, namelijk de hoeveelheid cellen, de myoblastzuiverheid van de verkregen cellen en de capaciteit van de cellen om te evolueren naar een volgend stadium. Een zuivere satellietcel en myoblastpopulatie worden gecontroleerd door een desmine en DAPI-kleuring uit te voeren. Deze kleuren respectievelijk de myoblasten groen en alle celkernen blauw. Op deze manier kan er na worden gegaan hoeveel van de verkregen cellen effectief groen kleuren en dus de beoogde myoblasten zijn tussen de andere, niet-groen gekleurde cellen.

Doorheen het proces van isoleren, opgroeien in cultuur, etc. kunnen de cellen ook hun capaciteit om over te gaan naar het volgende stadium verliezen. Om de invloed van de coating hierop na te gaan kan een soortgelijke kleuring worden uitgevoerd. Een combinatie van een tropomyosine en DAPI-kleuring kleurt, in een later stadium, respectievelijk de gefuseerde myoblasten en alle celkernen. Via een berekening kan worden bepaald in welke mate de myoblasten nog kunnen fuseren tot de volwassen spiervezels, namelijk: myotubes. Opnieuw behaalt laminine-521 een verbazingwekkend

resultaat op beide evaluaties. Bij de tropomyosine kleuring van de laminine-521 is al de typerende dwarsstreping van de skeletspiervezels duidelijk te zien.



Figuur 2: Overzicht van de drie doelstellingen, de geëvalueerde criteria (groen) en de onderzochte kandidaten (grijs).

Het is nu duidelijk op welke manier de satellietcellen moeten worden geïsoleerd, in welk voedingsmedium ze het beste groeien en welke coating de satellietcellen het best ondersteund in aantal en evolutie. Hierdoor is het pad geëffend voor het vervolg van dit onderzoek, namelijk het bepalen van de meest optimale parameters van de mechanische stimulatie van de bio-artificiële spier. Spiertransplantaties lijken een ver-van-mijn-bedshow, maar de gelijkenis met bloedtransfusies is groot en geeft een heel andere kijk op dit belangrijk onderwerp.