

Radiatie geïnduceerde vaatschade

Bachelor Scriptie voor "Cell Biology, Section Radiation & Stress Cell Biology"

Auteur: Jolanda Visser

Major: Biomedische Wetenschappen

Studentnummer: 1728709

Begeleider: dhr. Rob Coppes

Inleverdatum: 14-04-2010

Samenvatting

Radiotherapie wordt al jaren gebruikt als effectief middel in de strijd tegen kanker en is een belangrijke hoeksteen van het moderne kanker management geworden. Jaarlijks wordt er in Nederland bij meer dan 80.000 individuen kanker gediagnosticeerd, waarvan bij een kleine 9000 individuen longkanker. Ruim de helft van al deze patiënten zal in de loop van hun ziekte- en behandelingsproces met radiotherapie behandeld worden. Ondanks de voordelen die radiotherapie biedt zijn er ook enkele nadelen, zo is bijvoorbeeld de kans op het ontwikkelen van radiatie-pneumonitis zeer groot. Doordat de kans op het ontstaan van pneumonitis zeer groot is wordt de met radiotherapie te geven dosis beperkt, en daarmee de kans op genezing. Onderzoeken hebben aangetoond dat de door radiotherapie geïnduceerde vaatschade een belangrijke factor is voor het ontwikkelen van pneumonitis. Wanneer deze vaatschade voorkomt of gerepareerd kan worden zou de kans op pneumonitis naar beneden gaan en zouden er tijdens de radiotherapie hogere dosissen gegeven kunnen worden met een grotere kans op genezing. De centrale vraag in deze scriptie is: Op welke manieren kan de door radiotherapie veroorzaakte vaatschade voorkomen of gerepareerd worden? In deze scriptie is geprobeerd door middel van een literatuur studie een antwoord op deze vraag te vinden. De door radiotherapie geïnduceerde vaatschade kan op meerdere manieren voorkomen/gerepareerd kunnen worden. Allereerst zou men apoptose van de endotheelcellen, wat de vaatschade veroorzaakt, kunnen voorkomen door de pro-apoptotische routes die na radiotherapie in de endotheelcel plaatsvinden te beïnvloeden. Ten tweede zou men de door middel van therapeutische angiogenese de beschadigde vaten kunnen herstellen. De eindconclusie van deze scriptie is dat de schade aan de endotheelcellen wellicht voorkomen kan worden door inhibitie van de pro-apoptotische routes in de endotheelcel, verder zou de schade door middel van therapeutische angiogenese gerepareerd kunnen worden. Reductie van de vaatschade zou wellicht de kans op bijwerkingen zoals pneumonitis naar beneden brengen waardoor het mogelijk wordt om tijdens de therapie een hogere dosis te geven.

Inhoudsopgave

Samenvatting.....	Pag. 1
Inleiding.....	Pag. 3
1. Radiotherapie geïnduceerde vasculaire schade.....	Pag. 5
1.1 Reactie vasculair weefsel op radiatie.....	Pag. 5
1.2 Radiatie geïnduceerde apoptotic pathways.....	Pag. 6
2. Inhibitie van radiotherapie geïnduceerde vaatschade.....	Pag. 9
3. Repareren van vaatschade.....	Pag. 11
3.1 Angiogenese en Vasculogenese.....	Pag. 12
3.2 Ontdekking van circulerende endotheliale progenitor cellen (EPCs) en het bijstellen van het algemene paradigma.	Pag. 12
3.3 Therapeutische angiogenese.....	Pag. 13
Discussie.....	Pag. 15
Conclusie.....	Pag. 17
Referenties.....	Pag. 17

Inleiding

Radiotherapie wordt al jaren gebruikt als effectief middel in de strijd tegen kanker en is een belangrijke hoeksteen van het moderne kanker management geworden. Jaarlijks wordt er in Nederland bij meer dan 80.000 individuen kanker gediagnosticeerd, waarvan bij een kleine 9000 individuen longkanker. Ruim de helft van al deze patiënten zal in de loop van hun ziekte- en behandelingsproces met radiotherapie behandeld worden. Dit kan voor zowel voor curatieve als palliatieve doeleinden zijn. (1, 3)

In het geval van longkanker wordt vaak voor radiotherapie gekozen dit omdat het orgaan en functie besparend is, alhoewel dit laatste negatief beïnvloedt kan worden door bijwerkingen die pas laat na het bestralingsmoment plaatsvinden. (1)

Waar chemotherapie voor de bekende bijwerkingen zorgt, geeft radiotherapie dus ook de nodige bijwerkingen. Waar de bijwerkingen in het geval van medicinale therapieën (chemo bijv.) altijd systemisch zijn, zijn de bijwerkingen bij Radiotherapie voornamelijk lokaal, dat wil zeggen binnen het orgaan dat bestraald is. De bijwerkingen bij radiotherapie worden hoofdzakelijk veroorzaakt door het feit dat niet alleen het kwaadaardige tumor weefsel wordt bestraald maar ook een deel van het gezonde longweefsel eromheen.

Ondanks het risico op bijwerkingen bij radiotherapie blijft het een belangrijke behandelingsmethode omdat het heel precies toegediend kan worden (en steeds preciezer.) Door de jaren heen is er veel onderzoek gedaan om radiotherapie te optimaliseren met als doel zo curatief mogelijk te zijn en met zo weinig mogelijke bijwerkingen.

En aangezien het aantal kanker overlevenden de laatste jaren omhoog gaat door het verbeteren van de behandelingsmethoden is het belang van het verminderen en voorkomen van bijwerkingen ook belangrijker geworden. De mortaliteit van longkanker patiënten na bestraling is eigenlijk nog steeds erg hoog, ongeveer 10-20% van de longkanker patiënten leeft nog na drie jaar. (3) De reden dat deze mortaliteit zo hoog ligt, komt voornamelijk door het feit dat de vroege en late bijwerkingen die na de bestraling ontstaan schade veroorzaken aan de long wat kan leiden tot de nodige complicaties. Denk bijvoorbeeld aan ernstige ventilatie problemen door het kapot gaan van de alveoli.

De reactie van gezond longweefsel op radiotherapie is al vele malen beschreven, de originele beschrijving door Rubin en Casserat. (4) deelt de klinische fase in drie delen. Namelijk in (1.) een vroege fase, met een latente periode van pneumonitis (eerste maand); (2)

een midden fase, met acute pneumonitis (derde week tot enkele maanden); en (3) een late fase, met fibrose (6 maanden en later).

De vroege fase wordt gekarakteriseerd door het verdwijnen van type 1 pneumocyten, deze cellen zijn verantwoordelijk voor de gaswisseling en beslaan het grootste gedeelte van de alveolaire oppervlakte. Type 1 pneumocyten zijn zeer gevoelig voor bestraling en kunnen zichzelf niet repliceren, daardoor worden ze na bestraling vervangen door type 2 pneumocyten. Type 2 pneumocyten zijn surfactant producerende cellen, deze cellen komen in grotere aantallen voor dan type 1 pneumocyten maar zijn veel kleiner, waardoor ze een minder groot oppervlakte beslaan. Type 2 pneumocyten kunnen zichzelf wel repliceren en zijn na bestraling in staat om de type 1 pneumocyten te vervangen. In de eerste weken na bestraling zijn alleen met de elektronen microscoop verschillende veranderingen te zien, zo zijn er eerst degeneratieve veranderingen aan type 1 maar ook type 2 pneumocyten te zien. Verder is er sprake van verhoogde capillaire permeabiliteit; zwelling van het basale membraan en endotheliale veranderingen. In de interstitiële ruimte is er sprake van oedeem vorming en in de alveolaire ruimte is er een toename in het aantal macrofagen.

De midden fase van acute pneumonitis is via de lichtmicroscop wel te zien en wordt gekarakteriseerd door het lekken van eiwitten in de alveolaire ruimte; verdikking van de alveolaire septa; oedeem van het interstitium; veranderingen van de capillairen; en veranderingen in type 2 pneumocyten en alveolaire macrofagen.

De late fibrotische fase wordt gekarakteriseerd door verlies van capillairen, een verdere afname van type 1 pneumocyten en de uiteindelijk vervanging van type 1 pneumocyten door type 2 pneumocyten. Verder is er sprake van een toegenomen collageen depositie.

Na radiotherapie zijn er in de long twee verschillende soorten morfologische schade te onderscheiden, namelijk schade aan het parenchym en vaatschade. In de vroege pneumonitische fase zijn zowel parenchymale als vasculaire veranderingen te zien. Gedacht wordt dat de vasculaire schade in de vroege fase bijdraagt aan de ontwikkeling van de pneumonitis fase. Verschillende onderzoeken hebben aangetoond dat het in apoptose gaan van microvasculaire endotheel cellen een belangrijke factor is voor de radiosensitiviteit van de bloedvaten en aanleiding zou zijn voor de verdere weefselschade na bestraling. (5) Schade aan de capillaire endotheel laag zou de door radiatie geïnduceerde pneumonitis bevorderen en zou dus bijdragen aan de schade die in de latere fibrotische fase ontstaat. Wanneer de schade aan de capillaire endotheel laag voorkomen of beperkt zou kunnen worden zou het risico op radiatie

pneumonitis naar beneden kunnen brengen en zou de radiosensitiviteit van de vaten verminderd worden zodat er tijdens bestraling een hogere dosis gegeven zou kunnen worden.

De centrale vraag in deze scriptie is: Op welke manieren kan de door radiotherapie veroorzaakte vaatschade voorkomen of gerepareerd worden? In deze scriptie zal door middel van een literatuur onderzoek onderzocht een antwoord op deze vraag gezocht worden.

Deze scriptie zal zich eerst richten op hoe de vaatschade voorkomen kan worden, daarna zal besproken worden hoe de vaatschade juist gerepareerd kan worden.

In deze scriptie zal als eerst behandeld worden hoe radiotherapie schade aanricht aan de endotheel laag van de bloedvaten en hoe dit voorkomen kan worden. Eerst zal er gekeken worden naar wat de fysiologische veranderingen van de bloedvaten na het bestralingsmoment zijn. Vervolgens zal uitgelegd worden hoe radiotherapie schade veroorzaakt aan de endotheelcellen, er word vooral gekeken naar wat er zich in de endotheel cellen afspeelt. Hierna zal aan de hand van enkele artikelen beschreven worden hoe deze schade voorkomen zou kunnen worden.

Verder zal nog uitgelegd worden hoe beschadigde bloedvaten normaal gesproken gerepareerd worden en zal uitgelegd worden dat de ontdekking van EPCs de kijk op dit proces verbreedt hebben. Tot slot word er nog gesproken over hoe deze kennis therapeutisch gebruikt zou kunnen worden.

1. Radiotherapie geïnduceerde vasculaire schade

In deze paragraaf wordt de reactie van het vasculaire weefsel op radiotherapie beschreven.

1.1 Reactie van het vasculaire weefsel op radiotherapie

Al zolang dat wetenschappers de effecten van radiotherapie op gezond weefsel bestudeerden zag men al dat bestraling schade veroorzaakt aan het vasculaire apparaat. In deze paragraaf zal uitgelegd worden wat de morfologische veranderingen van de bloedvaten na het bestralingsmoment zijn.

Het vasculaire weefsel reageert in twee stappen op radiotherapie. Binnen de eerste 24 uur na bestraling zijn de eerste acute veranderingen van het vasculaire weefsel al te zien. Deze fase word gedomineerd door het in apoptose gaan van de endotheelcellen, deze zijn samen met type 1 pneumocyten het meest gevoelig voor bestraling in de long. (6)

De latere vasculaire veranderingen ontstaan binnen een paar maanden na bestraling. Deze fase wordt gekarakteriseerd door het inklappen van de capillairen, verdikking van het basale membraan, verlittekening van omliggend weefsel, telangiectasia en verlies van delingscapaciteit. (7) De latere vasculaire veranderingen hebben waarschijnlijk een groter effect op de latere parenchymale veranderingen van normaal weefsel, dan de vroege vasculaire veranderingen, maar van de vroege vasculaire veranderingen is bekend dat het de door radiatie geïnduceerde pneumonitis bevordert (7).

De kleine bloed capillairen zijn de meest radiosensitieve elementen van het vasculaire netwerk. Dit komt door de hoge radiosensitiviteit van de endotheel cellen waaruit de capillaire wanden grotendeels bestaan. De radiosensitiviteit van de capillairen is een beperkende factor voor de stralingstolerantie van gezond weefsel. Na bestraling is namelijk te zien dat het capillaire endotheel op begint te zwellen, dat leukocyten zich eraan vasthechten en dat de permeabiliteit toeneemt. (8) Karakteristieke veranderingen in de capillaire histologie zijn onder andere loslating van endotheelcellen van de basale lamina, cell pyknosis, thrombose en verlies van hele capillaire segmenten wat resulteert in weefsel ischemie of hergroei van verloren capillairen in bepaalde organen. (9) De kleine capillairen laten na bestraling veel meer morfologische veranderingen zien dan de grote vaten. Vasodilatatie komt ook vaak voor, dit komt waarschijnlijk door het feit dat sommige capillairen verdwijnen waardoor de overgebleven vaten hun functie over moeten nemen.(10) Wanneer deze vaten aan de oppervlakte liggen kunnen ze klinisch detecteert worden als telangiectasia.

1.2 Radiatie geïnduceerde apoptotische pathways

De door radiotherapie geïnduceerde vaatschade wordt voornamelijk veroorzaakt door het kapot gaan van de vasculaire epitheellaag aan de binnenkant van de vaten kort na het bestralingsmoment. Zoals al genoemd is zijn de epitheel cellen zeer gevoelig voor radiatie, het kapot gaan van deze epitheel laag zorgt er dan ook voor dat het vasculaire systeem zeer gevoelig is voor bestraling waardoor de bij radiotherapie te geven dosis beperkt wordt omdat het risico op het ontstaan van pneumonitis anders te groot wordt. Het is dus belangrijk om te weten hoe deze vaatschade veroorzaakt wordt zodat er naar methoden gezocht kan worden om deze vaatschade te voorkomen of te genezen. Op dit moment zijn de cellulaire en moleculaire reacties van de endotheelcellen op radiotherapie al door verschillende in vitro studies goed gekarakteriseerd.

Binnen een paar uren na bestraling zijn de eerste fysiologische veranderingen aan de epitheel cellen al te zien, deze worden veroorzaakt door veranderingen in structurele eiwitten. Verder laten de endotheelcellen veranderingen in synthese en secretie van verschillende moleculen zien, zoals groeifactoren, chemoattractanten en specifieke schade markers zoals thrombomodulin (is belangrijk voor de bloedstolling), Von Willebrand factor (bloedstollingsfactor), heparinase (vertraagt het bloedstollingproces) en leukocyte endothelial-cell adhesie molecuul 1 (11, 12) (zorgt voor de adhesie van neutrofielen). Endotheelcellen die de bestraling overleefd hebben laten cytoplasmatische hypertrofie (13) zien wat leidt tot de formatie van grote cellen die permanent vastzitten in de G1- of G0-fase.

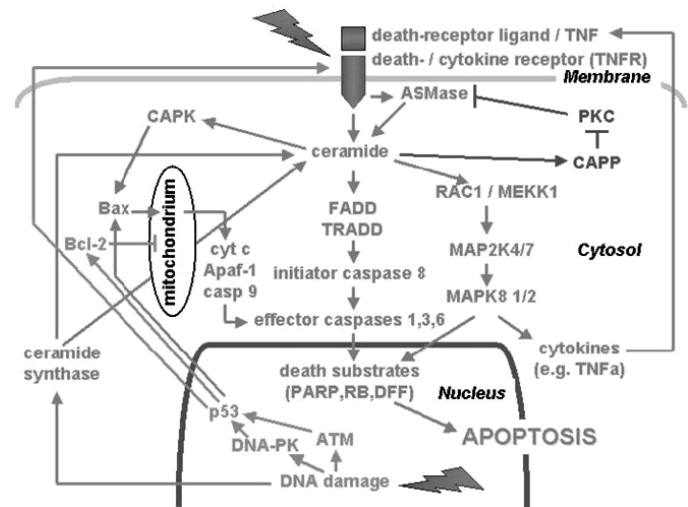
Omdat de door bestraling geïnduceerde endotheliale celdood een belangrijke oorzaak voor de hoge bestralingsgevoeligheid van het vasculaire systeem lijkt te zijn is het belangrijk om te weten hoe de specifieke pathways die deze cel dood veroorzaken in elkaar steken. De studies die zich hiermee bezig hebben gehouden hebben zich vooral gefocust op hoe de door radiatie geïnduceerde apoptose processen werken. Deze apoptotische processen zijn hoofdzakelijk DNA schade onafhankelijk maar membraan schade afhankelijk.

In 1994 is voor het eerst beschreven door Haimovotz-Friedman et al. (14,15) dat radiotherapie schade aanricht aan de celmembranen van endotheelcellen, zij beschreven dat deze membraanschade de sphingomyeline pathway activeert. Activatie van deze pathway leidt tot het aanmaken van ceramide deze is verantwoordelijk voor het initiëren van apoptose.(16,17)

De sphingomyeline pathway is een alomtegenwoordig en zeer geconserveerd signaal systeem vergelijkbaar met de phosphoinositol pathway. (17) Ceramide word gegenereerd van sphingomyeline door de actie van een neutral of door de activatie van acid sphingomyelinases (ASMases) maar kan ook aangemaakt worden door de novo synthese door het enzym ceramide synthase. Ceramide kan van membraan gebonden sphingosine losgelaten worden door activatie van ASMases, door binding van een dood receptor ligand of door radiatie geïnduceerde schade aan het membraan. (17)

Wanneer ceramide vrijgemaakt is kan het dienen als second-messenger molecuul in signaal responsen op fysiologische- of omgevingsfactoren, maar het kan ook omgezet worden naar verschillende structurele of effector moleculen. In endotheel cellen is het dus zo dat de door radiatie geïnduceerde verhoogde intracellulaire ceramide spiegels toegeschreven worden aan activatie van ASMases door membraan schade. (17) Wanneer ceramide van de membraan gebonden sphingosine vrijkomt kan het in de cel drie verschillende cascades activeren: de

MAPK8 pathway, de mitochondriale pathway en de death receptor pathway. In afbeelding 1 zijn de verschillende pathways aangegeven. (17)



Afbeelding 1 (17)

Endotheliale apoptose routes,

In deze afbeelding is te zien dat ceramide, ceramide-activated phosphatase (CAPP) kan stimuleren en via CAPP direct proteïne kinase C kan inactiveren. Proteïne kinase C is betrokken een anti-apoptose signaalroute. (17) Om de door ceramide geïnduceerde apoptose te remmen zou PKC een belangrijke rol kunnen spelen omdat PKC de hydrolyse van sphingomyeline kan blokkeren en dus ook het vrijkomen van ceramide van de celmembraan. Haimovits- Friedman et al. hebben hier onderzoek naar gedaan, zij ontdekten dat activatie van PKC de ASMase activiteit remt een daarmee apoptose van de endotheelcellen tegengaat. (14,15) Zij vonden dat basic fibroblast growth factor (FGF) de PKC activiteit kan stimuleren en via de PKC route apoptose remt.

Verder is in de afbeelding te zien dat ceramide via de RAC1/MEKK1 pathway MAPK8 activeert daarmee ook het cytokine TNF- α . TNF- α kan autocrien de TNF-receptor activeren maar kan ook voor stress aan de omgeving zorgen. Via de MAPK8 pathway worden ook de effector caspases 1,3 en 6 geactiveerd, deze initiëren apoptose door middel van degradatie van celdood substraten.

Verder zorgt activatie van de TNF- en de death- receptor voor de activatie van een directe apoptotische pathway. (17)

Ceramide kan ook nog via een mitochondriale pathway voor apoptose zorgen. Zie afb 1. Deze route wordt geactiveerd door stimulatie van CAPK, door ceramide. Deze route gaat

voornamelijk via de caspase 9 route. Belangrijk bij deze route is dat geactiveerd p53 via BCL-2 eiwitten en BAX via de mitochondriale route voor apoptose zorgt.

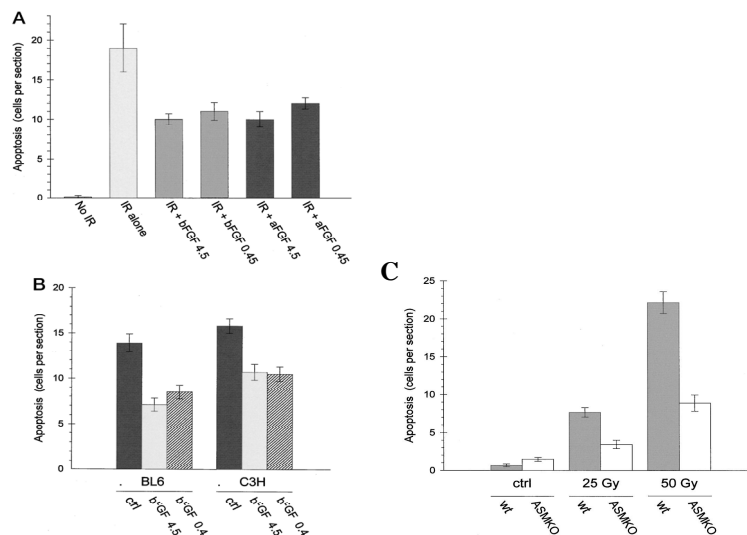
De studie van Haimovits-Friedman et al. (14,15, 17) leverde het bewijs dat apoptotische signalen ook door iets anders dan DNA schade geactiveerd kunnen worden, dus door radiatiegeïnduceerde membraan schade. Radiatie kan namelijk ook nog de dubbele DNA streng breken waardoor de activatie van ceramidesynthase plaatsvindt en dus ook de productie van ceramide (Afbeelding 1). (18) Het is ook algemeen bekend dat de door radiatiegeïnduceerde schade aan de dubbele helix structuur leid tot apoptose doordat p53 wordt geactiveerd, p53 activeert de mitochondriale apoptose route (Afbeelding 1). (17) Wel moet genoemd worden dat al deze studies gebruik hebben gemaakt van radiotherapie met een enkele en hoge dosis (tussen 10 en 20 Gy) hierdoor is het moeilijk te zeggen tot hoeverre deze processen bijdragen aan radiatiegeïnduceerde endotheliale cel dood bij klinisch relevante doses.

2. Inhibitie van Radiotherapie geïnduceerde vaatschade

Recente studies hebben aangetoond dat de door radiatie geïnduceerde apoptose van endotheel cellen in vitro en in de long in vivo gemedieerd wordt door de second messenger ceramide via activatie van acid sphingomyelinase (ASM).

Recente onderzoeken zoals die van Fuks et al. (11) hebben aangetoond dat microvasculaire endotheliale apoptose een vroege en kritisch element is radiatie pneumonitis. Ze toonden aan dat de pro apoptotische effecten van radiatie via de ASMases en de generatie van ceramide gemedieerd werden. (17) Genetische mutaties die ASM inactiveren of behandeling met injecties bFGF blokkeerden de ceramide generatie en daarmee apoptose. Het zelfde mechanisme van radiatie geïnduceerde apoptose via de generatie van ceramide werd ook door Haimovits-Friedman gezien in endotheel cellen in vitro. (14) Ook lieten ze zien dat de antiapoptotische werking van bFGF voor een deel gemedieerd werd door activatie van de α isoform van PKC, hierdoor werd ASM geremd en daarmee het vrijkomen van ceramide van de membraan. (7,15) Radiatie geïnduceerde apoptose in lymfoïde cellen wordt ook geassocieerd met een balans tussen ceramide en PKC activiteit, alhoewel in dit systeem BCL-2 ook ceramide- en radiatie geïnduceerde apoptose reguleerde. (7)

In de studie van Pena en Fuks. (7) Hebben ze in muizen gekeken naar de reactie van endotheelcellen in het Centrale zenuwstelsel (CNS) op radiotherapie. Uit voorgaande onderzoeken Fuks et al. was al bekend dat radiotherapie door middel van ceramide voor apoptose zorgt, en dat dit door middel van bFGF of door mutatie van ASM gehinibeerd kan worden. Bekend was ook dat in de CNS 15% van de endotheelcellen na bestraling verdween, het was echter niet bekend of dit ook met apoptose te maken had. In deze studie vonden ze dat 12 uur na een enkele dosis bestraling een piek in apoptose te zien was. Deze resultaten waren consistent met de observaties van Li et al. Deze lieten zien dat in de ruggengraat van ratten apoptose gedurende de eerste 24 uur plaatsvond met een piek bij de 12 uur. (28) Verder lieten ze zien dat ongeveer 16-20% van de cellen die apoptose ondergingen endotheelcellen waren, dat terwijl 20% van de cellen in de CNS endotheelcellen zijn. De endotheliale apoptose was proportioneel met de endotheliale cel fractie van de totale CNS populatie. Ook deze bevindingen kwamen overeen met andere onderzoeken die aantoonde dat 15% van de endotheelcellen binnen 24 uur na bestraling verdwenen waren, Ljubimova et al. (19) Verder liet deze studie zien dat zowel FGF als ASM deficiëntie de radiatie geïnduceerde apoptose van de endotheelcellen in de CNS remde. Onderzoek van deze onderzoeksgroep had ook al aangetoond dat BFGF ook in de long voor bescherming tegen apoptose zorgt. Hoewel de mechanismen voor de beschermende werking van FGF niet helemaal bekend zijn is er wel bewijs dat suggereert dat PKC via blokkering van sphingomyelinhydrolyse naar ceramide werkt.



Afbeelding 2

A. In deze afbeelding is de radiobeschermende werking van FGF te zien, in deze studie is zowel gekeken naar bFGF als aFGF, beide laten een reductie in apoptose zien. **B.** In twee verschillende muizenstammen is dezelfde reactie te zien, bFGF laat een reductie in apoptose zien. **C.** In ASM knock out muizen is ook een reductie te zien in apoptose zien.

Tee and Travis. (5) hebben onderzoek gedaan naar basic fibroblast growth factor en vonden in contrast tot de studie van Fuks dat bFGF juist niet tegen radiatie pneumonitis beschermd.

Deze studie was ontworpen naar aanleiding van de Fuks studie en had als doel om te kijken of bFGF tegen radiatie pneumonitis beschermd na het geven van een enkele dosis aan de long. En ze wilden kijken of er apoptose plaatvond in de long na bestraling en in welke weefsels. Voor dit experiment gebruikten ze twee verschillende muizen stammen met verschillende radiosensitiviteiten. De C3H stam kwam van dezelfde soort als die in de studie van Fuks et al. gebruikt was. De resultaten van Tee en Travis lieten zien dat bFGF in vivo helemaal niet tegen radiatie pneumonitis beschermd na een enkele dosis bestraling, in geen van de beide muizenstammen. Deze resultaten spraken de resultaten van de Fuks experimenten tegen.

Verder lieten ze zien dat de proportie van apoptotische lichamen niet hoger was in de sensitieve NCR stam dan in de meer resistente C3H stam, dit suggereert dat radiatie geïnduceerde apoptose juist niet de kritische determinant is in radiatie pneumonitis. De redenen voor deze discrepantie zijn niet helemaal duidelijk. De experiment waren beide hetzelfde uitgevoerd, het enige verschil was de bestralingstechniek. Fuks et al. beschermden het mediastinum waardoor waarschijnlijk ook een gedeelte van het long parenchym beschermd is. Hierdoor was er waarschijnlijk een reductie in de mortaliteit van radiatie pneumonitis en zou bFGF misschien een kleine bijdrage geleverd hebben aan de overleving van de endotheelcellen. Wat hun belangrijkste conclusie is dat bFGF wel muizen beschermde tegen een vroege fase van radiatie geïnduceerde longschade maar niet tegen radiatie pneumonitis.

3. Repareren van vaatschade

Het formeren van nieuwe bloedvaten en repareren van bestaande bloedvaten is belangrijk voor het maken en in stand houden van het vasculaire netwerk. De ontwikkeling op het gebied van de onderliggende mechanismen die het formeren en repareren van bloedvaten reguleren, hebben nieuwe therapeutische strategieën opgeleverd die voor een tal van vasculaire ziekten toegepast zouden kunnen worden. De twee belangrijke processen die verantwoordelijk zijn voor ontwikkelen en in stand houden van de bloedvaten zijn Angiogenese en Vasculogenese.

3.1 Angiogenese en Vasculogenese

Zoals net werd vermeld kan vasculaire schade in het lichaam door twee mechanismen gerepareerd worden, door angiogenese en door vasculogenese. Zowel angiogenese en vasculogenese worden gedefinieerd als processen die verantwoordelijk zijn voor het formeren van nieuwe bloedvaten, toch zijn het twee totaal verschillende processen.

Angiogenese is een proces dat gekarakteriseerd wordt door de formatie van nieuwe bloedvaten uit bloedvaten die al in het organisme aanwezig waren. Deze formatie ontstaat onder andere door de proliferatie en migratie van plaatselijke endotheelcellen maar kan ook gestimuleerd worden door rondcirculerende bone-marrow derived cells. Angiogenese komt zowel tijdens de embryogenese als tijdens de postnatale neovascularisatie voor. (20)

Vasculogenese is een proces dat plaats vindt door de-novo formatie van nieuwe bloedvaten, dit wordt gekarakteriseerd door rekrutering van cellen die de mogelijkheid hebben om als endothelial progenitor cells (EPCs) te dienen. Voorheen werd gedacht dat Vasculogenese alleen tijdens de embryogenese plaatsvond, dit beeld moest echter bijgesteld worden door de ontdekking van endotheliale voorloper cellen die in het perifere bloed van volwassenen rond circuleren. (20) De volgende paragraaf zal gaan over de ontdekking van deze cellen en over het paradigma dat tot aan de 90er jaren bestond.

3.2 Ontdekking van circulerende endotheliale progenitor cellen (EPCs) en het bijstellen van het algemene paradigma.

Ruim 20 jaar dacht men dat de vasculaire groei en remodelering in de postnatale levensfase kwam door de capaciteit van mature endotheelcellen om te prolifereren en te migreren. Dit algemene paradigma voor nieuwe vaatformatie in de jaren 90 stelde dan ook dat nieuwe capillairen gevormd worden door de lokale migratie en proliferatie van al bestaande endotheelcellen meestal vanuit de venulen, gevolgd door lumen formatie en inbedding van murale cellen zoals pericyten. (21)

Dit paradigma was sterk gebaseerd op het werk van Judah Folkman en collaga's uit de jaren 70. (22) De ontdekking van Asahara *et al.* (23) in 1997 dat been merg (BM)-afkomstige endotheel progenitor cellen (EPCs), circulerend in het perifere bloed van volwassenen, ook participeren in de neovascularisatie in volwassenen gaven het bewijs dat vasculogenese niet alleen in de embryogenese plaatsvindt maar ook tijdens de postnatale ontwikkeling.

De ontdekking van EPCs hebben onze kijk op angiogenese in volwassen weefsel radicaal veranderd, en wijzen op de contributie van circulerende BMDC op de nieuwe vaat formatie, in plaats van migratie en replicatie van plaatselijke epitheel cellen. EPCs openden deuren naar nieuwe manieren om beschadigde weefsels te repareren door deze te gebruiken om neo-angiogenese en re-endothelialisatie te bevorderen. Het concept van therapeutische angiogenese werd geboren.

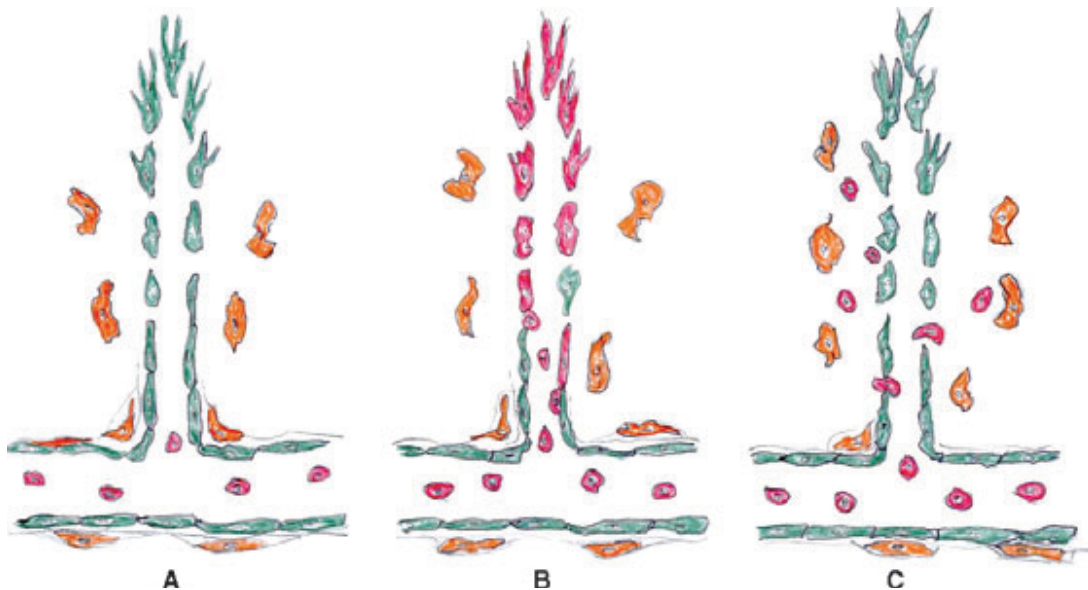


Fig 3. de verschillende concepten van volwassen neo-angiogenese. (21)

A: Tot de 1990er jaren een geaccepteerd paradigma (22 beschrijft de formatie van nieuwe bloedvaten door de migratie van bestaande endotheel cellen (groen). Pericyten en andere murale cellen (oranje) migreerden en replicateerden naarmate de nieuwe vaat groeide. Er werd geen contributie van cellen in het bloed (rood) herkend.

B: De beschrijving van circulerende endotheliale voorlopercellen (EPC) in 1997 door Asahara leidde tot een radicale revisie van het paradigma. Nu werd gezegd dat bone marrow-derived EPC naar de angiogenese plaats migreren, daar differentiëren en een significant deel van de nieuwe endotheelcellen vormen.

C: Inmiddels het paradigma alweer aangepast, onderzoek heeft aangetoond dat de contributie van de bone marrow-derived cellen niet als endotheliale voorlopercel is maar dat het in de neoangiogenese plaats signalen aflevert die de pericyten activeren. Deze zouden dan op hun beurt migratie en replicatie van lokale endotheelcellen stimuleren.

3.3 Studies naar therapeutische angiogenese

Zoals al genoemd spelen endotheliale voorlopercellen een significante rol in de re-endothelialisatie en neo-vascularisatie van beschadigd endotheel. Zoals al genoemd gaven Asahara et al. (23) als eerste het bewijs dat het perifere bloed een reservoir van beenmerg afkomstige EPC is. In hun studie isoleerden ze angioblasten uit het humane perifere bloed op

basis van de antigen expressie op de cel oppervlakten (CD34+ en VEGFR-2+). In vitro differentieerden deze cellen zich in endotheliale cellen, en werden in vivo opgenomen in actieve angiogenese sites. Deze bevindingen suggereerden dat endotheliale voorlopercellen bruikbaar zouden kunnen zijn voor reparatie van vaatschade(therapeutische angiogenese).(23) Deze paragraaf zal gaan over verschillende studies die zijn gedaan naar therapeutische angiogenese.

Na de ontdekking van EPC werden er binnen een korte tijd veel experimenten naar gedaan. In 2001, deden Kocher et al. (24) als een van de eersten onderzoek naar de therapeutische effectiviteit van EPC in een hart infarct model. Ze gebruikten G-CSF(een angiogenese groeifactor) om de CD34+ BM cellen uit het beenmerg te mobiliseren naar het perifere bloed, daar werden ze geïsoleerd, gezuiverd en gelabeld. Daarna werden ze in ratten waarvan de coronaire hartslagader 24 uur daarvoor geligeerd was ingespoten. Ze vonden dat dit leidde tot een verhoogde neoangiogenese in de infarct regio en ze schatten dat ongeveer 20-25% van de nieuwe vaten met de gelabelde cellen bedekt was. De CD34+ cellen stimuleerden de angiogenese en verbeterden de LVEF, CD34- cellen deden dit beide niet. Andere onderzoeken gaven bewijs dat EPC belangrijk waren voor de reparatie van grote vaten na beschadiging of na arteriosclerose. Griese et al. (25) lieten in hun studie zien dat de endotheel- en gladde spier schade die ze met een ballon veroorzaakt hadden na toediening van EPC weer gerepareerd werd. Normaal gesproken zou er sprake van intima hyperplasia zijn, EPC reduceerden dit significant, maakten zich vast aan de mono laag om de endotheellaag weer opnieuw samen te stellen. Afbeelding 3.

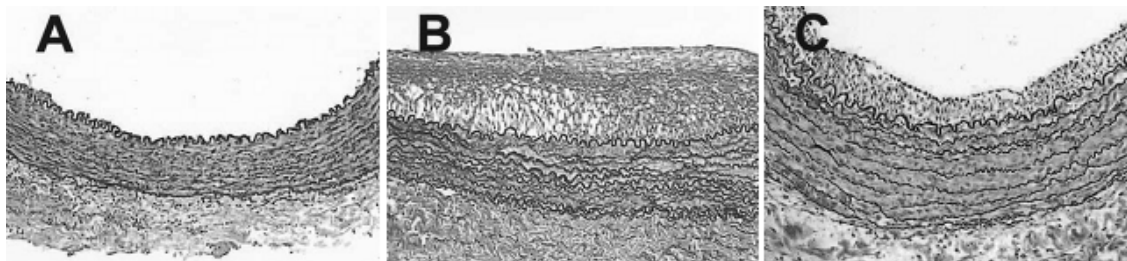


Fig 3. Inhibitie van neointima hyperplasia in ballon geïnduceerde schade aan de carotid artery door EPCs (25)

Deze twee en andere studies lieten zien dat BM cellen gebruikt kunnen worden om therapeutisch de angiogenese te bevorderen en vasculaire schade kunnen repareren in vele experimentele modellen. Hoewel deze studies allemaal laten zien dat EPCs naar de plaats waar de schade is migreren en daar differentiëren naar endotheliale cellen, is het exacte mechanisme

toch eigenlijk helemaal niet zo duidelijk. Verschillende studies hebben aangetoond dat de verbeterde angiogenese als reactie op injectie met CD43+ cellen, komt door de lokale actie van paracrine mediators die ze vrijlaten. Ook is er steeds nieuw en groeiend bewijs dat het volwassen hart weefsel en volwassen bloedvaten zelf voorlopercellen bevatten die in staat zijn om in alle cellen te differentiëren die nodig zijn voor de cardia- en vasculaire reparatie. (26, 27)

Discussie

Radiotherapie is een effectieve therapie in de strijd tegen kanker, ongeveer de helft van alle longkanker patiënten wordt met radiotherapie behandeld. Ondanks de voordelen die radiotherapie biedt zijn er ook enkele nadelen, zo is bijvoorbeeld de kans op het ontwikkelen van pneumonitis zeer groot. Doordat de kans op het ontstaan van pneumonitis zeer groot is worden de met radiotherapie te geven dosissen beperkt. Onderzoeken hebben aangetoond dat de door radiotherapie geïnduceerde vaatschade een belangrijke factor is voor het ontwikkelen van pneumonitis. Wanneer deze vaatschade voorkomt of gerepareerd kan worden zou de kans op pneumonitis naar beneden gaan en zouden er tijdens de radiotherapie hogere dosissen gegeven kunnen worden. In deze scriptie heb ik dan ook gekeken naar hoe je deze vaatschade kan voorkomen en repareren. Eerst heb ik besproken dat apoptose van de endotheelcellen voor de vaatschade zorgt. Ik heb beschreven hoe radiotherapie voor schade zorgt aan de endotheelcellen en hoe het apoptose induceert, ik heb enkele apoptotische pathways beschreven. In deze pathways liggen dan ook meteen de mogelijkheden om de apoptose tegen te gaan en dus ook de vaatschade.

Zoals al genoemd is de Sphingomyelin pathway een belangrijke apoptose route, activatie van de acid sphingomyelinase (ASM) genereert ceramide welke als second messenger dient en via drie verschillende routes apoptose kan induceren. Genetische mutaties die ASM inactiveren blokkeren de generatie van ceramide en daarmee de apoptose route.

Ceramide kan via CAPP direct proteïne kinase C inactiveren, proteïne kinase C is juist betrokken in een anti-apoptose signaalroute. Om de door ceramide geïnduceerde apoptose te remmen zou PKC een belangrijke rol kunnen spelen omdat PKC de hydrolyse van sphingomyeline kan blokkeren en dus ook het vrijkomen van ceramide van de celmembranen. Haimovits-Friedman (14) kwamen er achter dat wanneer PKC geactiveerd werd door middel van

bFGF er minder apoptose plaatsvond. Deze anti-apoptotische werking van bFGF werd voor een deel gemedieerd door activatie van de α isoform van PKC. Therapie met bFGF zou dus de apoptose van de endotheelcellen tegen kunnen gaan. Onderzoek van Pena en Fuks in het CNS bevestigden resultaten. Tee en Travis (5) vonden juist tegenstrijdige resultaten, zij vonden dat BFGF juist niet tegen pneumonitis beschermd en dus niet de apoptose tegen gaat. Voor dit onderzoek gebruikten ze een zelfde muizen stam als die in het experiment van Fuks gebruikt was, het enige verschil tussen deze studie was dat Fuks het mediastinum beschermd hadden. Hierdoor werd waarschijnlijk ook een gedeelte van het parenchym beschermd, hierdoor was er waarschijnlijk een reductie in de mortaliteit van radiatie pneumonitis en zou bFGF misschien een kleine bijdrage geleverd hebben aan de overleving van de endotheelcellen. Wat hun belangrijkste conclusie is dat bFGF wel muizen beschermde tegen een vroege fase van radiatie geïnduceerde longschade maar niet tegen radiatie pneumonitis. bFGF therapie zou dus een mogelijke therapie zijn om de endotheliale apoptose en de daaraan gerelateerde vaatschade te voorkomen/ tegen te gaan. De experimenten die hieraan gedaan zijn zijn wel uitgevoerd met een enkele en hoge dosis (tussen 10 en 20 Gy) hierdoor is het moeilijk te zeggen tot hoeverre deze processen bijdragen aan radiatiegeïnduceerde endotheliale cel dood bij klinisch relevante dosissen.

Vaatschade wordt normaal gesproken door twee verschillende processen in ons lichaam gerepareerd namelijk door angiogenese en vasculogenese. Therapeutische angiogenese door middel van EPCs zou een mogelijke manier zijn om de vaatschade na bestraling te repareren. Na de van EPCs werden er binnen een korte tijd veel experimenten naar gedaan. Vele onderzoeken gaven ook daadwerkelijk het bewijs dat EPC belangrijk waren voor de reparatie van grote vaten na beschadiging. Griese et al. (25) lieten in hun studie bijvoorbeeld zien dat endotheel- en gladde spier schade na toediening van EPC weer gerepareerd werd. EPCs kleefden zich vast aan de mono laag om de endotheellaag weer opnieuw samen te stellen. Hoewel deze studies allemaal laten zien dat EPCs naar de plaats waar de schade is migreren en daar differentiëren naar endotheliale cellen, is het exacte mechanisme toch eigenlijk helemaal niet zo duidelijk. Er zijn hypothesen die zeggen dat de verbeterde angiogenese komt door de lokale actie van paracrine mediators die EPCs vrijlaten. (26, 27)

Conclusie

De door radiotherapie geïnduceerde vaatschade zou dus op meerdere manieren voorkomen/gerepareerd kunnen worden. Allereerst zou men de apoptotische pathways die na bestraling in de endotheelcel plaatsvinden kunnen beïnvloeden. Zo zou door middel van bFGF PKC geactiveerd kunnen worden. Activatie van PKC zorgt ervoor dat de ASMAse activiteit geremd wordt en daarmee de generatie van Ceramide. Ook inhibitie van ASMAse zou een mogelijke manier zijn om de generatie van ceramide te voorkomen. Ten tweede zou men de door radiotherapie geïnduceerde vaatschade kunnen repareren met behulp van EPCs, deze cellen kunnen differentiëren naar nieuwe endotheelcellen en de endotheellaag van de vaten opnieuw kunnen bedekken.

Referenties

1. Bentzen M. Prevention or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nature* September 2006, volume 6
2. Peter van Luijk, Alena Novakova-Jiresova, Hette Faber, Jacobus M. Schippers, Harm H. Kampinga, Harm Meertens and Rob P. Coppes. Radiation damage to the heart enhances early radiation-induced lung function loss. *Cancer Res*, 2005; 65: (15). August 1, 2000
3. www.longkanker.info
4. P. Rubin and G.W. Casseratt. In: *Respiratory system* (3rd ed.), *Clinical Radiation Pathology* Vol 1, W.B. Saunders, Philadelphia (1968), pp. 423–470.
5. Patricia Grace Tee and Elizabeth L. Travis: Basic fibroblast growth factor does not protect against classical radiation pneumonitis in two strains of mice. *Cancer Research* 55, 298-302, January 15, 1995
6. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick R: Stress-induces apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochem Pharmacol* 53:615-621, 1997
7. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN: Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: Protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res* 60:321-327, 2000
8. Jaenke RS, Robbins ME, Bywaters T, et al: Capillary endothelium: Target site of renal radiation injury. *Lab Invest* 68:396-405, 1993
9. Fajardo LF: The complexity of endothelial cells. *Am J Clin Pathol* 92:241-250, 1989
10. Dimitrievich GS, Fischer-Dzoga K, Griem ML: Radiosensitivity of vascular tissue: I- Differential radiosensitivity of capillaries: A quantitative in vivo study. *Radiat Res* 99:511-535, 1984
11. Witte L, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, et al: Effects of irradiation on the release of growth factors from cultures bovine, porcine and human endothelial cells. *Cancer Res* 49:5066-5072, 1989

12. Nicolson GL, Gustead SE, Dulski KM, et al: effects of irradiation on cultured rat and mouse microvessel endothelial cells: Metastatic tumor adhesion, subendothelial matrix degradation and secretion of tumor cell growth factors. *Clin Exp Metastasis* 9:457-468, 1991
13. Rubin DB, Drab EA, Bauer KD: Endothelial cell subpopulations in vitro: Cell volume, cell cycle, and radiosensitivity. *J Appl Physiol* 67:1585-1590, 1989
14. Haimovits-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, et al: Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 180:525-535, 1994
15. Haimovits-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M, et al: Protein kinase C mediates basic fibroblast Growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis.
16. Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, et al: Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 63:5950-5956, 2003
17. Rodemann H.P, Bleise M.A: Response of normal Cells to ionizing radiation. *Semin Radiat Oncol* 17:81-88, 2007
18. Liao WC, Haimovitz-Friedman A, Persaud RS, et al: Ataxia Telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J Biol Chem* 274:17908-17917, 1999
19. Ljubimova NV, Levitman MK, Plotnikova ED, and Eidus L. Endothelial cell population dynamics in rat brain after local irradiation. *Br. J. Radiol* 64: 934-940, 1991
20. Omaidia C. Velazquez :Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg* 45:39A-47A, 2007
21. Pearson JD: Endothelial progenitor cells-hype or hope?. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 255-62
22. Folkman J, What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab invest* 1984; 51:601-4
23. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-7.
24. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma D, Edwards NM, Itescu S. Neovascularisation of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7:430-6
25. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003; 108: 2710-5
26. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 14068-73.
27. Sainz J, Al Haj Zen A, Caligiuri G, Demerens C, Urbain D, Lemitre M, Lafont A. Isolation of "side population" progenitor cells from healthy arteries of adult mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 281-6
28. Li YQ, Jay V, and Wong CS. Oligodendrocytes in the rat spinal cord undergo radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 5417-5422, 1996