

Oratie

**Apoptose en bio-engineering: er is leven na de dood\***

I. VERMES

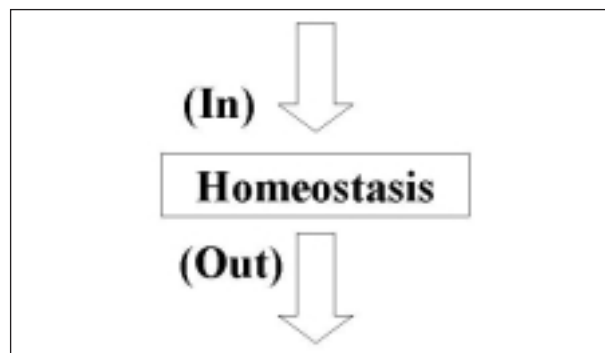
**Inleiding**

Het leven is een dynamisch evenwicht tussen het *milieu intérieur* en het *milieu extérieur* (1). Dit vereist de aanwezigheid van talrijke fysiologische regelmechanismen. De constantheid van het *milieu intérieur* die door deze regelmechanismen voortdurend wordt bewaakt, wordt de *homeostasis* genoemd (2) (figuur 1). Maar het levende organisme verandert voortdurend en moet zich handhaven in een steeds veranderend milieu. Een bepaalde waarde constant houden is op zichzelf al erg lastig, laat staan wanneer allerlei variabele omstandigheden deze waarde voortdurend bedreigen. Een homeostatisch systeem met een voortdurend veranderde norm noemen wij *allostasis*. *Allostasis* betekent “the ability to achieve stability through change” (3). Het organisme groeit en wordt oud, het bedrijft allerlei activiteiten en handhaaft zich onder wisselende omstandigheden die meestal niet voorspelbaar zijn. Dit noemen wij *allostatische* regeling. Bij ieder van ons gaan per dag >100 miljard lichaamscellen dood, hetgeen gelijke tred houdt met het aantal nieuwe cellen dat per dag door celdeling wordt gevormd. Een minimale verstoring van dit evenwicht (“allostatic load”) heeft fatale consequenties voor het individu. Allostase kan worden verstoord door een verandering in de celdeling (bijvoorbeeld een toegenomen proliferatie), maar ook door een verandering in het optreden van celdood. Met andere woorden: celdood is een absolute voorwaarde voor het allostatische evenwicht: “*Apoptosis is the concept of death as crucial for life*” (4) (figuur 2).

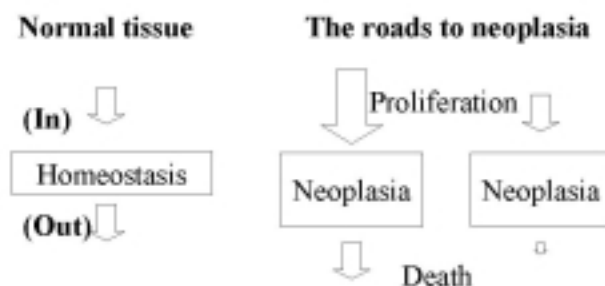
**Geprogrammeerde celdood**

De dood is de enige zekerheid die men in het leven heeft. Dit feit geldt voor ieder levend wezen, net zo goed als voor iedere cel. Tot voor kort nam men aan dat celdood alleen maar optrad als gevolg van allerlei mogelijke chemische of fysische beschadigingen, zuurstoftekort, immunologische aanvallen e.d. Pathologen noemden dit type van celdood: necrose, optredend als gevolg van een irreversibele beschadiging

van de integriteit van de cel. Pas sedert de jaren '70 werd het concept van een geprogrammeerde celdood geformuleerd; het gevolg van een energiekostend endogeen fysiologisch zelfmoordmechanisme. Het bestaan van zo'n fysiologische vorm van celdood was al eerder verondersteld door Glücksman in 1951 (5) en door Saunders in 1966 (6): deze zou optreden tijdens de normale ontwikkeling van organismen. Betreffende onderzoekers concludeerden uit de door hen waargenomen eliminatie van cellen en de regressie van larvale organen gedurende de metamorfose van amfibieën dat er een georkestreerd celdoodprogramma moest bestaan. Zij stelden dat een geprogrammeerde celdood een adaptatiemechanisme moest zijn, waarmee ongewenste of onbruikbare cellen konden worden opgeruimd. De laatste jaren is men zich bewust geworden dat een dergelijke omvangrijke geprogrammeerde celdood niet alleen plaatsvindt tijdens de embryonale en foetale ontwikkeling, maar dat dit een algemeen fenomeen is waardoor een dynamische balans tussen celgroei en celeliminatie, in elk



Figuur 1. Fysiologie: het homeostatische evenwicht.



Figuur 2. Het verstoorde evenwicht: “allostatic load”.

\*Rede uitgesproken bij het aanvaarden van het ambt van hoogleraar ‘Moleculaire Aspecten van Cel- en Weefseltechnologie’ bij het BioMedisch Technologisch Instituut en aan de Faculteit Chemische Technologie van de Universiteit Twente op donderdag 11 april 2002.

orgaan in stand wordt gehouden. Geprogrammeerde celdood lijkt te zorgen voor een discrete verwijdering van onbruikbare, ongewenste of verminkte cellen in elk weefsel, voor het modelleren van organen, het openhouden van afvoerkanaaltjes, het vormgeven aan het lichaam, zoals de vorming van vingers, het samsmelten van het gehemelte e.d.

Kerr en medewerkers beschreven in 1972 (7) als eersten de ultrastructurele verschillen die bestaan tussen celnecrose en geprogrammeerde celdood. Zij introduceerden de term "apoptose" ter onderscheid van necrose. Het woord apoptose komt uit het Grieks en betekent het afvallen van bladeren in de herfst en het uitvallen van bloemblaadjes. Apoptose werd door deze onderzoekers gedefinieerd op zuiver morfologische kenmerken, te weten condensatie van chromatine aan de kernmembraan, verschrompeling van cytoplasma met intact blijven van de celorganellen, gevolgd door fragmentatie van de kern en eindigend als z.g. *apoptotic bodies*. Momenteel wordt de term min of meer synoniem beschouwd met geprogrammeerde celdood, zoals die optreedt tijdens de embryonale ontwikkeling en de morfogenese van organen en het gehele lichaam. *Geprogrammeerde celdood (PCD)* daarentegen is een operationele definitie van het gecoördineerd cel-eliminatieprogramma dat nodig is tijdens de ontwikkeling van organen en individuen en gedurende de processen van embryogenese, metamorfose en morfogenese. *Apoptose* is de morfologische en biochemische beschrijving van het fysiologisch celdoodmechanisme, hetgeen niet noodzakelijk geprogrammeerd hoeft op te treden (8).

Later bleek dat er vormen van geprogrammeerde celdood voorkomen die niet geheel voldoen aan deze beschrijving (9-11). Op morfologische gronden worden 3 typen van geprogrammeerde celdood onderscheiden. Type I is identiek aan de klassieke apoptose. De *apoptotic bodies* worden gefagocyteerd door macrofagen en aangrenzende cellen. Type II wordt gekenmerkt door het optreden van autofagocytair vacuolen (10). De celresten worden bij deze vorm van apoptose gefagocyteerd door aangrenzende cellen. Het type III apoptose gaat gepaard met desintegratie van de cel in fragmenten zonder dat het lysosomale systeem daarbij is betrokken en zonder condensatie van de kern of het cytoplasma (9).

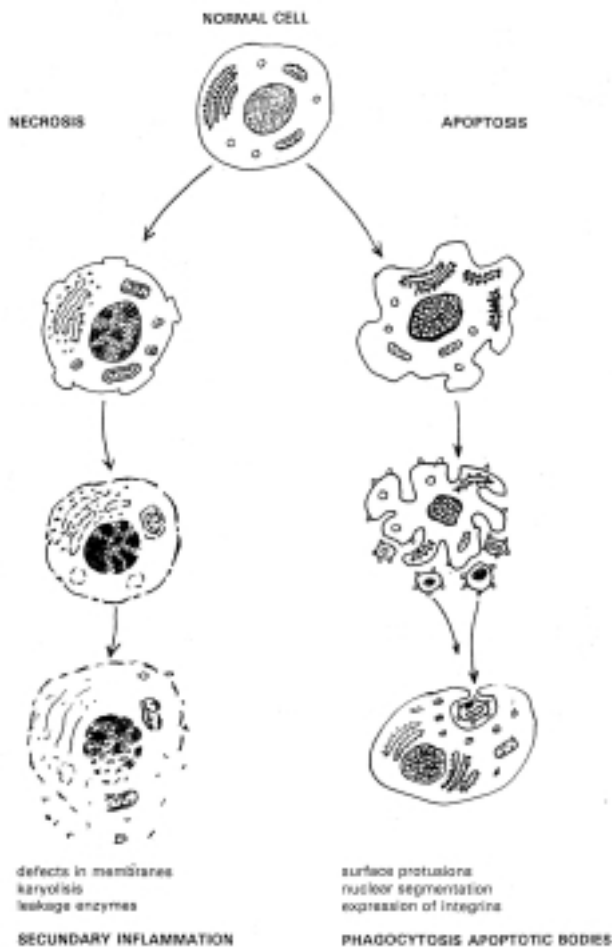
Apoptose staat de laatste jaren in de celbiologie in het centrum van de belangstelling. Geprogrammeerde celdood is de nauwkeurig georkestreerde wijze waarop cellen op een fysiologische manier worden geëlimineerd. Men heeft zich gerealiseerd dat apoptose een essentieel onderdeel van het leven is van elk multicellulair organisme. Het programma van de celdood is in de evolutie miljoenen jaren geconserveerd gebleven, vanaf primitieve levensvormen, zoals b.v. wormen (12). Gedurende de embryonale ontwikkeling bepaalt geprogrammeerde celdood de modellering van het lichaam en de grootte van de organen. Het zenuwstelsel en het immuunapparaat ontwikkelen zich na de geboorte dankzij een overproductie aan

orgaancellen, gevolgd door selectieve apoptose van die cellen, die geen functionele synapsen of effectieve antigene eigenschappen bezitten. Apoptose is de manier waarop het lichaam zich ontdoet van ongewenste, onbruikbare of potentieel gevaarlijke cellen: "*better dead than wrong*" (13). Apoptose is betrokken bij de cel-turnover in normale volwassen weefsels. Apoptose treedt op tijdens de involutie van hormonaafhankelijke organen (prostaat, endometrium, borstklier). Neutrofiële cellen ondergaan apoptose tijdens de ontstekingsreactie, lymfocyten tijdens de selectie van de cellen van het immuunsysteem. Celbeschadiging als gevolg van diverse invloeden (bestraling, virusinfectie, thermische beschadiging, chemotherapeutische of cytotoxische invloeden) kunnen leiden tot apoptose. Ook kan men apoptose waarnemen in premaligne of maligne aandoeningen (14).

### Apoptose vs. necrose

"*There are many ways to die, but nature knows only two: necrosis and apoptosis*" (figuur 3).

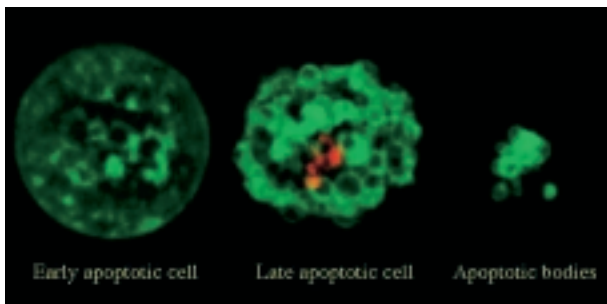
Necrose, ofwel accidentele celdood, treedt op als gevolg van een ernstige beschadiging, zoals na een fysisch trauma, hypoxie, hyperthermie, complementaanval, chemische inwerking. De eerste morfologische veranderingen die men waarneemt zijn zwelling van het cytoplasma en de celorganellen, ook van de mitochondria. Deze veranderingen worden veroorzaakt



**Figuur 3.** Belangrijkste morfologische verschillen tussen necrose en apoptose.

door beschadiging van de celmembranen, als gevolg van energietekort, verlies van de functie van de ionenpomp, soms door directe fysieke of chemische invloed op de celmembranen. Deze ontbinding eindigt in lekkage van de celinhoud naar de omgeving en weefselvaten, tenslotte eindigend in de complete ontbinding en verdwijning van de cytoplasmatische membranen. Activering van enzymen leidt tot afbraak van membranen, eiwitten, RNA en DNA, hetgeen de celdesintegratie bespoedigt. Necrose betreft hele weefselgebieden of tenminste groepen van aaneengesloten cellen en lokt een ontstekingsreactie uit in de aangrenzende weefsels als reactie op de vrijgekomen celresten (15).

Apoptose vertoont, in tegenstelling tot necrose, een morfologisch heel ander beeld. De eerste veranderingen betreffen het verlies van celjuncties en gespecialiseerde membraanstructuren zoals microvilli. Het cytoplasma schrompelt en de kern vertoont klontering die gedeeltelijk samenvalt in grotere massa's die daarna in fragmenten uiteenvallen. De mitochondriën blijven aanvankelijk intact. Het endoplasmatisch reticulum verandert in blaasjes, die samensmelten met de cytoplasmatische membraan. Deze veranderingen leiden uiteindelijk tot verkleining van het cytoplasmatische volume, tegelijk met verlies van intracellulaire vloeistof en ionen. Tijdelijk vertoont de cel een samengevouwen vorm en breekt vervolgens uiteen in apoptotische blaasjes (apoptotic bodies) waarin de intacte celorganellen en kernresten zijn opgenomen. De apoptotic bodies zijn verschillend van grootte en worden door naburige cellen gefagocyteerd. De fagocyterende cellen behoren grotendeels tot het monocytair-fagocyterend systeem, hoewel ook epitheelcellen, endotheelcellen en zelfs tumorcellen mee kunnen doen. Het is gebleken dat de apoptotic bodies zelf een stimulus voor het fagocyteren zijn door normaliter verborgen bestanddelen van de cel te tonen, zoals bepaalde suikergroepen, en door fosfatidylserine, dat normaal aan de binnenkant van de celmembranen gelokaliseerd is, naar buiten te brengen. Na het fagocyteren worden de apoptotic bodies snel afgebroken (15). De celfragmentatie duurt van enkele minuten tot uren. De snelle afbraak, het feit dat apoptose alleen geïsoleerde cellen betreft, en het feit dat er geen ontstekingsreactie optreedt, maken dat apoptose zo moeilijk is vast te stellen en verklaren het feit dat dit fenomeen pas zo kort geleden aan het licht is gekomen (figuur 4).



**Figuur 4.** Apoptotische cascade: het proces van de apoptose kan in 3 fasen worden onderscheiden.

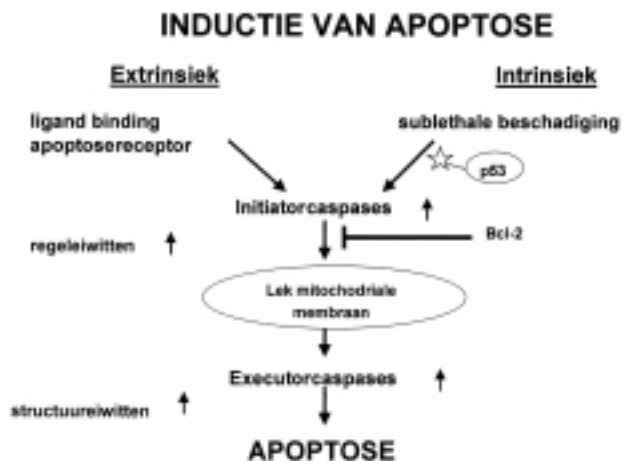
## De moleculaire biologie van apoptose

Al snel na de publicatie van Kerr *et al.* (7) werd ingezien dat manipulatie van apoptose een machtig middel zou kunnen zijn bij de bestrijding van aandoeningen waarbij dit mechanisme ontspoord is. De laatste 10 jaar is het moleculair-biologisch mechanisme van apoptose grotendeels in kaart gebracht. Het is duidelijk dat metingen aan de intracellulaire eiwitten, die betrokken zijn bij apoptose, informatie kunnen verschaffen over oorzaak en prognose van een aantal ziekten. Door middel van genetische manipulatie bleek het zelfs mogelijk om bij sommige ziekten het mechanisme van apoptose zodanig te beïnvloeden dat er therapeutische resultaten werden geboekt.

Het signaal waarop de apoptose van een cel wordt gestart komt ofwel van buiten (extrinsieke activering) na binding van het ligand FasL aan de Fas-receptor (FasR), tumornecrosefactorreceptor (TNFR), dan wel als gevolg van stress voor de cel, zoals onvoldoende aanbod van zuurstof, energiebronnen, groeihormoon en beschadiging van de celmembranen door b.v. cytotoxische T-lymfocyt. Apoptose kan ook op gang komen van binnenuit (intrinsieke activering), als gevolg van celveroudering, DNA-beschadiging, verlies van cel-cel- of cel-matrix-contact. Men kan het proces van apoptose in drie fasen onderscheiden: inductiefase, effectorfase en degradatiefase (figuur 5).

### Inductiefase

Genoemde signalen veroorzaken in de cel activering van een aantal pro-enzymen, een familie van 14 aan elkaar verwante cysteine-afhankelijke aspartaat klievende proteases, ook wel caspases genoemd. Deze enzymen kunnen elkaar stapsgewijze activeren (16). Enkele daarvan, de 'initiator' caspases vormen een eiwitcomplex dat een lek maakt in de mitochondriale membraan, waarna cytochroom-C en apoptosis-inducing factor (AIF) het celplasma binnenstromen (17), waarbij een point of no return wordt bereikt en het



**Figuur 5.** Vereenvoudigd schema van het apoptosemechanisme: activering van cytoplasmatische initiatorcaspases via de extrinsieke of de intrinsieke weg leidt tot lekkage van de mitochondriale membraan waarbij stoffen vrijkomen die zogenaamde executercaspases activeren met als gevolg apoptose van de cel.

proces van apoptose onherroepelijk wordt. Vóór het zover is, is er een aantal mechanismen actief, dat het optreden van de mitochondriale transitie kan tegenhouden of bevorderen. Een ander regeleiwit dat de gevoeligheid van de cel voor apoptose bepaalt is p53, het product van een tumorsuppressorgen. Het p53 blokkeert de voortgang van de celcyclus in geval van DNA-schade en biedt zo de tijd voor DNA-reparatie. Wanneer de reparatie niet tot stand komt, induceert p53 apoptose. Een mutatie in het p53-gen houdt in dat reparatie van DNA-schade niet plaatsvindt en dat de beschadigde cel niet wordt geëlimineerd (18).

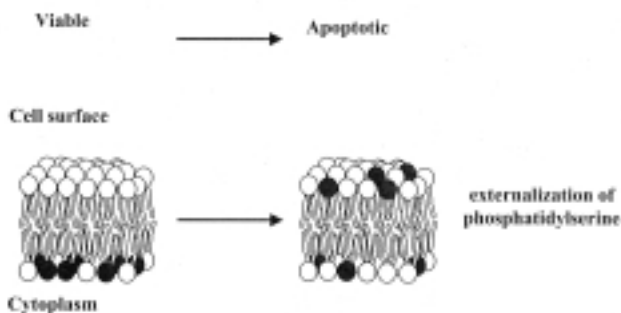
Daarnaast wordt de apoptose gestuurd door de mate van expressie van een familie van bcl-2-eiwitten. Deze eiwitten bevinden zich onder andere in het gebied van de mitochondriale membraan en regelen het vrijkomen van cytochroom-C in positieve of negatieve zin (19). De mitochondria bevatten ook remmers, inhibitors of apoptosis (IAP's, genaamd, die caspases blokkeren (20), en eiwitten die deze blokkade juist weer opheffen (Smac / DIABLO).

#### Effectorfase

Wanneer de mitochondriale membraan is aangetast, komt in het cytosol cytochroom-C vrij dat samen met apoptosis inducing factor (AIF) en apoptotic protease activating factor 2 (Apaf-2) een complex vormt dat de effectorcaspases activeert, hetgeen uiteindelijk leidt tot de degradatiefase met afbraak van macromoleculaire structuren in de cel. AIF veroorzaakt oligonucleosomale afbraak van DNA en intense condensatie van de kern (21, 22).

#### Degradatiefase

Tijdens de degradatiefase treden veranderingen op in de celmembraan, het celskelet en de celkern. De cel verschrompelt; het chromatine condenseert en het DNA wordt gefragmenteerd. Uiteindelijk blijven van de cel kleine fragmentjes over, omgeven door een lipidenmembraan; de 'apoptotic bodies', waarin de resten van de celinhoud zijn opgesloten. Deze bodies worden door macrofagen en naburige cellen gefagocytiseerd en komen dus niet in de weefsels terecht. Op deze wijze veroorzaakt apoptose, in tegenstelling tot necrose, geen lokale ontstekingsreactie en vindt men van de cel, die door middel van apoptose is geëlimineerd, na enkele uren niets meer terug.

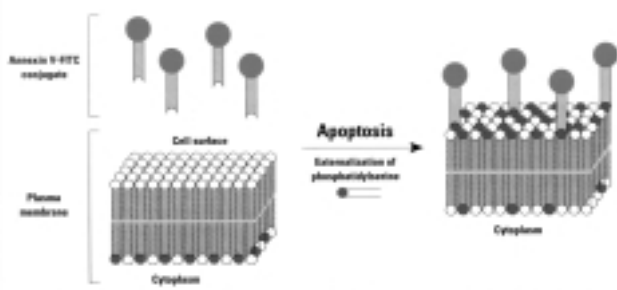


**Figuur 6.** Verandering in de celmembraan tijdens apoptose: redistributie van fosfatidylserine vanuit de binnenkant van de membraan naar de buitenkant ("kiss of death").

#### Detectie van apoptose

Normaal bestaat er een evenwicht tussen het aantal cellen dat wordt gevormd en het aantal dat in dezelfde tijd apoptotisch ten gronde gaat. Aangezien de celproliferatie en -rijping enkele dagen tot weken in beslag nemen en de apoptose zich in enkele uren afspeelt, is in de evenwichtssituatie het aantal cellen dat zich in apoptose bevindt, slechts een kleine fractie (< 5%) van het aantal cellen dat in proliferatie verkeert. De gouden standaard voor het vaststellen van apoptose blijft het optreden van de morfologische veranderingen zoals beschreven door Kerr *et al.* (7). In het laboratorium kan men apoptose vaststellen en kwantificeren door meting van veranderingen die tijdens apoptose optreden aan celmembraan, plasmaweiwitten, mitochondriën en DNA.

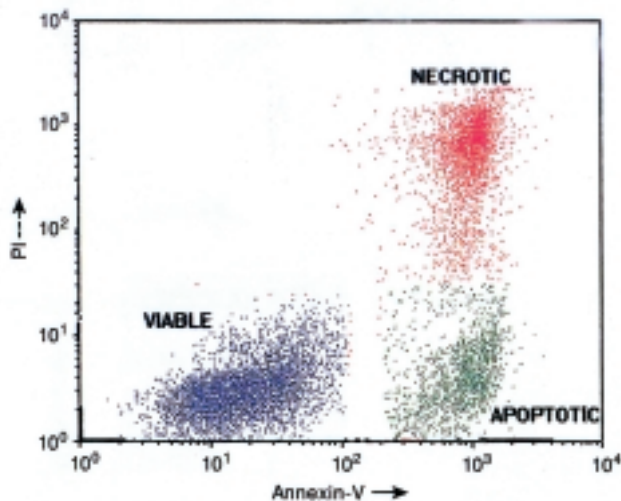
Sinds 1993 werken wij in het Medisch Spectrum Twente intensief samen met Clemens Haanen, emeritus hoogleraar hematologie, en Chris Reutelingsperger, biochemicus aan de afdeling Biochemie, Universiteit Maastricht, op het gebied van meetmethoden van het apoptotisch proces. Deze samenwerking heeft onder andere geresulteerd in het uitwerken en beschrijven van een nieuwe meetmethode die tijdens de afgelopen jaren behoorlijk succes heeft geboekt, de zogenaamde *annexine-V-binding-techniek*. Tijdens apoptose is de belangrijkste verandering in de celmembraan een herdistributie van fosfatidylserine vanuit de binnenkant van de membraan naar de buitenkant (figuur 6). De rationale van onze techniek komt voort uit de kennis dat annexine V in de aanwezigheid van  $Ca^{++}$  aan fosfatidylserine bindt, zodat met fluorochroom FITC gelabeld annexine V door middel van flowcytometrie kan worden gemeten (figuur 7) (23). Deze test is met name geschikt voor het aantonen van apoptose onder *in vitro* experimentele condities gedurende celkweek (figuur 8), maar kan eveneens worden gebruikt in geval van *ex vivo* waarnemingen aan hematopoëtische cellen van patiënten (figuur 9). De meest recente ontwikkeling betreft het *in vitro* aantonen van apoptotische celdood bij patiënten tijdens de behandeling van kanker of na een myocardinfarct met behulp van met technetium gelabeld annexine V en gevolgd door scintigrafie van het bestraalde of geïnfarceerde gebied (24, 25).



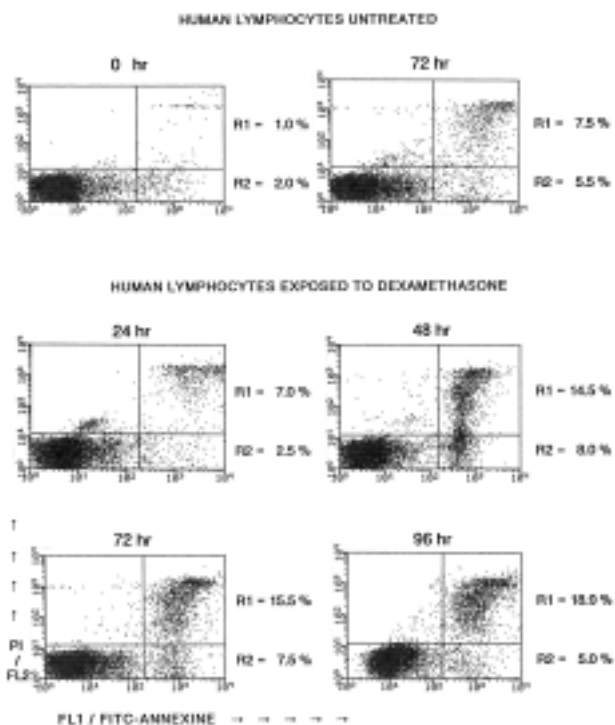
**Figuur 7.** Flowcytometrische bepaling van apoptose: meting van fosfatidylserine met fluorochroom FITC gelabeld annexine V.

Gedurende de afgelopen jaren hebben in ons laboratorium de researchanalisten Helga Steffens-Nakken, Ellen Kalsbeek-Batenburg en Ruby Overbeek niet alleen deze techniek geëvalueerd, maar eveneens duidelijk de voordelen aangetoond van deze methode in vergelijking tot andere meettechnieken gebaseerd op mitochondriale beschadiging, DNA-fragmentatie of enzymactiviteit (26, 27).

De annexine-V-techniek is met name geschikt voor cellen in suspensie, zoals hematopoietische cellen.



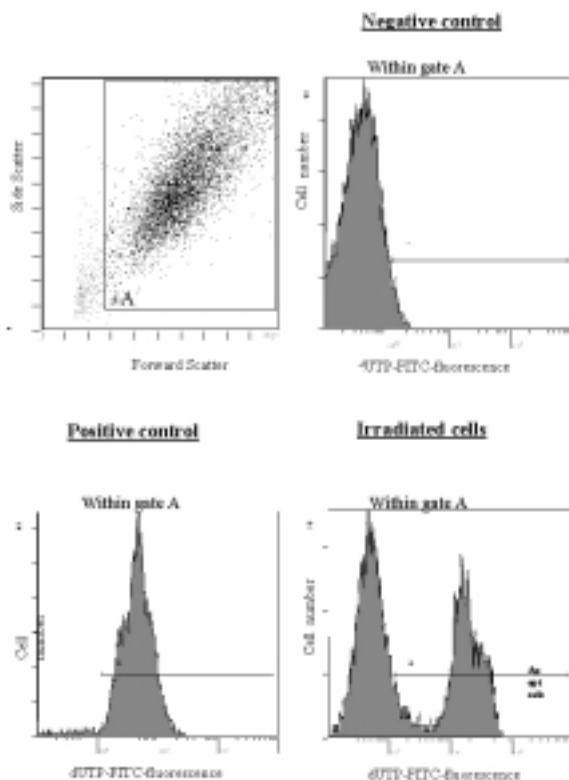
**Figuur 8.** Twee-parameter-flowcytometry: FITC-gelabeld annexine-V-binding en opname van propidium-iodide (PI). Met deze methode kan men onderscheiden intacte cellen (annexine-V-negatief en PI-negatief) apoptotische cellen (annexine-V-positief en PI-negatief) en necrotische cellen (annexine-V-positief en PI-positief).



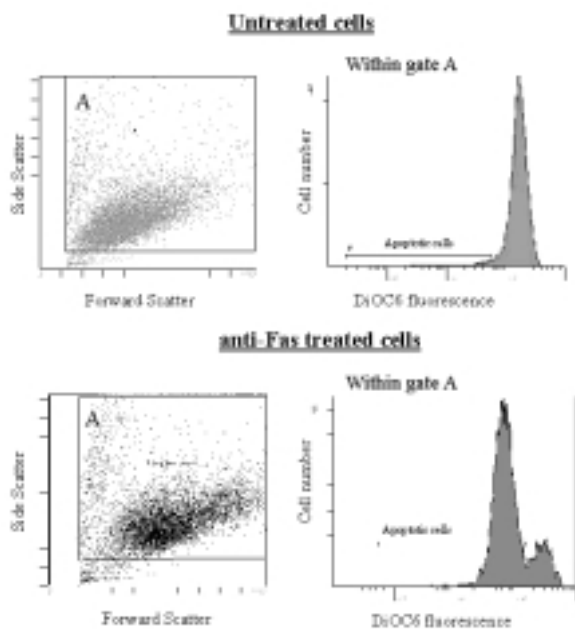
**Figuur 9.** Apoptose en necrose van vers geïsoleerde lymfocyten na incubatie met dexamethason.

Echter, in het geval van solide weefsels kan men apoptose beter bepalen aan de hand van tekenen van DNA-fragmentatie. De aanwezigheid van 3 hydroxylgroepen in het DNA kan men meten met ISN (*in situ nick translation*) of met TUNEL (*TdT dUTP nick end labelling*), waarbij gelabelde nucleotiden met TdT-transferase of DNA-polymerase worden ingebouwd en zichtbaar gemaakt (28). Na het TUNEL-procedé kan een celsuspensie met behulp van de flowcytometer worden gemeten. (figuur 10). In het plasma kan men tekenen van caspase-activering vaststellen met fluoromethyl-keeton-peptide gelabelde proteaserepressors, die zich hechten aan het actieve centrum van de caspases of met behulp van specifieke substraten die de caspase-enzymactiviteit bepalen.

De mitochondriale verandering kan worden aangetoond met behulp van specifieke kleuringen. Veranderingen in de transmembraanpotentiaal van cellen en celorganellen zijn van essentiële betekenis voor de celfunctie. Daarom kan meting van dergelijke veranderingen in de transmembraanpotentiaal informatie verschaffen over het celgedrag en met name over de volgorde waarin bepaalde processen verlopen (upstream of downstream). Bij het proces van de apoptose treden veranderingen op in de celmembranen en in de mitochondriale activiteit. Er komen intracellulaire pH-veranderingen voor,  $Ca^{++}$ -verschuivingen,



**Figuur 10.** DNA-fragmentatie tijdens apoptose: flowcytometrische bepaling van apoptose met behulp van de TUNEL ("terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling")-methode. In apoptotische cellen treedt fragmentatie van DNA op, waarbij aan de uiteinden vrije 3'OH-groepen ontstaan. Met behulp van het enzym terminal deoxynucleotidyl-transferase worden de vrije 3'OH-groepen met dUTP gekoppeld, dat gelabeld is met fluorochroom FITC. Vervolgens wordt met behulp van flowcytometrie het percentage dUTP-positieve cellen bepaald.



**Figuur 11.** Mitochondriale dysfunctie tijdens apoptose: veranderingen in de mitochondriale transmembraan potentiaal tijdens, met anti-Fas geïnduceerde apoptose van lymfocyten wordt aangetoond met flowcytometrie van DiOC6-fluorescentie.

activering van endonucleasen en activering van de mitochondria (meetbaar aan de veranderingen in de transmembraanpotentiaal). De membraanpotentiaal kan men afleiden uit de concentratieverdeling van een lipofiele kationische indicatorkleurstof tussen de binnen- en buitenzijde van een membraan. De lipide-water-verdelingscoëfficiënt hangt af van de potentiaalsprong over de membraan volgens de formule van Nernst. Indicatorkleurstoffen die goed bruikbaar zijn voor het meten van potentiaalveranderingen zijn bijvoorbeeld cyaninekleurstoffen. Wanneer mitochondriën in de cel gehyperpolariseerd zijn nemen zij meer kleurstof op en wanneer ze gedepolariseerd zijn bevindt zich alle kleurstof buiten de cel. Met flowcytometrie meet men de hoeveelheid, niet de concentratie, van de fluorescerende kleurstof per cel. De lipofiele kationische kleurstof accumuleert in energierijke mitochondria als gevolg van de hoge transmembraanpotentiaal (figuur 11).

### Apoptose en ziekte

De vitaliteit van cellen wordt bepaald door het bestaan van cel-cel- en cel-matrix-contact door de voorziening met specifieke groeifactoren, cytokinen en bij hormoongevoelige weefsels door de aanwezigheid van betreffende hormonen. Wanneer deze prikkels wegvallen komt apoptose op gang. De involutie van hormoongevoelige weefsels en tumoren, met name van mamma- en prostaatcarcinoom na hormonale deprivatie, is het gevolg van toegenomen apoptose. Zo ook de lymfocytopenie na behandeling met corticosteroiden, de tumorregressie na cytotoxische behandeling en de verworven immuundeficiëntie na HIV-infectie. Tijdens de ontwikkeling van het immunologisch systeem worden immunocyten, die lichaamseigen cellen zouden kunnen aanvallen, door apoptose reeds in de thymus geëlimineerd. De cel-

**Tabel 1.** Ziekten en aandoeningen die het gevolg zijn van een gestoorde apoptose

### Deficiënte of abnormale apoptose

- aangeboren afwijkingen (syndactylie, hazenlip, hypospadië, neuraalbuisdefect, focomelie)
- gestoorde keratinisatie (eczeem, psoriasis)
- gestoorde resolutie van ontsteking (keloid, longfibrose, levercirrose)
- afwijkende involutie van hyperplasie (dysmenorrhoe, cardiomyopathie)
- maligne metaplasie (carcinoom in situ)
- tumorontwikkeling (cervixcarcinoom)
- auto-immuunziekten (reumatoïde artritis, lupus erythematoses, Hashimoto thyreoiditis)
- lymfoproliferatieve ziekten (defect in Fas-receptor)
- myelodysplastische syndromen
- aplastische anemie
- residuele tumor na behandeling van maligniteit

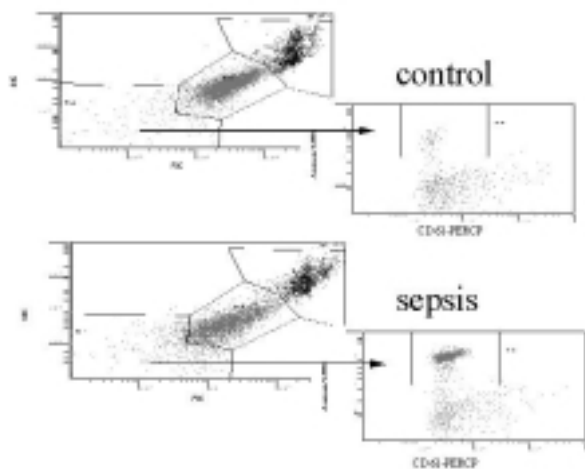
### Toegenomen apoptose

- neurodegeneratieve ziekten (Alzheimer, Parkinson, amyotrofische laterale sclerose)
- emaciatie (M. Hodgkin, carcinomatose, tuberculose)
- verworven immuundeficiëntiesyndroom (AIDS)
- type-I-diabetes mellitus
- seniele atrofie (maculadegeneratie, presbycusie, osteoporose) longemfyseem
- myocardopathie na hartinfarct
- slijmvlieserosies (steroiden, NSAID's, Reye's syndroom)
- acute leveratrofie (HELP-syndroom)
- tubulusnecrose
- tumorlysisyndroom
- colitis ulcerosa

dodende werking van cytotoxische T-lymfocyten (CTL's) en 'natural killer' cellen (NK-cellen) berust op hun vermogen om in de targetcel apoptose te induceren. Een aantal virussen weet te overleven doordat zij in de geïnfecteerde cel eiwitten tot expressie brengen, die het apoptoseprogramma van de gastheercel blokkeren. Een verstoring van het evenwicht tussen celgroei en celdood ligt ten grondslag aan een aantal aangeboren afwijkingen, aan bepaalde maligniteiten, auto-immuunziekten, degeneratieve ziekten en ouderdomskwalen. Ziekten en aandoeningen waarbij ontregeling van het apoptoseprogramma een rol speelt zijn samengevat in tabel 1.

De afgelopen jaren hebben wij in samenwerking met verschillende afdelingen van het Medisch Spectrum Twente onderzoek uitgevoerd waarbij onze methodologische kennis is toegepast. In de eerste plaats betreft het hierbij samenwerking met de internisten prof. dr. Dick Richel (thans hoogleraar interne geneeskunde AMC Amsterdam) en dr. Ron Schaafsma, met wie wij onderzoek hebben verricht naar apoptose bij patiënten met hematologische maligniteiten. Wij

hebben gerapporteerd over de veranderde apoptose-snelheid van leukemische B-cellen *in vitro* en hebben, wellicht als eersten, tijdens chemotherapeutische behandeling van patiënten lijdend aan *hairy cell* leukemie *ex vivo* de apoptotische celdood gedemonstreerd (29, 30) In samenwerking met apotheker/klinisch farmacoloog dr. Henk-Jan Guchelaar (thans klinisch farmacoloog AMC Amsterdam), hebben wij een experimenteel farmacodynamisch model ontwikkeld waarmee kwantitatief de sensitiviteit van bepaalde tumoren voor diverse typen cytostatica kan worden uitgedrukt (31). Wij hebben deze techniek voorgesteld als een mogelijk middel waarmee de effectiviteit van chemotherapie kan worden voorspeld. Tijdens zijn opleiding tot internist heeft dr. Bert Beishuizen jarenlang met ons onderzoek gedaan, onder andere over de rol van geprogrammeerde celdood bij multi-orgaan-falen, zoals die optreedt bij ernstig zieke patiënten (figuur 12). Op de samenhang van apoptose en de neuro-endocriene en immunologische veranderingen bij dergelijke patiënten is hij onlangs gepromoveerd (32). Meer dan vijf jaar geleden hebben wij samen met de internisten Leo te Velde en dr. Chris ten Napel aangetoond dat apoptotische celdood van CD4+ T-lymfocyten hoger is bij HIV-geïnfecteerde patiënten (33). Tegenwoordig is het in de literatuur algemeen geaccepteerd dat apoptotische celdood van T-lymfocyten een belangrijke rol speelt in de pathogenese van de immunodeficiëntie bij HIV-infectie. In samenwerking met de neuroloog dr. Ernst Jansen Steur en de neuropatholoog dr. Rob de Vos hebben wij uitgebreid onderzoek gedaan naar de samenhang van apoptotische en neurodegeneratieve fenomenen (34). Het is met onze apoptotische meetmethoden gelukt om bij Parkinson-patiënten een verband aan te tonen tussen de mate van apoptotische celdood en de klinische toestand van de patiënt. Tot slot, misschien als het meest extreme voorbeeld, wil ik graag het promotieonderzoek van de gynaecoloog dr. Jur Oosterhuis noemen, die tezamen met ons heeft aangetoond dat de geprogrammeerde celdood van eicellen en zaadcellen de belangrijkste factor is voor het succes van een IVF-behandeling (35).

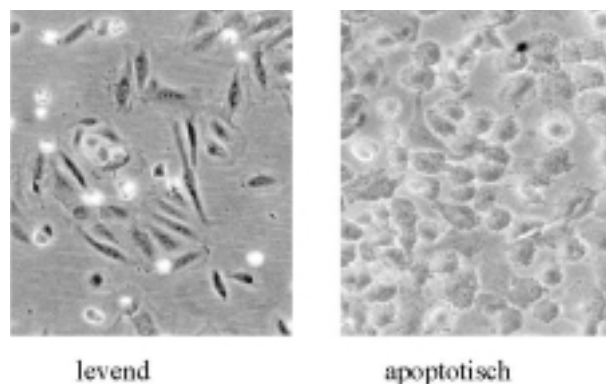


**Figuur 12.** Verhoogde apoptotische celdood bij patiënten met ernstige sepsis, zich uitend in een toename van micropartikels (apoptotic bodies).

Het is u misschien opgevallen dat ik veel verschillende onderzoekslijnen heb genoemd, maar over de epidemiologische doodsoorzaak nummer 1 heb ik tot nu toe nog geen woord gezegd. Cardiovasculaire aandoeningen vormen nog steeds de meest voorkomende oorzaak van de mortaliteit in de rijke industrielanden. In de Verenigde Staten telt men als gevolg hiervan meer dan een half miljoen doden per jaar en het jaarlijkse budget voor cardiovasculaire pathologie bedraagt meer dan 250 miljard dollar. In Nederland overlijden meer dan 50.000 personen aan hart- en vaatziekten op een totaal van 135.000 sterfgevallen. Hart- en vaatziekten blijven doodsoorzaak nummer 1 met een aandeel van 37% in de totale sterfte onder de Nederlandse bevolking. Ter vergelijking: kwaadaardige aandoeningen staan op de tweede plaats met 27%. Binnen de groep van hart- en vaatziekten zijn atherosclerose en diabetes met 57% de grootste vertegenwoordigers. Hoe komt dit? Om antwoord te geven op deze vraag zullen we moeten ingaan op de fysiologie van het vaatstelsel.

### De fysiologie van het vaatstelsel

Het vaatbed is een ononderbroken stelsel van arteriën, capillairen en venen die de bloedsomloop door het lichaam vormen. De instandhouding van een intact vaatbed waardoor bloed vrijelijk kan stromen, is dan ook van levensbelang. Een aaneengesloten monolaag van endotheelcellen omgeeft het circulerende bloed (figuur 13). Deze cellen vormen de binnenkleding van bloedvaten en scheiden de gladde bloedvatpierzellen en de onderliggende weefsels van het circulerende bloed. Een gemiddelde man van 70 kg bezit een hoeveelheid endotheel dat in massa equivalent is aan vijf normale harten en dat in oppervlak gelijk is aan circa zes tennisvelden. Het endotheel moduleert hemodynamische, humorale en immunologische veranderingen binnen het vaatstelsel en in een nauw gereguleerd evenwicht tussen endotheelcellen en naburige cellen. In de afgelopen jaren hebben wij dit evenwicht op cellulair niveau bestudeerd. Onze voormalige assistent klinische chemie, dr. André Mulder, thans klinisch chemicus in Den Bosch, heeft een techniek ontwikkeld om dit evenwicht *in vitro* te onderzoeken (36, 37). Hierbij hebben wij onze aandacht gericht op twee biologische processen van endotheelcellen die van belang blijken te zijn voor de



**Figuur 13.** Endotheelcelkweek *in vitro*: vitale en apoptotische endotheelcellen.

pathogenese van de endotheeldysfunctie, te weten: apoptose en proliferatie. Als parameter van de proliferatieve activiteit van de endotheelcel hebben wij de expressie van de zogenaamde *vascular endothelial growth factor* (VEGF) gemeten. VEGF is een polypeptide groeifactor die mitose, migratie van endotheelcellen en permeabiliteit van bloedvaten stimuleert en zodoende een belangrijke rol speelt in fysiologische en pathologische angiogenese en overleving van endotheelcellen. VEGF speelt verder een rol in de pathogenese van diabetische (micro)angiopathie en endotheeldysfunctie. Wij hebben een techniek ontwikkeld om de expressie van het VEGF-mRNA te meten met behulp van een kwantitatieve competitieve *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Voor de bepaling van apoptose werd gebruikt gemaakt van de TUNEL- en annexine-V-methode. Endotheelcellen, geïsoleerd uit venen van humane navelstrengen, worden gestimuleerd met verschillende mediators, waaronder glucose en *advanced glycosylation endproducts* (AGE's), mediators die er beide van worden verdacht een directe rol te spelen in diabetische endotheeldysfunctie. De resultaten lieten zien dat er weliswaar slechts een geringe inductie van apoptose optrad, maar dat er tegelijkertijd een concentratie-afhankelijke expressie van VEGF-mRNA optrad. Verder hebben wij aangetoond dat apoptose-inducerende verbindingen, zoals lipopolysacchariden en Fas-antistoffen, dezelfde concentratieafhankelijke effecten op apoptose en de VEGF-mRNA-expressie vertonen. Wij hebben de hypothese geopperd dat de verhoogde expressie van VEGF in staat blijkt te zijn om het optreden van de door AGE-producten geïnduceerde apoptose af te remmen. Als direct bewijs konden wij aantonen dat na toevoeging van een VEGF-antistof, tijdens de stimulatie met apoptose-inducerende verbindingen, niet alleen het VEGF-effect geblokkeerd wordt, maar dat daarbij de inductie van apoptose aanzienlijk sterker is. Door deze eenvoudige in-vitro-experimenten hebben wij het eerste directe bewijs geleverd dat een balans tussen apoptose en proliferatie een rol speelt in de homeostase van het endotheel.

### Endotheeldysfunctie

Wanneer het endotheel beschadigd raakt verandert de functionele toestand van het endotheel. Endotheeldysfunctie is geen apart ziektebeeld, maar is algemeen aanvaard als een belangrijke vroege factor in het ontstaan van atherosclerose. De eerste stap in de pathogenese van atherosclerose omvat een activering van de endotheelcellen met als resultaat de adhesie van trombocyten en de binding van mononucleaire cellen uit het bloed, waarvan sommige subendotheliale worden opgenomen en transformeren tot schuimcellen door opname van lokaal aanwezige lipoproteïnen. De transformatie van het pre-atheroma tot een fibreuze plaque, de natuurlijke vorm van de atherosclerotische laesie, wordt beïnvloed door de migratie van gladde spiercellen vanuit de media naar de intima. Dit vindt plaats onder invloed van groeifactoren en cytokinen die door beschadigde endotheelcellen en door intimale macrofagen worden vrijgegeven.

Behalve groeifactoren worden eveneens matrixcomponenten, waaronder collageen, elastine en proteoglycanen, vrijgemaakt. Het optreden van proliferatie en apoptose van gladde spiercellen, endotheelcellen en macrofagen is een weerspiegeling van de verstoorde balans tussen mitogene en apoptotische factoren tijdens endotheeldysfunctie. Aangezien de excessieve proliferatie van gladde spiercellen, die de neo-intima vormen, een fundamenteel onderdeel is van de ontwikkeling van atherosclerose zou verondersteld kunnen worden dat een toename in apoptose van vasculaire gladde spiercellen voordelig is uit oogpunt van compensatie. Echter, de bewijslast neemt toe voor de hypothese dat apoptose van vasculaire gladde spiercellen een bepalende factor is, gebaseerd op de waarneming dat de kwetsbaarheid van de atherosclerotische plaque waarschijnlijk toeneemt indien er sprake is van een versterking van apoptose van gladde spiercellen. Het is aangetoond dat de intimale accumulatie van schuimcellen geassocieerd is met een toename van verlies van gladde spiercellen. Dientengevolge wordt gesuggereerd dat apoptose van gladde spiercellen de textuur van de plaque destabiliseert hetgeen aanleiding geeft tot ruptuur van de plaque. Recentelijk is eveneens aangetoond dat Fas-gemedieerde apoptotische activering van gladde spiercellen in vitro in staat is tot het veroorzaken van een massale immigratie van macrofagen in vasculaire laesies. Aldus is het waarschijnlijk dat een functionele pro-inflammatoire interactie tussen vasculaire spiercellen, die apoptose ondergaan, en ontstekingscellen (zoals macrofagen en T-lymfocyten) zou kunnen bijdragen aan het opnieuw modelleren van de extracellulaire matrix en destabilisatie van de plaque.

### Apoptose en cel- en weefseltechnologie

#### Verleden

Indien het atherosclerotische proces, in analogie met apoptose, het zogenaamde "*point of no-return*" is gepasseerd, is er sprake van een irreversibel fenomeen dat slechts met behulp van een reconstructieve ingreep kan worden behandeld. Aangetaste slagaders kunnen worden vervangen of omgeleid. De gouden standaard hierbij is nog steeds het gebruik van een bloedvat dat uit het lichaam van de patiënt zelf wordt weggenomen. Maar atherosclerose is een systemische ziekte, waardoor in veel gevallen autologe bloedvaten ongeschikt zijn, aangezien deze zelf ook door atherosclerose zijn aangetast. In dat geval worden als alternatief kunststof bloedvaten gebruikt ter vervanging van de aangetaste bloedvaten.

De eerste vaatprothesen werden al zo'n twintig jaar geleden ontwikkeld. Moderne prothesen voor grote bloedvaten functioneren over het algemeen goed. Deze prothesen zijn gemaakt van polyester of van teflon. Ondanks het feit dat de toegepaste materialen weinig lichaams- en bloedvriendelijk zijn, raakt de bloedvatprothese niet verstopt door trombusvorming aangezien het bloed met relatief hoge snelheden door deze grote bloedvaten stroomt. Maar in het geval van de meest voorkomende aandoeningen, zoals diabetische atherosclerose, die voor meer dan 50% onder-



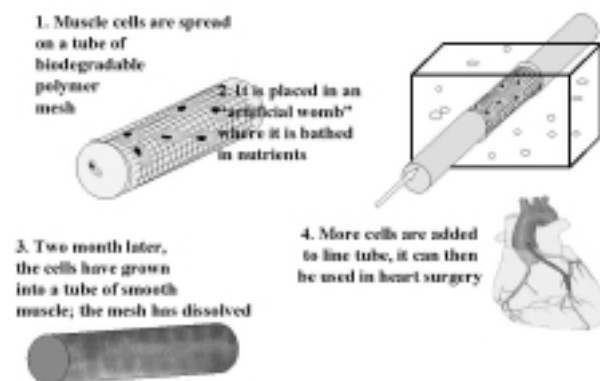
deel uitmaken van het totaal aan perifere vaatlijden, is er sprake van het verstopt raken van de kleinere bloedvaten. Na vervanging van deze kleine bloedvaten door prothesen treedt vrijwel altijd stolselvorming op. Veel onderzoek is verricht om vaatprothesen geschikt te maken voor vervanging van arteriën met een kleine diameter. Het bedekken van de binnenzijde van de prothese met lichaamseigen endotheelcellen, die immers de natuurlijke binnenbekleding vormen van normale bloedvaten, leidde tot een significante verbetering van de doorstroming. Diverse onderzoekers van de afdeling Polymeer Chemie en Biomaterialen van de Universiteit Twente onder leiding van prof. dr. Jan Feijen en dr. André Poot hebben dit aangetoond (onder andere promotieonderzoeken van dr. Bos (40) en dr. Wissink (41)). Het bleek goed mogelijk om endotheelcellen van een patiënt buiten het lichaam te kweken en deze vervolgens aan te brengen op de gemodificeerde protheseoppervlakken. Dit vormt de basis voor een hybride prothese: een buisje van kunststofmateriaal dat aan de binnenkant endotheelcellen bevat. Het is de bedoeling dat na implantatie van deze prothese deze cellen zullen uitgroeien, zodat uiteindelijk het gehele binnenoppervlak van het kunststof bedekt zal zijn met eigen endotheelcellen van de patiënt. Een andere mogelijkheid is om het binnenoppervlak van de prothese te voorzien van een volledig endotheellaag alvorens deze wordt geïmplanterd. In beide gevallen ontstaat er hierdoor een meer natuurlijke en bloedvriendelijke coating. De groei van endotheelcellen kan worden gestimuleerd met behulp van langzaam uit de prothese wegkijkende groeifactoren, maar kunststof blijft een verre van ideale matrix voor de groei van endotheelcellen. Daarnaast blijft ook het probleem van de hechting van de cellen aan het materiaaloppervlak bestaan. Maar het grootste probleem zijn de biologische eigenschappen van endotheelcellen: de cellen zijn niet voor langere tijd levensvatbaar en gaan verloren als gevolg van apoptotische celdood. Recent onderzoek heeft aangetoond dat zowel het proces van apoptose als ook de VEGF-gemedieerde proliferatie beïnvloed worden door hechting van endotheelcellen aan de onderliggende matrix via interacties tussen integrinen, groeifactoren en hun receptoren. Verbreking van deze contacten leidt tot spontane apoptose van deze cellen. Endotheelcellen zijn 'ankerafhankelijk', hetgeen betekent dat ze aan een substraat en aan elkaar moeten vastzitten om te kunnen groeien. Integrinen zijn primair verantwoordelijk voor de adhesie aan extracellulaire matrices en tevens betrokken bij de ankerafhankelijkheid. Endotheelcellen ondergaan apoptose indien ze van de matrix loskomen, een proces dat 'anoikis' wordt genoemd, naar het Griekse woord voor "dakloosheid" (42). Het anoikis-fenomeen impliceert dat een gedifferentieerde endotheelcel ten dode is opgeschreven indien het contact met de onderliggende matrix verloren gaat. Op deze wijze wordt voorkomen dat losgeraakte cellen in een nieuwe en wellicht ongewenste positie of locatie terecht komen. Dit proces is een essentieel verdedigingsmechanisme tegen metastasering van normale lichaamscellen en ter verdediging tegen cellen die

een maligne karakter hebben ontwikkeld. Hetzelfde mechanisme veroorzaakt echter grote hindernissen bij het zaaien en uitgroeien van endotheelcellen op vasculair transplantatiemateriaal.

### Heden

Een nieuwe strategie inzake weefselengineering van bloedvatprothesen is gebaseerd op het gebruik van biologische afbreekbare materialen en natuurlijke vaatwandcellen. Op deze manier wordt geprobeerd om een zo natuurlijk mogelijk bloedvat te reconstrueren en na degradatie van het prothesemateriaal alleen lichaamseigen materialen over te houden. Er zijn studies gepubliceerd met betrekking tot het kweken van cellen (endotheelcellen, gladde spiercellen, fibroblasten) in buisvormige collageen matrices, dan wel het kweken van deze cellen in verschillende lagen rond een tijdelijke kunststoffen houder waarbij de cellen zelf collageen afzetten (43). Implantaties van deze kunstbloedvaten in proefdieren hebben echter uitgewezen dat op deze wijze vervaardigde bloedvaten onvoldoende mechanische eigenschappen bezitten. Recent is gerapporteerd over het kweken van gladde spiercellen in een biologisch afbreekbare buisvormige structuur van polyglycolzuur (44). Wanneer er werd gekweekt onder pulsatiele stromingsomstandigheden, bleken de mechanische eigenschappen van deze vaatprothesen overeen te komen met die van natuurlijke bloedvaten (figuur 14). Er werd echter geen elastine aangetoond in de vaatwand en de spiercellen waren niet georiënteerd in de gewenste omtrekriching van het bloedvat.

Ons project is gebaseerd op eigen ervaringen op het gebied van modificatie van kunststofoppervlakken en bedekking met endotheelcellen gecombineerd met de ervaringen uit de hiervoor genoemde onderzoeken. Sinds een jaar werken twee promovendi, Laura Buttafoco en Paula Buijtenhuijs, in een samenwerkingsverband tussen UT en MST aan weefselengineering van kleine en middelgrote bloedvaten. Buisvormige collageenstructuren in een bioreactor fungeren als matrix voor de groei van humane vaatwandcellen. De structuurfunctionele relaties van collageen worden beïnvloed door het gebruik van diverse typen colla-

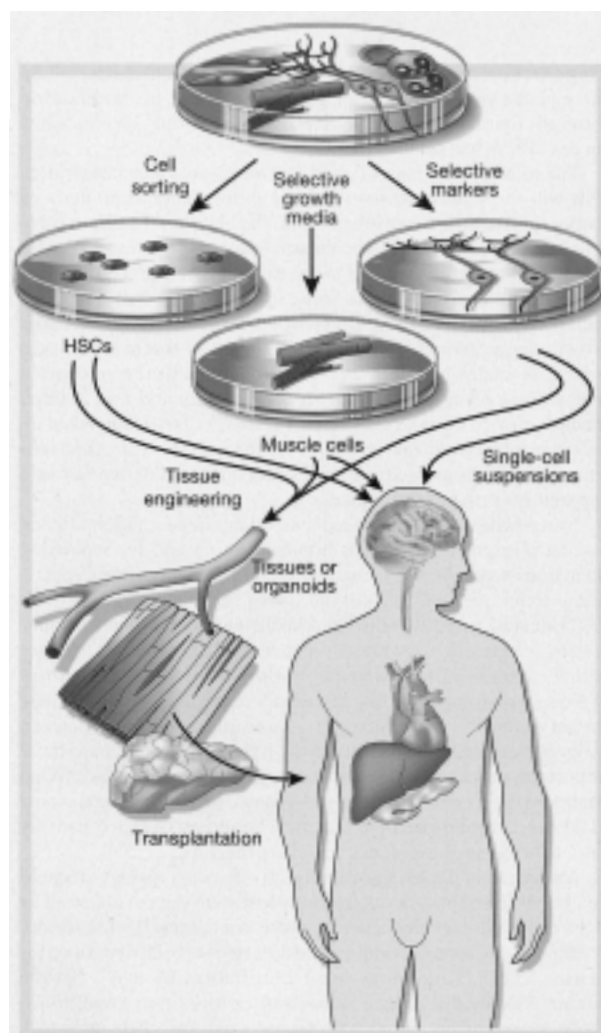


**Figuur 14.** Weefselengineering van bloedvaten: kweken van gladde spiercellen in biodegradeerbare buisvormige structuren van een collageen-elastine-matrix.

geen, door het oriënteren van het collageen in de matrix om daarmee de oriëntatie van de vaatwandcellen te beïnvloeden, door het cross-linken van het collageen en door het covalent binden van celadhesiepeptiden aan het collageen om daarmee de groei van verschillende typen vaatwandcellen te beïnvloeden. In eerste instantie wordt geprobeerd om, in een biologisch afbreekbare platte matrix van gemodificeerd collageen, gladde spiercellen te kweken, om vervolgens een buisvormige collageenstructuur te vervaardigen waarin de vaatwandcellen kunnen worden gekweekt onder pulserende stromingscondities. Na het opbouwen van voldoende mechanische eigenschappen zullen de constructies aan de binnenzijde worden voorzien van een bedekkingslaag van collageen type IV, waarop vervolgens endotheelcellen kunnen worden gezaaid en gekweekt.

### Toekomst

Een onophoudelijke stroom aan recente onderzoeken heeft laten zien dat het menselijk lichaam tot ver in het stadium van de volwassenheid onderdak biedt aan levende stamcellen die in staat zijn om zichzelf te ontwikkelen tot een groot aantal verschillende celtypen. Dergelijk wetenschappelijk werk heeft bij onderzoekers die zich bezighouden met bio-engineering de hoop gevestigd dat het in de toekomst mogelijk zal zijn om nieuwe weefsels en organen te laten groeien waarmee de door leeftijd en ziekte aangetaste onderdelen van het lichaam kunnen worden vervangen (45, 46). Onze strategie is erop gericht om stamcellen te kweken die zich selectief kunnen differentieëren tot gladde spiercellen van de vaatwand en tot endotheelcellen waarmee de intima van het bloedvat kan worden gevormd. In figuur 15 is deze opzet schematisch weergegeven. Het vaatskelet zal worden gemaakt van biologisch afbreekbare en flexibele polymeren met een poreuze tubulaire structuur, die onder controleerbare omstandigheden biologisch zullen worden afgebroken en die in de tussenperiode uitstekende elastische en flexibele eigenschappen vertonen. Stamcellen zullen hierin worden gezaaid en het kweken zal worden uitgevoerd in een bioreactor. Om het mogelijk te maken de kunstmatige bloedvaten *in vitro* te vormen, zullen de stamcellen in eerste instantie selectief worden gedifferentieerd tot gladde spiercellen. Dit zal worden vergezeld door het incorporeren van groeifactoren in de microholtes van het raamwerk om zodoende een embryonale omgeving te creëren en door in het kweekmedium biochemische actieve stoffen, 'cues', te laten circuleren. Eveneens zal de productie van elastine door gladde spiercellen worden gestimuleerd door toevoeging van geschikte groeifactoren. Door het toepassen van pulsatiele stroming van het kweekmedium zal radiale oriëntatie van de gladde spiercellen worden bereikt. Aansluitend zal de vorming van de intima van het bloedvat worden bewerkstelligd, door het aanpassen van het kweekmedium tot een situatie waarbij de voorkeur ligt op differentiatie van embryonale stamcellen naar endotheelcellen. Het zodanig kunstmatig ontwikkelde bloedvat zal histologisch worden geëvalueerd om de biologische eigenschappen te vergelijken met die van natuurlijke



**Figuur 15.** Weefselengineering met behulp van pluripotente stamcellen.

bloedvaten. De mechanische prestaties en de *in vitro* functionaliteit van dergelijke weefsels zal mettertijd moeten worden geëvalueerd.

Wij zijn ervan overtuigd dat, ondanks de vele krantenkoppen die aan stamcellen zijn gewijd, de sleutel tot het succesvol ontwikkelen van menselijke weefsels en organen wellicht niet in de cellen is gelegen, maar juist in de structuur en opbouw van het fijne poreuze raamwerk, het 'scaffold' (voornamelijk gecreëerd uit natuurlijke eiwitten of synthetische polymeren) waarop de cellen dienen te groeien. Gedurende vele jaren hebben onderzoekers die zich bezighouden met bio-engineering weinig aandacht geschonken aan het raamwerk- of scaffoldmateriaal. Dit scaffoldmateriaal werd beschouwd als een passieve structuur, slechts bedoeld als een plek voor cellen en om de mogelijkheid te bieden de cellen hieraan te laten hechten, in de tijd dat de groei plaatsvindt. Echter, gedurende de laatste jaren zijn we ervan bewust geworden dat de vorming van het scaffold, in analogie met de extracellulaire matrix die het moet nabootsen, veel meer functies bezit dan enkel en alleen het aanhechten en bijhouden van cellen. Het scaffoldmateriaal bezit cruciale informatie in de vorm

van groeifactoren, cytokinen en oppervlakte-eigenschappen voor cellen met betrekking tot hun groei en ontwikkeling. Zo goed als alle eigenschappen van het raamwerk -de chemie, de vorm en de wijze waarop het beweegt onder invloed van stress- zijn van essentieel belang voor het beïnvloeden van het gedrag van cellen. Deze signalen worden naar de binnenzijde van de cel doorgegeven door middel van receptoren op het celoppervlak die van vorm wijzigen indien ze binden aan collageen, fibronectine en andere extracellulaire matrixeiwitten. Dergelijke vormveranderingen van receptoren kunnen op hun beurt aanleiding geven tot het in gang zetten van intracellulaire cascades die uiteindelijk kunnen leiden tot wijzigingen in genexpressie en veranderingen in cel-functie. De toekomst van een stamcel, in hoeverre deze zal differentiëren tot een specifieke doelcel of daarentegen ten gronde zal gaan ten gevolge van apoptose, is gelegen in de informatie, zoals die wordt afgegeven door de extracellulaire matrix. De moleculaire biologie brengt niet alleen nieuwe kansen met zich mee voor het stamcelonderzoek maar ook voor het gebied van bio-engineering. Jammer genoeg ziten we met een klein probleem (47):

*“We do know if you get cells into the right conditions, they will figure things out. The problem is figuring out what the right conditions are!”*

#### Literatuur

- Bernard C. Leçons sur les Phénomènes de la Vie Communs aux Animaux et aut Végétaux. Ballière et fils, Paris, 1878.
- Cannon WB. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiol* 1914; 33: 356-372.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Eng J Med*. 1998; 338: 171-179.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- Glicksman A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Cambridge Phil Soc* 1951; 26, 59-86.
- Saunders JW. Death in embryonic systems. *Science* 1966; 154, 604-612.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Haanen C, Vermes I. Apoptose, de biologische tegenhanger van mitose. *Ned Tijdsch Geneesk* 1993; 137: 1914-1919.
- Clarke PGH. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 1990; 181: 195-213.
- Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin R. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis or other? *Cell Death Different* 1995; 2: 87-96.
- Bursch W, Hohegger K, Török L, Marian B, Ellinger A, Schulte Hermann R. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Science* 2000; 113: 1189-1198.
- Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76: 777-778.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM. Molecular biology of apoptosis and programmed cell death. In: *Free Radicals and Molecular Biology of Human Diseases*. Eds. Aruoma O, Halliwell B. OICA International, Saint Lucia WI, Chelsea GB. 1998; Chapter 8: 225-286.
- Haanen C, Vermes I. Apoptose als prognostisch en therapeutisch aangrijpingspunt in de geneeskunde. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000; 144: 1346-1350.
- Vermes I, Haanen C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv. Clin Chem* 1994; 31: 177-246.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410: 549-554.
- Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18: 6145-6157.
- Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000; 403: 29-30.
- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276-281.
- Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 2000; 476: 118-123.
- Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 571-580.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.
- Dumont EA, Hofstra L, van Heerde WL, van den Eijnde S, Doevendans PA, DeMunck E, et al. Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model. *Circulation* 2000; 102: 1564-1568.
- Kemerink GJ, Boersma HH, Thimister PW, Hofstra L, Liem IH, Pakbiers MT, et al. Biodistribution and dosimetry of 99mTc-BTAP-annexin-V in humans. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 1373-1378.
- Overbeeke R, Steffen-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometric assay. *Apoptosis* 1998; 3: 115-121.
- Overbeeke R, Yildirim M, Reutelingsperger CPM, Haanen C, Vermes I. Sequential occurrence of mitochondrial and plasma membrane alterations, fluctuations in cellular Ca<sup>2+</sup> and pH during initial and later phases of cell death. *Apoptosis* 1999; 4: 455-460.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243: 167-190.
- Vermes I, Haanen C, Richel DJ, Schaafsma R, Kalsbeek-Batenburg E, Reutelingsperger CPM. Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. *Acta Haematol* 1997; 98: 8-13.
- Idink-Mecking CAM, Vermes I, Richel DJ, Schaafsma RM, Reutelingsperger C, Haanen C. Ex vivo evidence of lymphocyte apoptosis in hairy cell leukaemia induced by 2-chlorodeoxyadenosine treatment. *Ann Hematol* 1998; 75: 25-29.
- Guchelaar H-J, Vermes I, Koopmans RP, Reutelingsperger CPM, Haanen C. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: A quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 42: 77-83.
- Beishuizen A. Ph.D. Immuno-neuro-endocrine adaptation in critical illness. Thesis, Free University, Amsterdam-Medical Spectrum Twente, Enschede 2001.

33. Te Velde LF, Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM, ten Napel CHH. Apoptotic cell death, detected ex vivo in peripheral blood lymphocytes of HIV-1 infected persons. *Mediators Inflamm* 1996; 5: 379-381.
34. Vermes I, Jansen Steur E, Reutelingsperger C, Haanen C. Decreased concentration of Annexin V in Parkinsonian cerebrospinal fluid: Speculation on the underlying cause. *Movement Disorders* 1999; 14: 1008-1010.
35. Oosterhuis G JE. Ph.D. Prognostic laboratory parameters for success in assisted reproduction. Thesis, Free University, Amsterdam-Medical Spectrum Twente, Enschede 2001.
36. Mulder AB, Vermes I, Marx PT, Overbeeke R, Haanen C. De rol van apoptotische endotheelcellen in de pathogenese van diabetische microangiopathie. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1998; 23: 181-185.
37. Marx PTJ, Mulder AB, van den Bergh FAJTM, Overbeeke R, Haanen C, Vermes I. Apoptosis inducers endotoxin and Fas-ligation enhance the expression of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Endothelium* 1999; 6: 335-340.
38. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999; 340: 115-126.
39. Kolodgie FD, Narula J, Guillo P, Virmani R. Apoptosis in human atherosclerotic plaques. *Apoptosis* 1999; 4: 5-10.
40. Bos B. Albumin-heparin matrices loaded with growth factor as substrates for endothelial cell seeding. Ph.D. Thesis, University Twente, 1998.
41. Wissink, MJB. Endothelialization of collagen matrices. Effect of crosslinking, heparin immobilization and  $\beta$ FGF loading. Ph.D. Thesis, University Twente, 1999.
42. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-478.
43. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998; 12: 47-56.
44. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489-493.
45. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001; 414: 118-121.
46. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-97.
47. McCarthy M. Bioengineers bring new slant to stem-cell research. *Lancet* 2000; 356: 1500.