

- Brief report: molecular biology and the earlier detection of carcinoma of the bladder- the case Hubert H. Humphrey. *N Engl J Med* 1994; 330: 1276-1278.
11. Vet JAM, Bringuier PP, Schaafsma HE, Witjes JA, Debruyne FMJ, Schalken JA. Comparison of p53 protein overexpression with p53 mutation in bladder cancer: clinical and biological aspects. *Lab Invest* 1995; 73: 837-843.
 12. Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem* 1997; 43: 1114-1128.
 13. Vet JAM, Witjes JA, Marras SAE, Hessels D, Poel HG van der, Debruyne FMJ, Schalken JA. Predictive value of p53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high risk superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1055-1061.
 14. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-709.
 15. Oyasu R, Nan L, Szumel RC, Kawamata H, Hirohasji S. p53 gene mutations in human urothelial carcinomas: analysis by immunohistochemistry and single-strand conformation polymorphism. *Mod Pathol* 1995; 8: 170-176.
 16. Goto K, Konomoto T, Hayashi K, Kinukawa N, Naito S, Kumazawa J, Tsuneyoshi M. p53 mutations in multiple carcinomas: a molecular analysis of the development of multiple carcinomas. *Mod Pathol* 1997; 10: 428-437.
 17. Schlechte HH, Schnorr D, Löning T, Rudolph BD, Pohrt UM, Loening S. Mutation of the tumorsuppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers - investigation by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *J Urol* 1997; 157: 1049-1053.

Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 182-186

De rol van apoptotische endotheelcellen in de pathogenese van diabetische microangiopathie

A.B. MULDER, I. VERMES, P.T.J. MARX, R. OVERBEEKE en C. HAANEN

Gestoorde functie van endotheelcellen blijkt een belangrijke rol te spelen in de pathogenese van diabetische microangiopathie. In dit overzicht beschrijven we experimenten met gekweekte endotheelcellen, waarin twee processen; apoptose (geprogrammeerde celdood) en expressie van "vascular endothelial growth factor" (VEGF), werden onderzocht.

Endotheelcellen, geïsoleerd uit venen van humane navelstrengen, werden gestimuleerd met verschillende mediators, waaronder glucose en niet-enzymatisch geglycosyleerd BSA. Voor bepaling van de apoptose werd gebruik gemaakt van de TUNEL methode. Expressie van VEGF mRNA werd bepaald met behulp van een semi-kwantitatieve competitieve reverse transcriptase polymerase chain reaction.

De resultaten tonen aan dat er slechts een geringe inductie van apoptose optrad (maximaal 12%), terwijl er een concentratie-afhankelijke inductie van VEGF mRNA werd waargenomen.

In aanvullend experimenten willen we de mogelijke relatie tussen expressie van VEGF en optreden van apoptose nader bestuderen. Daar losgelaten endotheelcellen mogelijk een rol spelen bij de diabetische microangiopathie, zullen we tevens de losgeraakte endotheelcellen onderzoeken.

Trefwoorden: diabetische microangiopathie; endotheelcellen; apoptose; vascular endothelial growth factor (VEGF); celadhesiefactoren.

Afdeling Klinische Chemie, Medisch Spectrum Twente, Enschede

Correspondentie: Dr. A.B. Mulder, Medisch Spectrum Twente, Afdeling Klinische Chemie, Postbus 50.000, 7500 KA Enschede. Ingekomen: 04.05.98

In de laatste 25 jaren is veel inzicht in het verband tussen hormonale en metabole veranderingen bij diabetes mellitus verkregen en de behandeling van diabetes mellitus is vooral gericht geweest op het voorkomen van ernstige metabole ontregeling. Maar ondanks de moderne, zeer uitgebreide diagnostische en therapeutische mogelijkheden heeft de patiënt met suikerziekte nog steeds een verhoogde ziektekans en een kortere levensverwachting. In de laatste jaren is de medische belangstelling van karakter veranderd en heeft zich sterk gericht op het optreden van late complicaties van diabetes mellitus. Dit zijn met name de microangiopathie, met als uitingsvormen de nefropathie en de retinopathie, en de macroangiopathie, zoals de atherosclerotische hart- en vaatziekten.

Deckert e.a. hebben laten zien dat van patiënten, die voor hun 31e levensjaar diabetes ontwikkelden, 40 jaar na het stellen van de diagnose nog slechts 40% in leven waren (1). De belangrijkste doodsoorzaken waren myocardinfarct en nierinsufficiëntie. Bij 20% van de nog levenden bestond een gestoorde nierfunctie, terwijl ook 20% een myocardinfarct had doorgemaakt. Ongeveer 10% van de patiënten was getroffen door een cerebrovasculair accident en 12% had een amputatie ondergaan wegens optreden van gangreen.

Oogafwijkingen komen bij diabetes patiënten in een hoge frequentie voor. De belangrijkste en meest specifieke diabetische oogafwijkingen zijn microvasculaire complicaties van het netvlies. Diabetische retinopathie is zelfs in de Westerse wereld de belangrijkste oorzaak van slechtziendheid en blindheid bij mensen tussen de 20 en 75 jaar (2). Diabetische retinopathie komt voor bij 40% van alle patiënten met diabetes mellitus.

Histologisch-morfologisch gezien worden de begin-

stadia van diabetische retinopathie gekenmerkt door verhoogde permeabiliteit en microaneurysmata van de capillairen, venulen en arteriolen in het netvlies, gepaard gaand met vochtophoppingen, exsudaten en kleine bloedinkjes. Later in het proces leidt verdikking van de capillaire basale membraan tot afsluiting van capillairen en het ontstaan van gebieden met ischemie. Ten gevolge van retinale ischemie treedt vervolgens vorming van nieuwe bloedvaatjes op: de fase van proliferatieve retinopathie. De bij dit proces van neovascularisatie ontstane bloedvaatjes zijn fragiel en kunnen gemakkelijk scheuren en bloeden. Uiteindelijk geeft dit vaak aanleiding tot dramatische complicaties, zoals recidiverende glasvochtbloedingen en netvliesloslatingen, wat belangrijke oorzaken van blindheid zijn.

Diverse hypothesen zijn opgesteld ter verklaring van de mogelijk schadelijke effecten van een aantal met diabetes mellitus samenhangende factoren. Met name hoge glucose concentraties (3) en niet-enzymatische glycosylering van eiwitten, zoals van bijvoorbeeld de lenseiwitten, albumine, lipoproteïnen en collageen, de zogenaamde "advanced glycosylation endproducts" (AGE's) (4), lijken een rol te spelen bij het ontstaan van diabetische retinopathie. Toch is het opvallend dat sommige patiënten ondanks langdurig bestaande matig gereguleerde diabetes soms weinig oogcomplicaties vertonen, terwijl anderen, ondanks goede bloedsuikerwaarden, deze complicaties wel hebben (5). Hoewel de precieze pathogenese van diabetische retinopathie nog grotendeels onduidelijk is, wordt algemeen aangenomen dat een disfunctie van endotheel; de binnenbekleding van bloedvaten, een belangrijke rol speelt in de pathogenese van diabetische retinopathie (6). Recent is gebleken dat bij diabetische retinopathie een toename van apoptose (geprogrammeerde celdood) in microvasculaire retinacellen kan worden waargenomen (7). Apoptose is een actief proces van zelfvernietiging van cellen, dat gepaard gaat met fragmentatie van de cel en het DNA ("apoptotische lichaampjes"). Voorafgaand aan de DNA-fragmentatie treden er veranderingen op aan de celmembraan, waaronder verplaatsing van fosfatidylserine vanaf de cytosolzijde naar de buitenkant van de cel. Deze veranderingen op het celoppervlak leiden tot herkenning en fagocytose van de apoptotische cel en de apoptotische lichaampjes door aangrenzende cellen en macrofagen (8). Het optreden van apoptose zou mede verantwoordelijk kunnen zijn voor de niet-proliferatieve afwijkingen, zoals verhoogde permeabiliteit en vaatafsluitingen, optredend in het begin van de diabetische retinopathie. Later, in de fase van proliferatieve retinopathie, worden o.a. migratie en proliferatie van endotheelcellen waargenomen. Het is thans algemeen geaccepteerd dat vascular endothelial growth factor (VEGF); een polypeptide groeifactor, die mitose, migratie en permeabiliteit van endotheelcellen stimuleert (9,10), een rol speelt bij het ontstaan van proliferatieve diabetische retinopathie (11). Er is o.a. gebleken dat AGE's in staat zijn om angiogenese te induceren via stimulatie van autocriene VEGF expressie (12). In het huidige

project willen we ons richten op het onderzoeken van processen, die een rol lijken te spelen bij het ontstaan van diabetische retinopathie. In dit overzicht beschrijven wij de pilotexperimenten, bespreken de resultaten hiervan en presenteren we plannen voor toekomstig onderzoek.

MATERIALEN en METHODEN

Materialen

Fibronectine was afkomstig van dr. C. Reutelingsperger; vakgroep Biochemie, Universiteit Maastricht. Medium 199, RPMI-1640, Hank's solution, HEPES, L-glutamine, 2 mmol/l L-alanyl-L-glutamine, penicilline, streptomycine, amphotericine B en Superscript II reverse transcriptase waren alle afkomstig van Life-Technologies, Paisley, Scotland. Foetaal kalf serum, bovine endothelial cell growth factor, de In Situ Cell Death Detection kit, TAQ-DNA-polymerase, bovine serum albumine (BSA) en PMSF waren afkomstig van Boehringer Mannheim, Duitsland. Heparine en lipopolysaccharide (LPS) waren afkomstig van Sigma, St Louis, USA. Ceramide (N-acetyl-D-erythro-sphingosine) was afkomstig van Calbiochem, La Jolla, USA. De Rneasy blood kit was afkomstig van Qiagen, Hilden, Duitsland en de MEGAscript kit van Ambion, Austin, USA. De VEGF-upper primer; CGG.GCC.TCC.GAA.ACC.ATG.AAC, de VEGF-lower primer; GCA.CAC.ACT.CCA.GGC.CCT.CGT en de Sepharose CL-4B kolom waren afkomstig van Pharmacia, Roosendaal, Nederland. PE-geconjugerd anti-FAS/CD95 was afkomstig van Immunotech, Marseille, Frankrijk.

Methoden

AGE BSA

Bovine serum albumine (20%) werd gedurende 6 weken bij 37°C geïncubeerd met 0.5 mol/l D-glucose in aanwezigheid van PMSF en de anti-microbiële middelen penicilline, streptomycine en amphotericine B. Vervolgens werd, na dialyse tegen PBS en filtratie met behulp van een Sepharose CL-4B kolom, een eindproduct verkregen met een eiwitconcentratie van 24.5 g/l.

Endotheelcelkweek

Endotheelcellen werden gekweekt volgens een eerder beschreven methode (13). In het kort, de endotheelcellen werden geïsoleerd uit venen van humane navelstrengen en gekweekt in kweekflesjes, gecoat met fibronectine. Het kweekmedium bestond uit: 40% Medium 199 met toevoeging van Hank's solution and L-glutamine; 40% RPMI-1640 met toevoeging van 25 mmol/l HEPES en L-glutamine; 2 mmol/l L-alanyl-L-glutamine; 20% foetaal kalf serum; 20 µg/ml bovine endothelial cell growth factor; 50 µg/ml heparine; 50 U/ml penicilline; 50 µg/ml streptomycine en 2,5 µg/ml amphotericine B.

Na 2 passages waren er voldoende cellen voorhanden voor het uitvoeren van de experimenten. Onderzoek naar inductie van apoptose werd verricht door con-

fluente endotheelcellagen gedurende 3 dagen te incuberen in kweekmedium met toevoeging van verschillende mediators, waarbij het medium elke dag werd verversd ter voorkoming van uitputting van een van de componenten. Onderzoek naar inductie van VEGF expressie werd verricht door adherente endotheelcellen gedurende 4 uren met verschillende mediators te incuberen.

Apoptose

Voor de bepaling van apoptose werd gebruik gemaakt van de TUNEL (van: "terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling") methode (14). De TUNEL werd uitgevoerd met de In Situ Cell Death Detection kit. 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 het fluorochrome FITC. Vervolgens wordt met behulp van flowcytometrie het percentage dUTP-positieve endotheelcellen bepaald.

VEGF mRNA expressie

De inductie van VEGF mRNA werd bepaald m.b.v. een semi-kwantitatieve reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (15). De methode is gebaseerd op een competitie tussen een onbekende hoeveelheid VEGF mRNA en een bekende hoeveelheid van een gesynthetiseerd mimicry RNA (de zogenaamde "interne standaard"). De basenvolgorde van de interne standaard is, op een deletie van 93 basen na, gelijk aan het te bepalen VEGF mRNA, waardoor het product m.b.v. elektroforese goed te onderscheiden is van het VEGF mRNA-product. De interne standaard werd gesynthetiseerd met behulp van de MEGAscript kit.

Totaal RNA werd geïsoleerd met behulp van de Rneasy blood kit. Vervolgens werd een concentratierij van de interne standaard tezamen met een te bepalen hoeveelheid VEGF mRNA met behulp van Superscript II reverse transcriptase omgezet tot cDNA. Daarna werd het totale cDNA met behulp van VEGF primers en TAQ-DNA polymerase geamplificeerd en na elektroforese werden de PCR-producten uiteindelijk gekwantificeerd met behulp van een charged coupled device (CCD)-camera.

Het verband tussen de hoeveelheid toegevoegde standaard en de verhouding van de hoeveelheden PCR producten van de standaard en het monster, gecorrigeerd voor het verschil in lengtes, vormt een ijklijn, waaruit m.b.v. logaritmische regressie de hoeveelheid VEGF mRNA in het uitgangsmateriaal is te herleiden. Daar de interne standaard voor de RT-reactie aan het monster wordt toegevoegd, hebben eventuele inefficiënte enzymreacties geen invloed op de verhouding tussen de hoeveelheid monster en standaard. Tevens moet de ijklijn een richtingscoëfficiënt van één hebben om zeker te zijn dat de reactie-omstandigheden voor interne standaard en monster overeen zijn gekomen (16).

Tabel 1. Percentage apoptotische cellen, bepaald met behulp van TUNEL, na incubatie van gekweekte adherente endotheelcellen, gedurende 3 dagen, met verschillende mediators.

Mediator	% Apoptose
LPS (10 µg/ml)	9
Ceramide (300 nmol/ml)	<5
Glucose (30 µmol/ml)	<5
AGE-BSA (50 µg/ml)	12
FAS-antilichamen (660 ng/ml)	<5

RESULTATEN

Apoptose inductie

In tabel 1 staan de percentages endotheelcellen weergegeven, waarin, na incubatie met verschillende stimulators, apoptose is opgetreden.

De resultaten laten zien dat na incubatie van adherente endotheelcellen met 30 mmol/l glucose gedurende 3 dagen geen duidelijke toename van apoptose had plaatsgevonden (< 5%). Na stimulatie van endotheelcellen met 50 mg/l AGE-BSA trad in 12% van de cellen apoptose op. Vervolgens werden de endotheelcellen geïnduceerd met endotoxine (LPS) en Fas antilichamen, waarvan op basis van literatuurgegevens een duidelijke inductie van apoptose kon worden verwacht (17,18). Zeer opvallend was dat ook nu slechts een geringe inductie van apoptose onder invloed van LPS (9%) en anti-Fas/CD95 (<5%) optrad. De gegevens uit Tabel 1 lijken erop te wijzen dat in adherente endotheelcellen slechts in een gering aantal cellen apoptose is op te wekken.

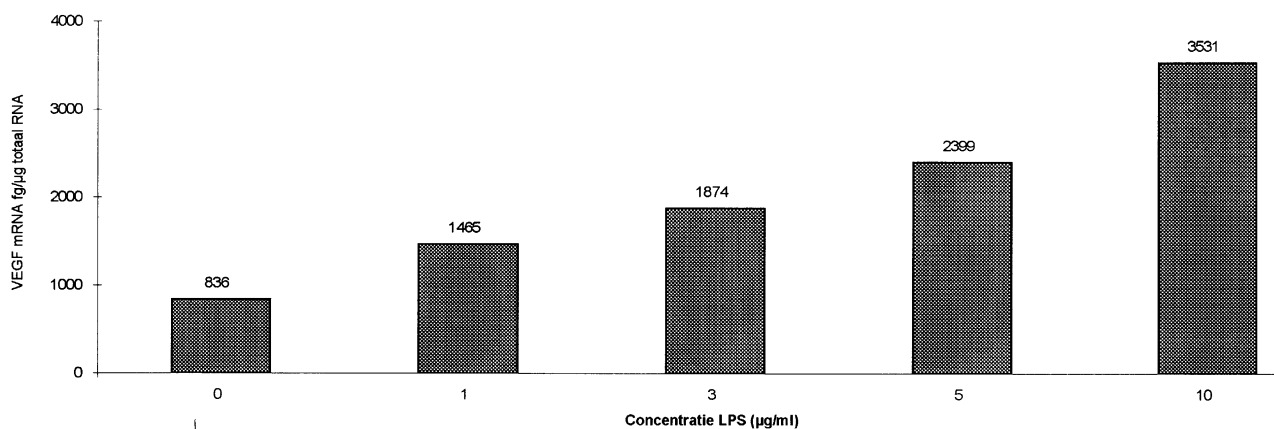
VEGF expressie

We vonden dat na stimulatie van endotheelcellen met LPS een concentratieafhankelijke inductie van VEGF expressie optrad (Figuur 1). Stimulatie van endotheelcellen met 10 µg/ml LPS, gedurende 4 uur, resulteerde in een 4- tot 10-voudige toename van het VEGF mRNA (n = 3).

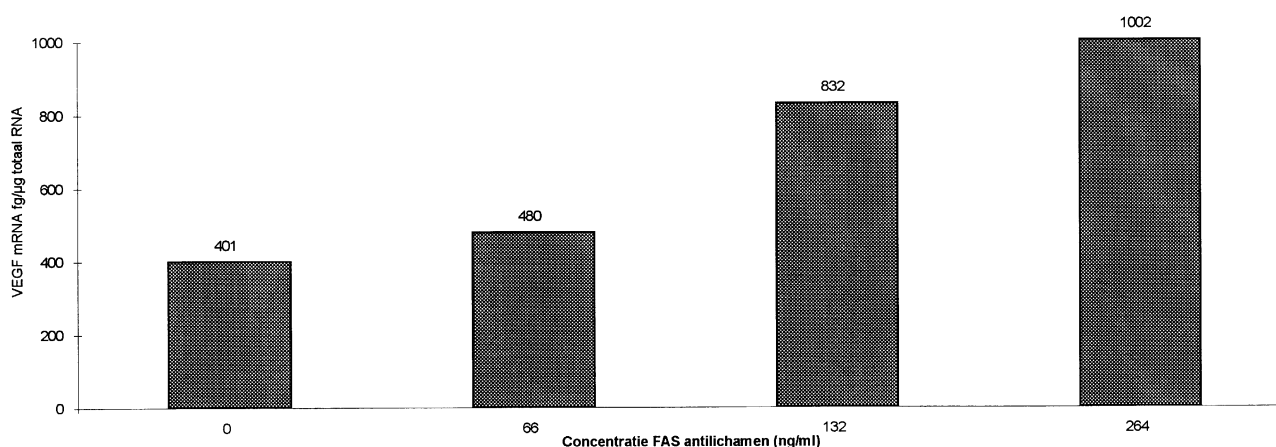
Na ligatie van de receptor op de endotheelcellen met behulp van Fas antilichamen werd eveneens een toename van VEGF mRNA expressie waargenomen (n = 2, Figuur 2).

DISCUSSIE

Hoewel het duidelijk is dat disfunctie van endotheel een belangrijke factor is in het proces van diabetische microangiopathie, is tot op heden weinig bekend over het precieze verloop van dit proces. In het huidige onderzoek richten we onze aandacht op twee biologische processen van endotheelcellen, die van belang



Figuur 1. Hoeveelheden VEGF mRNA (fg per microgram totaal RNA), geïnduceerd na incubatie van endotheelcellen, gedurende 4 uren, met verschillende concentraties LPS.



Figuur 2. Hoeveelheden VEGF mRNA (fg per microgram totaal RNA), geïnduceerd na incubatie van endotheelcellen, gedurende 4 uren, met verschillende concentraties Fas antilichamen.

lijken te zijn voor de pathogenese van de diabetische retinopathie; namelijk apoptose en proliferatie. De resultaten van de pilotexperimenten laten zien dat na incubatie van gekweekte, adherente endotheelcellen met verschillende reagentia geen duidelijke inductie van apoptose kon worden waargenomen. Tevens vinden we dat na stimulatie van endotheelcellen met zowel LPS als met Fas antilichamen een concentratieafhankelijke inductie van VEGF mRNA expressie optrad, mogelijk via inductie van NF- κ B.

Onze bevindingen sluiten aan bij recent verschenen literatuur, waarin staat beschreven dat VEGF in staat blijkt te zijn om apoptose te remmen (19,20).

In aanvullende experimenten willen we nagaan of inhibitie van autocriene effecten van VEGF met behulp van anti-VEGF antilichamen tot inductie van apoptose leidt. Tevens willen we, in samenwerking met de afdelingen Centraal Chemisch Laboratorium en Interne Geneeskunde van het Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit Amsterdam (zie elders in dit nummer), de effecten van andere met diabetes mellitus samenhangende factoren (hyperglycemie, AGE's, insulinedeficiëntie, geoxideerd LDL en cytokinen [TNF- α , IL-6 en IL-1]) op endotheliale apoptose en

expressie van VEGF en de VEGF receptoren nader bestuderen.

Recente studies hebben aangetoond dat zowel het proces van apoptose (21), als de VEGF-gemedieerde proliferatie (22) beïnvloed wordt door hechting van de endotheelcellen aan de onderliggende matrix via interacties tussen integrinen en hun receptoren. Verbreking van deze contacten leidt o.a. tot spontane apoptose van deze cellen.

Daar het ons inziens niet onwaarschijnlijk is dat losgelaten endotheelcellen in ischemische retinagebieden een rol spelen in de pathogenese van de diabetische retinopathie, zullen met name juist de productie van mediators door de losgeraakte endotheelcellen worden bestudeerd.

Mogelijk is de balans tussen apoptose en VEGF-afhankelijke proliferatie van retina-endotheel van invloed op de overgang van de niet-proliferatieve retina-afwijkingen naar de proliferatieve afwijkingen. Inzicht in de (dis)regulatie van deze endotheliale processen kan bijdragen aan het voorkomen of verbeteren van de therapie van de retinopathie en experimenteel onderzoek is hierbij dan ook van essentieel belang.

Literatuur

1. Deckert T, Poulsen JE, Larsen M. Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirty one, survival, causes of death and complications. *Diabetologica* 1978; 14: 363-370.
2. Centraal Begeleidingsorgaan voor de Intercollegiale Toetsing en Nederlandse Diabetes Federatie. *Diabetische retinopathie* 1997.
3. The Diabetes Control and Complications Trial research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J med* 1993; 329: 977-986.
4. Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol* 1992; 21: 1-33.
5. Chantelau E, Kohner EM. Why some cases of retinopathy worsen when diabetic control improves. *BMJ* 1997; 315: 1105-1106.
6. Porta M. Endothelium: the main actor in the remodeling of the retinal microvasculature in diabetes. *Diabetologica* 1996; 39: 739-744.
7. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM. Apoptosis - the genetically controlled physiological cell death: biochemistry and measurement. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1997; 22: 43-50.
8. Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 1996; 97: 2883-2890.
9. Watanabe Y, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor inhibits anchorage-disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation. *Exp Cell Res* 1997; 233: 340-349.
10. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 1997; 18: 4-25.
11. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal diseases. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
12. Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1997; 272: 8723-8730.
13. Mulder AB, Blom NR, Smit JW, Ruiters MHJ, Meer J van der, Halie MR, Bom VJJ. Basal tissue factor expression in endothelial cell cultures is caused by contaminating smooth muscle cells. Reduction by using chymotrypsin instead of collagenase. *Thromb Res* 1995; 80: 399-411.
14. Overbeek R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis* 1998; 3: 115-121.
15. Marx PTJ, Mulder AB, Haanen C, Vermes I. LPS enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells via ceramide? In preparation.
16. Raeymaekers L. Quantitative PCR: Theoretical considerations with practical implications. *Anal Biochem* 1993; 214: 582-585.
17. Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards III CK, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997; 186: 1831-1841.
18. Cifone MG, Roncaioli P, De Maria R, Camarda G, Santoni A, Ruberti G, Testi R. Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J* 1995; 14: 5859-5868.
19. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med* 1995; 1: 1024-1028.
20. Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, Losordo DW. Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals. *J Moll Cell Cardiol* 1997; 29: 1321-1330.
21. Meredith JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 953-961.
22. Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Medicine* 1996; 2: 529-533.

Summary

The role of apoptotic endothelial cells in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. Mulder AB, Vermes I, Marx PTJ, Overbeek R and Haanen C. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 182-186.

Endothelial dysfunction appears to play an important role in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. In this study, we investigated the induction of apoptosis (programmed cell death) and the expression of vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells.

Endothelial cells, isolated from human umbilical veins, were exposed to different mediators, including high glucose and glycosylated BSA. We used the TUNEL technique for measurement of apoptosis. The expression of VEGF mRNA was determined with a semi-quantitative, competitive reverse transcription polymerase chain reaction.

We found that the proportion of apoptotic endothelial cells did not exceed 12%. In addition, a concentration-dependent induction of VEGF mRNA was observed.

In future experiments, we want to study the possible relation between the expression of VEGF and the occurrence of apoptosis in endothelial cells. Because we think that detached endothelial cells do have important effects on the pathogenesis of diabetic microangiopathy, we will also examine the dislodged cells.

Key-words: diabetic microangiopathy; endothelial cells; apoptosis; vascular endothelial growth factor (VEGF); cell adhesion molecules.