

Academiejaar 2013-2014

Isolatie van stamcellen uit vetweefsel voor cardiale tissue engineering toepassingen

Ilia VAN CAMPENHOUT
Joke VERLINDEN

Promotor: prof. dr. M. Cornelissen
Co-promotor: dr. P. Somers
Co-promotor: drs. A. Roosens

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding

MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE

Academiejaar 2013-2014

Isolatie van stamcellen uit vetweefsel voor cardiale tissue engineering toepassingen

Ilia VAN CAMPENHOUT
Joke VERLINDEN

Promotor: prof. dr. M. Cornelissen
Co-promotor: dr. P. Somers
Co-promotor: drs. A. Roosens

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding

MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE

“De auteur en de promotor geven de toelating dit afstudeerwerk voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit afstudeerwerk.”

Datum

(handtekening)

Naam (student)

(promotor)

VOORWOORD

Deze masterproef werd geschreven in kader van onze opleiding geneeskunde. Twee jaar lang werd ons de mogelijkheid geboden deel uit te maken van een experimenteel onderzoek. Voor ons beiden bevond het onderwerp van deze thesis, cardiale tissue engineering, zich op de hoogste plank. We waren dan ook uitermate tevreden dat we geselecteerd werden om mee te werken aan dit onderzoek. De voorbije twee jaar zijn een zoektocht geweest, zowel wat betreft het experimentele luik als het leren schrijven van een wetenschappelijke scriptie. Daarbij hebben we momenten van succes gekend maar ook tegenspoed. We hebben kennis opgedaan die we blijvend met ons mee zullen dragen en hopen dat onze masterproef nuttig kan zijn voor verder onderzoek in dit domein. Het verwezenlijken van deze thesis was voor ons beiden een interessante en leerrijke ervaring.

Hiervoor willen we een aantal mensen bedanken. Eerst en vooral prof. dr. M. Cornelissen, om ons de kans te geven deze uitdaging aan te gaan. Graag willen wij daarnaast dr. P. Somers en drs. A. Roosens bedanken voor hun gegeven tijd en werk om ons bij te staan in het tot stand brengen van wat onze masterproef uiteindelijk is geworden. Zonder hun kennis en hulp zou dit project niet hetzelfde geweest zijn. Verder ook de laboranten, die deel uitgemaakt hebben van ons laboratorium werk, voor hun bijdrage.

Bovendien willen we graag elkaar bedanken voor de laatste twee jaar. Het is niet eenvoudig om samen een project als dit te realiseren, zeker wanneer we elkaar voorafgaandelijk niet kenden. Dit is voor ons echter een meevaller gebleken. We hebben in de loop van dit onderzoek geleerd met elkaar samen te werken en met elkaar om te gaan, om deze masterproef tot een goed einde te brengen. Onze samenwerking heeft deze twee jaar nog boeiender gemaakt en dit zal ons zeker bij blijven.

INHOUDSTABEL

ABSTRACT	1
INLEIDING	3
1. Algemeen	3
2. De aortaklep	4
2.1 Anatomie	4
2.2 Histologie	4
2.3 Functioneel	5
3. Aortakleppathologie	5
3.1 Aortaklepstenose (AS)	5
3.2 Aortaklepinsufficiëntie	6
4. Aortic valve replacement (AVR)	7
4.1 Algemeen	7
4.2 Mechanische hartklepprothese	8
4.2.1 Caged-ball valve of Starr-Edwards klep	8
4.2.2 Monoleaflet of tilting-disk valve	8
4.2.3 Bileaflet valve	8
4.3 Homografts	9
4.4 Biologische prothesen	10
5. Tissue engineering	11
5.1 Algemeen	11
5.2 Cellen	12
5.3 Extracellulaire matrix (Scaffold)	13
5.4 Hartkleppen	13
6. Cellen	13
6.1 Endotheelcellen	13
6.2. Stamcellen	16
6.2.1 Algemeen	16
6.2.2 Soorten stamcellen	17
6.2.3 Potentie van stamcellen	17
6.3. Adipose-derived Stem Cells (ADSCs)	18
6.3.1 De ideale bron van stamcellen	18
6.3.2 Voordelen van ADSCs	18
6.3.3 Nomenclatuur	18
6.3.4 Oppervlaktemerkers	18
6.3.5 Trilineage differentiatie	20
6.3.6 Endotheliale differentiatie	20
7. Extracellulaire matrix	21
8. Platelet rich plasma (PRP)	22
8.1 Wat is PRP?	22
8.2 PRP toepassingen	22
9. Bioreactor	23
10. Doelstelling	24

MATERIALEN EN METHODEN	25
1. Isolatie en decellularisatie van xenogene matrices	25
2. Isolatie en cultivatie van vetweefsel stamcellen	25
3. Isolatie en cultivatie van natieve endotheelcellen	26
4. In vitro adipogene, osteogene en chondrogene differentiatie	26
5. Differentiatie van ADSCs tot ECs	27
6. Evaluatie phenotype ECs - vWF en CD31	27
7. Preparatie van PRP supernatans	27
8. Proliferatie assay	28
9. Invasie assay	28
10. Groeifactor-oplading van acellulaire scaffolds	29
11. In vitro repopulatiemodel	29
RESULTATEN	31
1. Decellularisatie van xenogene matrices	31
2. Isolatie van ADSCs	31
3. Isolatie van natieve endotheelcellen	32
4. Trilineage differentiatie van ADSCs	32
5. Endotheliale differentiatie van ADSCs	34
6. Proliferatie assay	35
6.1 Effect van PRP op ADSC proliferatie	36
6.2 Effect van PRP op EC proliferatie	37
7. Invasie assay	38
8. Statisch repopulatiemodel	39
DISCUSSIE	41
1. Decellularisatie	41
2. Isolatie van ADSCs	42
3. Isolatie van natieve endotheelcellen	42
4. Differentiatie van ADSCs	43
5. PRP	44
6. Repopulatiemodellen	45
7. Toekomstperspectieven	46
REFERENTIES	48

ABSTRACT

Doel: Hartklepprothesen die actueel gebruikt worden voor aortaklepherstel hebben specifieke nadelen. Na implantatie van mechanische kleppen is de patiënt levenslang aangewezen op anticoagulantia. Daarentegen is de duurzaamheid van een bioprothese beperkt door immunologische degradatie. Tissue engineering biedt mogelijks een oplossing voor deze problemen. Door acellulaire matrices te bezaaien met lichaamseigen cellen zou de immuunrespons van het lichaam sterk beperkt kunnen worden. Zo zou de ideale hartklep kunnen worden ontwikkeld die na implantatie levenslang meegaat en geen anticoagulatetherapie vereist.

In deze masterproef werden de mogelijkheden van adipose stamcellen in cardiale tissue engineering geëvalueerd. Vetweefsel is immers een vrij recente bron van stamcellen. Deze ‘adipose-tissue derived stem cells’ (ADSCs) bezitten tevens een aantal opmerkelijke voordelen ten opzichte van beenmergstamcellen. Het endotheliaal differentiatiepotentieel van de stamcellen werd nagegaan. Daarenboven werd in een apart luik geëvalueerd welke concentratie aan platelet rich plasma (PRP) optimale resultaten geeft met betrekking tot cel proliferatie en invasie. Dit om finaal gedecellulariseerde hartkleppen te bezaaien en te evalueren onder statische omstandigheden.

Materialen en methoden: Adipose stamcellen werden geïsoleerd uit porciën vetweefsel. Om hun multipotentie aan te tonen werden deze gedifferentieerd tot de adipogene, chondrogene en osteogene cellijnen. Vervolgens werden de stamcellen geïncubeerd in endotheliaal differentiatie-medium om differentiatie tot endotheel te verwezenlijken. Voor de isolatie van endotheelcellen (ECs) werden twee methoden gehanteerd. De eerste betrof isolatie uit de vena femoralis van een varken. Voor de tweede methode werd een porciene aorta gebruikt. Daarnaast werd PRP geïsoleerd uit porciën bloed om het effect van PRP concentratie op ADSC en EC proliferatie en ADSC invasie na te gaan. Dit werd geëvalueerd aan de hand van een MTS assay. Porciene aortakleppen werden gedecellulariseerd en vervolgens opgeladen met groeifactoren afkomstig van het PRP. Tot slot werden de matrices bezaaid met ADSCs en ECs aan de hand van twee protocols. Enerzijds werd gebruik gemaakt van cilinders die op de klepbladen werden geplaatst en gevuld met PRP en cellen. Anderzijds werden volgens het tweede protocol de klepbladen uitgespreid in 48-well platen en via druppeltitratie bezaaid.

Resultaten: De geïsoleerde ADSCs bereikten na zes dagen confluentie, hetgeen werd aangetoond door brightfield microscopie. De isolatie van natieve endotheelcellen was niet succesvol wanneer de vena femoralis werd gehanteerd. Bij het isoleren van ECs uit de porciene aorta werden na vijf dagen een aantal celspots opgemerkt, zonder overtuigende endotheelcel morfologie. De trilineage differentiatie van de ADSCs werd aangetoond door Oil Red O en LipidTOX™ green lipid kleuring voor de adipogene cellijn, Von Kossa kleuring voor de osteogene cellijn en Alcian Blauw kleuring voor de chondrogene cellijn. De differentiatie van ADSCs tot endotheelcellen werd aangetoond aan de hand van vWF en CD31 kleuringen. Een beperkt aantal cellen bleken na differentiatie vWF aan te maken, maar aankleuring van de oppervlaktemerker CD31 werd niet waargenomen bij de ADSCs. Uit de MTS proliferatie assays bleek een concentratie van 5×10^4 plts/mL optimaal, zowel voor ADSC als EC proliferatie. De invasie assay toonde echter aan dat veel hogere concentraties (2×10^6 plts/mL) vereist zijn om invasie van ADSCs maximaal te stimuleren. Statische bezaaiing van de scaffolds met ADSCs aan de hand van cilinders toonde opmerkelijke oppervlakkige celadhesie en invasie. Daarentegen werd voor bezaaiing met ECs enkel duidelijke celadhesie waargenomen door applicatie van de cellen aan de hand van druppeltitratie. Voor de ECs werd geen invasie in de scaffold opgemerkt.

Conclusie: Gedecellulariseerde hartkleppen kunnen na oplading met PRP gerepopuleerd worden door ADSCs onder statische omstandigheden. Hierbij is lokale applicatie onder de vorm van cilinders aan te bevelen. Naar de toekomst toe is evaluatie onder dynamische omstandigheden aangewezen. Endotheliale differentiatie van ADSCs blijkt moeilijk bij gebruik van de huidige protocols. Meer onderzoek is nodig naar de optimalisering hiervan. Eveneens het isoleren van ECs uit porciene bloedvaten verliep moeizaam. Mogelijks kunnen kleine aanpassingen in het protocol leiden tot meer succes.

INLEIDING

1. Algemeen

Het hart staat in voor de bloedvoorziening van het menselijk lichaam. Het is een musculaire pomp die zich bevindt in het middenste mediastinum. Het wordt omgeven door het hartzakje, het pericardium, dat de beweging van de hartspier bij contractie en relaxatie faciliteert. Omwille van de centrale ligging in het cavum thoracis geniet het hart van de bescherming van de omliggende organen en de thoraxwand.

De musculaire pomp wordt onderverdeeld in een linker en een rechter hart, beide met een atrium en een ventrikel. Elk atrium staat met het overeenkomstige ventrikel in verbinding via een atrioventriculaire klep: rechts de valva atrioventricularis dextra of tricuspidalisklep en links de valva atrioventricularis sinistra of mitralisklep. Elk ventrikel staat in verbinding met een grote arterie via een semilunaire klep: rechts de pulmonalisklep met de truncus pulmonalis en links de aortaklep met de aorta. De vier hartholten worden van elkaar gescheiden door septa, welke zowel musculair als fibreus kunnen zijn. Het zuurstofarme bloed van de systemische circulatie bereikt het rechter atrium via de vena cava superior en inferior. Tijdens de diastole contraheren de atria, waardoor het zuurstofarme bloed via de tricuspidalisklep naar het rechter ventrikel wordt gestuwd. Wanneer tijdens de systole de ventrikels samentrekken stroomt het bloed via de pulmonalisklep door de arteria pulmonalis en zo de pulmonale circulatie binnen. Na in deze laatste geoxygeneerd te zijn bereikt het bloed via de venae pulmonales het linker atrium. De mitralisklep zorgt ervoor dat na de diastole geen bloed kan terugvloeien vanuit het linker ventrikel naar het linker atrium. Tot slot bereikt het bloed de systemische circulatie via de aortaklep en stroomt het verder naar de weefsels.

Hoewel de arterioventriculaire kleppen enerzijds en de atrioventriculaire kleppen anderzijds veel gelijkenissen vertonen, verschillen zij zowel op macro- als microscopisch vlak. De vier kleppen zijn gelegen in het fibreuse skelet van het hart, ook wel de hartbasis genoemd. Het fibreuse skelet zit verankerd in het myocard op een manier gelijkaardig aan hoe pezen zich aan spieren vasthechten. (1)

De mitralisklep bestaat uit twee klepbladen of cuspis: cuspis anterior, welke in continuïteit is met de annulus fibrosus van de aortaklep en de cuspis posterior. Aan de basis zijn ze vastgehecht op de annulus fibrosus en apicaal lopen ze uit in tendineuze structuren, bestaande uit collageen en elastine vezels: chordae tendinae. Deze chordae verbinden de klepbladen met de muscoli papillare, myocardiale bundels die uitstulpen in het ventriculair lumen. Deze combinatie van structuren, die we tevens ook terugvinden bij de tricuspidalisklep, zorgt ervoor dat tijdens de systole de mitralisklep de hevige druk in het linker ventrikel weerstaat en dat de klepbladen niet doorslaan. (1, 2)

De tricuspidalisklep bestaat uit drie cuspis: cuspis anterior, cuspis posterior en cuspis septalis. In vergelijking met de mitralis klepbladen valt op dat de tricuspidalis klepbladen dunner, translucenter en moeilijker van elkaar te onderscheiden zijn. De klepbladen van zowel mitralisklep als tricuspidalisklep bestaan uit drie lagen: de lamina atrialis, de lamina spongiosa en aan de ventriculaire zijde de lamina fibrosa. Aan de buitenzijde is deze fibreuze matrix bedekt met een enkele laag endocardiale cellen, i.e. endotheelcellen. (1, 3)

De pulmonalisklep is een semilunaire klep en heeft drie zwaluwnestvormige klepbladen. Ze vormt de overgang tussen het rechter ventrikel en de pulmonale circulatie. De drie sinussen worden, overeenkomstig

met de kleppen, de linker, de rechter en de posterieure sinussen genoemd. De structuur van de klepbladen is analoog met die van de aorta (zie verder). De annulus van de pulmonalisklep verschilt met die van de aortaklep omdat ze in contact staat met het myocard van de rechter ventriculaire outflow tract en niet met een klepblad van een atrioventriculaire klep of het membraneus deel van het interventriculair septum. (1, 4)

2. De aortaklep

2.1 Anatomie

De aortaklep is een tricuspide semilunaire klep die de anatomische overgang tussen het hart en de systemische circulatie vormt. Bestaande uit een kroonvormige annulus, de drie commissuren, de klepbladen met de drie sinussen van Valsalva en de sinotubulaire junctie speelt de aortaklep een cruciale rol in de ventriculaire functie, flowrichting en coronaire perfusie. De annulus vormt het fibreuze skelet waaraan de klepbladen zijn opgehangen. Het zorgt voor een zekere rigiditeit in een omgeving die blootgesteld wordt aan zeer hoge drukken. Het apicale deel van de kroonvormige annulus, waar twee naburige klepbladen samen komen om zich vast te hechten aan de aortawand ter hoogte van de sinotubulaire junctie, noemt men de commissuren. De drie klepbladen, elk ongeveer 25mm hoog en 14mm breed, worden historisch benoemd volgens hun positie in het hart. Ook hier wordt gesproken van een linker, een rechter en een posterior klepblad. De ruimte tussen de klepbladen en de aortawand wordt de sinus van Valsalva genoemd. Aangezien de linker en rechter coronaire arterie vertrekken vanuit de linker en de rechter sinus respectievelijk, spreekt men van het linker coronaire, het rechter coronaire en het niet coronaire klepblad. Aan het midden van hun vrije randen hebben de klepbladen een kleine verdikking, de noduli van Arantius, die instaan voor het optimaal sluiten van de klep tijdens de diastole. De lannulae zijn de vrije randen van de klepbladen die tijdens het sluiten van de klep in contact staan met elkaar en proximaal uit de commissuren voortkomen. Vlak onder de commissuren bevinden zich drie driehoekige zones die deel uit maken van het fibreuze skelet. De zone tussen de linker coronaire en de rechter coronaire sinus ligt naar de pulmonalisklep toe. De driehoek tussen de rechter en de niet coronaire sinus is georiënteerd naar het rechter atrium en staat in contact met het membraneus interventriculair septum, waar de bundel van His vlak onder loopt. Tot slot is het gebied tussen de linker en de niet coronaire sinus continu met de cuspis anterior van de mitralisklep. Er bestaan grote inter- en intra-individuele verschillen wat de grootte van de klepbladen en oorsprongslocalisaties van de coronaire arteriën betreft. (1, 5)

2.2 Histologie

De annulus en zijn verwante structuren bestaat uit een dens collageen netwerk met een weinig elastinevezels, kleine bloedvaatjes en neurogene structuren. De sinussen van Valsalva hebben een structuur te vergelijken met die van de aorta. De binnenste laag heet de tunica intima, bestaande uit endotheelcellen georiënteerd in de richting van de aorta. De tunica media bestaat uit circulair gerangschikte gladde spiercellen, elastinevezels, collageen type II en III en proteoglycanen. De tunica media wordt gescheiden van de tunica intima door de membrana elastica interna en van de tunica adventitia door de membrana elastica externa. De vezels van deze laatste zijn opnieuw longitudinaal gerangschikt en bestaan uit collageen type I. De sinotubulaire junctie wordt gekenmerkt door dezelfde hiërarchische structuur als de sinussen van Valsalva, maar de diameter van de wand is groter. De semilunaire kleppen bestaan uit 5 lagen: lamina ventricularis, lamina radialis, lamina spongiosa, lamina fibrosa en lamina arterialis. De laminae verschillen in

samenstelling en oriëntatie van de vezels. De lamina ventricularis komt voort uit de endocardiale bekleding van het ventrikel. Onder het oppervlakkig gelegen endotheel, bestaat er een dens reticulair netwerk van collageen en elastine vezels. In de lamina radialis liggen deze vezels voornamelijk radiaal georiënteerd. Hoewel men in de lamina spongiosa een losmazig reticulair netwerk van proteoglycanen vindt, karakteriseert de lamina fibrosa zich door de circulaire ligging van dens opeengepakte collageenvezels. Tot slot vinden we aan de arteriale zijde een dun netwerk van collageen en elastine vezels dat bedekt is met een laag endotheelcellen, de lamina arterialis, continu met de lamina intima van de sinussen. (1)

2.3 Functioneel

Tijdens de systole zorgt de hoge druk in het linker ventrikel ervoor dat de aortaklep open slaat en het bloed de systemische circulatie binnenstroomt. Op het einde van de systole zorgt een daling van de drukgradiënt ervoor dat bloed de sinussen van Valsalva vult. Hierdoor sluiten de klepbladen nauw aan en is er geen retrograde bloedstroom naar het ventrikel mogelijk. Aangezien de coronaire arteriën boven de aortaklep ontspringen, worden deze tijdens de diastole niet afgesloten. Integendeel, het ventriculaire myocard relaxeert tijdens de diastole, wat optimale perfusie van de coronairen toelaat.

3. Aortakleppathologie

3.1 Aortaklepstenose (AS)

Een stenose van de aortaklep wordt in de meeste gevallen veroorzaakt door calcificatie van de klepbladen, een proces dat gelijkaardig is aan dat van atherosclerose. Endotheliale disfunctie leidt tot het neerslaan van lipoproteïnen (LDL) en andere factoren die een inflammatoir proces initiëren. Infiltratie en activatie van macrofagen en T-lymfocyten zorgt voor de differentiatie van myofibroblasten tot osteoblastachtige cellen die calcificatie van de matrix veroorzaken. (6) Deze calcificatie leidt tot verminderde oppervlakte van de klep en gereduceerde mobiliteit van de klepbladen. Hierdoor ontstaat een grotere weerstand over de klep waartegen het linker ventrikel een hogere druk moet leveren tijdens de systole. Compensatoir ontwikkelt zich stilaan een concentrische ventriculaire hypertrofie. Dit kan op termijn aanleiding geven tot relatieve ischemie met angorklachten, ritmestoornissen en linkerhartfalen ten gevolge van een gedecompenseerde gedilateerde cardiomyopathie. De algemene cardiovasculaire risicofactoren zoals hypertensie, hyperlipidemie, diabetes mellitus type 2, roken, hoog BMI, etc. predisponeren voor het ontwikkelen van aortakleplijden. (7)

Een tweede oorzaak van AS is reumatische degeneratie, waarbij de commissuren fusioneren en eveneens verkalking plaatsvindt. Reumatisch lijden is echter meer frequent de oorzaak van mitralisklepstenose dan van AS. Congenitale afwijkingen vormen een derde oorzaak van AS en worden in tegenstelling tot de calcifiërende vormen voornamelijk vastgesteld op jonge leeftijd. (7) In de Westerse wereld bedraagt de prevalentie van aortaklepstenose bij 75+ers 12.4% (95% BI: 6.6% tot 18.2%), in België is dit voor 80+ers 22,84% (95% BI: 19,41% tot 26,56%). Het is daarmee de meest frequente hartklepaandoening bij ouderen in de Westerse wereld. Door de toenemende vergrijzing zal het aantal patiënten met AS de komende jaren wellicht sterk toenemen. (8, 9)

Voor de onderverdeling in graden van ernst bestaan er voor de AS verschillende parameters. Klepoppervlakte (valve area - VA), gemiddelde drukgradiënt (mean gradiënt - MG) en Jet velocity (JV) zijn de meest courante. De verschillende gradaties in functie van deze parameters zijn weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1: Aortaklepstenose gradaties i.f.v. parameters

Graad	VA (cm²)	MG (mmHg)	JV (m/s)
Milde AS	≥ 1.5	≤ 25	≤ 3.0
Matige AS	1.0 tot 1.5	25 tot 40	3.0 tot 4.0
Ernstige AS	<1	> 40	> 4.0

Wat de symptomatologie betreft zijn er veel interindividuele verschillen. Sommige patiënten met een ernstige AS zijn volkomen klachtenvrij. Anderen ontwikkelen daarentegen reeds symptomen bij een milde of matige AS. Er dient dus te worden opgemerkt dat bovenstaande criteria de nood tot klepherstel of klepvervanging (aortic valve replacement - AVR) niet kunnen determineren zonder rekening te houden met aan- of afwezigheid van symptomen. (7, 10)

3.2 Aortaklepinsufficiëntie

De meest voorkomende oorzaken van aortaklepinsufficiëntie of -regurgitatie (AR) zijn reumatische degeneratie en infectieuze endocarditis van een eerder beschadigde klep. Het onvolledig sluiten van aortaklep tijdens de diastole zorgt voor een retrograde bloedstroom naar het linker ventrikel. Wanneer dit acuut gebeurt kan het linker ventrikel onvoldoende compenseren en kan de patiënt het slachtoffer worden van longoedeem en cardiogene shock. In de chronische situatie zal eenzelfde cardiale output moeten worden behouden door twee compensatiemechanismen. Enerzijds is er een volumeoverbelasting waardoor het linker ventrikel gaat dilateren. Anderzijds zal aan de verhoogde drukken - het gevolg van de verhoogde afterload - tegemoet moeten worden gekomen door hypertrofie van het myocard. Dergelijke dilatatie in combinatie met hypertrofie kan op termijn onvoldoende zijn als compensatiemechanisme. De verhoogde zuurstofnood van het hypertroof myocard kan samen met de lagere diastolische druk en de daaruitvolgende verminderde coronaire perfusie leiden tot ischemie van het linker ventrikel. (7)

Hoewel minder frequent dan AS komt AR voor bij 13% van de mannen en 8,5% van de vrouwen. De ernst kan sterk variëren, gaande van louter minimale afwijkingen op beeldvorming (kleuren Doppler echocardiografie) tot ernstige symptomatische vormen. (11)

Voor de ernstbepaling van AR zijn reeds veel parameters voorhanden. Een veelgebruikte is de regurgitant fractie (RF). Dit is de verhouding van het lekvolume over het slagvolume van het linker ventrikel en wordt berekend met behulp van Doppler echografie. Andere parameters zijn bijvoorbeeld het lekvolume (regurgitant volume - RV) en het lekoppervlak (effective regurgitant orifice area - EROA) (7, 10) De gradaties van AR in functie van deze parameters zijn weergegeven in Tabel 2.

Bij AR komen symptomen vaak pas laattijdig op. Op dit moment is er vaak reeds myocardiële schade aanwezig. Men zal symptomatische patiënten dus steeds trachten te behandelen, hoewel er meestal reeds eerder interventies plaatsvinden. Een aantal hemodynamische parameters zullen worden opgevolgd bij patiënten met een gekende AR. De ejectiefractie (EF) is de verhouding van het slagvolume over het

einddiastolisch volume. Wanneer bij personen in rust de EF van het linker ventrikel minder dan 50% bedraagt zal men overgaan tot chirurgie. AVR is de standaard, behalve in de pediatrische setting waar valvuloplastie de voorkeur geniet. Ook bij patiënten met een EF van meer dan 50% zal men overgaan tot chirurgie wanneer de eindsystolische diameter van het linker ventrikel meer dan 50 mm bedraagt of bij een einddiastolische diameter van minstens 70 mm. (7, 10)

Tabel 2: Aortaklepregurgitatie gradaties i.f.v. parameters

	Graad	RF (%)	RV (ml)	EROA (cm²)
Milde AR	<i>I</i>	< 30	< 30	< 0,20
Matige AR	<i>II</i>	30 - 39	30 - 44	0,20 - 0,29
	<i>III</i>	40 - 49	45 - 49	0,30 - 0,39
Ernstige AR	<i>IV</i>	≥ 50	≥ 50	≥ 0,40

4. Aortic valve replacement (AVR)

4.1 Algemeen

Pathologie van de aortaklep wordt behandeld met een chirurgische vervanging van de klep. De selectie van patiënten die in aanmerking komen voor een ingreep is moeilijk, omdat bijvoorbeeld een aortaklepstenose en de daarmee gepaard gaande graad van vernauwing, niet altijd evenredig is met de beperkingen die de patiënt ervan ondervindt. (12)

Patiënten worden ingedeeld in types, waarvoor aanbevelingen bestaan. Zodra een stenose van de aortaklep symptomatisch wordt, komt de patiënt in aanmerking voor een vervanging. Dit wordt een type I aanbeveling genoemd. Er is echter een groot aandeel patiënten met een aortaklepstenose die geen klachten melden of geen symptomen vertonen. Deze patiënten komen enkel in aanmerking voor een ingreep bij een type IIb aortaklepstenose. Dit zijn patiënten met een snel evolutieve stenose, een klepoppervlakte van minder dan 0,6 vierkante centimeter of wanneer de stenose een functionele weerslag heeft bij inspanning.

Men kan overwegen om bij patiënten die reeds een operatie ondergaan voor bijvoorbeeld een coronaire bypass, ook simultaan de klep te vervangen. (12)

Het vervangen van een aortaklep zorgt voor een grotere overleving van asymptomatische en symptomatische patiënten. Zij hebben een groot risico op het ontwikkelen van symptomen, irreversibele schade aan het linker ventrikel en plotse cardiale dood. Studies toonden aan dat deze complicaties vermeden worden wanneer de aortaklep vervangen wordt. Er wordt een lagere mortaliteit genoteerd, zowel algemeen als cardiaal. (13)

In de loop der tijd zijn inzichten omtrent hartklepvervanging geëvolueerd, zowel wat de ingreep betreft als het materiaal dat gebruikt wordt ter vervanging van de zieke hartklep. Er worden ongeveer 290 000 hartkleppen vervangen per jaar wereldwijd. (14) In 1960 werden de eerste kleppen vervaardigd uit synthetisch materiaal, de zogenaamde mechanische hartkleppen. Twee jaar later werden de homografts ontwikkeld en in 1965 uiteindelijk de biologische prothesen. (15)

Elke prothese heeft voor- en nadelen. De keuze voor een bepaalde prothese hangt daarbij af van verschillende factoren. Deze factoren zijn onder andere de leeftijd van de patiënt, de levensverwachting, aanwezige co-morbiditeiten en contra-indicatie voor anticoagulantia. (16) Er is echter niet zoiets als een ideale hartklepprothese. De prothese moet in een zo groot mogelijke mate de natieve hartklep benaderen wat betreft hemodynamiek, implantatie in het omringende weefsel en levensduur. (12)

4.2 Mechanische hartklepprothese

Sinds 1960 zijn mechanische hartkleppen beschikbaar. De kleppen bestaan uit meerdere delen; een klepring, een hechtingsring, een strut en een occluder. (15) Zoals de naam het eerder al doet vermoeden, bestaan deze kleppen uit stevige, niet-natuurlijke materialen. De hechtingsringen zijn vervaardigd uit Dacron, PTFE (= Teflon) of polyester. (17) Zij omgeven de klepring, vervaardigd uit zeer sterk materiaal zoals pyrolytisch carbon. De strut is het ophangmechanisme en de occluder is de structuur die de klepring cyclisch gaat afsluiten, beiden ook gemaakt van carbon of titanium gecoat met carbon. (14, 16)

Er bestaan ondertussen drie soorten mechanische kleppen: de monoleaflet, de bileaflet en de caged ball klep.

4.2.1 Caged-ball valve of Starr-Edwards klep

Dit is het allereerste model dat ontwikkeld werd. Deze klep bestaat uit een ring met daarop een kooi gevormd door drie spijlen, vervaardigd uit metaal. In deze kooi bevindt zich een siliconen balletje. Wanneer het hart contraheert tijdens de systole, wordt de druk in het linker ventrikel zeer groot en overstijgt ze de druk in de aorta. Dit veroorzaakt een verplaatsing van de bal van de ring van de klep naar de nok van de kooi, waardoor bloed vrij kan stromen van het linker ventrikel naar de aorta. Op het einde van de systole zakt de druk in het linker ventrikel terug beneden het peil van de aortadruk en verplaatst het balletje zich terug naar de ring en wordt de bloedflow onderbroken. Dit type van hartklep wordt thans echter niet meer geïmplantéerd. (14, 18)

4.2.2 Monoleaflet of tilting-disk valve

Dit was het tweede type mechanische klep die in 1969 voor het eerst werd geïmplantéerd. Deze klep bestaat uit een enkele schijf die al naargelang de drukverschillen tussen linker ventrikel en aorta de bloedflow kan verzekeren. De ring waarin de schijf zich bevindt bestaat opnieuw uit metaal met mogelijkheid om deze met suturen vast te naaien in het omliggende weefsel. De ring zelf is vervaardigd uit een heel stevig materiaal, carbon, dat de lange levensduur van de klep garandeert. (14, 15)

4.2.3 Bileaflet valve

Dit laatste type van mechanische klep bestaat uit twee schijven, halvmekaanisch, die een zeer natuurgetrouwe flow van het bloed nabootsen. Het grote voordeel van deze klep is dat er een grotere klepoppervlakte ontstaat wat een belangrijke impact heeft op de dosis van bloedverdunner die de patiënt iedere dag moet innemen. Zij zijn echter het meest vatbaar voor lekkage van bloed van de aorta naar het linker ventrikel. (14)



Figuur 1: De drie soorten mechanische kleppen; van links naar rechts: de caged-ball valve, de monoleaflet en de bileaflet. (resp. emedecine.medscape.com, scientificamerican.com, heartcarecentre.org)

Mechanische hartkleppen hebben als voordeel ten opzichte van de andere types dat zij een zeer grote duurzaamheid hebben. Deze hartkleppen zijn vervaardigd uit sterk materiaal, zorgen voor een goede hemodynamiek en zijn in staat de patiënt te overleven dankzij hun lange levensduur. Het grote nadeel bij deze kleppen is de noodzaak tot levenslange anticoagulatie. Men brengt hier immers vreemd materiaal in het lichaam, met een groot risico op thrombo-embolische processen. Door het gebruik van anticoagulantia is het risico op bloedingen anderzijds ook sterk toegenomen. (17)

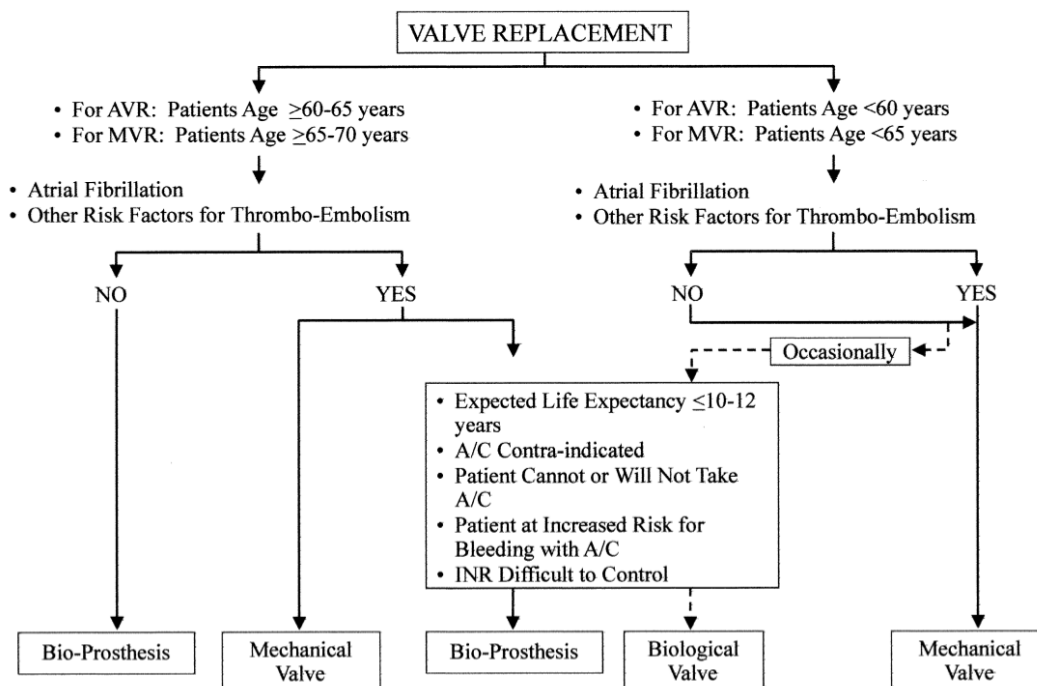
Mechanische kleppen zijn daarenboven niet volledig geluidloos, waarbij de patiënt telkens een klik hoort bij het sluiten en openen van de kleppen. Sommige patiënten zien dit eerder als een geruststelling, daar dit betekent dat de hartklep naar behoefte functioneert. Men kiest voor een mechanische hartklep wanneer dit de wens is van de patiënt, als de patiënt jonger is dan 65 jaar en een goede levensverwachting heeft of als hij of zij reeds onder anti-coagulatie therapie staat. (16)

4.3 Homografts

Homografts zijn kleppen van humane oorsprong. Ze kunnen geïmplant worden uit donorharten of uit een menselijk kadaver. (14)

Een bijzondere procedure in het implanteren van homografts is de Ross Procedure. Ross was diegene die voor het eerst donorkleppen (=allografts) implanteerde bij patiënten die nood hadden aan een nieuwe hartklep. Dit bleek echter niet de optimale keuze te zijn, waarna Ross een vooruitstrevende techniek toepaste, waarin hij de zieke aortaklep van de patiënt verving met de natieve pulmonale klep (=autograft). De pulmonale klep werd vervangen door een allograft. (19)

Het grote voordeel aan homografts is dat in tegenstelling tot de mechanische hartkleppen er geen anticoagulantia vereist zijn. Daar ze bestaan uit humaan weefsel hebben ze een zeer goede hemodynamiek. Een aantal factoren spelen in het nadeel van de homografts, zoals de beperkte beschikbaarheid van donorhartkleppen, hun beperkte duurzaamheid en de verschillen in kwaliteit van donorhartkleppen. De kwaliteit hangt immers af van de leeftijd van de donor. Na een termijn van ongeveer vijftien jaar, ziet men een zeer snelle degeneratie van deze kleppen. (14, 20)



Figuur 2: Schema voor de selectieprocedure van een hartklep volgens Rahimtoola et al.

4.4 Biologische prothesen

In tegenstelling tot de homografts, zijn biologische prothesen van porciene of bovine oorsprong. Dit dierlijke materiaal wordt gepreleveerd waarna het in een synthetisch frame wordt gemonteerd, vervaardigd uit metaal of plastic. In 1965 werd voor het eerst een varkenshartklep ontwikkeld. Porciene hartkleppen bestaan uit drie porciene aortaklepbladen die gemonteerd worden in een synthetische stent. (14) Een voorbeeld van zo'n hartklep is de O'Brien hartklep. Er was echter een aanzienlijke mortaliteit bij kinderen die deze klep hadden ontvangen, omwille van een ernstige immuunreactie met vorming van fibrose. (21) Een andere manier bestaat erin volledige varkenshartkleppen te transplanteren. Het bekendste type hartklep op deze manier vervaardigd is de Carpentier-Edwards klep. Later werd een ander model ontwikkeld, de Hancock, met een nog betere hemodynamiek en duurzaamheid. (18)

Hartkleppen van bovine oorsprong werden pas later ontwikkeld, met de eerste transplantatie in 1971. Deze kleppen worden gemaakt uit runderpericard, waar men uit een blad pericard de klepbladen gaat genereren en monteren aan de binnen- of buitenzijde van een ondersteunende stent. (14) Een groot voordeel van deze kleppen is dat men de blaadjes op maat kan maken. Pericard is echter zeer onderhevig aan verkalking, wat een vroegtijdige stenose van de aortaklep kan betekenen. (22) De Sorin of de Edwards klep zijn gekende voorbeelden van bovine hartkleppen. (18)

Omdat het biologisch materiaal zeer sterk antigeen is en onderhevig aan enzymatische afbraak, wordt het allereerst behandeld met een cross-linker om degradatie tegen te gaan. De eerste kleppen werden gefixeerd met formaldehyde, maar dit leverde op lange termijn geen goede resultaten op. Het werd vervangen door glutaraaldehyde. Deze evolutie zorgde voor minder antigeniciteit en een langere overleving van de klep. (23)

De keuze voor een hartklep voor een welbepaalde patiënt is niet eenvoudig. De drie soorten hartkleppen hebben elk hun voor- en nadelen. Essentieel wordt de keuze voornamelijk herleid tot een keuze tussen een mechanische klep en een bioprothese. Daar homografts weinig beschikbaar zijn, moeilijk te implanteren en de kwaliteit bovendien sterk onderling verschilt, zal men eerder opteren voor een van de voorgenoemde. (20)

Als men het schema bekijkt voor de selectieprocedure van een hartklep, ziet men dat patiënt gerelateerde factoren een zeer belangrijke rol spelen in de keuze. De leeftijd van de patiënt wordt in rekening genomen; een patiënt jonger dan 65 jaar met een goede levensverwachting zal eerder een mechanische klep krijgen, omwille van zijn duurzame kenmerken. Oudere patiënten krijgen een bioprothese, omdat deze een beperkte levensduur hebben van om en bij de vijftien jaar. Bij jonge vrouwen die in de toekomst waarschijnlijk nog een zwangerschap zullen doormaken, is men eerder geneigd een bioprothese te geven, omdat anticoagulatie therapie op die manier vermeden wordt. (16)

Anticoagulantia vormen een centraal punt in de discussie over welke klep de beste is. Deze therapie is nodig bij elke soort mechanische klep en dit levenslang. Zij hebben immers een groter thrombo-embolisch risico. Bij patiënten die reeds onder anticoagulatie therapie staan kan men overwegen, ook bij oudere personen, een mechanische klep te plaatsen. Wanneer anticoagulantia gecontra-indiceerd zijn, is de keuze voor bioprothesen evident.

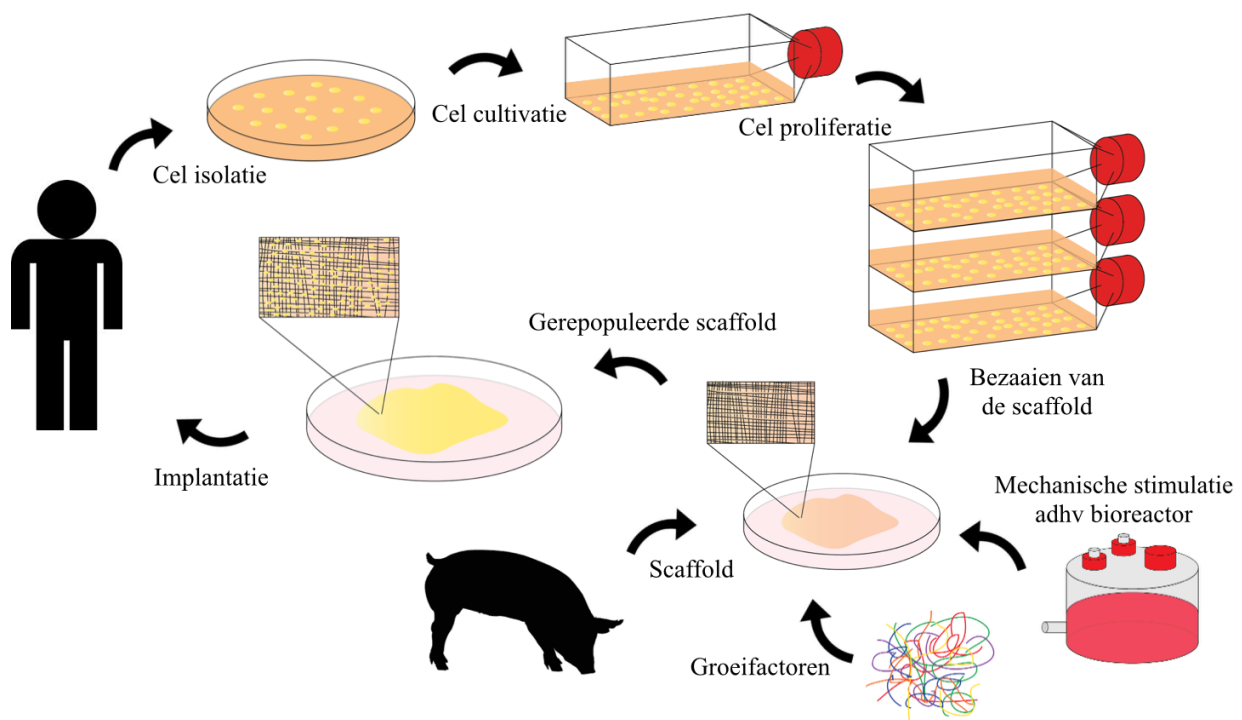
Wanneer er uiteindelijk gekozen is voor een bepaald type klep, is het van het uiterste belang dat de klep zo goed mogelijk wordt afgestemd op de patiënt. Dit wordt de “patient-prosthesis mismatch” genoemd, die uiteraard zo klein mogelijk moet blijven. (12) Preventie van een mismatch bekomt men door met factoren rekening te houden zoals lichaamsgestalte, leeftijd en levensstijl, comorbiditeit en belangrijkste van allemaal; de kleppoppervlakte. De beste parameter voor de kleppoppervlakte is de Effective Orifice Area gedeeld door lichaamsoppervlakte van de patiënt. (17) Deze uitkomst is een maat voor de “patient-prosthesis mismatch”. (12)

5. Tissue engineering

5.1 Algemeen

Hartziekten vormen een aanzienlijke percentuele bijdrage tot de wereldwijde mortaliteit. *Lyer et al* toonde aan dat in 2011, 34% van de totale mortaliteit in de Verenigde Staten te wijten was aan cardiovasculaire ziektes. (24) In België loopt dit volgens de *Belgische Cardiologische Liga* op tot 45% van de sterfte. Cijfers van het *Vlaams Agentschap voor Zorg en Gezondheid* delen dit verder op in 28% bij mannen en 33% bij vrouwen. Omwille hiervan is de voorbije jaren de belangstelling voor nieuwe therapeutische interventies in dit domein toegenomen. Een nieuwe benaderingswijze is tissue engineering. In deze techniek wordt gebruik gemaakt van levende cellen, een extracellulaire matrix of scaffold en bioreactoren die de omstandigheden *in vivo* nabootsen. (25) Deze componenten worden in hun omgeving gealterneerd, of genetisch gemanipuleerd, om op die manier te dienen als een substitutie voor biologisch natief materiaal. Dit materiaal kan vervolgens geïmplanterd worden bij de mens. (26) Er zijn drie manieren om beschadigd weefsel te behandelen. Ten eerste kan men *in situ* zorgen voor de regeneratie van het weefsel. Een andere manier is om *in vitro* met behulp van levende cellen en matrices weefsel te genereren en dit te implanteren. Ten laatste kan men

gecultiveerde of geïsoleerde cellen implanteren. (25) Zodoende zou men problemen van beperkte cardiale regeneratie na een myocardiaal infarct of het tekort aan donororganen kunnen verhelpen. Het algemene doel van biologisch materiaal vervaardigd met tissue engineering is het vervangen, herstellen of verbeteren van de functie van een bepaald orgaan of weefsel aangetast door ziekte. (24) Een belangrijke voorwaarde voor toepassen van tissue engineering is het begrijpen van de normale anatomie en fysiologie van de weefsels die men wil substitueren. Er is daarbij, naast levende cellen, noodzaak aan een extracellulaire matrix (ECM) ter ondersteuning van de structurele functie van het weefsel of een scaffold die dient als oppervlak om een driedimensionale opbouw van een cellulaire structuur mogelijk te maken. (26) Het weefsel moet morfologisch en functioneel gelijkaardige aspecten hebben met het natieve weefsel en natuurlijk levensvatbaar blijven na implantatie. (24)



Figuur 3: Een schematische voorstelling van het tissue engineering proces. In dit schema vertrekt men van humane cellen en een biologische scaffold.

5.2 Cellen

De levende cellen zijn het uitgangspunt van de tissue engineering. Deze cellen moeten eenvoudig te verkrijgen zijn en in een voldoende mate aanwezig zijn zodat ze kunnen gekweekt worden ter vorming van de nieuwe weefsels. Een goed voorbeeld hiervan zijn hepatocyten, die relatief ongecompliceerd verkregen kunnen worden, in tegenstelling tot beenmergcellen, die een ingrijpende en pijnlijke procedure vereisen. De capaciteit van cellen om te groeien in cultuur hangt af van het differentiatiestadium waarin ze gepreleveerd worden. De cellen moeten daarenboven zo weinig mogelijk immuunreactie veroorzaken. Hier hebben humane cellen een voordeel ten opzichte van dierlijke cellen omwille van hun grotere histocompatibiliteit. Deze immuunreactie wordt tot een minimum beperkt wanneer men autologe cellen van de patiënt kan afnemen en deze *ex vivo* kan kweken. Tissue engineering van huid grafts vindt hierin zijn toepassing. (26) Bronnen van cellen voor tissue engineering zijn autologe cellen van de patiënt, allogene cellen van een

humane donor of xenogene cellen van een andere species. (25) Ten laatste kan men ook gebruik maken van genetisch gemanipuleerde cellen. Een uitdaging daarbij is het controleren van de groei van deze getransformeerde cellen *in vivo* en het voorkomen van de vorming van maligniteiten. (26) Cellen met een belangrijke toepassing in tissue engineering zijn de stamcellen. De meest frequent gebruikte stamcellen zijn diegene geïsoleerd uit beenmerg. Meer en meer groeit de interesse voor het gebruik van stamcellen geïsoleerd uit vet, omwille van hun abundantie en de eenvoudige prelevatie. (27)

5.3 Extracellulaire matrix (Scaffold)

Een tweede belangrijke component in tissue engineering is het extracellulaire materiaal. In het menselijk lichaam worden cellen omgeven door extracellulaire matrix, wat zorgt voor doorgeven van signalen en behoud van de functie en structuur van cellen; een essentieel gegeven dat moet terugkomen bij weefsels die vervaardigd worden via tissue engineering. Deze extracellulaire matrix staat in contact met zowel het lichaamseigen weefsel als met het artificieel vervaardigde biomateriaal. Als de matrix enkel deze steunfunctie vervult wordt deze inert genoemd. Scaffolds kunnen bestaan uit synthetisch materiaal (dit zijn polymeren zoals polyglycolide, polylactide, polylactide coglycolide) of natuurlijke materialen (collageen of fibrine). Matrices mogen niet thrombogene zijn, moeten zorgen voor immunoprotectie en kunnen dienen als constructie ter sturing en controle van de celproliferatie en migratie. (26)

5.4 Hartkleppen

Men zoekt naar nieuwe methodes om de biologische en de mechanische klepprothesen te vervangen door weefsel dat meer overeenkomstig is met de *in vivo* situatie. De voorgenoemde kleppen zijn uitstekend wat betreft hemodynamiek maar hebben toch beperkingen. Levenslange anticoagulantia bij de mechanische kleppen en de snelle weefseldegeneratie en calcificatie bij de bioprothesen zijn problemen die de nood aan nieuwe oplossingen verantwoorden. (28) Bovendien zijn deze kleppen niet in staat mee te groeien met het weefsel van de patiënt, wat belangrijk is in een pediatrische populatie. Met tissue engineering kan men hartkleppen vervaardigen die net zoals de natieve klep op een adequate manier reageren op fysiologische krachten. De laatste jaren zijn er twee manieren bestudeerd: regeneratie en repopulatie. (29) In geval van *in vivo* repopulatie gebruikt men porciene hartkleppen die op voorhand werden gedecellulariseerd en op deze manier geïmplanterd werden in de patiënt. Zij vormen also de biologische acellulaire matrix als levende constructie. Alvorens de kleppen geïmplanterd worden, moeten de porciene kleppen eerst gecrosslinked worden met glutaraldehyde. Stamcellen van de patiënt worden in staat geacht deze hartkleppen te repopuleren. Regeneratie steunt enkel op het *in vivo* remodelleren van een matrix, die uiteindelijk zal bestaan uit proteïnen en cellen van de patiënt. Deze twee methodes hebben echter nog niet tot noemenswaardige resultaten geleid. (29) Een andere manier voor tissue engineering is de *in vitro* repopulatie van de acellulaire porciene kleppen met levende cellen, die op deze wijze een levensvatbare constructie vormen klaar voor implantatie in de patiënt. (28)

6. Cellen

6.1 Endotheelcellen

Endotheliale cellen hebben een belangrijke functie in het menselijke lichaam. Zij verzorgen het aflijnen van alle bloedvaten, gaande van de grootste arteriën tot het capillaire bed. Elk bloedvat bestaat uit meerdere

lagen van bindweefsel, gladde spiercellen en endotheel. De dikte van deze lagen varieert al naargelang het type bloedvat. De grote arteriën en venen hebben een dikke wand van bindweefsel en een volumineuze spierlaag, gescheiden door een basale lamina van het endotheel aan de binnenzijde van het bloedvat. Ter hoogte van het capillaire bed bestaat de bloedvatwand voornamelijk uit endotheel en de basale lamina. De structuur van een bloedvat verschilt afhankelijk van zijn ligging, zijn grootte en functie. Dit vertaalt zich in een andere verhouding van componenten, maar de endotheliale laag is altijd aanwezig. (30)

Endotheel wordt zowel gezien in de micro- als de macrovasculatuur van het menselijk lichaam. Het microvasculaire endotheel kent twee onderverdelingen; continu of discontinu. Onder discontinu valt ook het gefenestreerde endotheel maar dit verschilt enkel in poriediameter van het discontinue endotheel. Er worden geclusterde holtes gevormd tussen individuele endotheelcellen met een diameter omtrent 80 tot 200 nm. Dit soort endotheel wordt bijvoorbeeld gezien ter hoogte van de renale glomeruli en de endocriene klieren. Continu endotheel heeft een ononderbroken cytoplasma en wordt gezien in het centrale zenuwstelsel, lymfeknopen en spierweefsel. (31)

Macrovasculair endotheel speelt een rol in het behoud van de bloeddruk door middel van vasoconstrictie en vasodilatatie. Het draagt echter niet bij tot de uitwisseling van bloedcomponenten of herstel van beschadigd weefsel door angiogenese. (32) Een speciaal type van macrovasculair endotheel is het endocardium. Endocardiaal endotheel wordt geacht een sensorische functie te hebben ter hoogte van het hart. Het komt in contact met het totale volume aan circulerend bloed. De volledige caviteit van de hartkamers wordt bedekt met endocardiaal endotheel, gaande van de trabekels tot de microvilli, met als gevolg een vergroting van het beschikbare contactoppervlak met meer dan honderd maal. (33) Wanneer endocardium aangekleurd wordt met PECAM-1, ontstaat er een densificatie van kleuring ter hoogte van de grenszone die correspondeert met een zone van overlap van meerdere endotheelcellen. Dit in tegenstelling tot microvasculair endotheel waarbij de kleuring meer verspreid is over het volledige celoppervlak. Dit suggereert een verschil in permeabiliteit tussen beide endotheeltypen. (33) Bovendien bevinden zich ter hoogte van het endocardium meer gap junctions, wat wijst op de mogelijkheid van sterke en snelle intercellulaire communicatie tussen de endocardiale endotheelcellen.

Zowel microvasculair als endocardiaal endotheel spelen een belangrijke rol bij de functie van het hart, maar dragen hierbij elk op een verschillende manier bij. Histologisch zien we ter hoogte van het endotheel aanzienlijke cel-cel interacties. Er is expressie van zowel de adherente juncties als de 'tight junctions', die afwisselend voorkomen. Voor de adherente juncties wordt de celadhesie verzekerd door VE-cadherin, terwijl de tight junctions gebruik maken van proteïnes zoals claudine, JAM en occludine. Deze moleculen maken verbinding met het actine cytoskelet, wat zorgt voor de stabilisatie van de adhesie. In tegenstelling tot bijvoorbeeld epitheliale cellen, hebben endotheelcellen geen desmosomen. Deze cel-cel adhesies zijn niet enkel noodzakelijk voor de onderlinge coherentie maar spelen ook een beduidende rol in celsignalisatie, bescherming tegen apoptose en contact inhibitie van celgroei. Verder onderzoek moet gebeuren naar de complexiteit van de interacties ter hoogte van het endotheel. (34)

Humane endotheelcellen in cultuur tonen met licht microscopie en scanning elektronenmicroscopie een enkellagig dens groeipatroon, gekenmerkt door grote polygonale cellen. Ze groeien dicht op elkaar en

hebben onduidelijke celgrenzen. Er is een duidelijke, centraal ovale nucleus. Ter vergelijking groeien humane fibroblasten en gladde spiercellen daarentegen in overlappende lagen van parallelle cellen. Transmissie elektronenmicroscopie toonde naast duidelijke celgrenzen, ook cytoplasmatische inclusies aan, te vinden bij humane endotheelcellen maar niet bij fibroblasten of gladde spiercellen. Deze inclusies worden de Weibel-Palade lichaampjes genoemd. In het cytoplasma zijn organellen zoals het glad en het ruw endoplasmatisch reticulum te vinden, naast filamenten, vrije ribosomen, prominente Golgi, mitochondria en microtubuli. Verder is er ook aanwezigheid van ABH antigenen (correlerend met de bloedgroep) en actomyosine. (32)

Het endotheel is mesodermaal van oorsprong. Tijdens de embryonale periode wordt het cardiovasculaire systeem het eerst voltooid. In de gastrulatiefase wijzigt de tweelagige structuur van het embryo naar een drielagig kiemblad. Dit kiemblad bestaat uit ectoderm, endoderm en mesoderm. Differentiatie van laatstgenoemde geeft aanleiding tot de progenitorcellen voor bloedvaten en endotheelcellen. De voorlopercellen voor endotheel zijn angioblasten. (31) Zij assembleren verder tot het vasculair systeem onder invloed van verschillende signalisatiewegen.

Tijdens het proces van gastrulatie werd het belang van Fibroblast Growth Factor (FGF) in de inductie en Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in de migratie van angioblasten aangetoond in muis knock-out studies. (35) FGF signaleert via de MAP kinase cascade en is belangrijk in de omzetting van het epiblast naar het drielagig kiemblad. VEGF behoort tot de familie van Platelet Derived Growth Factor (PDGF), ingedeeld in VEGF-A tot -E. Deze isoformen verschillen in hun moleculaire massa en de wijze waarop ze interageren met receptoren en moleculen. (36) VEGF-A en -B zijn de voornaamste voor de vasculaire embryogenese, daar waar VEGF-C een rol speelt bij de differentiatie van lymfatisch endotheel. Over de andere types VEGF is nog weinig gekend over hun rol bij vasculogenese. Muizen die een allel van het VEGF-A gen ontbreken, zijn niet levensvatbaar. Heterogene muizen ontwikkelden minder rode bloedcellen in de bloedeilandjes en het endotheel was niet in staat om een normaal vasculair patroon te vormen. (35) Studies waarbij dierenembryo's het gen ontbreken voor VEGF receptoren, sterven voor de geboorte, omdat de differentiatie van endotheelcellen niet tot stand komt. (36) Dit wijst op het aanzienlijke belang van VEGF en zijn receptoren bij de vasculogenese. Zoals reeds hoger vermeld, wordt VEGF geïnduceerd door signalen van hypoxie, oncogenen en allerlei cytokines.

Endotheel werd lange tijd beschouwd als een statische barrière voor het bloedvat. Met het gebruik van elektronenmicroscopie konden onderzoekers zoals Palade en Gowan aantonen dat endotheel eerder een zeer dynamisch orgaan is, met metabole, secretoire en immunologische functies. Endotheel verzekert de uitwisseling van verschillende bloedcomponenten zoals nutriënten maar ook de eigenlijke bloedcellen tussen de omgevende weefsels en de bloedbaan. Het bepaalt met andere woorden de permeabiliteit van het bloedvat; zo speelt de doorgankelijkheid van endotheel voor leukocyten een rol bij inflammatie. Deze permeabiliteit wordt mogelijk gemaakt en gereguleerd door de aanwezigheid van receptoren voor tal van moleculen zoals metaboliëten (NO), groeifactoren, LDL en hormonen zoals endotheline-1. (37) Het vormt bovendien een niet-thrombogene oppervlak, belangrijk in kader van de bloedstolling, daar het moleculen bevat zoals heparansulfaat, die een anti-coagulerende werking hebben door interferentie met de coagulatie cascade.

Endotheelcellen hebben de capaciteit om beschadigd weefsel te herstellen. Dit gebeurt in essentie via twee mechanismen: duplicatie en sprouting. Wanneer een deel van de bloedvatwand beschadigd is, zullen endotheelcellen van de nabijgelegen zone prolifereren en migreren en op die manier de beschadigde zone bedekken. Dit gebeurt via eenvoudige duplicatie van bestaande endotheelcellen. Sprouting treedt op wanneer er nieuwe capillairen moeten gevormd worden. Endotheelcellen zullen via uitlopers vanuit bestaande venulen of capillairen als het ware een bloedvatstructuur creëren. Dit proces houdt aan tot het nieuwgevormde capillair een andere capillair ontmoet. Op deze manier wordt de bloedstroom verzekerd.

Deze angiogenese komt tot stand door signalen vanuit de weefsels die beschadigd werden. Men weerhoudt daarbij voornamelijk hypoxie, lokale irritatie en inflammatoire signalen. In minder frequente mate speelt dit ook een rol bij tumorale metastase en invasie. (30) De sleutelrol in de angiogenese is weggelegd voor VEGF. Cellen met een tekort aan zuurstof produceren meer HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), wat zorgt voor een toegenomen transcriptie van het gen dat codeert voor VEGF. Daaruit volgt een toename van de concentratie aan VEGF, met een effect op de omliggende endotheelcellen. Zij worden gestimuleerd tot nieuwvorming van bloedvaten, via proliferatie, migratie naar de plaats van het signaal, vorming van holle bloedvatstructuren en differentiatie. Wanneer de zuurstofvoorziening naar de beschadigde zone werd vervolledigd, vermindert de transcriptie van VEGF en wordt de angiogenese stopgezet. (30)

6.2. Stamcellen

6.2.1 Algemeen

De cellen van het menselijk lichaam kunnen grofweg worden ingedeeld in drie groepen: kiemcellen, somatische cellen en stamcellen.

Kiemcellen staan in voor de vorming van gameten. Meer concreet zijn spermatogonia bij de man en oögonia bij de vrouw diploïde cellen die door een proces van mitose en meiose aanleiding zullen geven tot het ontstaan van respectievelijk zaadcellen en eicellen. Deze haploïde cellen zullen bij de bevruchting fusioneren tot een zygote die dan zal uitgroeien tot een nieuw menselijk individu.

Somatische cellen zijn de meest abundante groep in het volwassen menselijk lichaam. Deze groep omvat cellen in een gedifferentieerd stadium met een specifieke functie en een kopie van het genoom onder de vorm van 46 chromosomen. De enige somatische cel die hierop een uitzondering vormt is de rode bloedcel, omdat deze geen nucleus bevat. (38)

Stamcellen zijn cellen die het vermogen hebben zich onbeperkt te delen in cultuur en ontstaan geven aan gespecialiseerde celtypes. Bij het delen van een stamcel zal er dus ofwel een nieuwe stamcel gevormd worden ofwel zal de dochtercel ontstaan geven aan een gedifferentieerde cellijn.

Het vermogen om zichzelf continu te hernieuwen is toe te schrijven aan telomerase activiteit. Telomerase is een enzyme dat zorgt voor het toevoegen van TTAGGG sequenties aan het chromosoomuiteinde. Zonder telomerase activiteit gaan deze repetitieve sequenties, telomeren genaamd, tijdens celdeling stilaan verloren waardoor de cellen hun delingscapaciteit verliezen, verouderen en sterven.

Stamcellen spelen een cruciale rol in regeneratie van weefsels. Bij zoogdieren is er geen mogelijkheid tot regeneratie van volledige lidmaten, maar gesofisticeerde wondheling en orgaanregeneratie (e.g. na partiële hepatectomie) maakt het belang van stamcellen duidelijk. (38) Ook bij planten kunnen stamcellen worden

teruggevonden. Etymologisch is het woord stamcel terug te leiden tot het in 1868 gepubliceerde “Natürliche Schöpfungsgeschichte”. Hierin introduceerde de Duitse bioloog Ernst Haeckel het woord “Stammzelle” om het unicellulaire organisme te beschrijven waaruit volgens hem alle multicellulaire organismen evolueerden. (39)

6.2.2 Soorten stamcellen

Stamcellen worden klassiek ingedeeld volgens het weefsel van oorsprong. De zygote bevat de capaciteit om alle cellen van het menselijk soma voort te brengen. Om die reden wordt ze vaak beschouwd als de ultieme stamcel. Aangezien ze echter niet in staat is zichzelf te hernieuwen, is ze dat *de facto* niet. Embryonale stamcellen (ESCs) worden geïsoleerd uit de ‘inner cell mass’ (ICM) van de blastocyst. Deze cellen zijn continu in cultuur te houden, waardoor ze wel beantwoorden aan de definitie van stamcel. Bovendien kunnen ze zich differentiëren tot de drie kiembladen (endoderm, mesoderm en ectoderm), maar geen aanleiding geven tot extra-embryonale structuren en worden daarom pluripotent genoemd. (38)

Primordiale kiemcellen (primordial germ cells - PGCs) zijn precursoren van diploïde kiemcellen nog voor ze in nauw contact komen met de somatische cellen van de gonaden en zich toewijden aan de kiemcellijn. Embryonale kiemcellen - een soort stamcellen - kunnen geïsoleerd worden uit de PGCs van gonadale plooien van 5 tot 9 weken oude foetussen na electieve abortus. Na isolatie kunnen deze stamcellen *in vitro* kenmerken vertonen van pluripotente embryonale stamcellen. (38)

Volwassen of somatische stamcellen kunnen worden geïsoleerd uit diverse weefsels en organen. De hematopoïetische stamcellen (HSCs) zijn hiervan de meest bestudeerde en best gekarakteriseerde. Ze worden geïsoleerd uit beenmerg, navelstrengbloed of perifere bloed en vormen een belangrijke vorm van therapie voor verscheidene hematologische aandoeningen e.g. Acute Myeloïde Leukemie. Aangezien deze cellen kunnen differentiëren tot de verschillende bloedcellijnen, maar niet tot andere weefseltypen worden ze multipotente stamcellen genoemd. Ook uit andere weefsels en organen zoals de hersenen, de huid, het oog en de darm kan men stamcellen isoleren (respectievelijk neuronale, epidermale, retinale en intestinale crypt stamcellen). (38)

Mesenchymale stamcellen (MSCs) worden voornamelijk geïsoleerd uit beenmerg (BM-MSC) of navelstrengbloed en kunnen differentiëren tot een grote variëteit aan cellen die kraakbeen, bot, spierweefsel, pezen en ligamenten, vet en ander bindweefsel opbouwen. (40)

6.2.3 Potentie van stamcellen

Uit recent onderzoek is gebleken dat de indeling van toti-, pluri- en multipotent niet helemaal sluitend is. Bepaalde stamcellen kunnen onder *in vitro* omstandigheden differentiëren tot celtypen van een ander kiemblad, hetgeen in de literatuur beschreven wordt als stamcel plasticiteit. Ook kunnen cellen uit bepaalde cellijnen transdifferentiëren tot andere phenotypes. Zo heeft men mesenchymale stamcellen laten differentiëren tot Schwann cellen (41), hematopoietische stamcellen tot hepatocyten (42) en spierweefsel (43) en heeft men kunnen aantonen dat chondrocyten kunnen transdifferentiëren tot osteoblasten en adipocyten (44).

6.3. Adipose-derived Stem Cells (ADSCs)

6.3.1 De ideale bron van stamcellen

Het onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van stamcellen is de laatste decennia zowel kwalitatief als kwantitatief exponentieel toegenomen. Het gebruik van ESCs is gezien hun pluripotentie zeer aantrekkelijk, maar vooral de beperkte beschikbaarheid en in mindere mate ethische kwesties laten grootschalig gebruik ervan niet toe. De nood aan een andere bron van stamcellen werd beantwoord door de ontdekking van autologe somatische stamcellen. Immers, hun immunocompatibiliteit en afwezigheid van ethische bezwaren rond hun gebruik laat toe om somatisch stamcellen - HSCs en MSCs in het bijzonder - massaal te gebruiken voor onderzoek. Beenmergpuncties voor het isoleren van deze stamcellen zijn echter pijnlijk en vergen vaak spinale of algemene anesthesie. Daarnaast is het aantal stamcellen dat op deze manier kan geïsoleerd worden eerder beperkt. Voor HSCs is dit ongeveer 1 per 10^5 cellen, voor MSCs ligt dit aantal nog iets lager. De *in vitro* proliferatie nodig om voldoende stamcellen te isoleren is tijdrovend, duur en creëert een hoog risico op contaminatie. De ideale bron van stamcellen zou bijgevolg eenvoudig toegankelijk moeten zijn, minimaal ongemak voor de patiënt teweegbrengen en toch voldoende stamcellen voortbrengen zodat langdurige *in vitro* expansie overbodig wordt. (38, 45)

6.3.2 Voordelen van ADSCs

Door de eenvoudige toegang en mogelijkheid tot prelevatie van grote hoeveelheden weefsel aan de hand van liposuctie, leek vetweefsel een geschikte bron. In 2001 slaagde *Zuk et al.* er in om stamcellen te isoleren uit verwerkt lipoaspiraats (processed lipoaspirate - PLA). Geslaagde differentiatie van de stamcellen tot adipocyten, chondrocyten, osteocyten en myocyten toonde de multipotentie ervan aan. De afwezigheid van senescentie bevestigde de isolatie van stamcellen. (45) Afgelopen decennium werd het gebruik van deze vetstamcellen om voorgenoemde redenen erg populair. Ook het aantal cellen per milliliter aspiraat en het aantal stamcellen per totaal aantal cellen (10%) ligt significant hoger dan bij beenmergpuncties. (46, 47) Daarnaast komen vetstamcellen significant meer voor bij oudere patiënten (60+) dan bij jongere. Dit staat in contrast met het aantal BM-MSCs geïsoleerd uit beenmergaspiraats dat een negatieve correlatie kent met leeftijd. (48)

6.3.3 Nomenclatuur

Vetweefsel vormt dus na beenmerg en umbilicaal bloed een derde belangrijke bron van mesenchymale stamcellen. Ze zijn immers afkomstig uit het mesenchym, het losmazende embryonaal bindweefsel dat zijn oorsprong kan vinden in alle drie de kiembladen. Wat de nomenclatuur betreft zijn er verscheidene termen voor het omschrijven van deze stamcellen. Het gaat over adipose-derived stem/stromal cells (ADSCs), adipose-derived adult stem (ADAS) cells, adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs), adipose MSCs (AMSCs), adipose stem/stromal cells (ASCs), preadipocyten, lipoblasten en historisch ook over processed lipoaspirate (PLA) cells. In dit werk zal de meest frequent gebruikte term ADSCs worden gehanteerd. (38, 45)

6.3.4 Oppervlakte markers

In 2006 formuleerde The International Society of Cellular Therapy (ISCT) drie criteria om mesenchymale stamcellen te definiëren: 1) MSCs moeten zich vasthechten op plastic onder standaard cultuur

omstandigheden. 2a) MSCs brengen CD105, CD73 en CD90 tot expressie. 2b) MSCs vertonen geen expressie van CD45, CD34, CD14 of CD11b, CD79alpha of CD19 en HLA-DR. 3) MSCs hebben de mogelijkheid om *in vitro* te differentiëren tot osteoblasten, adipocyten en chondrocyten. (49)

Hoewel ADSCs aan de meeste van deze criteria voldoen, zullen ze ook als CD34+ bestaan (zie verder). (50) Veel onderzoek is ondertussen gebeurd naar specifieke merkers voor ADSCs. Hoewel de resultaten van de verschillende studies minimaal verschillen is er een algemene consensus onder de publicaties dat ADSCs positief zijn voor CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 en CD105. De hematopoietische merkers CD14 en CD45, evenals de endotheliale merker CD31 zijn afwezig. De resultaten van een aantal studies zijn samengevat in Tabel 3. (46-48, 51-61) Aangezien de merkers CD29, CD44 en CD90 nauw verbonden zijn met stromale cellen, is hun aanwezigheid op ADSCs niet te verwonderen. CD34 speelt een belangrijke rol in cel-cel adhesie en komt frequent voor op (somatische) stamcellen, maar blijkt uit een aantal studies niet tot expressie te komen bij ADSCs. Dit is toe te schrijven aan het verlies van deze merker na het langdurig in cultuur houden van de stamcellen. In de recente literatuur wordt beschreven dat CD34+ ADSCs sneller prolifereren dan de CD34- ADSCs. Daarentegen is het adipogeen en osteogeen differentiatievermogen van de CD34- ADSCs significant groter. (62) Opvallend is de afwezigheid van HLA-DR. Deze en andere klasse II MHC moleculen spelen een belangrijke rol in immunotolerantie. Dit houdt in dat ADSCs bijzonder geschikt kunnen zijn voor allogene of xenogene transplantatie. Daarenboven heeft een recente studie aangetoond dat ADSCs minder vatbaar zijn voor natural killer (NK) cellen in vergelijking met BM-MSCs, wat de immunotolerantie nog verder in de hand werkt. (63)

Tabel 3: Oppervlakterekers van ADSCs

Auteur en publicatiejaar	Positieve expressie	Negatieve expressie
Gronthos 2001 (51)	HLA-ABC, CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44 , CD49e, CD54, CD55, CD59, CD105 , CD166, CD146	HLA-DR , CD11a, CD11b, CD11c, CD14 , CD18, CD31, CD45 , CD50, CD56, CD62e
Zuk 2002 (52)	CD13, CD29, CD44 , CD49d, CD71, CD90, CD105 , STRO-I	CD14 , CD16, CD31 , CD34, CD45 , CD56, CD61, CD62e, CD104, CD106
Lee 2004 (53)	CD29, CD44 , CD90, CD105	HLA-DR, CD14 , CD34, CD117
Aust 2004 (46)	HLA-ABC, CD10, CD13, CD29, CD44 , CD49e, CD59, CD90 , CD166	HLA-DR , CD11b, CD45
Cao 2005 (54)	HLA-ABC, CD29, CD44, CD105 , CD166, Flk-1	CD31 , CD34, CD45 , CD106, CD184
Moon 2006 (55)	CD44, CD90	CD31, CD45 , Flk-1
Yoshimura 2006 (56)	CD29 , CD34, CD44 , CD49d, CD73, CD90, CD105 , CD151	CD31, CD45 , CD105, CD146
Oedayrajsingh-Varma 2006 (47)	CD34, CD90, CD105 , CD166	CD31, CD45

Tabel 3: Oppervlaktemarkers van ADSCs

Auteur en publicatiejaar	Positieve expressie	Negatieve expressie
DiMuzio 2007 (57)	CD13, CD29, CD90	
Zannettino 2008 (58)	3G5, CD44, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166,	CD14, CD31, CD45
Fisher 2009 (59)		eNOS, vWF, CD31
Calazzo 2010 (60)	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, eNOS	CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, vWF, VEGF-R 1&2
Zhang 2011 (48)	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	
Wang 2013 (61)	CD44, CD90	CD31, CD34, CD45

Frequent voorkomende en afwezige markers zijn weergegeven in vet

6.3.5 Trilineage differentiatie

De multipotentie van ADSCs werd bevestigd door meerdere *in vitro* studies aan de hand van succesvolle differentiatie tot adipocyten, osteocyten en chondrocyten. De differentiatie mogelijkheden bleken echter niet beperkt tot deze drie cellijnen. Men slaagde er afgelopen decennium in ADSCs te laten differentiëren tot skeletspierweefsel, glad spierweefsel en hartspierweefsel. Maar ook differentiatie tot cellijnen uit de ectodermale en endodermale kiembladen kon worden aangetoond. Meer specifiek gaat het hier over neuronaal weefsel, Schwann cellen, epitheel, endotheel, respectievelijk pancreascellen en hepatocyten. ADSCs bezitten kortom een opvallende plasticiteit. De differentiatie tot cellijnen uit alledrie de kiembladen suggereert zelfs pluripotentie van ADSCs. Huidig onderzoek moet overeenkomsten met ESCs aantonen en deze pluripotentie bevestigen. (52, 64)

6.3.6 Endotheliale differentiatie

Het vermogen van ADSCs om te differentiëren tot endotheelcellen maakt het gebruik ervan in cardiale en vasculaire tissue engineering erg interessant. Voordelen van het bezaaien van matrices met endotheelcellen zijn onder andere infectie-resistentie, anti-thrombogene eigenschappen en compliantie, waardoor groei en herstel mogelijk wordt. (60) Het onderzoek dat reeds gebeurd is naar endotheliale differentiatie van ADSCs is eerder beperkt. Toch zijn de eerste resultaten veelbelovend. In de verschillende studies worden ADSCs in een (endotheliaal) groei medium geplaatst. Vervolgens worden de cellen morfologisch en immunohistochemisch geanalyseerd.

Een aantal belangrijke markers van endotheliale differentiatie zijn endothelial nitric oxide synthase (eNOS), von Willebrand Factor (vWF), platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM of CD31), vascular-endothelial cadherin (VE-cadherin of CD144) en de opname van Acetylated-Low Density Lipoprotein (Ac-LDL). eNOS staat in voor de endotheliale productie van stikstofmonoxide (NO) dat een belangrijke rol speelt in de vasotonus door inhibitie van gladde spiercelcontractie en plaatjesaggregatie. De endotheelcel staat eveneens in voor de productie van vWF, een glycoproteïne dat zorgt voor plaatjesaggregatie bij beschadiging van de bloedvatwand. Binnenin de endotheelcel komt vWF geconcentreerd voor in Weibel-

Palade lichaampjes. CD31 is een cel-adhesie molecule (CAM) die typisch voorkomt op het oppervlak van de endotheelcel, maar eveneens aanwezig kan zijn bij bepaalde bloedcellen zoals macrofagen, megakaryocyten, lymfocyten, e.d. Ook VE-cadherin is een CAM en zorgt voor intercellulaire juncties tussen de endotheelcellen. (57)

Recent onderzoek heeft aangetoond dat zowel biochemische als biofysische factoren een rol spelen bij de differentiatie van stamcellen tot endotheelcellen. Het in cultuur brengen van ADSCs in endothelial growth medium (EGM) leidt tot een significante toename van vWF, CD31 en eNOS expressie. De expressie van VE-cadherin blijkt afhankelijk te zijn van de cel-densiteit. (48, 57, 60) *Fisher et al.* kon opname van Ac-LDL, een kenmerk van mature endotheelcellen, en CD31 expressie pas aantonen na het toepassen van 'shear stress'. Dit is het toepassen van mechanische krachten op de cellen. (59) Latere studies bevestigen het positieve effect van 'shear stress' op endotheliale differentiatie. Zo blijkt er een significante toename van CD31 en vWF expressie te zijn, evenals een significante toename aan NO productie. Op deze manier promoot 'shear stress' dus het anti-thrombogene vermogen van de gedifferentieerde ADSCs. 'Shear stress' is op zich onvoldoende om endotheliale differentiatie te induceren, maar werkt duidelijk synergetisch met cultuur in EGM. De ADSCs, in cultuur gebracht op Matrigel-coated dekglasjes, vertonen na verloop van tijd lichtmicroscopisch een typische organisatie en vormen tubulaire structuren. (48, 60)

7. Extracellulaire matrix

Lange tijd werd onderzocht hoe een ideale scaffold voor tissue geëngineerde hartkleppen gevormd moest worden. Een scaffold is een gedecellulariseerde matrix waarop adhesie, proliferatie en migratie van cellen mogelijk blijft. Daarnaast zou moeten worden voldoen aan een aantal criteria; idealiter is de micro-architectuur van de scaffold te vergelijken met die van een natieve hartklep. Hij bezit daarnaast mechanische karakteristieken die de dynamische omstandigheden *in vivo* kunnen weerstaan. Bovendien zou de aanwezigheid van een oppervlakkige endotheellaag de scaffold niet thrombogene maken. (65) Er zijn drie majeure methodes om een scaffold te genereren; matrices gemaakt van synthetisch materiaal, opgebouwd uit gedecellulariseerd hartklepmateriaal of uit biologisch materiaal dat niet afkomstig is van een hartklep. Tot op heden is de ideale scaffold nog steeds niet ontwikkeld, daar de drie types elk hun voor- en nadelen bezitten. (65) De belangrijkste cellen bij een tissue geëngineerde hartklep scaffold zijn de 'Valvular Interstitial Cells' en de 'Valvular Endothelial Cells'. (65)

VICs of 'Valve Interstitial Cells' zijn een van de vier celtypes die voorkomen in hartkleppen. Naast endotheliale cellen, gladde en dwarsgestreepte cardiale spiercellen zijn VICs de meest prevalentie cellen. Daarenboven komen ze voor in alle lagen waaruit de klep is opgebouwd. (66) Ze groeien in eilandjes van cuboïdale cellen of groeien uit tot spoelvormige cellen. (67) VICs vinden hun origine in endotheliale cellen, die tijdens de embryogenese migreren van de oppervlakkige enkelvoudige endotheellaag naar het endotheliale kussen waar ze epitheliale-mesenchymale-transformatie (EMT) ondergaan. Dit is het proces dat finaal aanleiding geeft tot de vorming van VICs. (68) VICs worden geacht een essentiële rol te spelen in het handhaven van de normale functie en de structurele integriteit van hartkleppen. (67) Ze staan centraal in de vorming van de extracellulaire matrix door productie van de bestanddelen zoals collageen, proteoglycanen en elastine. (66) Bovendien produceren VICs ook matrix metalloproteïnasen en hun inhibitorische TIMPs

(tissue inhibitor of metalloproteinase), moleculen die verantwoordelijk zijn voor de modulatie van de extracellulaire matrix. (67) Doordat ze over de capaciteit beschikken om te moduleren, zijn VICs belangrijk in de respons van het hartklepweefsel op veranderingen van mechanische krachten en stress. Dit doen ze door bijvoorbeeld collageen type III tot een grotere expressie te brengen. (68) VICs zijn fibroblastisch van aard en brengen markkers tot expressie zoals het α -smooth muscle actine, calponine en zware keten myosine. (69)

Algemeen beschouwd worden er vijf belangrijke fenotypes van VICs onderscheiden; embryonale progenitor cellen, activated VICs, quiescent VICs, osteoblastic VICs en progenitor VICs. Elk fenotype heeft zijn eigen waarde en functie, samen contribuerend tot het geheel van de functionerende klep. Daaruit concludeert men dat VICs geen homogene groep van cellen zijn, maar een heterogene populatie. (66)

VECs of 'Vascular Endothelial Cells' zijn een ander belangrijk celtype in de hartklep. Zij bevinden zich voornamelijk ter hoogte van de lamina arterialis en ventricularis en vormen aldaar een niet-thrombogene oppervlak. (65) Valvulair endotheel is verschillend van het vasculair endotheel dat de bloedvaten aflijnt. VECs groeien in een 'cobblestone'-formatie en aligneren zich niet parallel met de bloedstroom maar staan loodrecht op de richting van de bloedstroom. (70) Er zou een belangrijke communicatie zijn tussen VICs en VECs waarbij VECs paracrine signalen doorgeven aan VICs onder de vorm van bijvoorbeeld NO en endotheline-1. (68) Deze signalen komen tot stand doordat VECs de capaciteit bezitten om de bloedflow te voelen en daarop specifieke agentia produceren om de 'shear stress' aan te passen. (69) Deze communicatie speelt een zeer voorname rol in de hemodynamische respons op mechanische stress. (68)

8. Platelet rich plasma (PRP)

8.1 Wat is PRP?

Platelet rich plasma is een concentraat van bloedplaatjes in een kleine hoeveelheid plasma. Het is gekend om zijn wondhelingscapaciteiten. PRP bevat aanzienlijke hoeveelheden groeifactoren en stelt na activatie ook een belangrijke hoeveelheid aan pro- en anti-inflammatoire cytokines vrij. In een recente studie van *Kruger et al.* wordt de aanwezigheid van 76 verschillende groeifactoren beschreven. (71) Als meest frequente vindt men platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), VEGF, insuline-like growth factor-1 (IGF-1), insuline-like growth factor-2 (IGF-2), epidermis growth factor (EGF) en transforming growth factor- β (TGF- β). (71-73)

De bereiding van PRP bestaat uit vier fasen: bloedafname, centrifugatie voor plaatjesconcentratie, geleren van het concentraat en activatie door calcium of thrombine. De centrifugatie gebeurt best traag, omdat te snelle centrifugatie kan leiden tot inwerken van mechanische krachten en temperatuurstijging, waardoor partiële plaatjesactivatie kan ontstaan met een potentieel verlies aan granulaire inhoud. De bereiding van PRP kan zowel manueel als (semi-)automatisch gebeuren. Hiervoor zijn diverse toestellen op de markt. (72)

8.2 PRP toepassingen

PRP kent intussen diverse toepassingen in de reconstructieve heelkunde, cardiochirurgie, mond-kaak-aangezicht chirurgie en orthopedie. Ondanks een aantal positieve resultaten wordt het routinematig gebruik

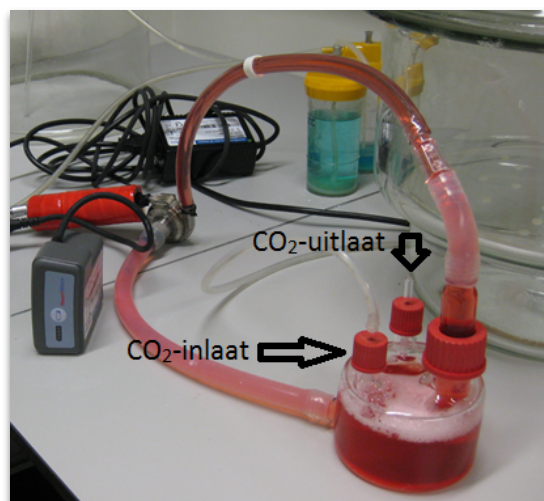
van PRP voor heling van chronische wonden in een recente Cochrane review echter niet aangeraden wegens gebrek aan grootschalige RCTs. (74)

De voordelen van het gebruik van (autoloog) PRP zijn onder andere de veiligheid, de eenvoudige en relatief goedkope beschikbaarheid van cytokines, chemokines, groeifactoren en andere eiwitten. Omwille hiervan heeft het gebruik van PRP ook zijn intrede gemaakt in de tissue engineering. Het positieve effect van PRP op zowel humane als ovine mesenchymale stamcel proliferatie en differentiatie werd reeds aangetoond. (73) (75)

9. Bioreactor

Een bioreactor is een toestel waarin biologische of biochemische processen kunnen plaatsvinden onder strikt gecontroleerde omstandigheden. In tissue engineering maakt een bioreactor gebruik van mechanische krachten om biologische processen te beïnvloeden. Het statisch bezaaien van scaffolds met cellen leidt tot een inhomogene celdistributie. Een concentratiegradiënt van nutriënten stelt zich in statische cultuur na verloop van tijd onvermijdelijk in. Hierdoor migreren de cellen chemotactisch naar de periferie van de scaffold wat leidt tot deze ongelijke celverdeling. Het bevorderen van de homogene celdistributie kan bijgevolg worden nagestreefd door een continue flow van groeimeidium te verwezenlijken.

In casu wordt de bioreactor gebruikt om het effect van flow op de vasthechting en migratie van ADSCs en ECs op gedecellulariseerde matrices te evalueren. Daartoe wordt groeimeidium in flow gebracht rond een ingenaaide scaffold. Op deze manier komt de scaffold tevens onder mechanische stress te staan. Dit bootst de *in vivo* situatie na waarbij hartkleppen continu onderhevig zijn aan de krachten geleverd door het hart. (76)



Figuur 4: De gebruikte bioreactor met aangeduide CO₂ in- en uitlaat

De bioreactor bestaat uit een glazen kamer, speciaal ontworpen voor dit onderzoek. Voor de CO₂ in- en uitlaat zijn apicaal twee openingen voorzien. Om medium flow toe te laten werden twee buizen enerzijds aangesloten op de glazen kamer en anderzijds op een left ventricular assist device (LVAD). Daar waar de flow de glazen kamer bereikt, werd een tussenstuk voorzien met de mogelijkheid om scaffolds in te naaien. De gebruikte materialen zijn steriliseerbaar en bio-inert. Daarenboven is de gebruikte bioreactor transparant en is er dus de mogelijkheid continu macroscopisch te evalueren. Het plaatsen van de bioreactor in een

warme kamer van 37°C en continue CO₂ circulatie garandeert optimale omstandigheden voor scaffold repopulatie, cel proliferatie, migratie en invasie.

10. Doelstelling

Hartklepprothesen die actueel gebruikt worden voor aortaklep herstel (aortic valve replacement - AVR) hebben specifieke nadelen. Mechanische kleppen vereisen continue anticoagulatetherapie. Bioprothesen daarentegen hebben een beperkte levensduur, omdat het immuunsysteem van de patiënt de lichaamsvreemde hartklep stilaan degradeert. De ideale hartklepprothese impliceert bijgevolg levenslange durabiliteit en afwezigheid van nood aan medicatie. Theoretisch zou een dergelijke hartklep kunnen worden geconstrueerd door het decellulariseren van een xenogene hartklep en deze vervolgens te bezaaien met cellen van de patiënt. Op deze manier zou het immuungemedieerde verval van de bioprothese kunnen worden omzeild en de duurzaamheid bewaard blijven.

Het gebruik van adipoos weefsel als bron van mesenchymale stamcellen (adipose-derived stem cells - ADSCs) is een recent gegeven. De voordelen ten opzichte van de klassieke mesenchymale stamcellen, geïsoleerd uit beenmerg (BM-MSCs), maken het gebruik van ADSCs voor tissue engineering erg interessant. De differentiatie van ADSCs tot endotheelcellen (ECs) zou een eerste stap kunnen vormen tot het succesvol cultiveren van dit laatste type cellen. Deze endotheelcellen zouden bijgevolg kunnen gebruikt worden om de acellulaire scaffolds te bezaaien.

Het doel van dit werk omvat verschillende luiken. Eerst en vooral zal geëvalueerd worden of ECs kunnen worden gecultiveerd uit ADSCs. Vervolgens wordt gestreefd naar de bepaling van de optimale concentratie platelet rich plasma (PRP) voor de proliferatie en invasie van zowel ADSCs als ECs. Dit teneinde deze concentratie later te gebruiken om acellulaire matrices mee op te laden en zo een maximale repopulatie te verwezenlijken. Tot slot zullen acellulaire matrices bezaaien worden met stamcellen en endotheelcellen. Dit zowel statisch als dynamisch met behulp van een bioreactor. De capaciteit van deze celtypes m.b.t. het repopuleren van deze gedecellulariseerde matrices zal nadien geëvalueerd worden.

De resultaten van dit onderzoek kunnen de basis vormen voor verder onderzoek en klinische toepassingen van tissue engineering.

MATERIALEN EN METHODEN

1. Isolatie en decellularisatie van xenogene matrices

Als xenogene matrix werd er gebruik gemaakt van de porciene aortaklep. Voor het bekomen van deze porciene aortakleppen, deed men beroep op Ryckaert M NV, een erkend slachthuis in Eeklo. Het slachthuis leverde volledig intacte varkensharten. De harten werden getransporteerd op ijs in een spoeloplossing. Vervolgens werd elk hart verder gedisseceerd tot enkel nog de aorta met de 3 klepbladen, onderliggend spierweefsel van ongeveer 4mm en 1 aanpalend mitralisklepblad overbleef.

De xenogene matrices werden gedecellulariseerd aan de hand van een gepatenteerde detergent-enzymatische behandeling, zoals beschreven door Wilson e.a. (1995) en door Zeltinger e.a. (2001). De weefsels werden eerst overgebracht in een Tris gebufferde NaCl oplossing (pH 8.0). Op dag 2 werden de weefsels overgebracht in een oplossing met de Tris buffer en Triton-X100 (pH 8.0; Biorad, Eke, België). Op dag 3 werden de weefsel eerst gedurende 2x10 minuten gespoeld met HBSS (Hank's Balanced Salt Solution: PromoCell, Duitsland) op 4°C. Na spoeling werden de weefsels onderworpen aan een digestieve procedure door gebruik te maken van een enzymatische oplossing met DNase, RNase en trypsine (Sigma-Aldrich, Diegem, België). Om complete digestie te verzekeren, werden de weefsels ongeveer 45 minuten onder continue beweging in een warme kamer op 37°C geplaatst. Hierna werden de klepblaadjes opnieuw in een Tris gebufferde oplossing geplaatst (+Triton X-100). Tenslotte werden de weefsels gedurende 24 uur gewassen in een magnesium- en calciumvrije HBSS oplossing.

2. Isolatie en cultivatie van vetweefsel stamcellen

De vetweefsel stamcellen (ADSCs) zijn afkomstig uit porcien subcutaan vetweefsel. Om deze cellen te isoleren, werd op steriele wijze de buikholte van het geanestheiseerd varken geopend en een stukje subcutaan vetweefsel van 10 gram afgenomen. Het vetweefsel werd in een steriel recipiënt gevuld met PBS (phosphate buffered saline) met 100µg/mL streptomycine en 100U/mL penicilline (Invitrogen, Merelbeke, België) overgebracht. Vervolgens werd het vetweefsel in een steriele petrischaal in zeer kleine stukjes (<5mm) versneden. Het vermaalde vetweefsel werd gedigesteerd in een voorverwarmde steriele 0.1% collagenase - PBS oplossing (Sigma-Aldrich, Diegem, België) op een shaker (200rpm - 37°C) gedurende 2u. De bekomen celsuspensie werd gefiltreerd aan de hand van 100µm Millipore filter om de niet gedigesteerde stukjes vetweefsel te elimineren. De zuivere celsuspensie werd gecentrifugeerd aan 1200rpm gedurende 5 minuten. De bekomen celpellet werd geresuspendeerd in cultuurmedium, bestaande uit DMEM-Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Invitrogen, Merelbeke, België), 20% foetaal kalfs serum (fetal bovine serum, FBS: Invitrogen, Merelbeke, België), 100µg/ml streptomycine en 100U/ml penicilline.

De geresuspendeerde cellen werden verder uitgeplaat in cultuurflessen van 75cm² en geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂. Na een incubatietijd van 24 uur werden de niet-adherente cellen verwijderd, terwijl de adherente cellen tweemaal werden gewassen met PBS. Vervolgens werd er opnieuw cultuurmedium toegevoegd en werden de cellen gedurende 7 tot 10 dagen geïncubeerd. Men verversde het medium elke 72 uur. Wanneer de cultuurfles 80% confluentie bereikt had, werden de cellen getrypsiniseerd met 0.25% trypsine en 1mM EDTA (Ethyleendiaminetetra-azijnzuur) bij 37°C. Voor de experimenten werden cellen van passage 2 of 3 gebruikt.

3. Isolatie en cultivatie van natieve endotheelcellen

Voor de isolatie van natieve endotheelcellen werden twee protocols gehanteerd. Volgens de eerste methode werden endotheelcellen geïsoleerd uit de vena femoralis van een varken. Hiervoor werd de vene (15 cm lengte) op steriele wijze gedisseceerd uit de inguinale regio van een geanestheesd varken. De vena femoralis werd overgebracht in een steriel recipiënt gevuld met steriele HBSS met 100 µg/mL streptomycine en 100U/mL penicilline. Het lumen van het bloedvat werd vervolgens gespoeld met HBSS. Eén uiteinde van de vene werd afgeklemd en het lumen werd gevuld met een voorverwarmde steriele 0.2% collagenase - PBS oplossing (Sigma-Aldrich, Diegem, België). Het andere uiteinde werd eveneens afgesloten. Het bloedvat werd in een steriele, met HBSS gevulde, petrischaal geplaatst en gedurende 20 minuten geïncubeerd op 37°C en 5% CO₂. De vene werd nadien gespoeld met EBM-2 (endothelial cell basal medium 2, Lonza, Verviers, België) gesupplementeerd met 20% FBS, 100µg/ml streptomycine en 100U/ml penicilline. De oplossing werd gecollecteerd in een centrifugebuis en gedurende 5min gecentrifugeerd aan 300g. De celpellet werd geresuspendeerd in EBM-2 gesupplementeerd met 20% FBS, 100µg/ml streptomycine en 100U/ml penicilline. De geresuspendeerde cellen werden verder uitgeplaat in cultuurflessen van 75cm² en geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂.

Voor de tweede methode werden de endotheelcellen geïsoleerd uit de aorta van een varken. Hiervoor werd de aorta (15cm lengte) op steriele wijze gedisseceerd uit de thorax van het varken. De aorta werd overgebracht in een steriel recipient gevuld met PBS. De zijtakken van de aorta werden afgeklemd met vaatklemmen. Eén uiteinde van de aorta werd afgeklemd en het lumen werd gevuld met een voorverwarmde enzyme oplossing bestaande uit 0,1% type 1 collagenase (Invitrogen, Merelbeke, België) en 0,12% dispase (Sigma-Aldrich, Diegem, België) in DMEM. Het bloedvat werd vervolgens zacht gemasseerd om optimale inwerking van de enzymes te verwezenlijken. Na 10 minuten werd de vloeistof met ECs overgebracht in een centrifugeerbuis. Dit werd vier keer herhaald. Vervolgens werd het geheel gecentrifugeerd aan 200g en 4°C voor 10 minuten, ten einde een celpellet te verkrijgen. Het supernatans werd afgenomen en de pellet geresuspendeerd met endothelial growth medium (EGM; DMEM gesupplementeerd met 10% FBS, 100U/mL penicilline, 0,1 mg/mL streptomycine, 1mM natriumpyruvaat (100mM; Life technologies, Gent, België), 1% non-essential amino acids (100x) (NEAA, Gibco; Life technologies, Gent, België), 50µg/ml endothelial cell growth (ECGS; Sigma-Aldrich, Diegem, België) en 10U/ml heparine (Sigma-Aldrich, Diegem, België)). De cellen werden uitgezaaid in 0,5% gelatine gecoate cultuurflessen en nadien in een incubator geplaatst bij 37°C en 5% CO₂. Medium werd verversd binnen 24 uur en vervolgens na 48-72 uren intervallen.

4. *In vitro* adipogene, osteogene en chondrogene differentiatie

De geïsoleerde cellen uit het vetweefsel werden geïnduceerd tot zowel adipogene, osteogene als chondrogene differentiatie. Dit om aan te tonen dat deze geïsoleerde cellen wel degelijk ADSCs waren. Adipogene differentiatie werd gedurende 14 dagen geïnduceerd aan de hand van STEMPro adipogeen differentiatiumedium (Invitrogen, Merelbeke, België) en geëvalueerd via Oil Red O (Sigma-Aldrich, Diegem, België) en HCS LipidTOX™ (Invitrogen, Merelbeke, België) green lipid kleuring. Osteogene differentiatie werd gedurende 14 dagen geïnduceerd aan de hand van STEMPro osteogeen differentiatiumedium (Invitrogen, Merelbeke, België) en geëvalueerd via von Kossa kleuring. Tenslotte werd de chondrogene differentiatie gedurende 21 dagen geïnduceerd aan de hand van STEMPro chondrogeen

gecentrifugeerd om een supernatans te bekomen dat rijk is aan de door de plaatjes vrijgestelde groeifactoren. Dit supernatans werd vervolgens onderworpen aan een aantal centrifugaties van telkens 10 minuten aan 1200 rpm om de rode bloedcellen, debris en stroma te scheiden van de groeifactoren. Dit kon men dan vers gebruiken voor de verschillende experimenten. De initiële concentratie aan bloedplaatjes in het PRP varieerde tussen de 40×10^3 en 3.5×10^6 plts/mL tijdens de verschillende preparaties. Voor het tellen en het op punt stellen van het gewenste plaatjesaantal nodig voor de experimenten, werden de PRP stalen verdund met PBS. Vervolgens werd het PG supernatans, bekomen van het gewenste plaatjesaantal, toegevoegd aan het medium.

8. Proliferatie assay

De proliferatiecapaciteit van ADSCs en ECs onder invloed van de groeifactoren afkomstig van PRP werd geanalyseerd aan de hand van een MTS assay. (Promega CellTiter 96 ® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Madison, USA). De ADSCs werden in een concentratie van 5000 cellen/mL uitgezaaid in een 96 well plaat. De ADSCs werden 24 uur voor het uitvoeren van het assay geïncubeerd in serum-vrij medium. De groeifactoren afkomstig van het supernatans van de plaatjesgel werden toegevoegd in verschillende concentraties ($0-2 \times 10^6$ plts/mL), verdund met DMEM-Glutamax. Als negatieve controle werden cellen in FBS-vrij medium (DMEM-Glutamax) gebruikt, terwijl als positieve controle beroep gedaan werd op cellen in DMEM-Glutamax met 10% FBS. De proliferatie van de cellen werd geanalyseerd na 24u, 48u en 72u incubatie bij 37°C en 5% CO₂. De assay werden in drievoud uitgevoerd.

Het aantal levensvatbare cellen werd indirect bepaald door de conversie van 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3 carboxymethoxylphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium zout (MTS) tot een oplosbare kleurstof. De MTS assay is gebaseerd op de conversie van MTS in een wateroplosbaar formazan door mitochondriale dehydrogenase enzymen aanwezig in metabool actieve cellen. De hoeveelheid gevormd formazan, gemeten door 490 nm absorptie is evenredig met het aantal levende cellen in de cultuur. Concreet werd 100 µL MTS oplossing toegevoegd aan de culturen. Na 4 uur bij 37°C in een vochtige, 5% CO₂ atmosfeer werd de 490 nm absorptie gemeten met behulp van een ELISA reader (EL 800, Universal Micropalte Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, USA).

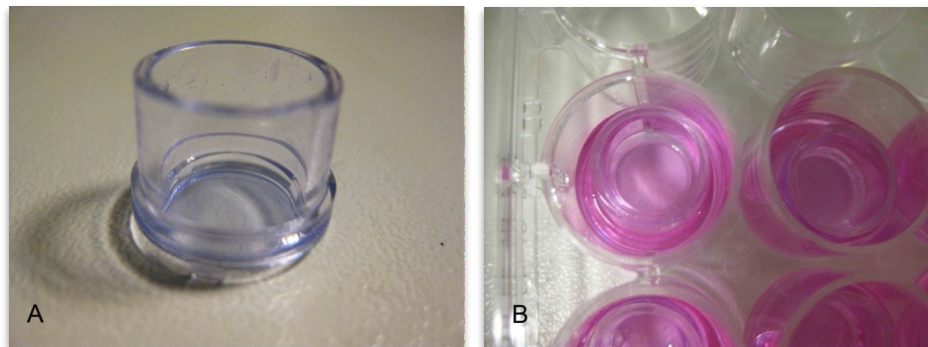
9. Invasie assay

Het effect van de groeifactoren afkomstig van PRP op de invasie van ADSCs werd bestudeerd aan de hand van een invasie assay.

Het Chemicon QCM 24-Well Colorimetric Cell Migration Assay (Millipore) werd uitgevoerd in een migratiekamer, gebaseerd op het Boyden celkamer principe. Elke kit beschikt over 24 inserts. Elke well bevat een polycarbonaat membraan met een poriegrootte van 8µm, gecoat met een dunne laag collageen. Deze collageenlaag blokkeert de poriën van de membraan en verhindert dat niet-invasieve cellen door de membraan migreren. Invasieve cellen migreren daarentegen wel door de gepolymeriseerde collageen membraan en hechten zich aan de onderzijde van de polycarbonaatmembraan. Cellen die door de polycarbonaat membraan migreren naar de bodem van de kamer, werden geïncubeerd met Cell Stain Solution, geëxtraheerd en vervolgens gedetecteerd aan de hand van een standaard ELISA reader (560 nm).

De ADSCs werden 24 uur voor het uitvoeren van het assay geïncubeerd in serum-vrij medium, namelijk DMEM-Glutamax. Na twee wasbeurten met HBSS, werden de cellen getrypsiniseerd. Het supernatans werd

na centrifugatie geaspireerd en de pellet resuspendeerde men in 1 mL DMEM-Glutamax met 0.5% bovien serum albumine (BSA: Invitrogen, Merelbeke, België). De ADSCs werden in een concentratie van 0.5×10^6 cellen/mL in het bovenste compartiment van de migratiekamer gebracht. De groeifactoren afkomstig van het supernatans van de plaatjesgel werden in het onderste compartiment toegevoegd in verschillende concentraties ($0-2 \times 10^6$ plts/mL), verdund met DMEM-Glutamax. Als negatieve controle werden cellen in FBS-vrij medium (DMEM-Glutamax) gebruikt, terwijl als positieve controle beroep gedaan werd op cellen in DMEM-Glutamax met 10% FBS. De invasie van de ADSCs werd geanalyseerd na 72 uur incubatie bij 37°C en 5% CO₂. Beide assays werden in drievoud uitgevoerd.



Figuur 5: Opstelling van het invasie assay. A Het bovenste compartiment van de migratiekamer. B De volledige migratiekamer: het onderste compartiment bevat de groeifactoren in DMEM-Glutamax, het bovenste compartiment bevat de ADSCs en ECs in suspensie.

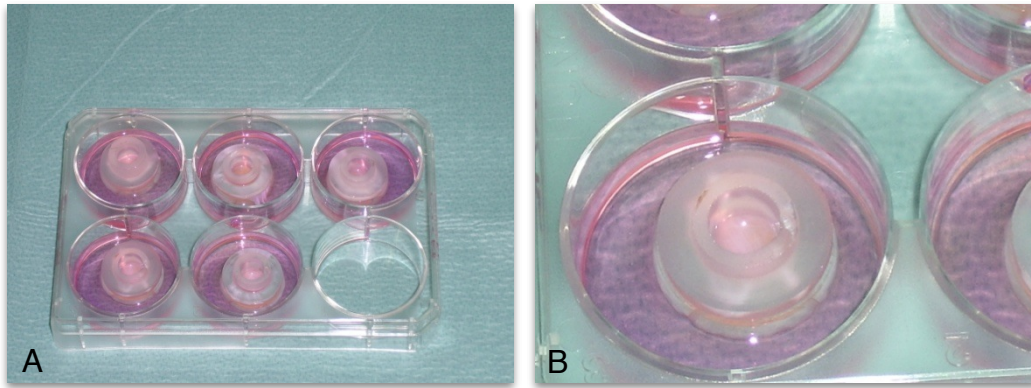
10. Groeifactor-oplading van acellulaire scaffolds

Twaalf porciene acellulaire klepbladen werden gespoeld in PBS. De klepbladen werden opgeladen met 2 mg/mL heparine gedurende 2 uur. Vervolgens werden de klepbladen gedurende 3 uur geïncubeerd met supernatans afkomstig van de plaatjesgel (PG), aangelengd met DMEM-Glutamax. In de gebruikte PG bevonden er zich 2×10^6 plts/mL. De acellulaire klepbladen werden verder in een 48-well plaat gelegd en op elk klepblad bracht men 0.5 mL PG supernatans in DMEM-Glutamax aan. Na 3 uur incubatie, werden de klepbladen uit het PG supernatans genomen en telkens overgebracht in een nieuwe well. Vervolgens werden de kleppen statisch bezaaid.

11. *In vitro* repopulatiemodel

Een eerste *in vitro* repopulatiemodel is statisch en maakt gebruik van glazen cilinders. Deze cillinders worden op de klepbladen geplaatst en vervolgens gevuld met ADSCs en ECs. Voor beide celtypes werden 3 opgeladen klepbladen en drie controle matrices gebruikt. Deze matrices werden bezaaid met ADSCs en ECs aan een densiteit van 1×10^6 cellen/cm². De opstelling is weergegeven in Figuur 6.

In een tweede statisch repopulatiemodel werd gebruik gemaakt van een 48-well plaat waarin de matrices werden uitgespreid. In dit model werden de kleppen eveneens voorafgaandelijk opgeladen met 100% PRP (2×10^6 plts/mL). Vervolgens werden ADSCs en ECs druppelsgewijs getitreerd op de klepbladen aan een densiteit van 6×10^6 cellen/cm². Voor beide celtypes werden drie opgeladen klepbladen bezaaid. Voor beide celtypes werd ook één controle klepblad (geïncubeerd in DMEM + 10% FBS) bezaaid. Het medium werd vervangen na 3 dagen incubatie en de matrices werden gefixeerd op dag 6.

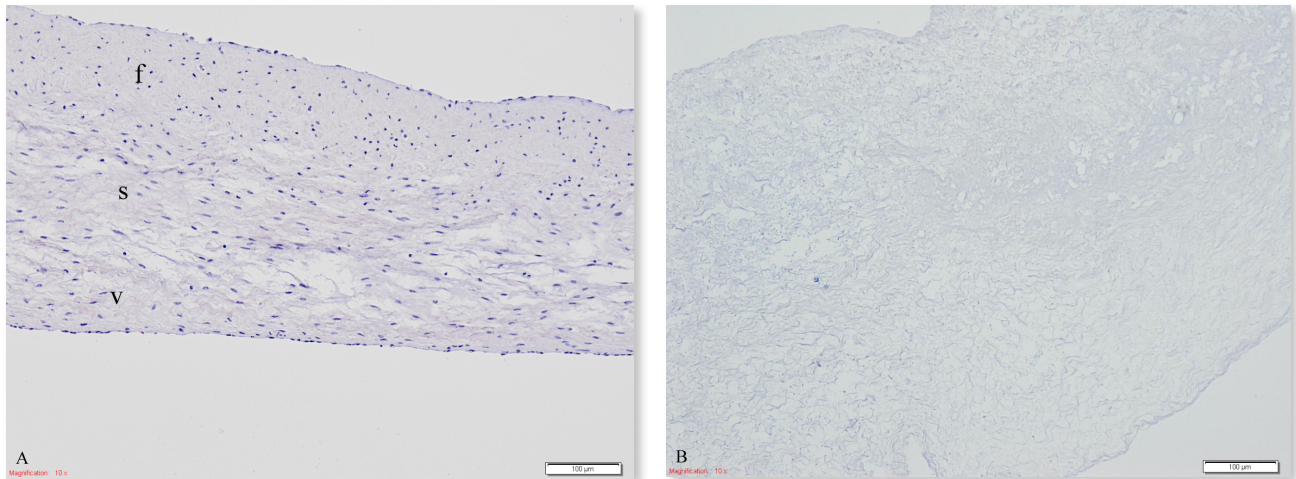


Figuur 6: A In vitro repopulatiemodel aan de hand van glazen cilinders. B Close-up glazen cilinder op klepblad.

RESULTATEN

1. Decellularisatie van xenogene matrices

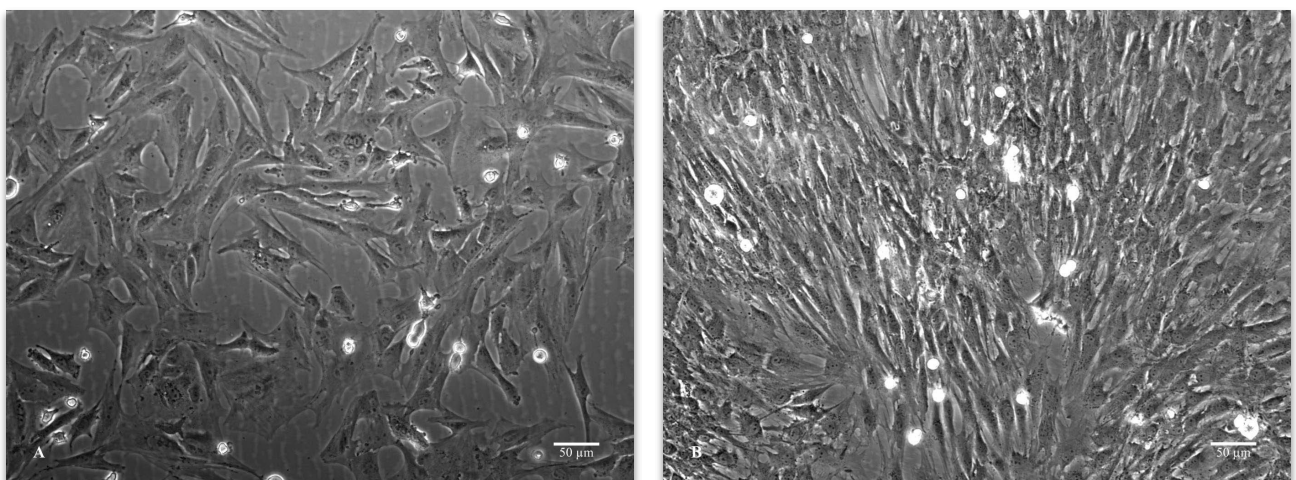
Het succesvol decellulariseren van de porciene aortaklepblaadjes kon worden aangetoond door haematoxyline-eosine (HE) kleuring, waaruit duidelijk blijkt dat de klepbladen acellulair geworden zijn. Deze kleuring is eveneens geschikt voor het aantonen van de verschillende cellagen. De foto's van de porciene matrices voor en na decellularisatie zijn weergegeven in Figuur 7.



Figuur 7: Heematoxyline-eosine (HE) kleuring van natief en gedecellulariseerd porciene aortaklepblad. A De duidelijk aangekleurde celkernen wijzen op maximale infiltratie en popularisatie van het klepblad. De drie histologisch te onderscheiden cellagen van het klepblad zijn aangeduid: Lamina ventricularis (v), lamina spongiosa (s) en lamina fibrosa (f). Schaal: 100µm B De afwezigheid van gekleurde celkernen wijst op succesvolle decellularisatie. Schaal: 100µm. De foto's zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B.

2. Isolatie van ADSCs

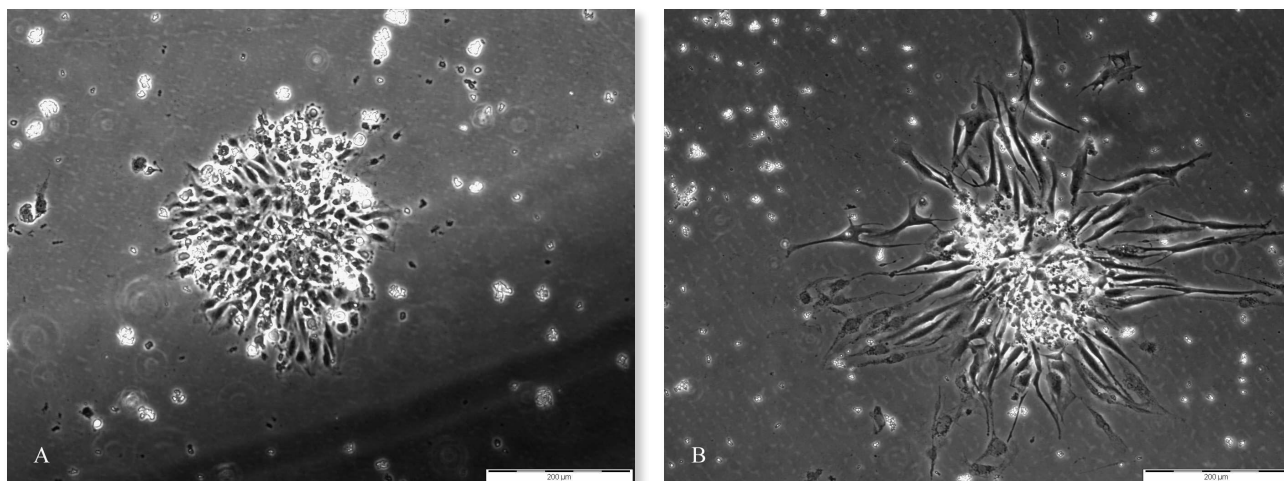
De uitgezaaide ADSCs bereikten na zes dagen confluentie. Dit werd bevestigd aan de hand van eenvoudige brightfield microscopie. Hierop zijn cellen te zien met een onregelmatige spoelvorm en diverse cytoplasmatische uitlopers. De celkernen zijn moeilijk te beoordelen, maar worden beschouwd als rond ovaal. Bovendien is het cytoplasma sterk gegranuleerd wat wijst op actieve eiwitsynthese nodig voor proliferatie. Deze morfologie stemt overeen met adipose stamcellen gezien hun oorsprong. De brightfield foto's zijn weergegeven in Figuur 8.



Figuur 8: Brightfield opnames van ADSCs A Toenemende confluentie van onregelmatige cellen met cytoplasmatische uitlopers, suggestief voor ADSCs. Duidelijke granules zichtbaar, wat wijst op geactiveerde status van de cellen. Enkele tientallen niet viabele cellen zijn te zien. Schaal: 50µm B Maximale confluentie van onregelmatige cellen met cytoplasmatische uitlopers, suggestief voor ADSCs. Duidelijke granules zichtbaar, wat wijst op geactiveerde status van de cellen. Enkele tientallen niet viabele cellen zijn te zien. Schaal: 50µm. De foto's zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B.

3. Isolatie van native endothelcellen

Bij het isoleren van endothelcellen uit porciene aorta's werden pas na dubbele centrifugatie celpellets bekomen. Deze celpellets waren voornamelijk rood van kleur. Hierbij werd sterk getwijfeld aan de kwaliteit van de pellets en was er een vermoeden van contaminatie door rode bloedcellen. Na vijf dagen cultuur van deze pellets werden enkele celspots opgemerkt. Deze celspots vertoonden voornamelijk cellen met fibroblast-like morfologie, maar ook enkele spots met kubische cellen werden waargenomen. Dit suggereert dat er een beperkt aantal endothelcellen geïsoleerd kon worden. De media werden verder ververst, maar na acht dagen cultuur werden geen viabele cellen meer waargenomen.



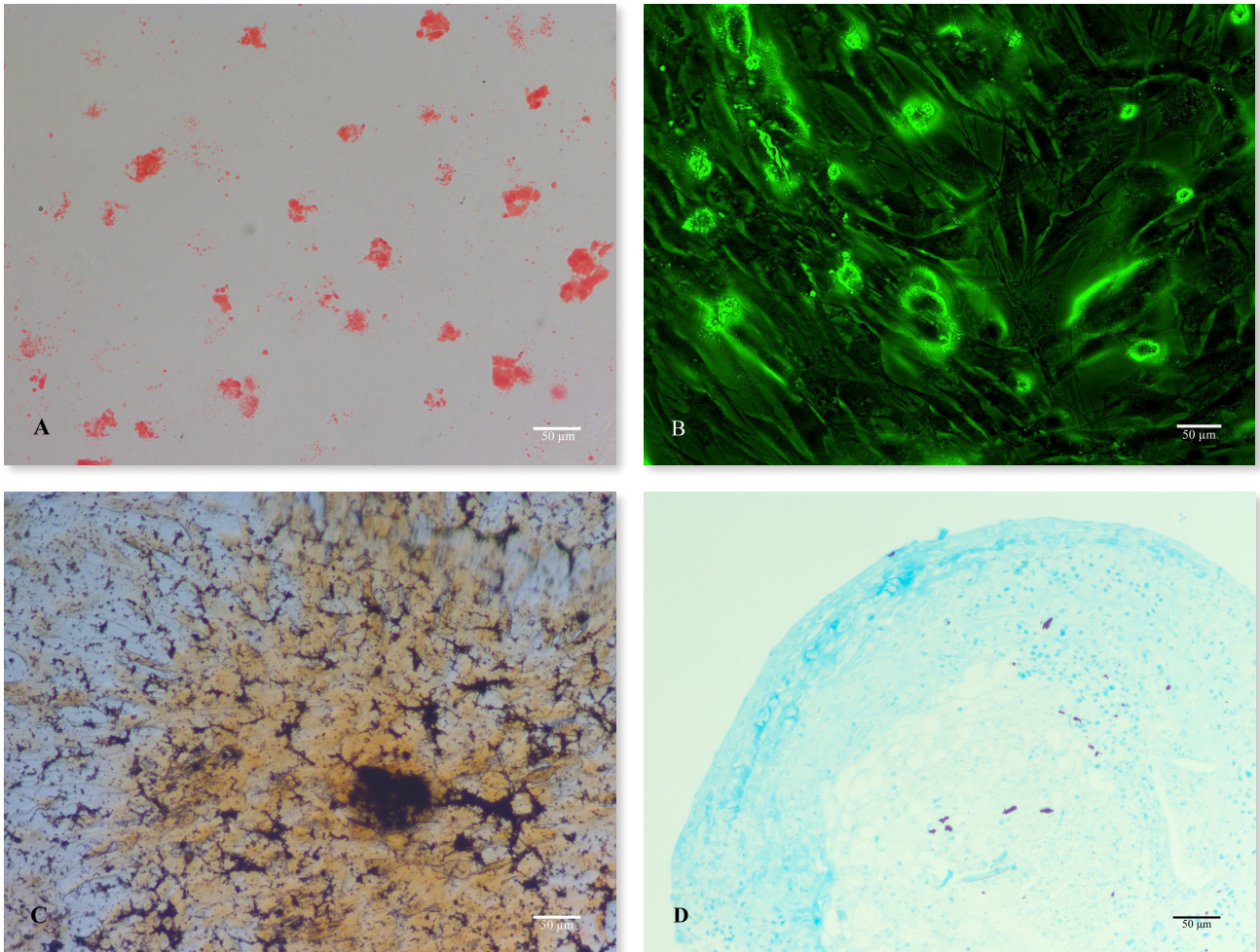
Figuur 9: Brightfield opnames van celspots geïsoleerd uit een porciene aorta A Dens celspot met spoelvormige tot kubische cellen en veel celdebris. Schaal: 200µm B Celspot van meer uiteenlopende spoelvormige cellen en celdebris. Schaal: 200µm. De foto's zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B.

4. Trilineage differentiatie van ADSCs

De multipotentie van de ADSCs werd bevestigd door trilineage differentiatie. Voor het aantonen van de adipogene differentiatie werd zowel een Oil Red O als een HCS LipidTOX™ green lipid kleuring gehanteerd. Na 14 dagen in differentiatie medium te zijn geplaatst kleurden de ADSCs duidelijk aan voor vetaccumulatie. (zie Fig. 10A-B) Osteogene differentiatie werd bevestigd door von Kossa kleuring dewelke calcium deposits aantoonde door precipitatie van zilver ionen. (zie Fig. 10C) Tot slot werd de chondrogene differentiatie aangetoond door Alcian blauw kleuring. Deze kleuring zorgt voor de visualisatie van gesulfateerde proteoglycanen in de extracellulaire matrix, hetgeen wijst op de aanwezigheid van chondrocyten. (zie Fig. 10D) De verschillende kleuringstechnieken en de cellijn specifieke merkers zijn weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4: Differentiatie merkers en assays van cellijn specifieke differentiatie

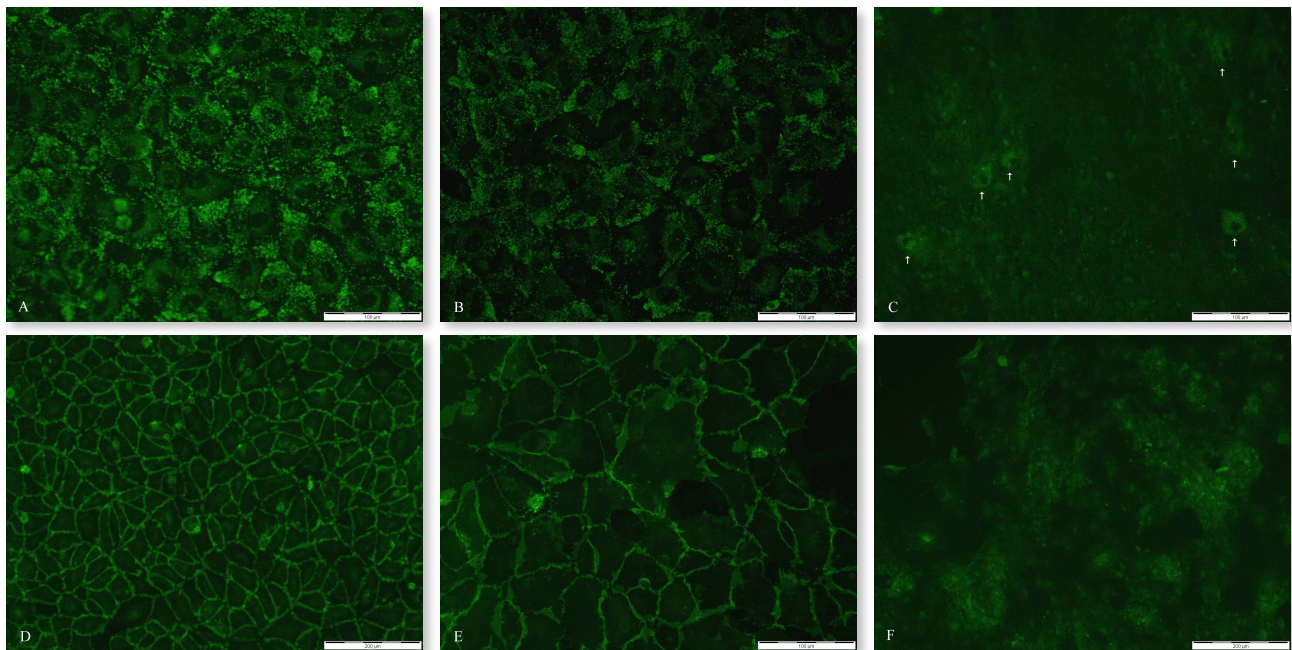
Cellijn	Cellijn specifieke merker	Histologische / Immunocytochemische assay
Adipogene	Vetaccumulatie	Oil Red O LipidTox
Osteogene	Gecalcifieerde matrix	Von Kossa
Chondrogene	Gesulfateerde proteoglycanenrijke matrix	Alciaan Blauw



*Figuur 10: Foto's na trilineage differentiatie van ADSCs **A** Oil Red O kleuring na 14 dagen in adipogeen differentiatie medium toont duidelijke roodverkleuring van vetaccumulatie wat wijst op geslaagde differentiatie tot adipocyten **B** HCS LipidTOX™ green lipid kleuring toont onder fluorescentiemicroscopie vetaccumulatie na cultuur in adipogeen differentiatie medium voor 14 dagen **C** Von Kossa kleuring toont gecalcificeerde matrix aan na 14 dagen cultuur in osteogeen differentiatie medium door precipitatie van zilverionen (zwart op foto) **D** Alciaan blauw kleuring toont de aanwezigheid van een zure proteoglycaanrijke matrix, dit wijst op een geslaagde differentiatie tot chondrocyten na 21 dagen cultuur in chondrogeen differentiatie medium. Schaal: 50 µm. De foto's zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B.*

5. Endotheliale differentiatie van ADSCs

Na veertien dagen in cultuur brengen van ADSCs in endotheliaal differentiatiedmedium werd een immunokleuring uitgevoerd tegen de intracellulaire merker vWF en de extracellulaire merker CD31. Deze kleuring werd eveneens uitgevoerd bij de controle human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). De fluorescentiefoto's van de HUVECs toonden duidelijke aankleuring van intracellulaire vWF, exclusief nucleus. Ook de extracellulaire merker CD31 kleurde duidelijk aan bij de controles. De gedifferentieerde ADSCs vertoonden slechts in een beperkt aantal cellen duidelijke intracellulaire aankleuring van vWF. Deze cellen werden op onderstaande foto (Figuur 11C) aangeduid met een witte pijl. De CD31 kleuring kon geen ADSCs aankleuren na 14 dagen cultuur in endotheliaal differentiatiedmedium. We kunnen hieruit besluiten dat het induceren van de expressie van de endotheliale markeringen vWF en CD31 bij ADSCs slechts in zeer beperkte mate succesvol is, indien men het huidige protocol hanteert.



Figuur 11: vWF en CD31 kleuring van HUVECs en ADSCs na 14 dagen cultuur in EBM-2. A,B Controle HUVECs toonden duidelijk cytoplasmatische aankleuring van vWF. Eveneens zijn de nuclei zichtbaar door non-captatie van de kleuring. *C* ADSCs in endotheliaal differentiatiedmedium toonde slechts een zeer beperkt aantal cellen. Een zestal cellen (witte pijlen) vertonen duidelijk intracytoplasmatische aankleuring van vWF en contrast met de niet aangekleurde nuclei. *D,E* Na CD31 kleuring van controle HUVECs is er duidelijk extracellulaire aankleuring van CD31. *F* Er konden geen cellen met een duidelijke kleuring van CD31 worden aangetoond bij ADSCs na cultuur in endotheliaal differentiatiedmedium. Schaal: 100µm (A,B,C,D); 200µm (E,F). Alle foto's zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B.

6. Proliferatie assay

De resultaten van de MTS proliferatie assay werden uitgelezen door de ELISA reader na 24, 48 en 72 uur. Het effect van verschillende PRP concentraties op de proliferatie van zowel ADSCs en ECs werd nagegaan. Als negatieve controle werd FBS-vrij medium (DMEM-Glutamax) gebruikt. Voor het positieve controle medium werd 10% FBS toegevoegd aan DMEM-Glutamax. Als PRP concentraties werden verdunningen van 2×10^6 plts/mL gebruikt, uitgedrukt in percentages. Een overzicht van de gebruikte verdunningen is te vinden in tabel 5.

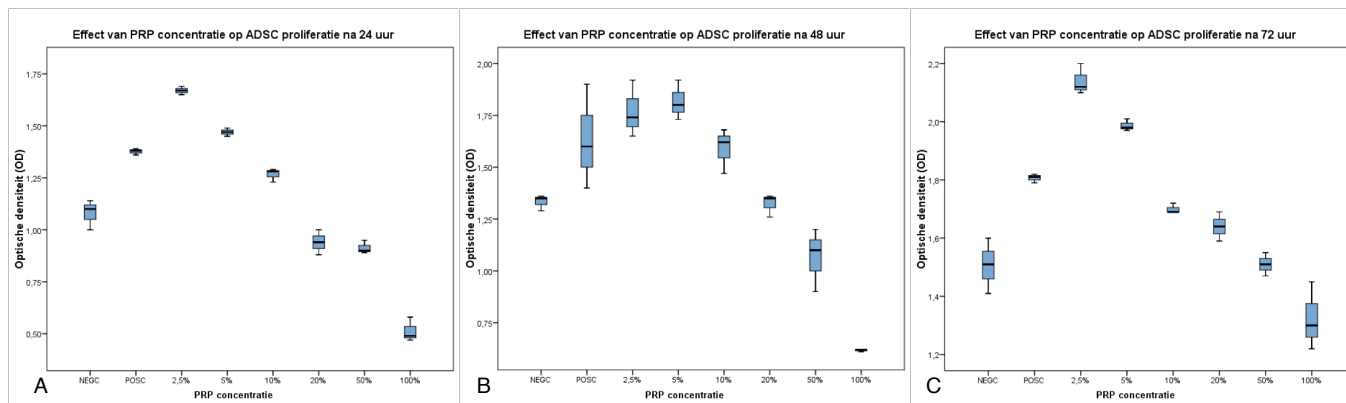
Tabel 5: Overzicht van gebruikte PRP concentraties

Concentratie (plts/mL)	Percentage van oorspronkelijke concentratie (%)
2×10^6	100
1×10^6	50
4×10^5	20
2×10^5	10
1×10^5	5
5×10^4	2,5

6.1 Effect van PRP op ADSC proliferatie

De resultaten van de MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 24, 48 en 72 uur zijn onder de vorm van gemiddelden en standaarddeviaties van optische densiteit weergegeven in Tabel 6-8, de grafische weergave ervan in Figuur 12.

Na analyse van deze resultaten aan de hand van de parametrische paired student-t test bleken PRP concentraties van 2,5% en 5% de ADSC proliferatie significant beter te stimuleren dan de positieve en negatieve controles na 24 en 72 uur ($p < 0,05$). Dit was niet te zien na 48 uur ten gevolge van de grote standaarddeviatie bij de positieve controles. Een PRP concentratie van 100% bleek ADSC proliferatie significant te inhiberen ten opzichte van de positieve controles na 24, 48 en 72 uur.



Figuur 12: Het effect van PRP concentratie op ADSC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 24, 48 en 72 uur. (NEGC = negatieve controle) (POSC = positieve controle) **A** Duidelijke toename van proliferatie na applicatie van 2,5% PRP. Eveneens overtuigend inhiberend effect van hoge concentraties (20%, 50% en 100%) **B** Geen duidelijke toename van ADSC proliferatie. Grote standaarddeviatie bij positieve controles. Inhiberend effect bij 100% PRP. **C** Toename van proliferatieve capaciteit bij 2,5% en 5% is op te merken. Inhiberend effect enkel bij 100% PRP overtuigend. De grafieken zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B. De resultaten van de paired student-t test zijn terug te vinden in appendix C.

Tabel 6: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 24 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,080	1,377	1,670	1,470	1,267	0,940	0,913	0,513
Std. Deviatie	0,072	0,015	0,020	0,020	0,032	0,060	0,032	0,059

Tabel 7: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 48 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,333	1,633	1,770	1,817	1,590	1,323	1,067	0,617
Std. Deviatie	0,038	0,252	0,137	0,096	0,108	0,055	0,153	0,006

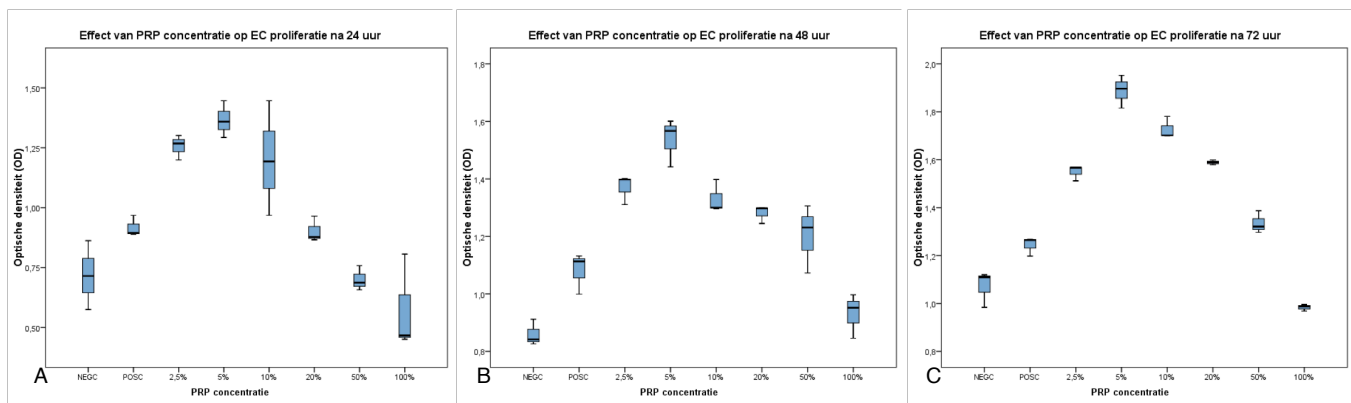
Tabel 8: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 72 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,507	1,807	2,140	1,987	1,700	1,640	1,510	1,323
Std. Deviatie	0,095	0,015	0,053	0,021	0,017	0,050	0,040	0,117

6.2 Effect van PRP op EC proliferatie

De resultaten van de MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 24, 48 en 72 uur zijn onder de vorm van gemiddelden en standaarddeviaties van optische densiteit weergegeven in Tabel 9-11, de grafische weergave ervan in Figuur 13.

Voor EC proliferatie zijn de significant beste concentraties 2,5% en 5%, na zowel 24, 48 als 72 uur ($p < 0,05$). Het effect van 2,5% na 72 uur was significant beter dan van 5% ($p = 0,026$). Hoge PRP concentraties bleken hier niet consistent inhiberend op de EC proliferatie.



Figuur 13: Het effect van PRP concentratie op EC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 24, 48 en 72 uur. (NEGC = negatieve controle) (POSC = positieve controle) **A** Overtuigend stimulerend effect van lage concentraties PRP (2,5%; 5% en 10%). Geen duidelijk verschil ten opzichte van de controles bij hoge concentraties (50%; 100%) **B** Stimulerend effect van lage concentraties PRP (2,5%; 5%; 10% en 20%). Geen inhiberend effect van hogere concentraties. **C** Duidelijk stimulerend effect van lage concentraties PRP (2,5%; 5%; 10% en 20%). Groot verschil in gemiddelde waarden voor optische densiteit tussen 2,5% en 5%. De grafieken zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B. De resultaten van de paired student-t test zijn terug te vinden in appendix C.

Tabel 9: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op EC proliferatie na 24 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	0,717	0,917	1,256	1,366	1,202	0,903	0,701	0,575
Std. Deviatie	0,144	0,044	0,052	0,077	0,239	0,054	0,052	0,201

Tabel 10: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op EC proliferatie na 48 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	0,860	1,081	1,370	1,537	1,332	1,281	1,203	0,932
Std. Deviatie	0,046	0,072	0,051	0,084	0,057	0,031	0,119	0,078

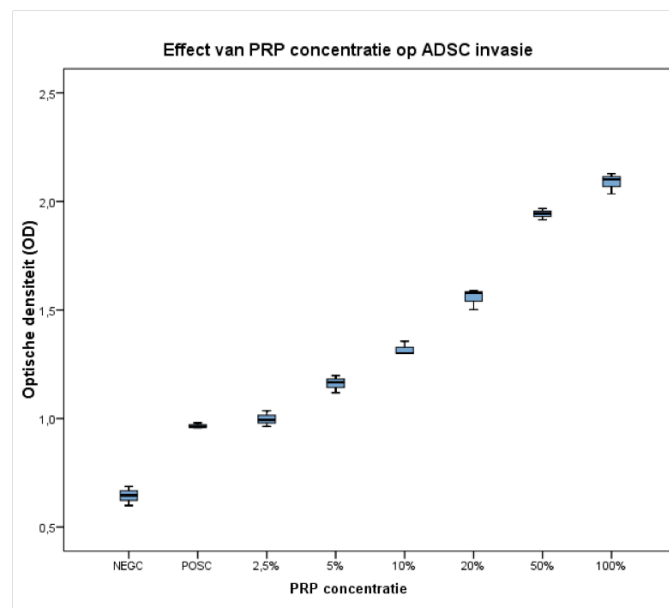
Tabel 11: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op EC proliferatie na 72 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,071	1,244	1,549	1,888	1,728	1,589	1,335	0,984
Std. Deviatie	0,076	0,040	0,032	0,068	0,046	0,010	0,047	0,014

7. Invasie assay

De resultaten van de MTS assay voor het effect van PRP concentratie op invasie van ADSCs zijn onder de vorm van gemiddelden en standaarddeviaties weergegeven in Tabel 12, de grafische weergave ervan in Figuur 14.

Alle PRP concentraties, met uitzondering van 2,5%, geven sterk significant ($p < 0,005$) betere resultaten wat betreft ADSC invasie ten opzichte van de positieve controles (10% FBS) en de negatieve controles. Een PRP concentratie van 2×10^6 plts/mL (100%) blijkt significant beter dan alle andere concentraties. ($p < 0,05$) Geen enkele PRP concentratie had een significant inhiberend effect op ADSC invasie.



Figuur 14: Het effect van PRP concentratie op ADSC invasie uitgedrukt in optische densiteit. Hoge PRP concentraties stimuleren de invasie van ADSCs overtuigend beter dan de positieve en negatieve controles. Een PRP concentratie van 100% geeft duidelijk de beste resultaten. Geen van de concentraties blijken een inhiberend effect op ADSC invasie te hebben. De grafiek is in groot formaat terug te vinden in appendix B. De resultaten van de paired student-t test zijn terug te vinden in appendix C.

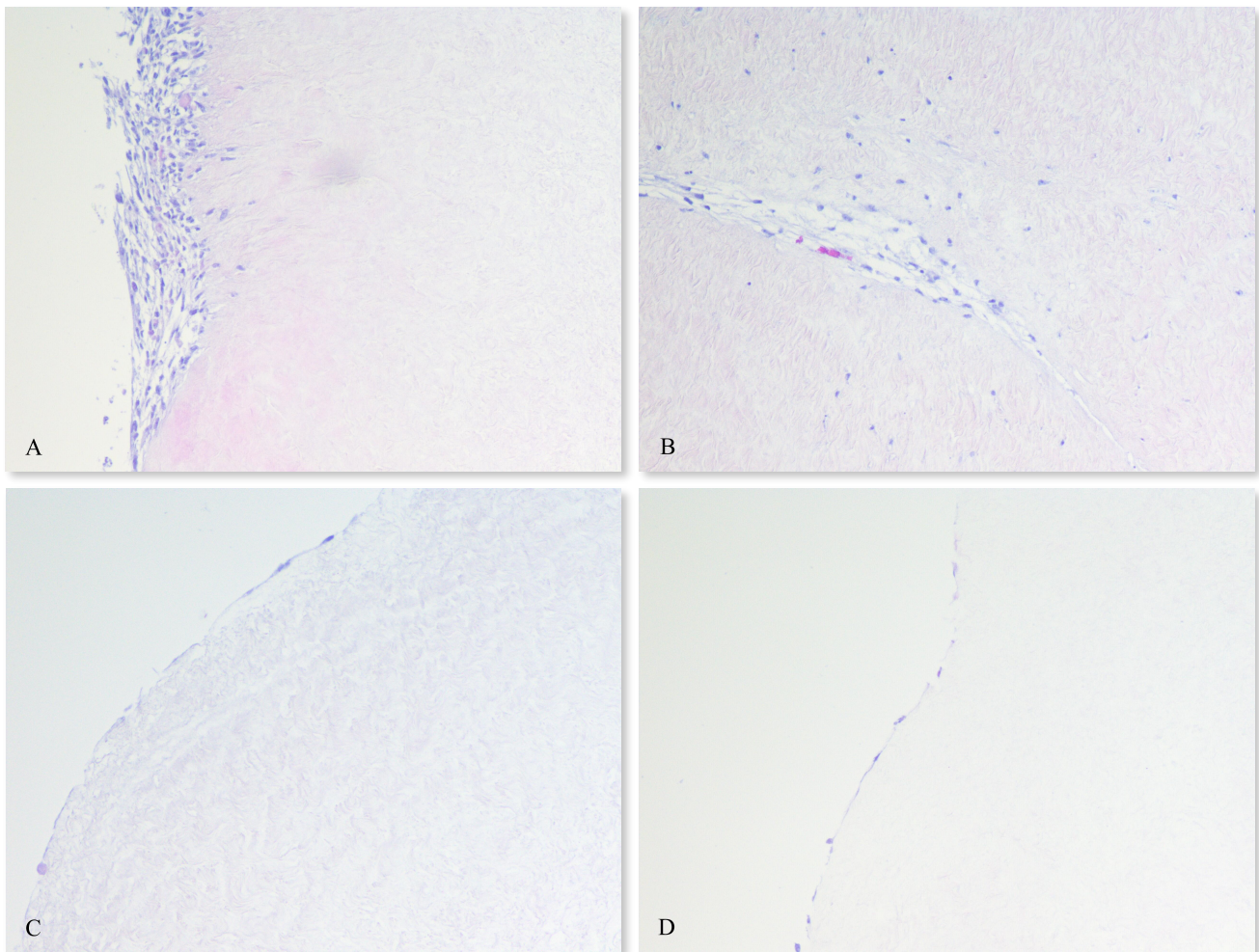
Tabel 12: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC invasie.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	0,64433	0,96633	0,99800	1,16133	1,31867	1,55633	1,94267	2,08833
Std. Deviatie	0,044061	0,012097	0,036166	0,039804	0,032347	0,047269	0,025580	0,047983

8. Statisch repopulatiemodel

Voor de repopulatie van de acellulaire scaffolds werden twee protocols gehanteerd. Na de statische bezaaiing aan de hand van cilinders toonden de kleppen bezaaid met ADSCs eenzijdige oppervlakkige celadhesie. Op de coupes werden na HE-kleuring immers multiplale cellagen waargenomen op het kleppoppervlak. Ook invasie van de vetstamcellen in het klepstroma kon worden waargenomen na een week incubatie.

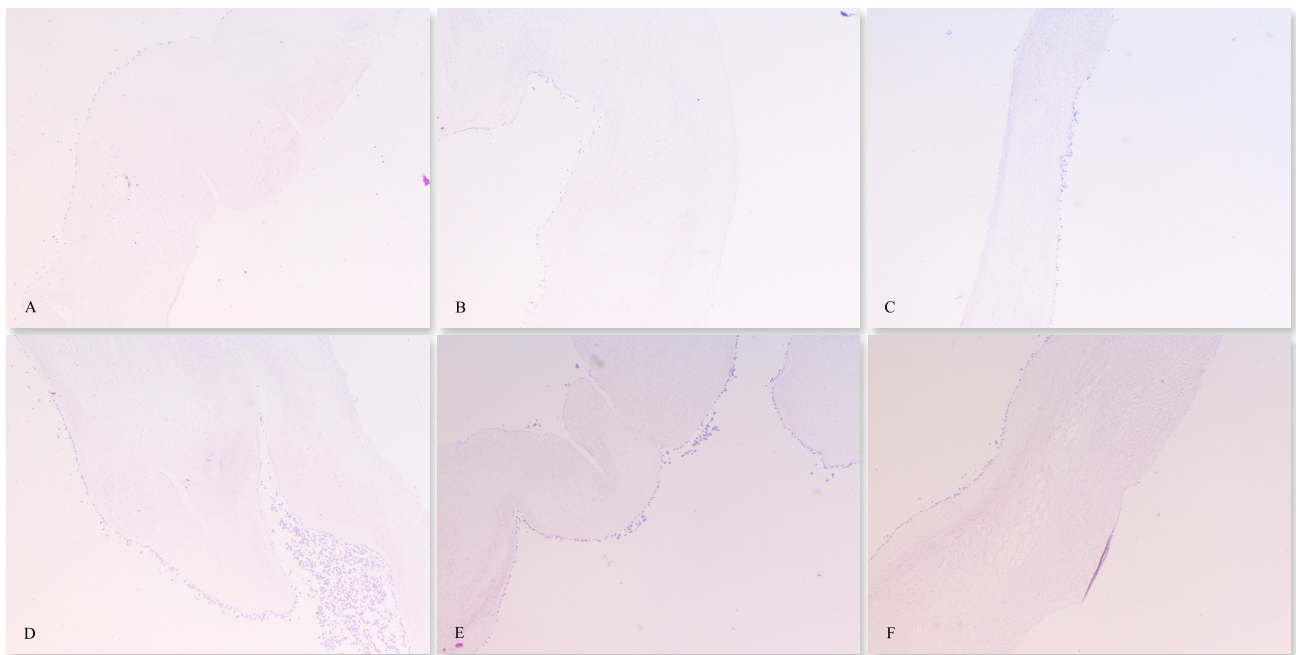
Het bezaaien van de matrices met HUVECs resulteerde in zeer beperkte tot afwezige celadhesie en geen invasie. De coupes van de bezaaide klepbladen zijn weergegeven onder Figuur 15.



*Figuur 15: Haematoxyline-eosine kleuring van bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes aan de hand van de cilindermethode **A,B** Matrices na bezaaiing met ADSCs. Er is oppervlakkige celadhesie van multiplale lagen en celinvasie waar te nemen. **C,D** Matrices na bezaaiing met HUVECs. Er zijn slechts een minimaal aantal cellen waar te nemen op het kleppoppervlak en er is geen sprake van invasie. Vergroting: 20x. Alle foto's zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B.*

Het bezaaien van de scaffolds met ADSCs aan de hand van druppeltitratie resulteerde duidelijk in unilaterale oppervlakkige celadhesie, maar slechts minimale celinvasie. Er werd geen verschil waargenomen tussen de klepbladen opgeladen met PRP en de controlematrices.

De HE-kleuring van de acellulaire klepbladen bezaaid met HUVECs aan de hand van druppeltitratie toonde dense oppervlakkige celadhesie. Op het controlepreparaat werden lokaal ook conglomeraten van endotheel aangetroffen. Op de coupes werden geen geïnvadeerde cellen opgemerkt. Overigens waren er geen opmerkelijke verschillen tussen controle en opgeladen matrices waar te nemen. De coupes van de bezaaide klepbladen zijn weergegeven onder Figuur 16.



*Figuur 16: Haematoxyline-eosine kleuring van bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes door middel van druppeltitratie **A** Controlematrices na bezaaiing met ADSCs. Er is oppervlakkige celadhesie en celinvasie waar te nemen. **B,C** Opgeladen matrices na bezaaiing met ADSCs. Er is oppervlakkige celadhesie en celinvasie waar te nemen. **D** Controlematrices na bezaaiing met HUVECs. Er is oppervlakkige celadhesie van multiële cellagen en celinvasie waar te nemen. **E,F** Opgeladen matrices na bezaaiing met HUVECs. Er is unilaterale celadhesie op te merken, maar geen celinvasie. Vergroting: 3.2x. Alle foto's zijn in groot formaat terug te vinden in appendix B.*

DISCUSSIE

De ontwikkeling van een tissue geëngineerde hartklep verdient veel aandacht omdat het een veelbelovend alternatief kan vormen voor de huidige gebruikte mechanische kleppen en bioprothesen. Het doel van dit werk was om te evalueren in welke mate ADSCs geschikt zijn voor de repopulatie van gedecellulariseerde matrices en in welke mate ze de capaciteit bezitten om te differentiëren tot endotheelcellen. Om na te gaan wat het effect is van groeifactoren op de repopulatie werd de optimale PRP concentratie voor proliferatie en invasie van de stamcellen in een apart luik geëvalueerd.

1. Decellularisatie

Het decellularisatieproces is van cruciaal belang bij tissue engineering. De matrices moeten maximaal ontdaan worden van cellen, maar tevens moeten de structurele en mechanische eigenschappen van de klep bewaard blijven. Uit een vergelijkende studie van verschillende decellularisatieprotocollen werd de detergent-enzymatische decellularisatie methode als meest effectieve bevonden. De decellularisatie kan zoals in deze studie vermeld wordt op verschillende manieren geschieden maar allen brengen een verandering teweeg in de structuur van de extracellulaire matrix. (77)

Men ziet dat hoe langer de matrices gedecellulariseerd worden, hoe zwakker de resultaten zijn bij het testen van de mechanische kracht van de klep. Porcien materiaal bleek hierbij meer bestendig te zijn dan ovien weefsel. (78) Wanneer de Triton en trypsine decellularisatie methoden met elkaar worden vergeleken, concludeert men dat trypsine zorgt voor een beduidend verlies van het elastine, wat met Triton niet het geval is. Dit zou een belangrijke impact hebben op de uitrekbaarheid en stijfheid van de klep. Wat betreft collageen is er bij beide een beperkt verlies van hoeveelheid en densiteit van de collageenvezels. (79) Daar collageen essentieel is voor de mechanische kracht van de klep, kan een dergelijk verlies nefaste functionele gevolgen inhouden. (80) Een significant verlies aan proteoglycanen blijkt onvermijdelijk bij de verschillende methoden van decellularisatie. (77)

De voornaamste reden voor het dysfunctioneren van een bioprothese is calcificatie. Men ziet daarbij met behulp van lichtmicroscopie een beduidende deterioratie van het collageen in de kleppen. (81) De immunologische basis van calcificatie en dus degeneratie van een bioprothese was sinds lange tijd onbegrepen. Het algemeen mechanisme bestaat erin dat rondcirculerende immunoglobulines de klepmatrix invaderen, waarop macrofagen en erythrocyten zich vasthechten op de klep. Dit proces zorgt voor calcificatie van de klepbladen door afbraak van het collageen. (82) De inflammatoire respons die hiervoor verantwoordelijk is zou de aanwezigheid kunnen zijn van IgM-antilichamen gericht tegen het α -Gal epitoom dat voorkomt op fibrocyten in het bindweefsel van het porcine materiaal. Dit werd onderzocht in de studie van *Konakci et al.* waar men tot de conclusie kwam dat er een augmentatie was van de hoeveelheid anti- α -Gal-antilichamen in de circulatie na transplantatie met een bioprothese in vergelijking met een mechanische klepprothese. Rekening houdend met het feit dat we in ons onderzoek vertrekken van een gedecellulariseerde matrix, waarbij er geen fibrocyten meer aanwezig zijn in de matrix en dus ook geen α -Gal-epitopen, zou

deze immuunrespons vermeden kunnen worden. Dit leidt tot minder rejectie en minder afbraak door calcificatie op lange termijn. (83)

2. Isolatie van ADSCs

Het onderzoek naar het gebruik van stamcellen voor tissue engineering is de laatste decennia sterk toegenomen. Adipose derived stem cells winnen aan interesse omdat ze een aantal voordelen bezitten ten opzichte van mesenchymale stamcellen geïsoleerd uit beenmerg. De procedure voor het isoleren van vetweefsel is veel eenvoudiger en minder belastend voor de patiënt. Daarenboven is vetweefsel meer abundant in het menselijk lichaam dan andere bronnen van stamcellen. Uit de resultaten van een studie van *Zhang et al.* blijkt dat ADSCs talrijker aanwezig zijn in vetweefsel van oudere personen. Hierbij moet worden opgemerkt dat, door opstapeling van genetische defecten, de kwaliteit van de stamcellen mogelijks achteruitgaat met de leeftijd. (48)

Het isoleren van ADSCs aan de hand van het gebruikte protocol leverde snel goede resultaten met confluente binnen de week na het opstarten van de celculturen. Adherentie aan plastic, onbeperkte cultivatie en differentiatie tot de adipogene, chondrogene en osteogene cellijnen bevestigden in dit onderzoek het multipotentiële karakter van de geïsoleerde ADSCs. Dit is conform de resultaten die *Zuk et al.* in 2001 publiceerden. (45) Algemeen wordt aangenomen dat men van stamcellen mag spreken van zodra aan voorgenoemde voorwaarden voldaan is. Idealiter zou men echter aan de hand van flow cytometrie een aantal veelvoorkomende oppervlaktemerkers kunnen kwantificeren om hieromtrent zekerheid te verkrijgen. Deze oppervlaktemerkers, zoals CD29, CD44 en CD90 komen zowel op humane als porciene ADSCs tot expressie. Toch is meer onderzoek nodig naar de overeenkomsten en verschillen tussen porciene en humane merkers van ADSCs. (49, 84)

3. Isolatie van natieve endotheelcellen

Als controle voor het uitvoeren van de proeven met ADSCs was er nood aan natieve endotheelcellen. Voor de isolatie van deze cellen uit porciene bloedvaten werden twee protocols gehanteerd. Bij de eerste methode werd getracht de endotheelcellen te isoleren uit de vena femoralis. Het falen van de isolatie van endotheelcellen kan mogelijks te wijten zijn aan een te klein kaliber van de vene, wat onvoldoende cellen voortbrengt voor *in vitro* expansie. Anderzijds zou het gebruik van enkel collagenase onvoldoende kunnen zijn voor het losmaken van de cellen. In een studie van *Cheung et al.* blijkt dat het gebruik van enkel collagenase significant meer cellen geeft, maar voornamelijk door contaminatie van intersitiële cellen. Een combinatie van collagenase en dispase zou meer pure populaties van endotheelcellen voortbrengen. (85)

De tweede methode is gebaseerd op een endotheel isolatieprotocol bij katten. (86) Hier werd wel degelijk dispase aan de enzyme oplossing toegevoegd. Een beperking aan dit protocol is mogelijks het niet voorverwarmen van de gebruikte PBS om de aorta voorafgaandelijk te spoelen. De enzyme oplossing dient voorverwarmd geapliceerd te worden om optimaal in te werken. Aangezien door de spoeling de aorta aanzienlijk afgekoeld was, kan de enzyme mixtuur mogelijks niet voldoende effect gehad hebben om gepaste hoeveelheden endotheelcellen los te maken. Daarenboven kon de opstelling om steriliteitsredenen niet in de incubator worden geplaatst, wat mogelijkerwijs bij heeft gedragen tot het niet slagen van de isolatie.

Uiteindelijk werd beslist om af te stappen van het idee om porcien endotheel te gebruiken en werd geopteerd voor endotheelcellen van humane origine. Deze ‘human umbilical vein endothelial cells’ hebben als voordeel dat zij eenvoudig geïsoleerd kunnen worden uit navelstrengen, die in overmaat beschikbaar zijn. Navelstrengen zijn aldus sinds geruime tijd de majeure bron voor isolatie van endotheelcellen. (87) Deze HUVECs bezitten een zekere immunologische naïviteit, daar zij afkomstig zijn van foetaal weefsel. Dit onderscheidt hen op vlak van antigenpresentatie en cytokinerespons van matuur endotheel. (87)

Zheng et al. toonde aan dat er een verschil bestaat tussen humane en porciene endotheelcellen betreffende de immunologische mechanismen bij transplantatie. De HLA klasse I molecule op porciene endotheelcellen wordt herkend door de CD8⁺ T-lymfocyten van de acceptor en dit speelt een voorname rol bij rejectie. Men zag daarbij dat de doelwitten van het immuunsysteem verschillen tussen humane en porciene endotheelcellen. Porciene endotheelcellen zijn hierdoor meer vatbaar voor Fas-L, dat voorkomt op het oppervlak van CD8⁺ T-lymfocyten en apoptose kan induceren van de cel waarmee het contact maakt. Concluderend kan worden gesteld dat porcien endotheel frequenter het doelwit is van cytotoxische T-lymfocyten dan humaan endotheel. In ons onderzoek werd gebruik gemaakt van HUVECs om de acellulaire scaffolds te bezaaien. Aangezien humane cellen minder vatbaar zijn voor apoptose via de Fas-FasL pathway, zou de reactie van het immuunsysteem bij gebruik van HUVECs omzeild kunnen worden. (88) Hierbij dient opgemerkt te worden dat bezaaiing met enkel endotheelcellen niet compenseert voor het stromale celverlies van het klepblad, wat nefast is voor de structuur en mechanische sterkte ervan. Idealiter zouden humane adipose stamcellen de scaffold volledig repopuleren en oppervlakkig differentiëren tot endotheelcellen.

4. Differentiatie van ADSCs

Dit onderzoek zou de basis kunnen vormen voor toekomstige klinische toepassingen van tissue geëngineerde hartkleppen. Hiervoor moeten porciene hartkleppen worden gedecellulariseerd en opnieuw bezaaid worden met humane stamcellen. Zo zou de immunologische degradatie van de bioprothese kunnen worden omzeild. Om echter kwalitatieve kleppen te verwezenlijken dienen deze stamcellen zich te differentiëren tot gespecialiseerde celtypes, waaronder het endotheel.

Het differentiëren van ADSCs tot endotheel is mogelijk gebleken uit een aantal studies. Dit werd bewezen door het aantonen van enerzijds morfologische karakteristieken en anderzijds de expressie van specifieke endotheliale merkers. (48, 54, 57, 59, 60)

In ons onderzoek toonde CD31 en vWF kleuringen geen duidelijke expressie van deze merkers na veertien dagen incubatie in endotheliaal differentiatiemedium. Mogelijks kan dit verklaard worden door een suboptimale samenstelling van het medium. Het toevoegen van 50 ng/mL VEGF aan EGM zou een significante toename van vWF en eNOS productie teweegbrengen. (48) VEGF is een groeifactor die angiogenese stimuleert en gekend is om endotheliale differentiatie te induceren bij stamcellen. Nochtans wordt dit door recente studies in zeker mate weerlegd. In een studie van *Konno et al.* wordt immers aangetoond dat basic fibroblast growth factor (bFGF, ook FGF2 en FGF-β) - aan een optimale concentratie van 10 ng/mL - onontbeerlijk is voor het tot expressie brengen van endotheliale merkers bij ADSCs.

Daarentegen blijkt VEGF hierop geen significant effect te hebben in afwezigheid van bFGF. (89) In een andere studie, waar endothelial cell growth medium-2 (EGM-2) met hoge concentraties (50 - 100 ng/mL) VEGF werd vergeleken met EGM-2 zonder VEGF, werd aangetoond dat VEGF noch de proteïne- noch de genexpressie van vele endotheliale markers significant deed toenemen. De proteïne expressie van Ephrin-B1, een arteriële marker, werd wel duidelijk significant beïnvloed door hoge VEGF concentraties. Hieruit kan worden besloten dat hoewel VEGF geen prominente rol zou spelen in de differentiatie van mesenchymale stamcellen tot endotheelcellen, het wel het arteriële lot van stamcellen kan moduleren. (90) Dit is een interessant gegeven daar scaffolds ontwikkeld met arteriële cellen superieure mechanische eigenschappen bevatten tegenover met veneuze cellen geconstrueerde scaffolds. (91)

5. PRP

PRP vormt een relatief eenvoudige en goedkope bron van groeifactoren zoals PDGF, bFGF, VEGF, IGF-1, IGF-2, EGF en TGF- β . (71) Het is om deze reden dat het gebruik van PRP in tissue engineering zijn opmars maakt. Het effect van verschillende PRP concentraties op de proliferatie, migratie en invasie van mesenchymale stamcellen werd reeds in het schaapmodel bestudeerd. (73) Studies omtrent het effect van PRP op gecultiveerde ADSCs - al dan niet van porcine oorsprong - zijn echter schaars. Daarenboven kan, wegens het gebrek aan gestandaardiseerde protocols, de samenstelling van het PRP sterk variëren tussen onderzoeksgroepen en leiden tot verschillen in resultaten. (92) In deze studie werd gepoogd een vergelijking te maken van het effect van verschillende PRP concentraties op ADSC en EC proliferatie enerzijds en ADSC invasie anderzijds.

Het proliferatief effect van PRP op de proliferatie van vetstamcellen bleek optimaal bij lage concentraties. PRP concentraties van 2,5% en 5% stimuleerden proliferatie van ADSCs significant beter dan 10% FBS (positieve controle) en negatieve controles ($p < 0,05$). Dit was het geval na 24 en 72 uur. Het effect van 2,5% en 5% PRP op ADSC proliferatie was na 48 uur significant beter ten opzichte van de negatieve controles, maar niet ten opzichte van de positieve controles. Dit zou te wijten zijn aan de grote standaarddeviatie bij de positieve controles. Hoge concentraties PRP inhiberen ADSC proliferatie. Dit blijkt uit de resultaten na 24, 48 en 72 uur. Na 24 uur inhiberen concentraties van 20%, 50% en 100% de proliferatie ten opzichte van de positieve en negatieve controles. Na 48 uur is dit enkel voor 100% PRP het geval en na 72 uur inhiberen 10%, 20%, 50% en 100% de proliferatie significant ten opzichte van de positieve controles, maar niet ten opzichte van de negatieve controles. Naar verder onderzoek toe is het aan te bevelen lage concentraties PRP te gebruiken (in grootteordes van 5×10^4 - 1×10^5 plts/mL) om optimale stamcelproliferatie te beogen. Deze resultaten zijn conform de resultaten van een eerdere studie over het effect van PRP op ovine mesenchymale stamcellen. (73) Uit een studie van *Kakudo et al.* over het effect van PRP concentratie op humane ADSC proliferatie bleek een PRP concentratie van 5×10^4 plts/mL eveneens de optimale concentratie. (93)

De resultaten van het effect van PRP concentratie op EC proliferatie toonden eveneens dat lage concentraties de proliferatie optimaliseerden. Na 24 uur bleken concentraties van 2,5% en 5% de EC proliferatie significant beter te stimuleren dan de positieve en negatieve controles. Het verschil tussen de twee was echter niet significant ($p = 0,091$). De andere concentraties hadden geen stimulerend, noch inhiberend effect

na 24 uur. Na 48 uur bleek het stimulerend effect van 2,5% sterk significant ($p < 0,005$) ten opzichte van de positieve en negatieve controles. Voor een concentratie van 5% was dit significant ($p < 0,05$). Het verschil in effect tussen beiden concentraties was niet significant ($p = 0,0143$). Na 72 uur stimuleerden concentraties van 2,5%, 5%, 10% en 20% de EC proliferatie significant ten opzichte van de negatieve en positieve controles. Daarenboven is een concentratie van 2,5% significant superieur aan een concentratie van 5% ($p = 0,026$). Een concentratie van 100% bleek de proliferatie enkel significant te inhiberen ten opzichte van de positieve controles, maar niet ten opzichte van de negatieve controles. Deze resultaten komen overeen met de resultaten die eerder voor het effect van PRP concentratie op ADSC proliferatie werden besproken. Hierbij dient te worden opgemerkt dat hoge PRP concentraties - in tegenstelling tot bij ADSCs - de proliferatie van ECs niet overtuigend inhiberen. Mogelijks wordt dit inhiberend effect pas duidelijk wanneer gebruik wordt gemaakt van nog hogere concentraties PRP ($> 2 \times 10^6$ plts/mL). In toekomstig onderzoek kan het gebruik van PRP concentraties van 5×10^4 plts/mL worden aanbevolen om snelle EC proliferatie te realiseren.

Het invaderen van ADSCs in de acellulaire matrix zou aanleiding kunnen geven tot de vorming van VICs en zo de verloren mechanische sterkte van de klep kunnen recupereren. Om na te gaan wat het effect van PRP concentratie is op deze invasie van ADSCs werd een invasie assay opgesteld. De resultaten hiervan tonen dat PRP concentraties van 5%, 10%, 20%, 50% en 100% allen de invasie van ADSC significant stimuleren ten opzichte van de positieve en negatieve controles. Voor de PRP concentratie van 2,5% is dit significant ($p = 0,017$) ten opzichte van de negatieve controles, maar niet significant ($p = 0,317$) ten opzichte van de positieve controles. Een PRP concentratie van 100% is significant superieur aan de andere concentraties ($p < 0,05$). Geen van de concentraties heeft een significant inhiberend effect op ADSC invasie ten opzichte van de positieve en negatieve controles.

Proteoglycanen zijn een essentieel onderdeel van de extracellulaire matrix en interageren met de andere componenten ervan, zoals het voorgenoemde elastine en collageen. (94) Zonder deze proteoglycanen wordt de oplading en release van de scaffold met groeifactoren sterk belemmerd, aangezien deze binden op proteoglycanen. Eerdere experimenten hebben reeds aangetoond dat preloading van de matrices met heparine de opname en vrijstelling van groeifactoren, afkomstig van PRP, significant verbetert. Daarom werden *in casu* de klepbladen voor het opladen met PRP 2 uur geïncubeerd in een 2 mg/mL heparine oplossing. (73) Het is belangrijk om verder onderzoek te verrichten naar methoden van decellularisatie die zo weinig mogelijk veranderingen teweeg brengen aan de componenten en de samenstelling van de extracellulaire matrix.

6. Repopulatiemodellen

Voor de statische repopulatie werden twee verschillende protocols gehanteerd. In de eerste methode werd gebruik gemaakt van cilinders die op de klepbladen werden geplaatst, waarin vervolgens de celsuspensies werden getitreerd. In de tweede methode werd geen gebruik gemaakt van deze cilinders en werden de klepbladen in 48-well platen geplaatst alvorens ze te bezaaien aan de hand van druppeltitratie.

De resultaten van de met ADSCs bezaaide klepbladen tonen duidelijk oppervlakkige celadhesie en invasie bij gebruik van de eerste methode. Wanneer het protocol van druppeltitratie werd gehanteerd werd er geen

duidelijk verschil opgemerkt tussen de controles en de opgeladen klepbladen. Beide toonden beperkte celadhesie. De minimale invasie die werd opgemerkt bij de bezaaiing van de opgeladen matrices is mogelijks te wijten aan onvolledige decellularisatie. De betere resultaten bij het gebruik van de cilinders kunnen eventueel verklaard worden door meer locale applicatie van de cellen. Bij de druppeltitratiemethode bestaat immers de mogelijkheid dat cellen niet op het klepblad resideren, maar aflopen naar de periferie. Hetzelfde geldt voor het PRP waarmee de klepbladen werden opgeladen.

In tegenstelling tot het voorgaande zijn de resultaten na applicatie van HUVECs op de acellulaire scaffolds superieur na druppeltitratie in vergelijking met de cilindermethode. Dit is mogelijks te verklaren door het verschil in celdensiteit dat werd gehanteerd voor beide protocols. Aangezien bij de druppeltitraties zes maal hogere celconcentraties werden gebruikt voor het uitvoeren van het experiment, zou kunnen worden besloten dat optimale celadhesie van endotheelcellen pas plaatsvindt bij hoge concentraties. Anderzijds zou het kunnen dat de cilinders niet voldoende aansloten op de klepbladen en dat een verlies aan PRP en HUVECs de oorzaak vormt van de mislukte repopulatie. Dat er geen invasie werd waargenomen onder beide condities hoeft niet te verwonderen daar endotheelcellen karakteristiek oppervlaktecellen zijn. De cel adhesie werd overigens zowel bij de ADSCs als de HUVECs enkel waargenomen aan één zijde van het klepblad. Dit valt te verklaren door de unilaterale bezaaiing van de matrices. De cilinders die instonden voor de bezaaiing van de controlematrices verloren tijdens de experimenten hun inhoud. Dit verlies aan PRP en cellen heeft er toe geleid dat de klepbladen acellulair bleven. Er zijn van deze controlepreparaten om die reden geen foto's genomen.

De volgende stap in dit onderzoek zou zijn acellulaire scaffolds te bezaaien en in te naaien in een bioreactor. Zo zou de repopulatie op een dynamische manier kunnen geëvalueerd worden. Het gebruik van een bioreactor in tissue engineering kent tal van mogelijkheden. Cel stimulatie vormt daar een van. Mechanische stimulatie zal bepaalde gen- en proteïne expressie in cellen stimuleren. Een van de voornaamste voorbeelden hiervan is de significante productietoename van extracellulaire matrix in vergelijking met scaffolds in statische cultuur. (76) Significante toename van collageen, actine en fibronectine expressie is beschreven bij bezaaide scaffolds na plaatsing in een bioreactor. Daarenboven blijken dynamisch gerecellulariseerde scaffolds mechanisch superieur te zijn aan statische controles. Dit is mogelijks te verklaren door de hogere concentraties aan collageen. (95)

Ook celdifferentiatie kan worden gefaciliteerd door de mechanische stress uitgeoefend door de bioreactor flow. Zo is endotheliale differentiatie van MSCs onder de invloed van 'shear stress' superieur aan statische differentiatie (cf. supra). (59, 76)

7. Toekomstperspectieven

Wat betreft de decellularisatie kan nog verder onderzoek gebeuren naar optimalisatie van de protocols met het oog op meer behoud van structuur en mechanische functie van de klepbladen. Het protocol voor het isoleren van ECs moet duidelijk nog verder worden uitgewerkt. Dit ten einde een behoorlijke kwantiteit aan cellen te bekomen om in cultuur te brengen en te houden. Ook is er meer onderzoek vereist naar het endotheliaal differentiatiepotentieel van ADSCs. Hoewel er in de literatuur reeds beperkte resultaten beschreven zijn, zou men zich moeten toespitsen op het optimaliseren van het endotheliaal

differentiatiedmedium. Hiervoor zou men de stoffen die een rol spelen in de differentiatie van ADSCs naar endotheel moeten identificeren. Uit dit onderzoek is gebleken dat het opladen van scaffolds met PRP de proliferatie en invasie gunstig beïnvloedt. Deze resultaten kunnen in verder onderzoek naar tissue engineering worden gebruikt. Het dynamisch repopuleren van de scaffolds in een bioreactor is absoluut noodzakelijk omdat dit de *in vivo* situatie beter nabootst dan de statische repopulatie methode die in dit werk werd geëvalueerd. Uiteindelijk zou het interessant zijn om porcine scaffolds te bezaaien met ovine ADSCs en deze vervolgens te implanteren in het schaap. Deze matrices kunnen nadien immunologisch geëvalueerd worden, waarbij de mate van xenograft rejectie kan worden nagegaan. Finaal zouden gedecellulariseerde varkenskleppen bezaaid kunnen worden met humane ADSCs en worden gebruikt bij AVR met een mogelijks grotere duurzaamheid dan de huidige beschikbare bioprothesen.

REFERENCES

1. Misfeld M, Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2007;362(1484):1421-36.
2. McCarthy KP, Ring L, Rana BS. Anatomy of the mitral valve: understanding the mitral valve complex in mitral regurgitation. *European journal of echocardiography : the journal of the Working Group on Echocardiography of the European Society of Cardiology*. 2010;11(10):i3-9.
3. Rogers JH, Bolling SF. The tricuspid valve: current perspective and evolving management of tricuspid regurgitation. *Circulation*. 2009;119(20):2718-25.
4. Stamm C, Anderson RH, Ho SY. Clinical anatomy of the normal pulmonary root compared with that in isolated pulmonary valvular stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;31(6):1420-5.
5. Piazza N, de Jaegere P, Schultz C, Becker AE, Serruys PW, Anderson RH. Anatomy of the aortic valvar complex and its implications for transcatheter implantation of the aortic valve. *Circulation Cardiovascular interventions*. 2008;1(1):74-81.
6. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation*. 2007;115(3):377-86.
7. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC, Jr., Faxon DP, Freed MD, et al. 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *Circulation*. 2008;118(15):e523-661.
8. Vaes B, Rezzoug N, Pasquet A, Wallemacq P, Van Pottelbergh G, Mathei C, et al. The prevalence of cardiac dysfunction and the correlation with poor functioning among the very elderly. *International journal of cardiology*. 2012;155(1):134-43.
9. Osnabrugge RL, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, et al. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(11):1002-12.
10. Vahanian A, Alfieri O. Guidelines on valvular heart disease in clinical practice. *EuroIntervention*. 2013;9 Suppl:S11-3.
11. Singh JP, Evans JC, Levy D, Larson MG, Freed LA, Fuller DL, et al. Prevalence and clinical determinants of mitral, tricuspid, and aortic regurgitation (the Framingham Heart Study). *The American journal of cardiology*. 1999;83(6):897-902.
12. Kunkala MR, Schaff HV. Indications for and outcomes of valve replacement for asymptomatic aortic valve stenosis. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2013;9(1):23-7.
13. van Geldorp MW, Heuvelman HJ, Kappetein AP, Busschbach JJ, Takkenberg JJ, Bogers AJ. The effect of aortic valve replacement on quality of life in symptomatic patients with severe aortic stenosis. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*. 2013;21(1):28-35.
14. Pibarot P, Dumesnil JG. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*. 2009;119(7):1034-48.
15. Butany J, Ahluwalia MS, Munroe C, Fayet C, Ahn C, Blit P, et al. Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2003;12(1):1-22.
16. Rahimtoola SH. Choice of prosthetic heart valve for adult patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(6):893-904.
17. Zilla P, Brink J, Human P, Bezuidenhout D. Prosthetic heart valves: catering for the few. *Biomaterials*. 2008;29(4):385-406.
18. Matthews AM. The development of the Starr-Edwards heart valve. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital*. 1998;25(4):282-93.
19. Ross DN. Aortic-valve replacement. *Lancet*. 1966;2(7461):461-3.
20. Barratt-Boyes BG, Roche AH. A review of aortic valve homografts over a six and one-half year period. *Annals of surgery*. 1969;170(3):483-92.
21. Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *The Annals of thoracic surgery*. 2001;71(5 Suppl):S428-32.
22. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *The Annals of thoracic surgery*. 2005;79(3):1072-80.
23. Talman EA, Boughner DR. Glutaraldehyde fixation alters the internal shear properties of porcine aortic heart valve tissue. *The Annals of thoracic surgery*. 1995;60(2 Suppl):S369-73.
24. Iyer RK, Chiu LL, Reis LA, Radisic M. Engineered cardiac tissues. *Current opinion in biotechnology*. 2011;22(5):706-14.
25. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002;295(5557):1009-14.
26. Nerem RM, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue engineering*. 1995;1(1):3-13.

27. Martinez EC, Kofidis T. Adult stem cells for cardiac tissue engineering. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;50(2):312-9.
28. Narine KK, Kramm K, Dumont K, Jalali H, Sparks L, Segers P, et al. Hydrodynamic evaluation of kangaroo aortic valve matrices for tissue valve engineering. *Artificial organs*. 2006;30(6):432-9.
29. Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circulation research*. 2005;97(8):743-55.
30. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2008. 1268 p. p.
31. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(10):926-33.
32. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*. 1973;52(11):2745-56.
33. Brutsaert DL, Franssen P, Andries LJ, De Keulenaer GW, Sys SU. Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovascular research*. 1998;38(2):281-90.
34. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(4):261-70.
35. Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2001;220(1):1-17.
36. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(1):9-22.
37. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-61.
38. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2004;18(6):827-42.
39. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell stem cell*. 2007;1(1):35-8.
40. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(2):341-7.
41. Mantovani C, Terenghi G, Shawcross SG. Isolation of adult stem cells and their differentiation to Schwann cells. *Methods in molecular biology*. 2012;916:47-57.
42. Camargo FD, Finegold M, Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(9):1266-70.
43. Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature medicine*. 2003;9(12):1520-7.
44. Tallheden T, Dennis JE, Lennon DP, Sjogren-Jansson E, Caplan AI, Lindahl A. Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;85-A Suppl 2:93-100.
45. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
46. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6(1):7-14.
47. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-77.
48. Zhang P, Moudgill N, Hager E, Tarola N, Dimatteo C, McIlhenny S, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells from elderly patients with cardiovascular disease. *Stem cells and development*. 2011;20(6):977-88.
49. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
50. Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, Togashi K, Ohno T, Tamura T, et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system. *Cytotherapy*. 2008;10(4):417-26.
51. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology*. 2001;189(1):54-63.
52. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
53. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2004;14(4-6):311-24.
54. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;332(2):370-9.
55. Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2006;17(5-6):279-90.
56. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of cellular physiology*. 2006;208(1):64-76.

57. DiMuzio P, Tulenko T. Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose-derived stem cells. *Journal of vascular surgery*. 2007;45 Suppl A:A99-103.
58. Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of cellular physiology*. 2008;214(2):413-21.
59. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *The Journal of surgical research*. 2009;152(1):157-66.
60. Colazzo F, Chester AH, Taylor PM, Yacoub MH. Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells. *The Journal of heart valve disease*. 2010;19(6):736-44.
61. Wang JQ, Fan J, Gao JH, Zhang C, Bai SL. Comparison of in vivo adipogenic capabilities of two different extracellular matrix microparticle scaffolds. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013;131(2):174e-87e.
62. Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem cells and development*. 2009;18(8):1201-10.
63. DelaRosa O, Sanchez-Correa B, Morgado S, Ramirez C, del Rio B, Menta R, et al. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem cells and development*. 2012;21(8):1333-43.
64. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*. 2009;76(2):56-66.
65. Brody S, Pandit A. Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2007;83(1):16-43.
66. Mulholland DL, Gotlieb AI. Cardiac valve interstitial cells: Regulator of valve structure and function. *Cardiovascular Pathology*. 1997;6(3):167-74.
67. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003;35(2):113-8.
68. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *The American journal of pathology*. 2007;171(5):1407-18.
69. Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2007;362(1484):1445-57.
70. Butcher JT, Penrod AM, Garcia AJ, Nerem RM. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(8):1429-34.
71. Kruger JP, Freymann U, Vetterlein S, Neumann K, Endres M, Kaps C. Bioactive factors in platelet-rich plasma obtained by apheresis. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2013;40(6):432-40.
72. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(3):230-6.
73. Somers P, Robyns L, Nollet E, De Somer F, Cornelissen M, Thierens H, et al. Platelet gel supernatant as a potential tool to repopulate acellular heart valves. *Cell proliferation*. 2012;45(4):378-85.
74. Brick N. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *The American journal of nursing*. 2013;113(8):54.
75. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2009;15(3):431-5.
76. Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine*. 2011;19(1):55-69.
77. Somers P, De Somer F, Cornelissen M, Thierens H, Van Nooten G. Decellularization of heart valve matrices: search for the ideal balance. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. 2012;40(1-2):151-62.
78. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *Journal of structural biology*. 2003;143(3):201-8.
79. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2005;27(4):566-71.
80. Rodriguez KJ, Piechura LM, Porras AM, Masters KS. Manipulation of valve composition to elucidate the role of collagen in aortic valve calcification. *BMC cardiovascular disorders*. 2014;14(1):29.
81. Schoen FJ, Collins JJ, Jr., Cohn LH. Long-term failure rate and morphologic correlations in porcine bioprosthetic heart valves. *The American journal of cardiology*. 1983;51(6):957-64.
82. Human P, Zilla P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. *The Annals of thoracic surgery*. 2001;71(5 Suppl):S385-8.
83. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B, et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *European journal of clinical investigation*. 2005;35(1):17-23.
84. Song SH, Kumar BM, Kang EJ, Lee YM, Kim TH, Ock SA, et al. Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose, and ovarian tissues and their differentiation in vitro into putative oocyte-like cells. *Stem cells and development*. 2011;20(8):1359-70.

85. Cheung WY, Young EW, Simmons CA. Techniques for isolating and purifying porcine aortic valve endothelial cells. *The Journal of heart valve disease*. 2008;17(6):674-81.
86. Olyslaegers DA, Desmaretz LM, Dedeurwaerder A, Dewerchin HL, Nauwynck HJ. Generation and characterization of feline arterial and venous endothelial cell lines for the study of the vascular endothelium. *BMC veterinary research*. 2013;9:170.
87. Tan PH, Chan C, Xue SA, Dong R, Ananthesayanan B, Manunta M, et al. Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):171-83.
88. Zheng L, Ben LH, Pober JS, Bothwell AL. Porcine endothelial cells, unlike human endothelial cells, can be killed by human CTL via Fas ligand and cannot be protected by Bcl-2. *Journal of immunology*. 2002;169(12):6850-5.
89. Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, et al. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;400(4):461-5.
90. Galas RJ, Jr., Liu JC. Vascular endothelial growth factor does not accelerate endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*. 2014;229(1):90-6.
91. Gauvin R, Guillemette M, Galbraith T, Bourget JM, Larouche D, Marcoux H, et al. Mechanical properties of tissue-engineered vascular constructs produced using arterial or venous cells. *Tissue engineering Part A*. 2011;17(15-16):2049-59.
92. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Correa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(3):67.
93. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(5):1352-60.
94. Rothenburger M, Volker W, Vischer P, Glasmacher B, Scheld HH, Deiwick M. Ultrastructure of proteoglycans in tissue-engineered cardiovascular structures. *Tissue engineering*. 2002;8(6):1049-56.
95. Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV, et al. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue engineering*. 2002;8(5):863-70.

APPENDIX A

Lijst van gebruikte afkortingen

Ac-LDL = acetylated-low density lipoprotein	HUVEC = human umbilical vein endothelial cell
AD-MSC = adipose derived mesenchymal stem cell	ICM = inner cell mass
ADAS = adipose derived adult stem cell	IGF-1 = insuline like growth factor 1
ADSC = adipose derived stem cell	IGF-2 = insuline like growth factor 2
AMSC = adipose mesenchymal stem cell	ISCT = International Society of Cellular Therapy
AR = aortaklepregurgitatie	JAM = junctional adhesion molecule
AS = aortaklepstenose	JV = jet velocity
ASC = adipose stem/stromal cell	LDL = low-density lipoprotein
AVR = aortic valve replacement	LVAD = left ventricular assist device
bFGF = basic fibroblast growth factor	MAP kinase = mitogen activated protein kinase
BM-MSC = bone marrow derived mesenchymal stem cell	MG = mean gradient
BMI = body mass index	MHC = major histocompatibility complex
CAM = cel adhesie molecule	MSC = mesenchymal stem cell
CDX = cluster of differentiation X	NO = stikstofmonoxide
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium	PDGF = platelet derived growth factor
EC = endothelial cell	PECAM-1 = platelet endothelial cell achesion molecule 1
ECM = extracellulaire matrix	PGC = primordial germ cell
EF = ejectiefractie	PLA = processed lipoaspirate
EGF = epidermal growth factor	PRP = platelet rich plasma
EGM = endothelial growth medium	PTFE = polyfluorotetraethyleen
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay	RCT = randomised control trial
eNOS = endothelial nitric oxide synthase	RF = regurgitant fractie
EROA = effective regurgitant orifice area	RV = regurgitant volume
ESC = embryonic stem cell	TGF- β = transforming growth factor- β
FBS = fetal bovine serum	TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinase
FGF = fibroblast growth factor	VA = valve area
Flk-1 = fetal liver kinase 1	VE-cadherin = vascular endothelial cadherin
HE-kleuring = haematoxyline-eosine kleuring	VEC = valve endothelial cell
HIF-1 = hypoxia-inducible factor 1	VEGF = vascular endothelial growth factor
HLA = human leukocyte antigen	VIC = valve interstitial cell
HSC = haematopoietic stem cell	vWF = von Willebrand Factor

APPENDIX B

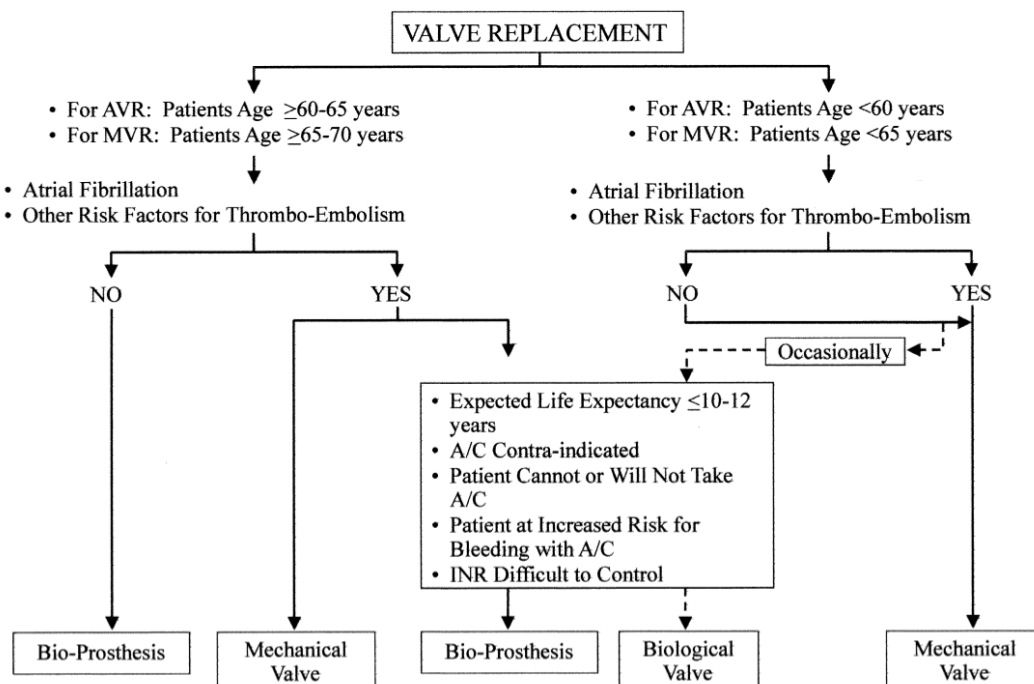
Lijst van gebruikte figuren

Figuur 1



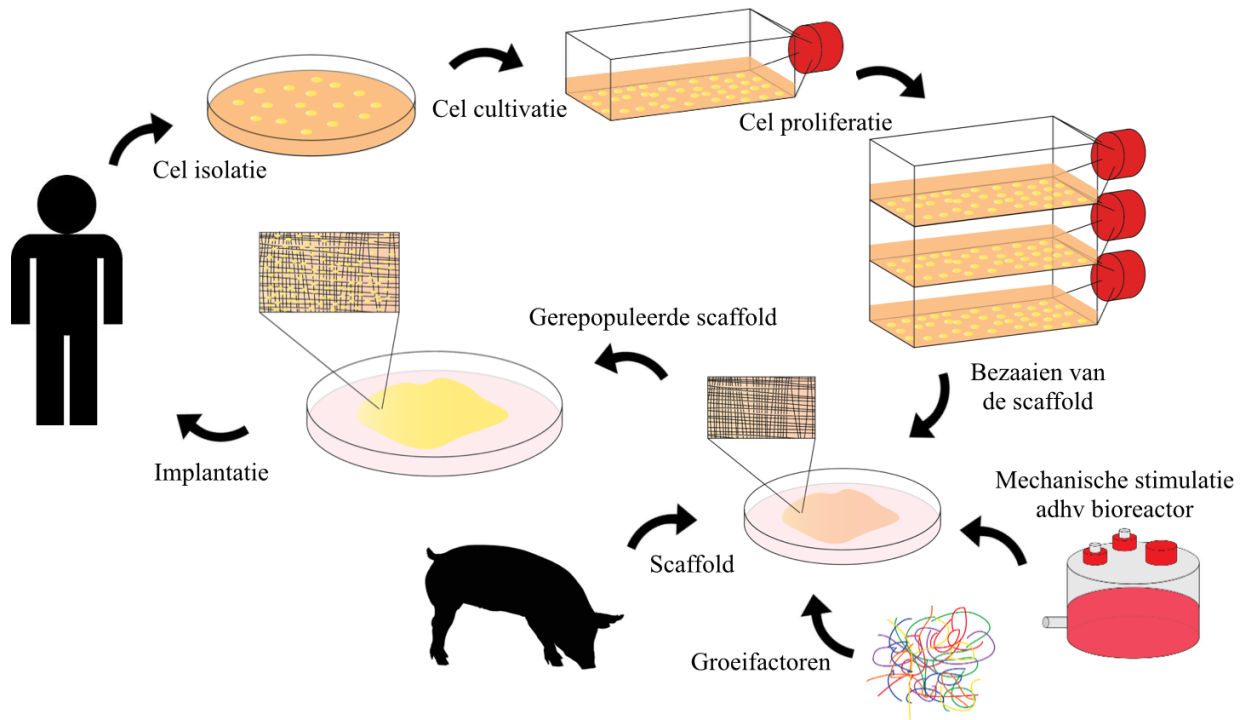
Figuur 1: De drie soorten mechanische kleppen; van links naar rechts: de caged-ball valve, de monoleaflet en de bileaflet. (resp. emedecine.medscape.com, scientificamerican.com, heartcarecentre.org)

Figuur 2



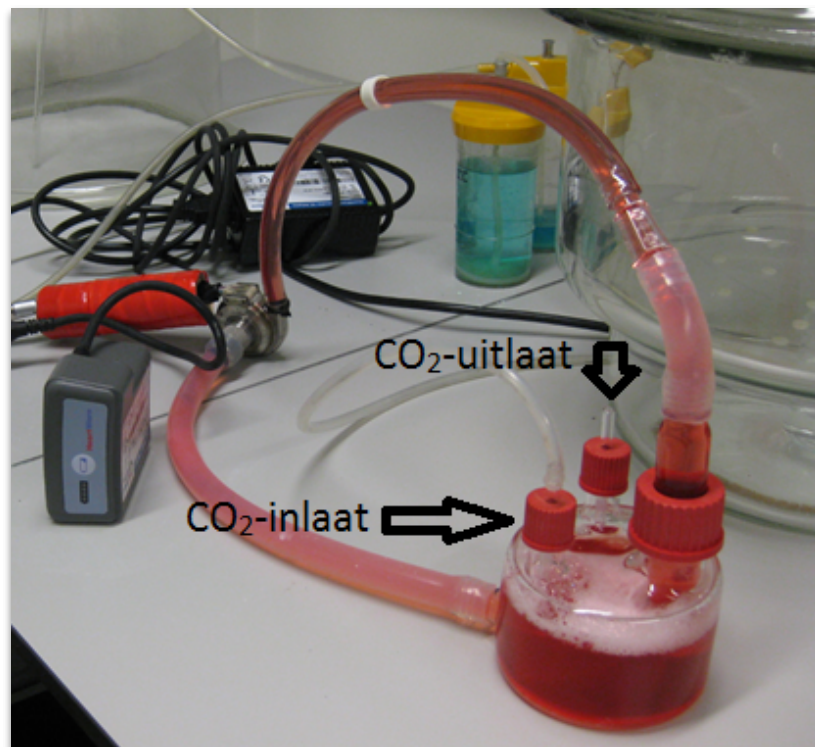
Figuur 2: Schema voor de selectieprocedure van een hartklep volgens Rahimtoola et al.

Figuur 3



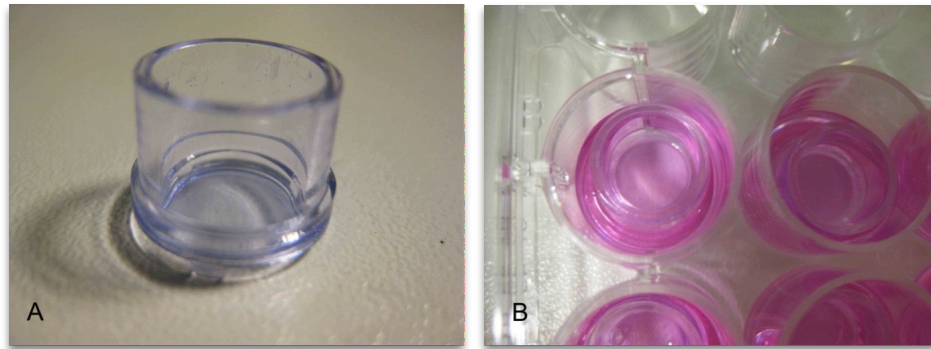
Figuur 3: Een schematische voorstelling van het tissue engineering proces. In dit schema vertrekt men van humane cellen en een biologische scaffold.

Figuur 4



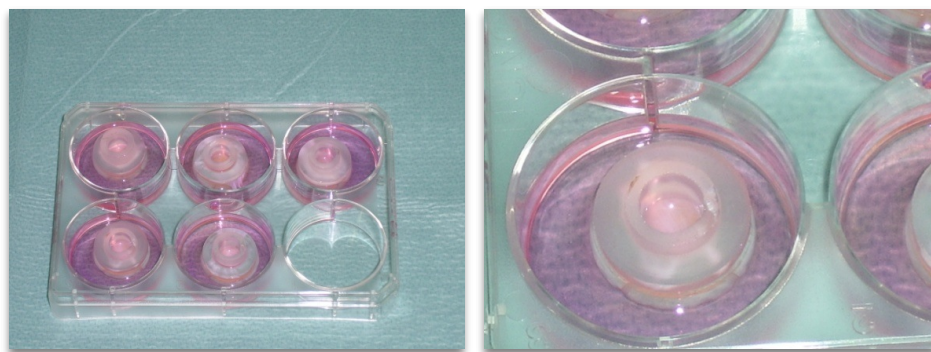
Figuur 4: De gebruikte bioreactor met aangeduide CO₂ in- en uitlaat

Figuur 5



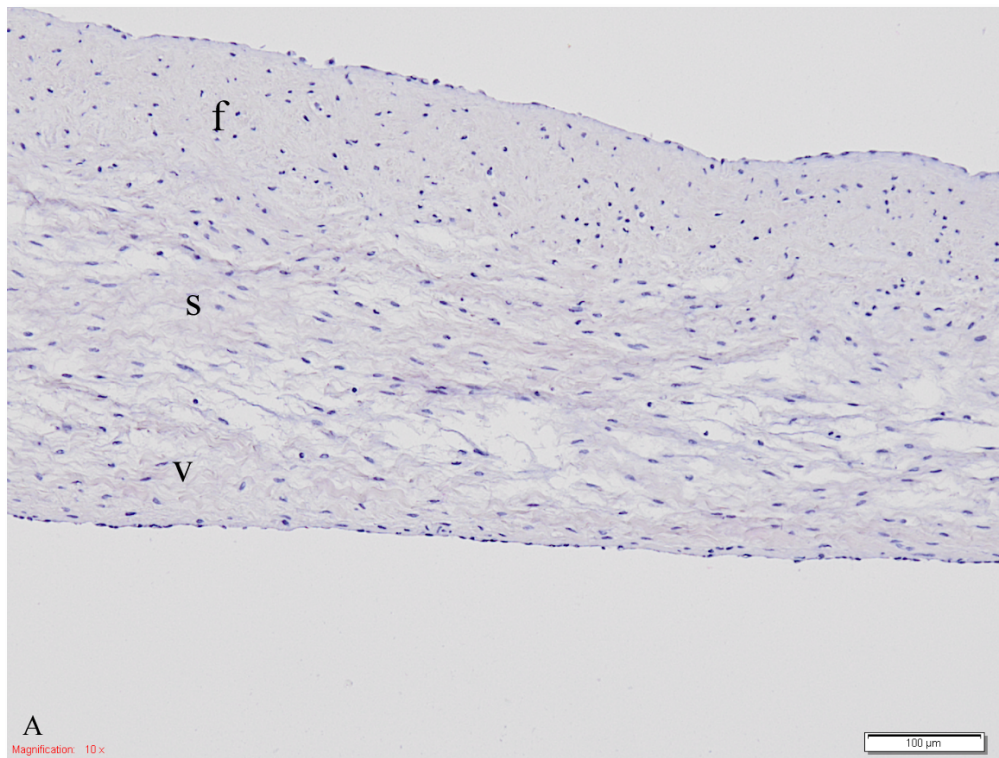
Figuur 5: Opstelling van het invasie assay. **A** Het bovenste compartiment van de migratiekamer. **B** De volledige migratiekamer: het onderste compartiment bevat de groeifactoren in DMEM-Glutamax, het bovenste compartiment bevat de ADSCs en ECs in suspensie.

Figuur 6



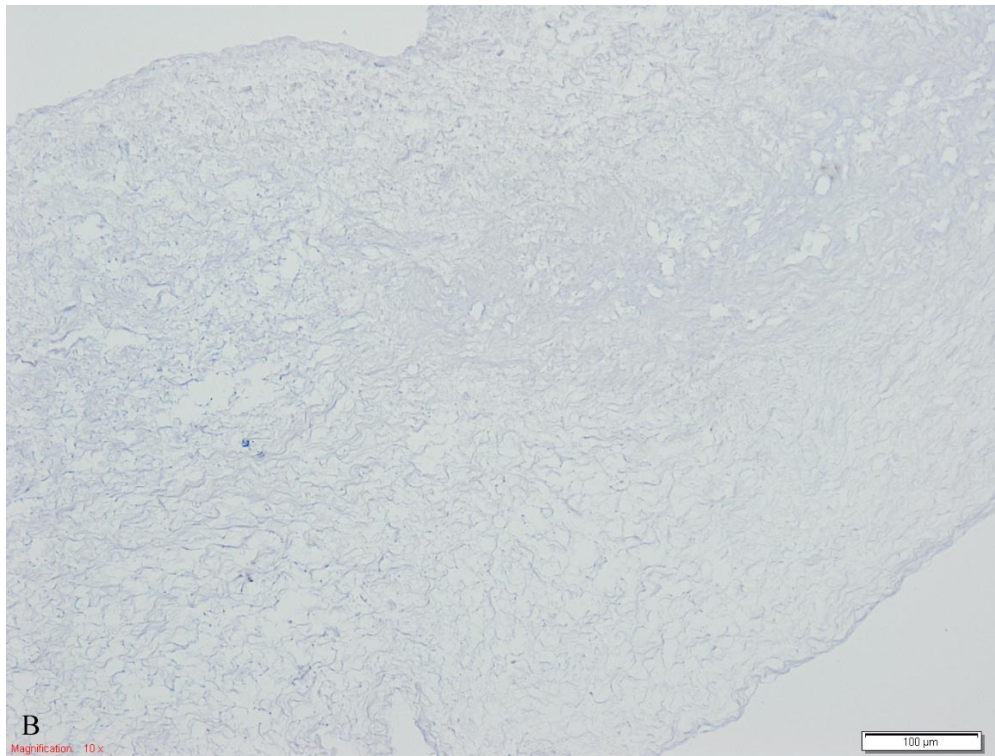
Figuur 6: **A** In vitro repopulatiemodel aan de hand van glazen cilinders. **B** Close-up glazen cilinder op klepblad

Figuur 7A



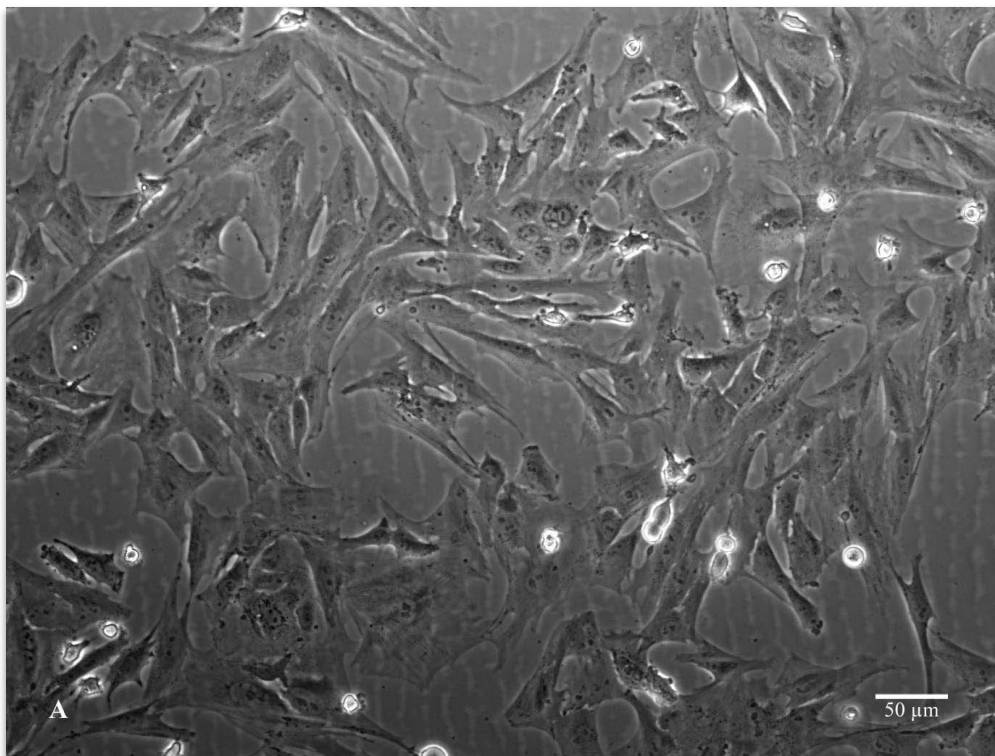
Figuur 7A: Heamatoxyline-eosine (HE) kleuring van natief porciene aortaklepblad. De duidelijk aangekleurde celkernen wijzen op maximale infiltratie en bezetting van het klepblad. De drie histologisch te onderscheiden cellagen van het klepblad zijn aangeduid: Lamina ventricularis (v), lamina spongiosa (s) en lamina fibrosa (f). Schaal: 100μm

Figuur 7B



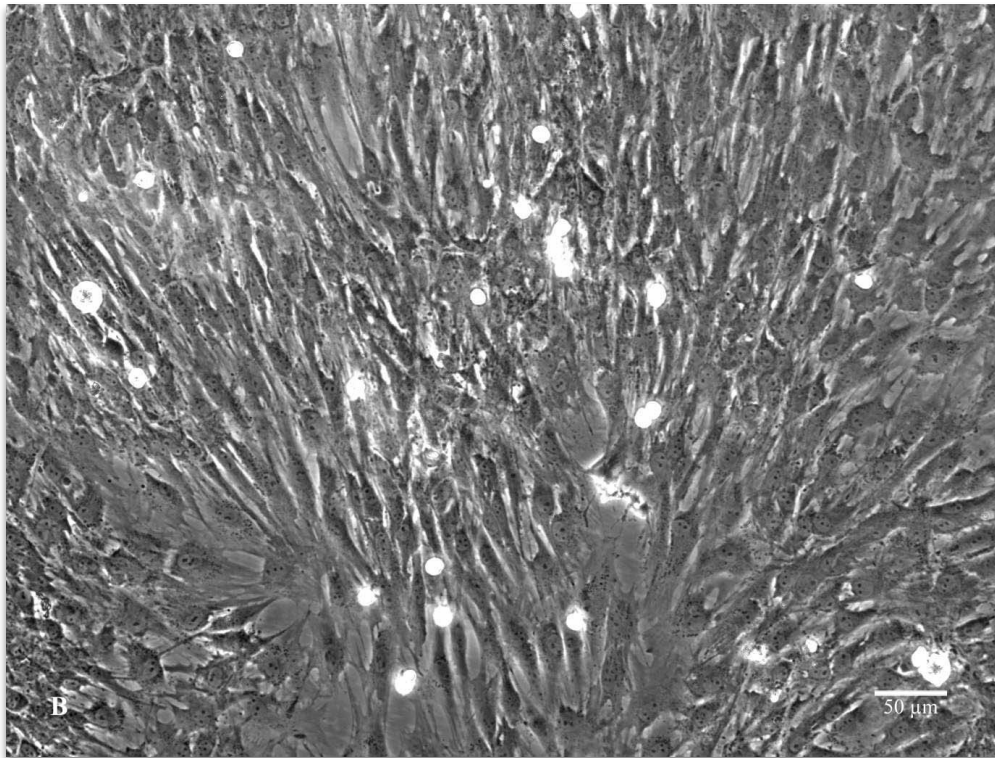
Figuur 7B: Heamatoxyline-eosine (HE) kleuring van gedecellulariseerd porcien aortakleplad. De afwezigheid van gekleurde celkernen wijst op geslaagde decellularisatie. Schaal: 100µm.

Figuur 8A



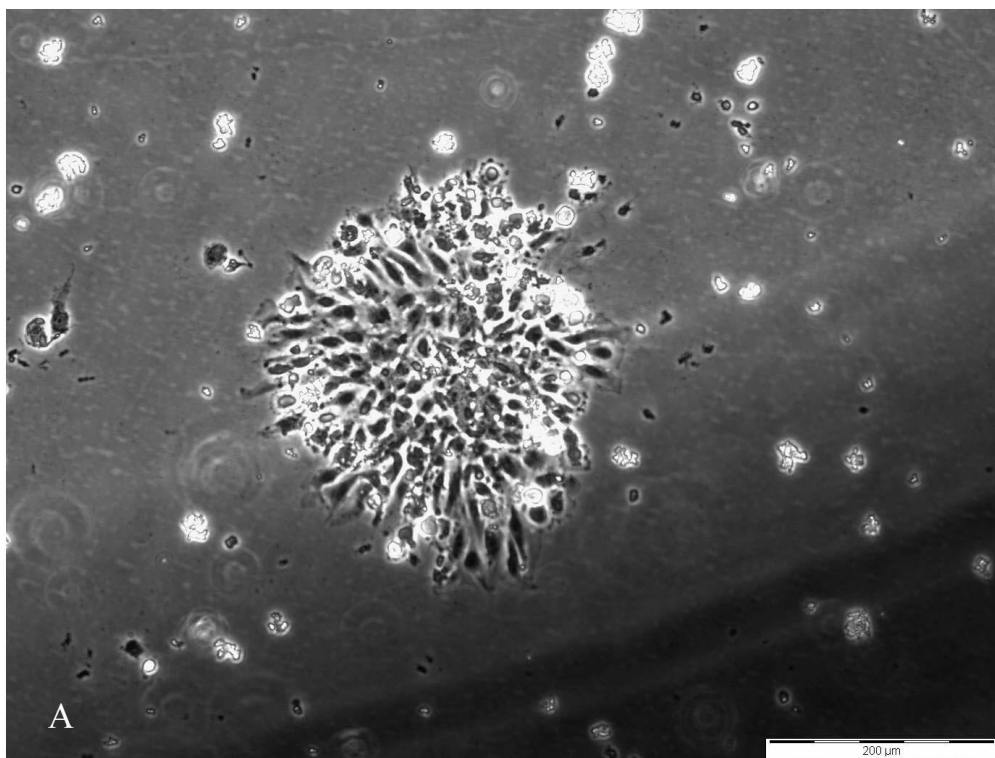
Figuur 8A: Brightfield opname van ADSCs. Toenemende confluentie van onregelmatige cellen met cytoplasmatische uitlopers, suggestief voor ADSCs. Duidelijke granules zichtbaar; wat wijst op geactiveerde status van de cellen. Enkele tientallen dode cellen zijn te zien. Schaal: 50µm

Figuur 8B



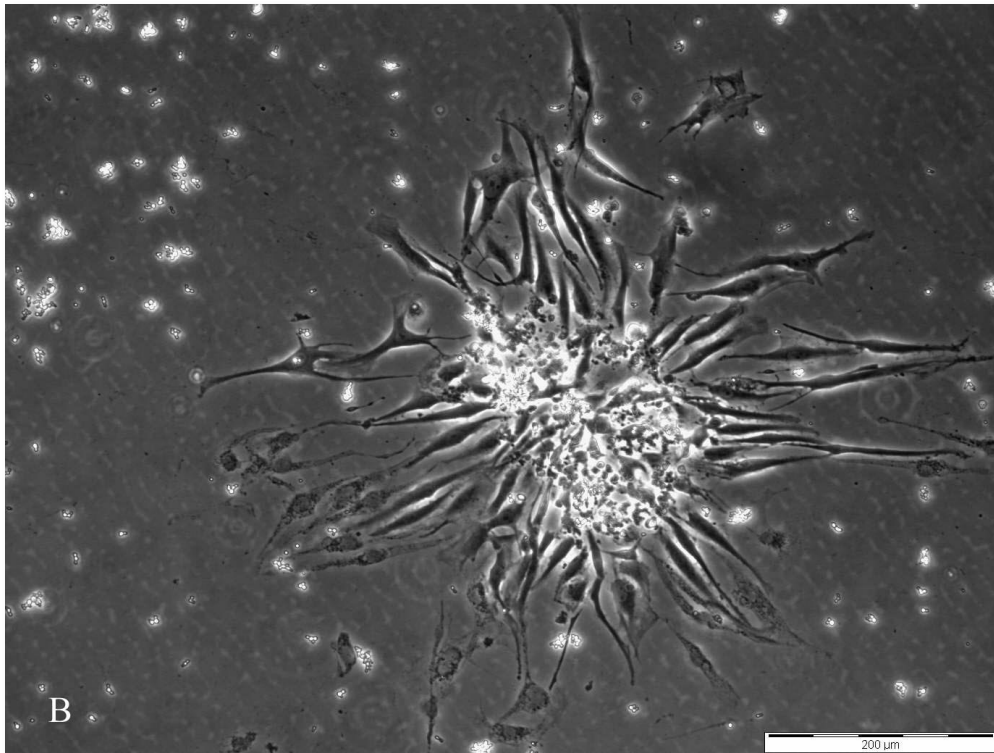
Figuur 8B: Brightfield opname van ADSCs. Maximale confluentie van onregelmatige cellen met cytoplasmatische uitlopers, suggestief voor ADSCs. Duidelijke granules zichtbaar, wat wijst op geactiveerde status van de cellen. Enkele tientallen dode cellen zijn te zien. Schaal: 50µm.

Figuur 9A



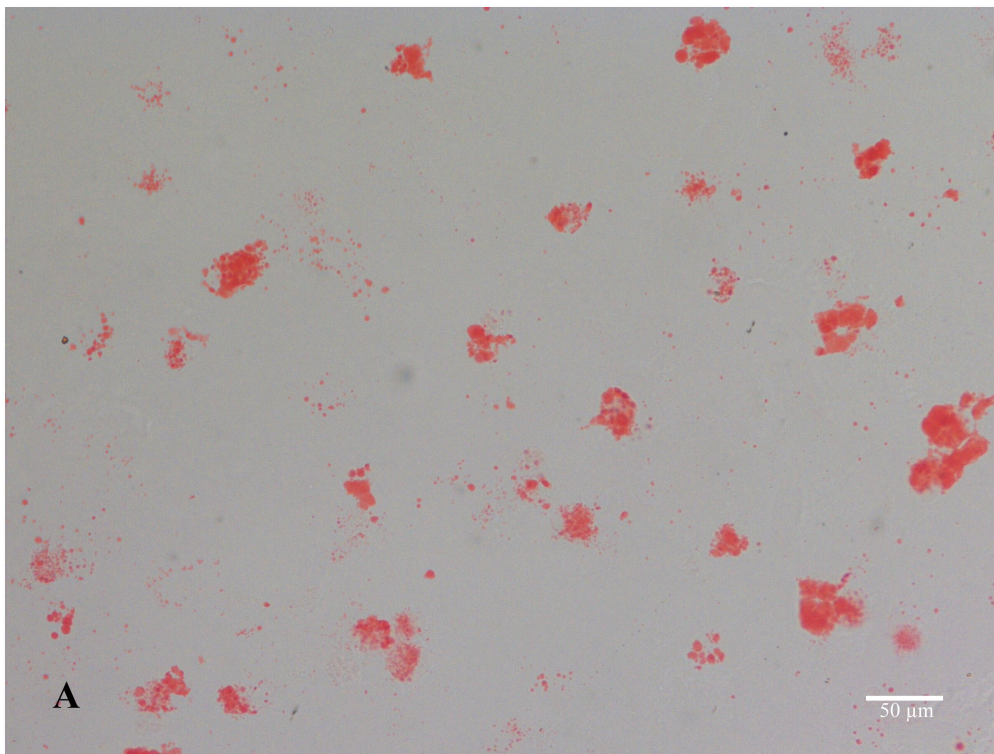
Figuur 9A: Brightfield opname van celspot geïsoleerd uit een porciene aorta. Densc celspot met spoelvormige tot kubische cellen en veel celdebris. Schaal: 200µm

Figuur 9B



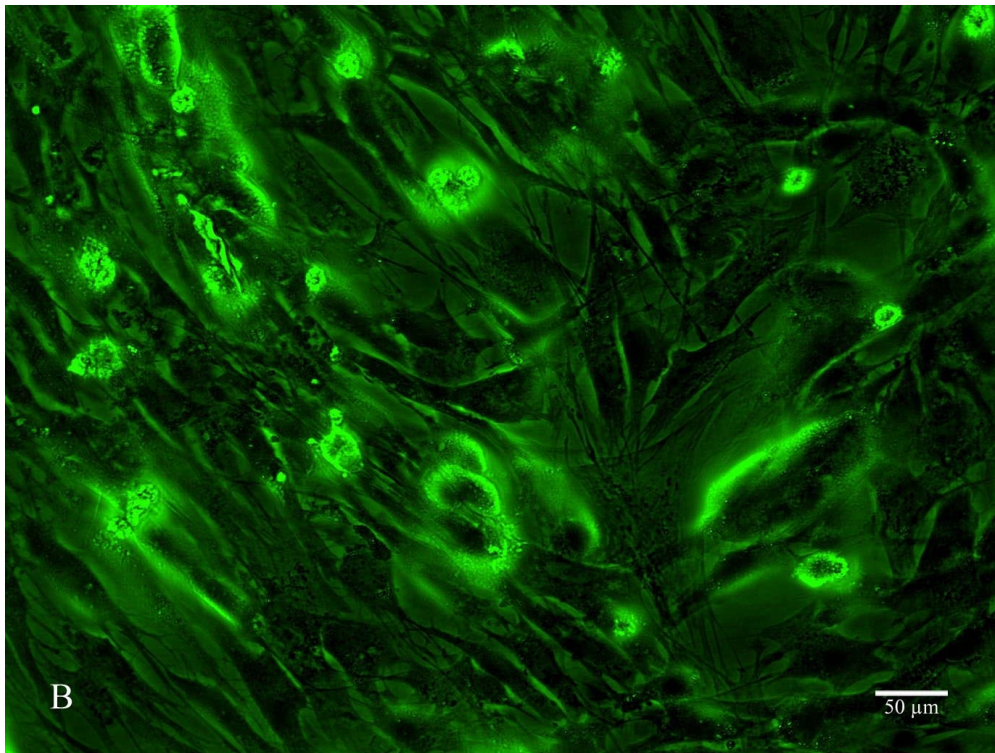
Figuur 9B: Brightfield opname van celspot geïsoleerd uit een porciene aorta. Celspot van meer uiteenlopende spoelvormige cellen en celdebris. Schaal: 200μm.

Figuur 10A



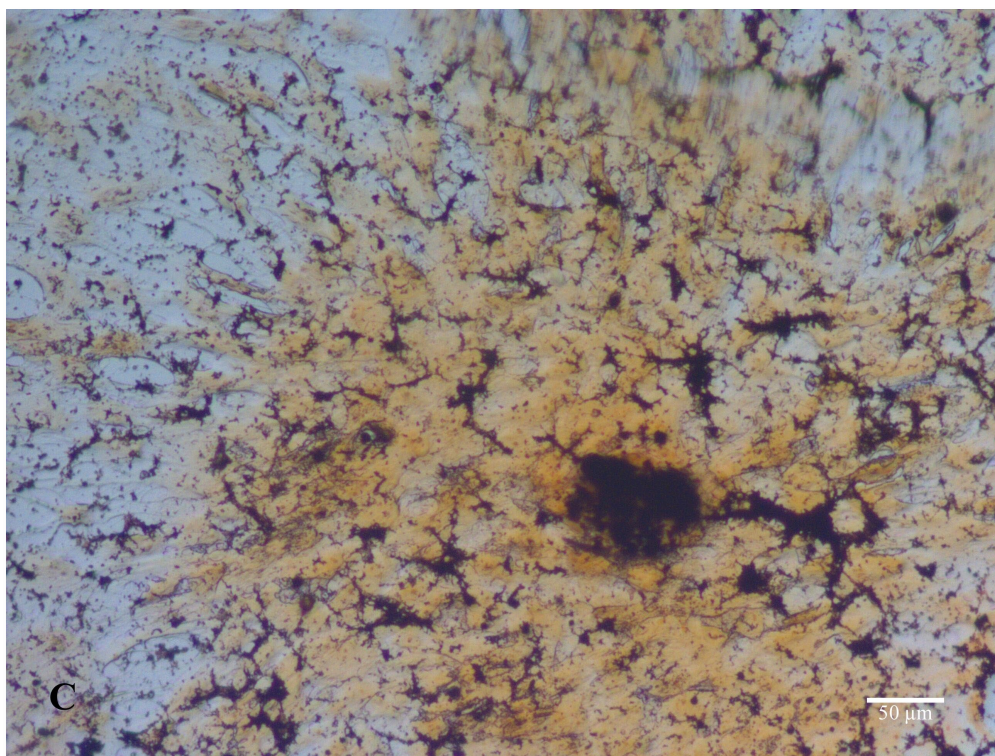
Figuur 10A: Foto na trilineage differentiatie van ADSCs. Oil Red O kleuring na 14 dagen in adipogeen differentiatie medium toont duidelijke roodverkleuring van vetaccumulatie wat wijst op geslaagde differentiatie tot adipocyten. Schaal: 50μm.

Figuur 10B



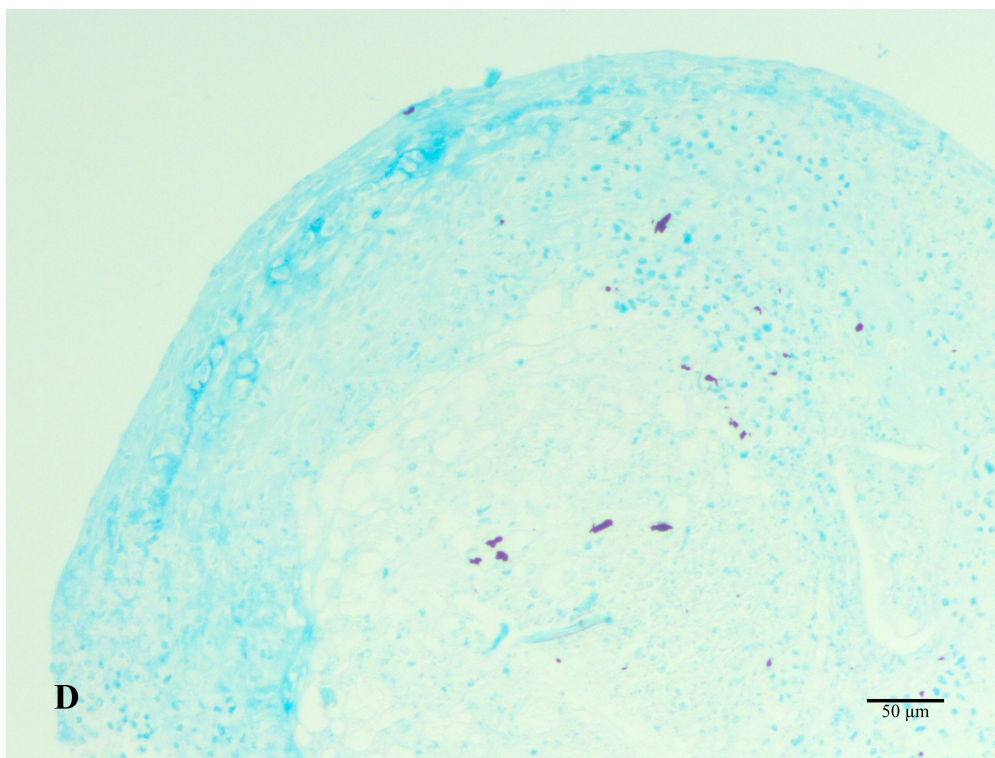
Figuur 10B: Foto na trilineage differentiatie van ADSCs. HCS LipidTOX™ green lipid kleuring toont onder fluorescentiemicroscopie vetaccumulatie na cultuur in adipogeen differentiatie medium voor 14 dagen. Schaal: 50 μm.

Figuur 10C



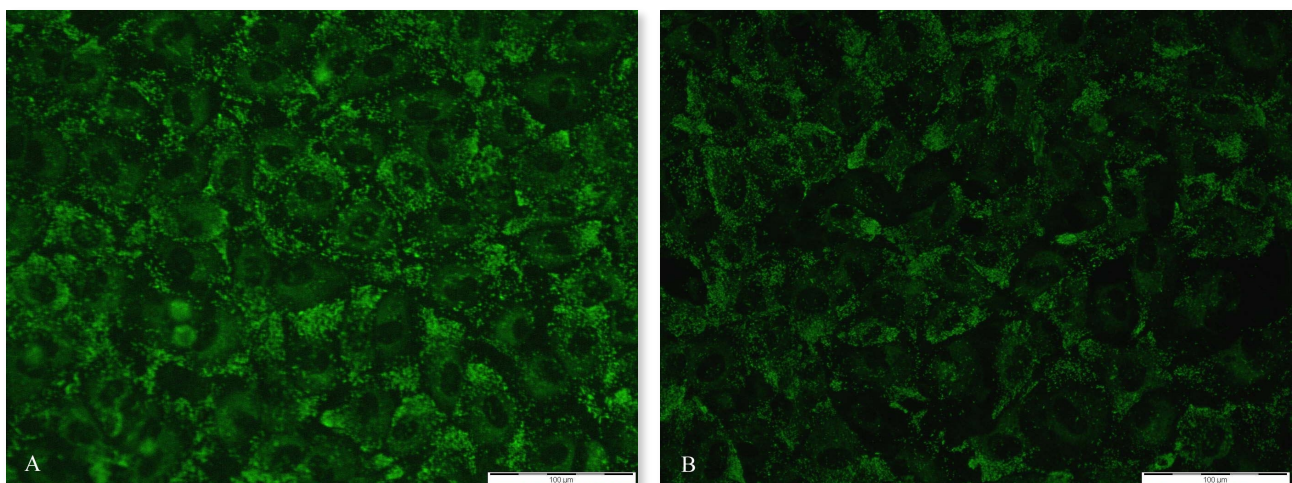
Figuur 10C: Foto na trilineage differentiatie van ADSCs. Von Kossa kleuring toont gecalcificeerde matrix aan na 14 dagen cultuur in osteogeen differentiatie medium door precipitatie van zilverionen (zwart op foto). Schaal: 50 μm.

Figuur 10D



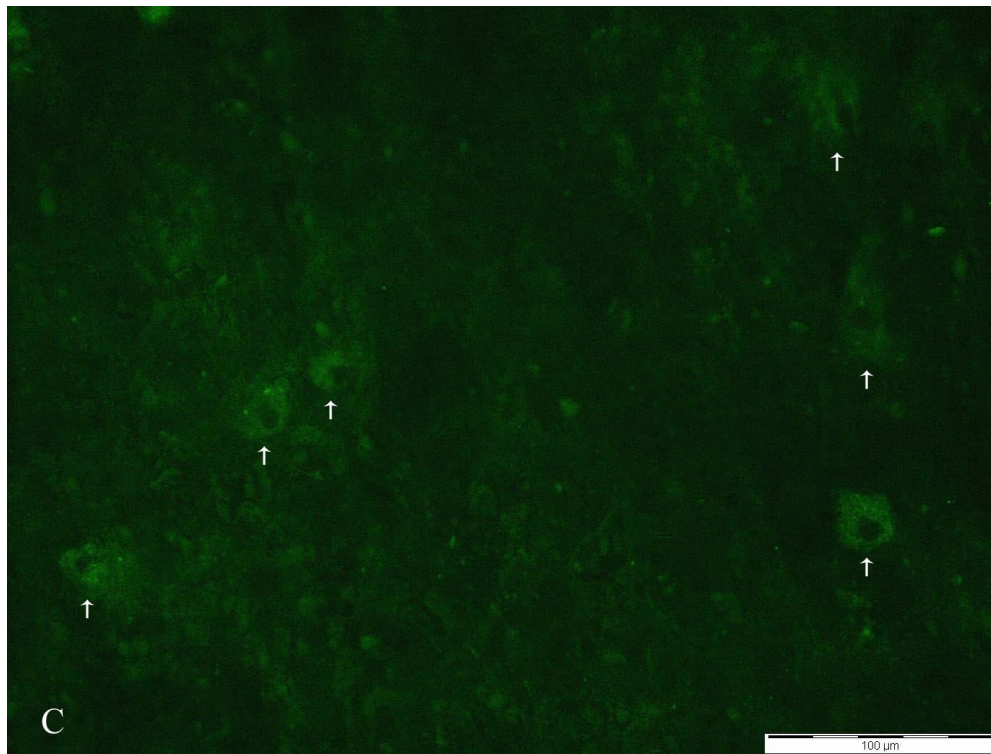
Figuur 10D: Foto na trilineage differentiatie van ADSCs. Alciaan blauw kleuring toont de aanwezigheid van een zure proteoglycaanrijke matrix, dit wijst op een geslaagde differentiatie tot chondrocyten na 21 dagen cultuur in chondrogeen differentiatiedium. Schaal: 50 µm.

Figuur 11A,B



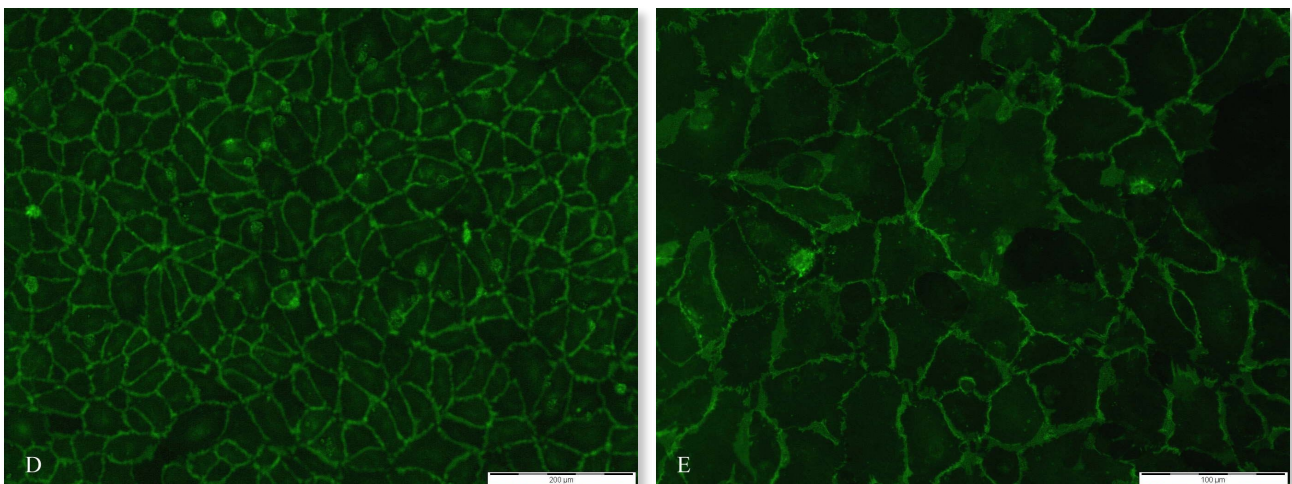
Figuur 11A,B: vWF kleuring van HUVECs na 14 dagen cultuur in EBM-2. Controle HUVECs toonden duidelijk cytoplasmatische aankleuring van vWF. Eveneens zijn de nuclei zichtbaar door non-captatie van de kleuring. Schaal: 100µm.

Figuur 11C



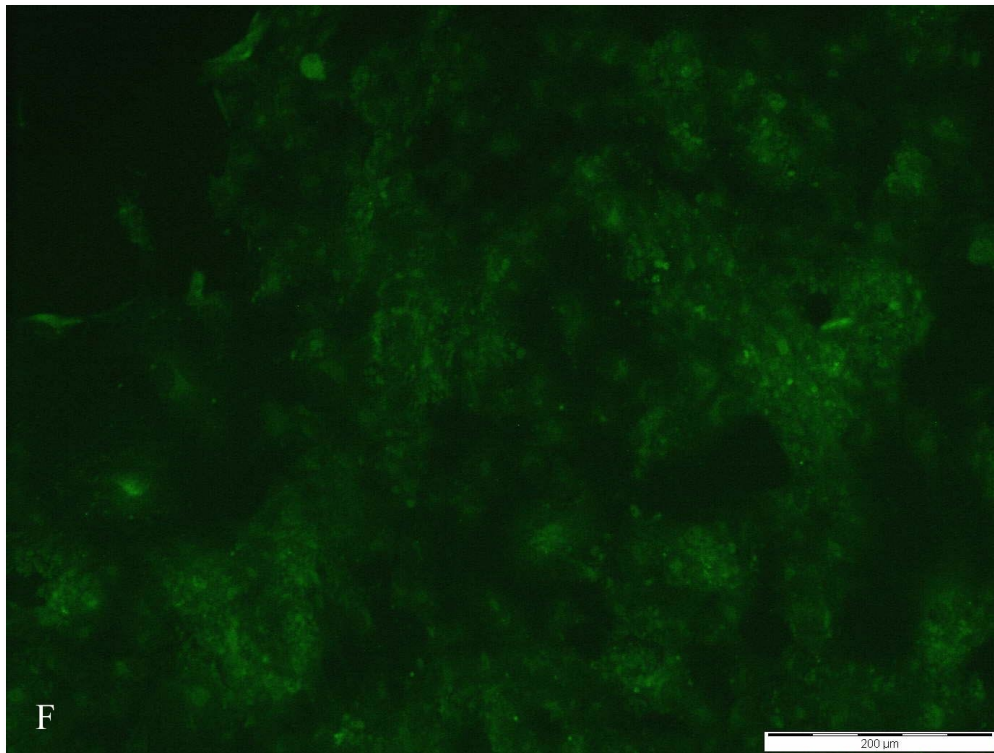
Figuur 11C: vWF kleuring van ADSCs na 14 dagen cultuur in EBM-2. ADSCs in endotheliaal differentiatiedmedium toonde slechts een zeer beperkt aantal cellen. Een zestal cellen (witte pijlen) vertonen duidelijk intracytoplasmatische aankleuring van vWF en contrast met de niet aangekleurde nuclei. Schaal: 100μm.

Figuur 11D,E



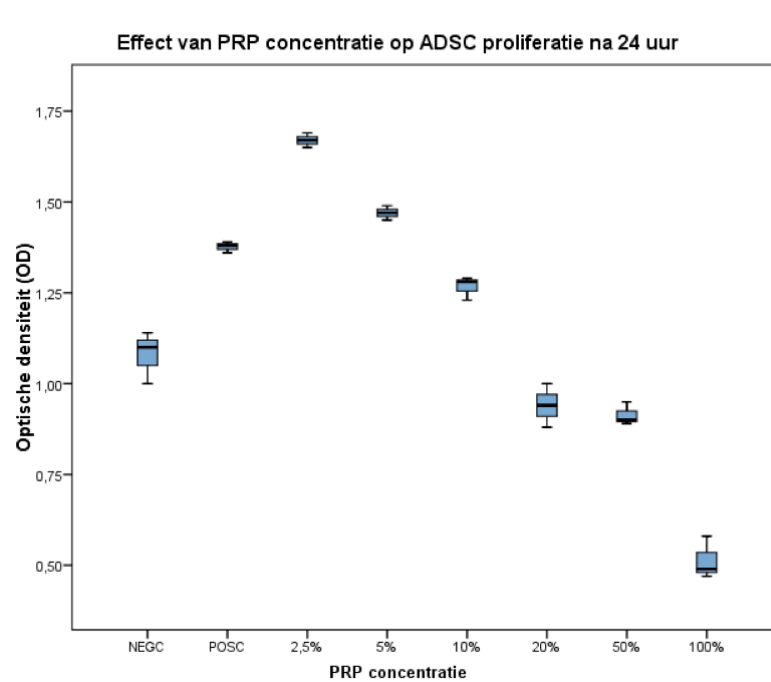
Figuur 11D,E: CD31 kleuring van HUVECs na 14 dagen cultuur in EBM-2. Na CD31 kleuring van controle HUVECs is er duidelijk extracellulaire aankleuring van CD31. Schaal: 100μm (D); 200μm (E).

Figuur 11F



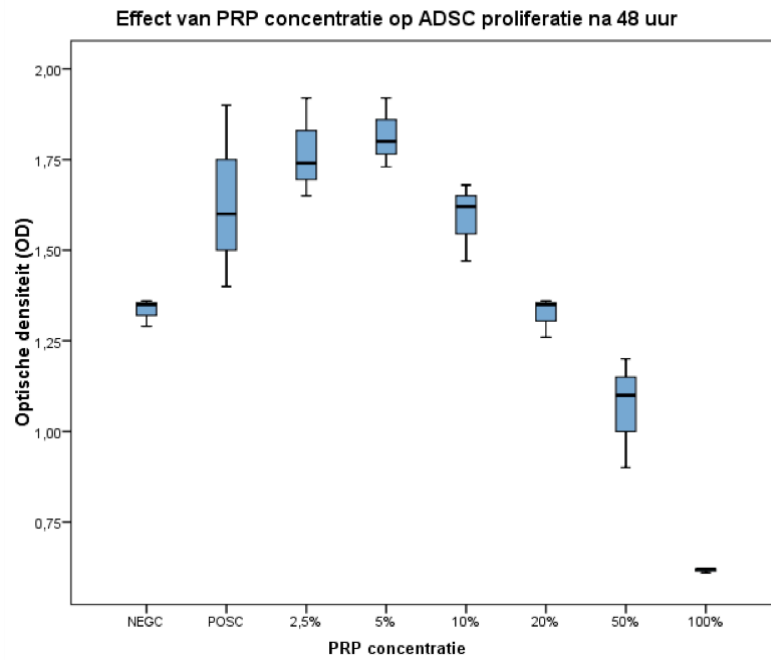
Figuur 11F: CD31 kleuring van ADSCs na 14 dagen cultuur in EBM-2. Er konden geen cellen met een duidelijke kleuring van CD31 worden aangetoond bij ADSCs na cultuur in endotheliaal differentiatie-medium. Schaal: 200μm.

Figuur 12A



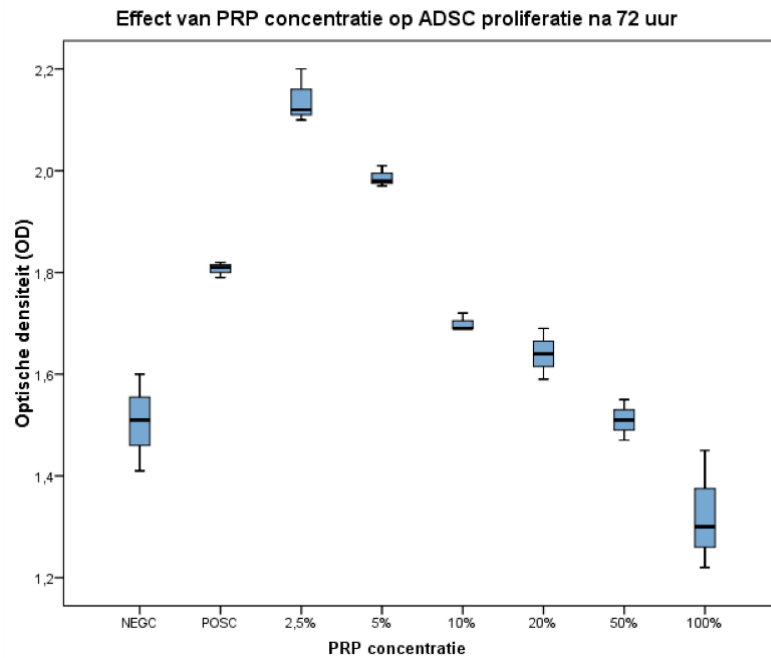
Figuur 12A: Het effect van PRP concentratie op ADSC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 24 uur. (NEG = negatieve controle) (POSC = positieve controle) Duidelijke toename van proliferatie na applicatie van 2,5% PRP. Eveneens overtuigend inhiberend effect van hoge concentraties (20%, 50% en 100%).

Figuur 12B



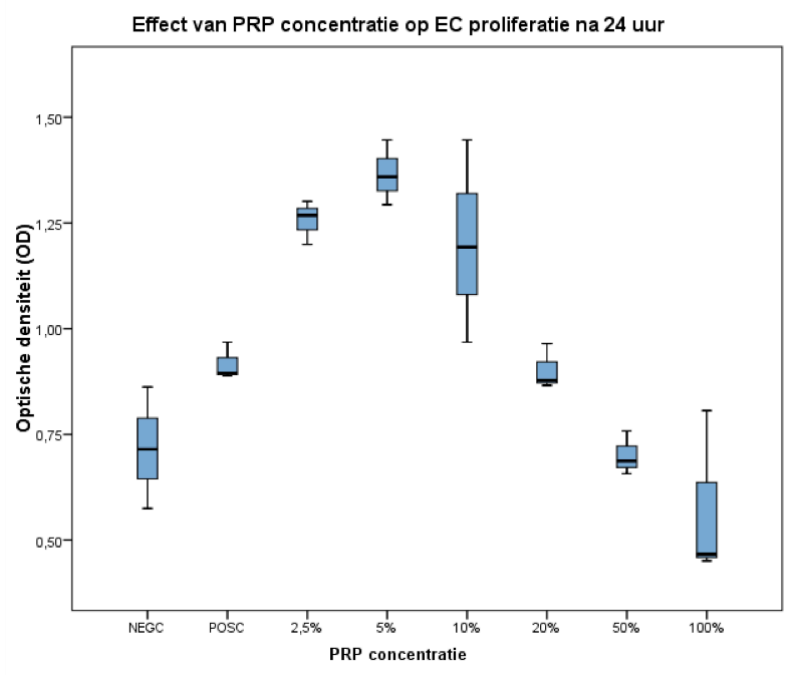
Figuur 12B: Het effect van PRP concentratie op ADSC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 48 uur. (NEG = negatieve controle) (POSC = positieve controle) Geen duidelijke toename van ADSC proliferatie. Grote standaarddeviatie bij positieve controles. Inhiberend effect bij 100% PRP.

Figuur 12C



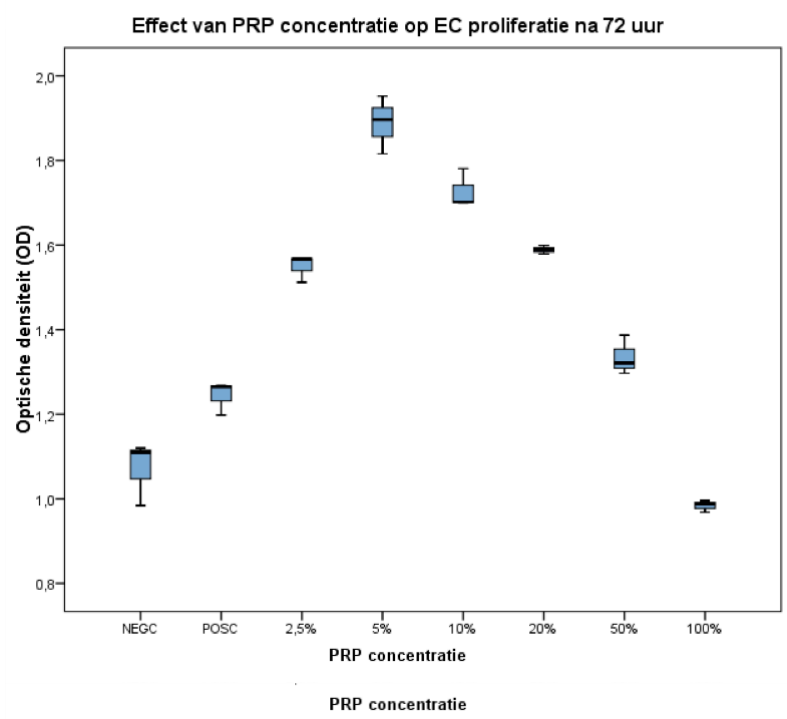
Figuur 12C: Het effect van PRP concentratie op ADSC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 72 uur. (NEG = negatieve controle) (POSC = positieve controle) Toename van proliferatieve capaciteit bij 2,5% en 5% is op te merken. Inhiberend effect enkel bij 100% PRP overtuigend.

Figuur 13A



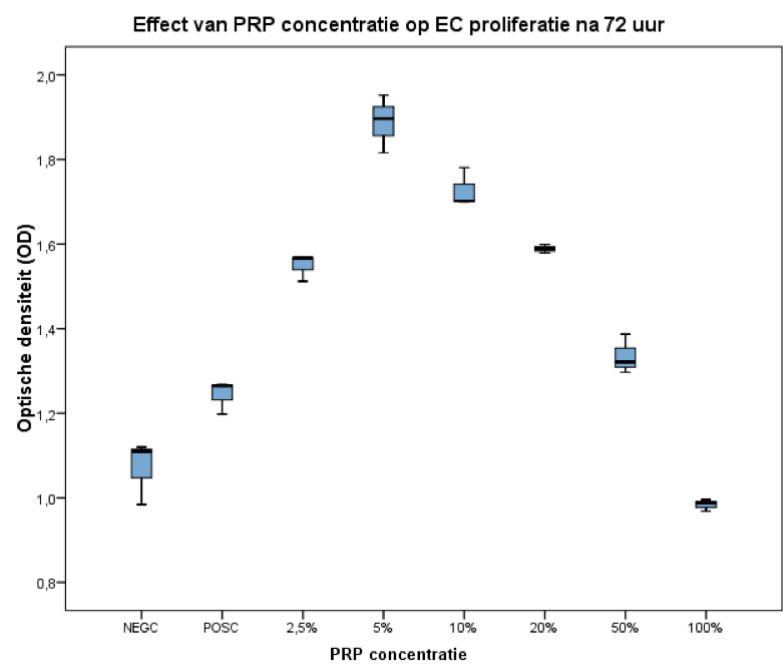
Figuur 13A: Het effect van PRP concentratie op EC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 24 uur. (NEGC = negatieve controle) (POSC = positieve controle) Overtuigend stimulerend effect van lage concentraties PRP (2,5%; 5% en 10%). Geen duidelijk verschil ten opzichte van de controles bij hoge concentraties (50%; 100%).

Figuur 13B



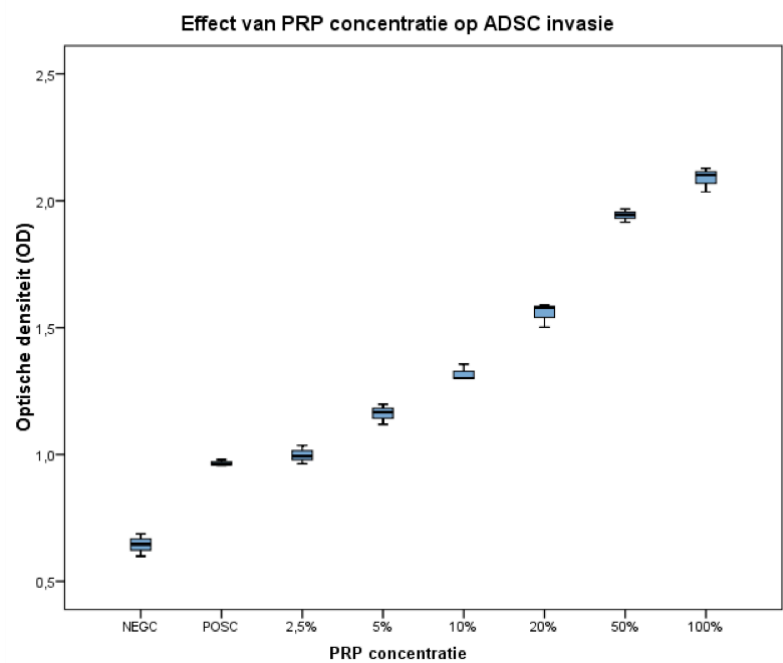
Figuur 13B: Het effect van PRP concentratie op EC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 48 uur. (NEGC = negatieve controle) (POSC = positieve controle) Stimulerend effect van lage concentraties PRP (2,5%; 5%; 10% en 20%). Geen inhiberend effect van hogere concentraties.

Figuur 13C



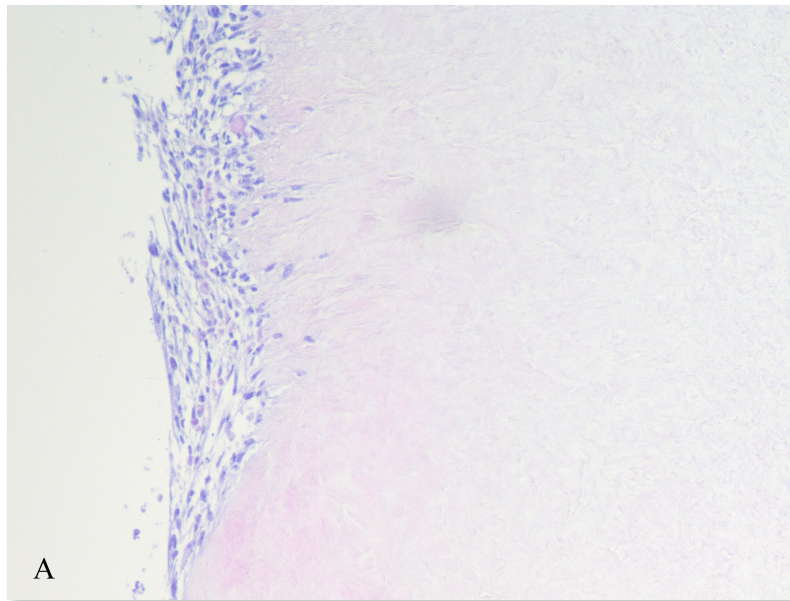
Figuur 13C: Het effect van PRP concentratie op EC proliferatie uitgedrukt in optische densiteit na 72 uur. (NEGC = negatieve controle) (POSC = positieve controle) Duidelijk stimulerend effect van lage concentraties PRP (2,5%; 5%; 10% en 20%). Groot verschil in gemiddelde waarden voor optische densiteit tussen 2,5% en 5%.

Figuur 14



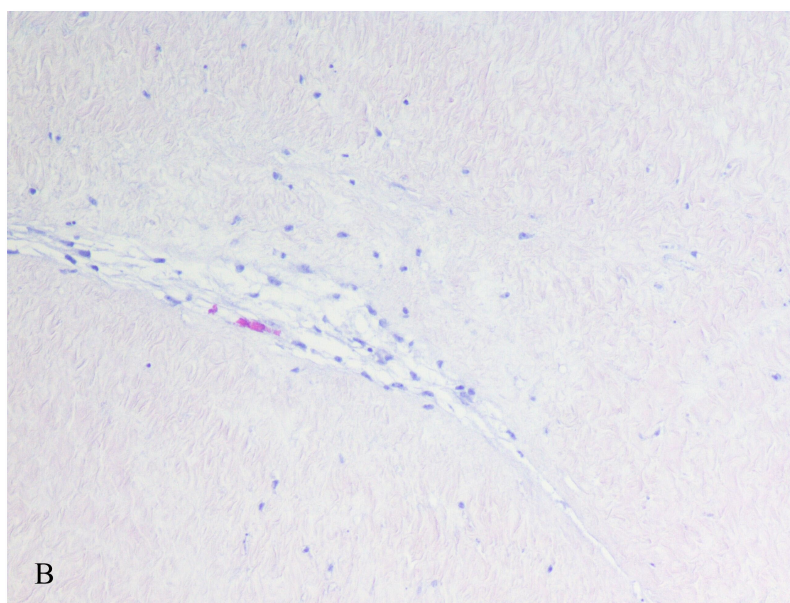
Figuur 14: Het effect van PRP concentratie op ADSC invasie uitgedrukt in optische densiteit. Hoge PRP concentraties stimuleren de invasie van ADSCs overtuigend beter dan de positieve en negatieve controles. Een PRP concentratie van 100% geeft duidelijk de beste resultaten. Geen van de concentraties blijken een inhiberend effect op ADSC invasie te hebben.

Figuur 15A



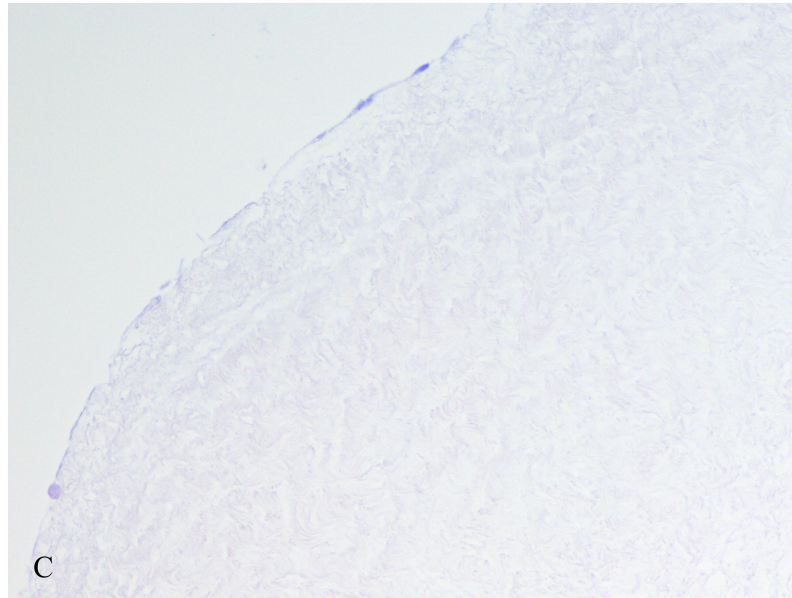
Figuur 15A: Haematoxyline-eosine kleuring van met ADSCs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes aan de hand van de cilindermethode. Er is oppervlakkige celadhesie van multiële lagen en celinvasie waar te nemen. Vergroting: 20x.

Figuur 15B



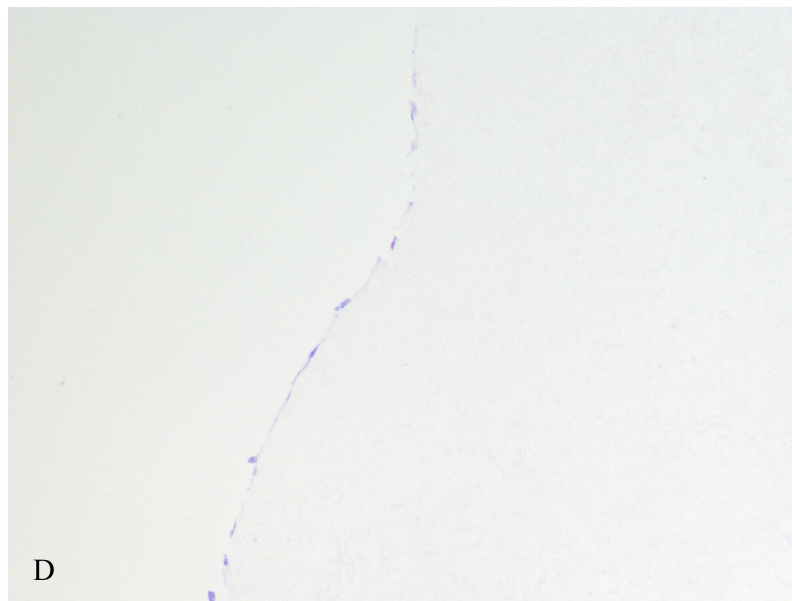
Figuur 15B: Haematoxyline-eosine kleuring van met ADSCs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes aan de hand van de cilindermethode. Er is oppervlakkige celadhesie en uitgebreide celinvasie waar te nemen. Vergroting: 20x.

Figuur 15C



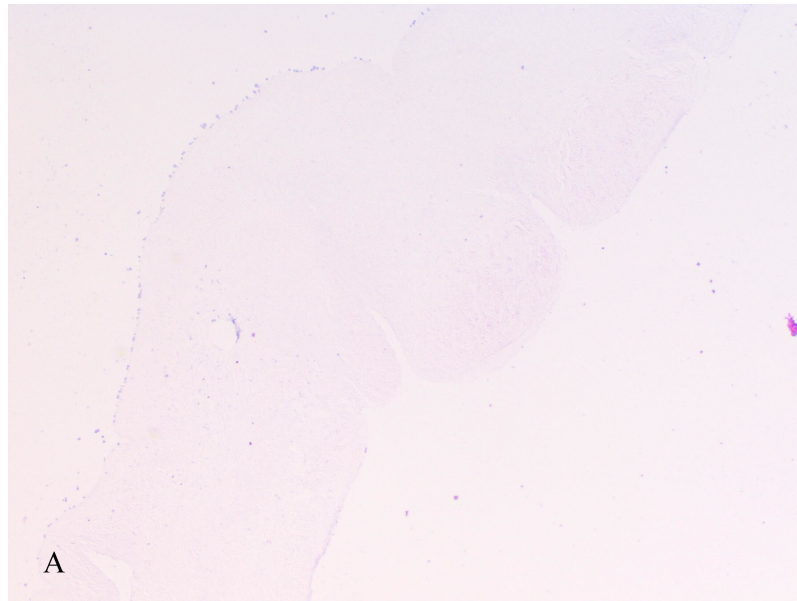
Figuur 15C: Haematoxyline-eosine kleuring van met HUVECs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes aan de hand van de cilindermethode. Er zijn slechts een minimaal aantal cellen waar te nemen op het kleppervlak en er is geen sprake van invasie. Vergroting: 20x.

Figuur 15D



Figuur 15D: Haematoxyline-eosine kleuring van met HUVECs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes aan de hand van de cilindermethode. Er zijn slechts een minimaal aantal cellen waar te nemen op het kleppervlak en er is geen sprake van invasie. Vergroting: 20x.

Figuur 16A



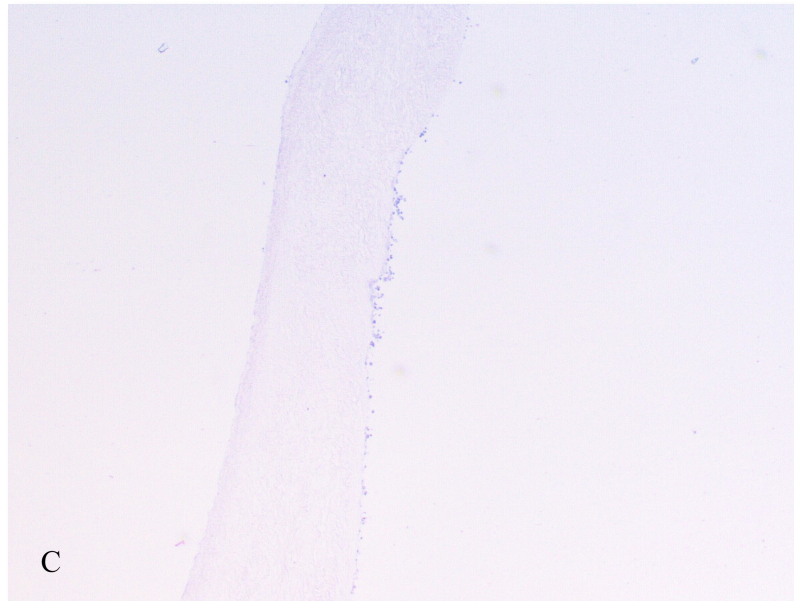
Figuur 16A: Haematoxyline-eosine kleuring van bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes door middel van druppeltitratie. Controlematrices na bezaaiing met ADSCs. Er is oppervlakkige celadhesie en celinvasie waar te nemen. Vergroting: 3.2x.

Figuur 16B



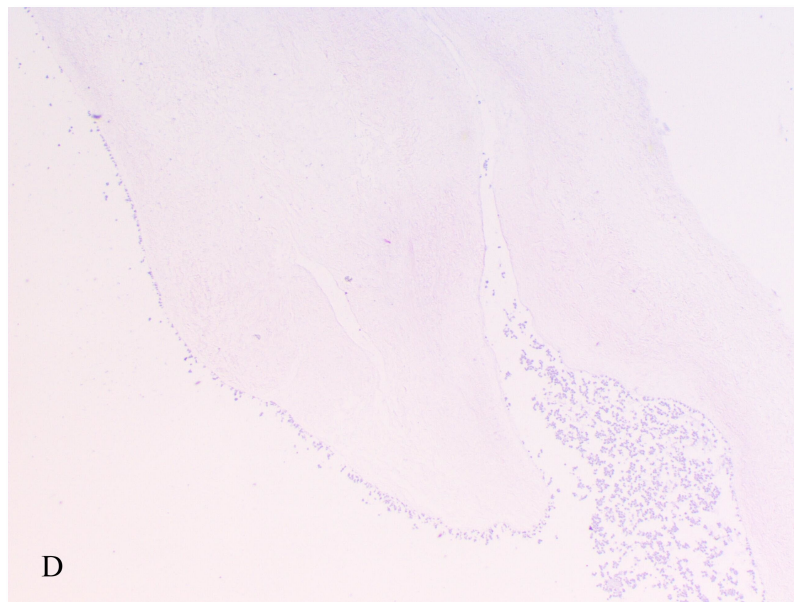
Figuur 16B: Haematoxyline-eosine kleuring van met ADSCs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes door middel van druppeltitratie. Opgeladen matrices na bezaaiing met ADSCs. Er is oppervlakkige celadhesie en celinvasie waar te nemen. Vergroting: 3.2x.

Figuur 16C



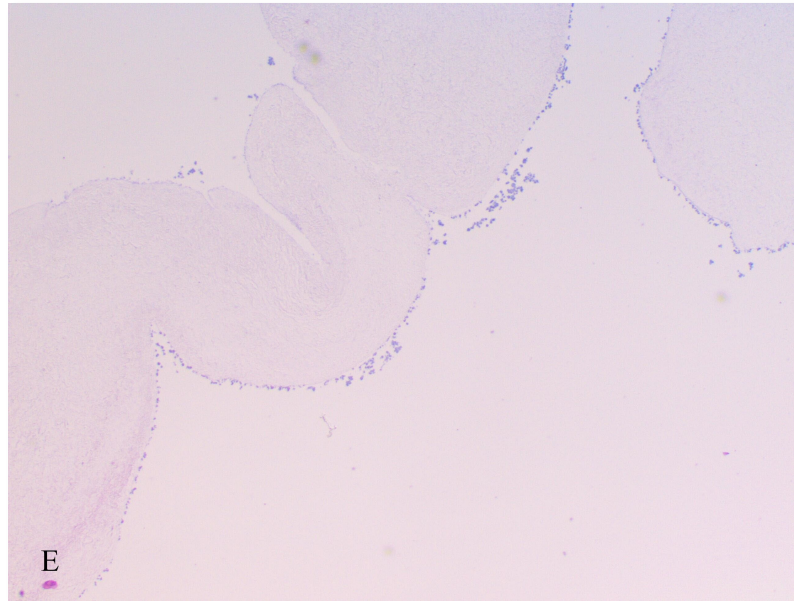
Figuur 16C: Haematoxyline-eosine kleuring van met ADSCs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes door middel van druppeltitratie. Opgeladen matrices na bezaaiing met ADSCs. Er is oppervlakkige celadhesie en celinvasie waar te nemen. Vergroting: 3.2x.

Figuur 16D



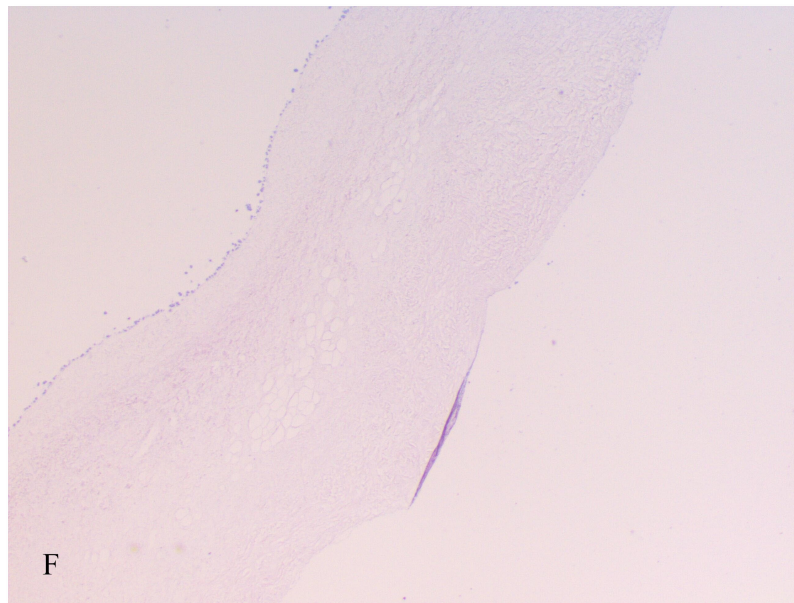
Figuur 16D: Haematoxyline-eosine kleuring van bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes door middel van druppeltitratie. Controlematrices na bezaaiing met HUVECs. Er is oppervlakkige celadhesie van multiële cellagen en celinvasie waar te nemen. Vergroting: 3.2x.

Figuur 16E



Figuur 16E: Haematoxyline-eosine kleuring van met HUVECs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes door middel van druppeltitratie. Opgeladen matrices na bezaaiing met HUVECs. Er is unilaterale celadhesie op te merken, maar geen celinvasie. Vergroting: 3.2x.

Figuur 16F



Figuur 16F: Haematoxyline-eosine kleuring van met HUVECs bezaaide acellulaire porciene aortaklepblaadjes door middel van druppeltitratie. Opgeladen matrices na bezaaiing met HUVECs. Er is unilaterale celadhesie op te merken, maar geen celinvasie. Vergroting: 3.2x.

APPENDIX C

Lijst van gebruikte tabellen

Tabel 1: Aortaklepstenose gradaties i.f.v. parameters

Graad	VA (cm ²)	MG (mmHg)	JV (m/s)
Milde AS	≥ 1.5	≤ 25	≤ 3.0
Matige AS	1.0 tot 1.5	25 tot 40	3.0 tot 4.0
Ernstige AS	<1	> 40	> 4.0

Tabel 2: Aortaklepregurgitatie gradaties i.f.v. parameters

	Graad	RF (%)	RV (ml)	EROA (cm ²)
Milde AR	<i>I</i>	< 30	< 30	< 0,20
Matige AR	<i>II</i>	30 - 39	30 - 44	0,20 - 0,29
	<i>III</i>	40 - 49	45 - 49	0,30 - 0,39
Ernstige AR	<i>IV</i>	≥ 50	≥ 50	≥ 0,40

Tabel 3: Oppervlaktemerkers van ADSCs

Auteur en publicatiejaar	Positieve expressie	Negatieve expressie
Gronthos 2001 (51)	HLA-ABC, CD9, CD10, CD13 , CD29 , CD34, CD44 , CD49e, CD54, CD55, CD59, CD105 , CD166, CD146	HLA-DR , CD11a, CD11b, CD11c, CD14 , CD18, CD31 , CD45 , CD50, CD56, CD62e
Zuk 2002 (52)	CD13 , CD29 , CD44 , CD49d, CD71, CD90 , CD105 , STRO-I	CD14 , CD16, CD31 , CD34, CD45 , CD56, CD61, CD62e, CD104, CD106
Lee 2004 (53)	CD29 , CD44 , CD90, CD105	HLA-DR , CD14 , CD34, CD117
Aust 2004 (46)	HLA-ABC, CD10, CD13 , CD29 , CD44 , CD49e, CD59, CD90 , CD166	HLA-DR , CD11b, CD45
Cao 2005 (54)	HLA-ABC, CD29 , CD44 , CD105 , CD166, Flk-1	CD31 , CD34, CD45 , CD106, CD184
Moon 2006 (55)	CD44 , CD90	CD31 , CD45 , Flk-1
Yoshimura 2006 (56)	CD29 , CD34, CD44 , CD49d, CD73 , CD90 , CD105 , CD151	CD31 , CD45 , CD105, CD146
Oedayrajsingh-Varma 2006 (47)	CD34, CD90 , CD105 , CD166	CD31 , CD45
DiMuzio 2007 (57)	CD13 , CD29 , CD90	
Zannettino 2008 (58)	3G5, CD44 , CD90 , CD105 , CD106, CD146, CD166, STRO-I	CD14 , CD31 , CD45
Fisher 2009 (59)		eNOS, vWF, CD31
Calazzo 2010 (60)	CD29 , CD44 , CD73 , CD90 , CD105 , eNOS	CD14 , CD31 , CD34, CD45 , CD133, vWF, VEGF-R 1&2
Zhang 2011 (48)	CD13 , CD29 , CD44 , CD73 , CD90 , CD105	
Wang 2013 (61)	CD44 , CD90	CD31, CD34, CD45

Frequent voorkomende en afwezige merkers zijn weergegeven in vet

Tabel 4: Differentiatie merkers en assays van cellijn specifieke differentiatie

Cellijn	Cellijn specifieke merker	Histologische / Immunocytochemische assay
<i>Adipogene</i>	Vetaccumulatie	Oil Red O LipidTox
<i>Osteogene</i>	Gecalcifieerde matrix	Von Kossa
<i>Chondrogene</i>	Gesulfateerde proteoglycanenrijke matrix	Alciaan Blauw

Tabel 5: Overzicht van gebruikte PRP concentraties

Concentratie (plts/mL)	Percentage van oorspronkelijke concentratie (%)
2x10 ⁶	100
1x10 ⁶	50
4x10 ⁵	20
2x10 ⁵	10
1x10 ⁵	5
5x10 ⁴	2,5

Tabel 6: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 24 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,080	1,377	1,670	1,470	1,267	0,940	0,913	0,513
Std. Deviatie	0,072	0,015	0,020	0,020	0,032	0,060	0,032	0,059

Paired Samples Test 24 uur									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	NEGC - POSC	-,29667	,08145	,04702	-,49899	-,09435	-6,309	2	,024
Pair 2	NEGC - 2,5%	-,59000	,09165	,05292	-,81767	-,36233	-11,150	2	,008
Pair 3	NEGC - 5%	-,39000	,06928	,04000	-,56211	-,21789	-9,750	2	,010
Pair 4	NEGC - 10%	-,18667	,04509	,02603	-,29868	-,07465	-7,170	2	,019
Pair 5	NEGC - 20%	,14000	,13115	,07572	-,18579	,46579	1,849	2	,206
Pair 6	NEGC - 50%	,16667	,05859	,03383	,02111	,31222	4,927	2	,039
Pair 7	NEGC - 100%	,56667	,08963	,05175	,34402	,78932	10,951	2	,008
Pair 8	POSC - 2,5%	-,29333	,02082	,01202	-,34504	-,24162	-24,407	2	,002
Pair 9	POSC - 5%	-,09333	,01528	,00882	-,13128	-,05539	-10,583	2	,009
Pair 10	POSC - 10%	,11000	,04583	,02646	-,00384	,22384	4,158	2	,053
Pair 11	POSC - 20%	,43667	,05686	,03283	,29541	,57792	13,301	2	,006
Pair 12	POSC - 50%	,46333	,03055	,01764	,38744	,53922	26,269	2	,001
Pair 13	POSC - 100%	,86333	,07234	,04177	,68363	1,04304	20,670	2	,002
Pair 14	2,5% - 5%	,20000	,03464	,02000	,11395	,28605	10,000	2	,010
Pair 15	2,5% - 10%	,40333	,04933	,02848	,28079	,52587	14,162	2	,005
Pair 16	2,5% - 20%	,73000	,04000	,02309	,63063	,82937	31,610	2	,001
Pair 17	2,5% - 50%	,75667	,04933	,02848	,63413	,87921	26,568	2	,001
Pair 18	2,5% - 100%	1,15667	,05859	,03383	1,01111	1,30222	34,191	2	,001
Pair 19	5% - 10%	,20333	,04041	,02333	,10294	,30373	8,714	2	,013
Pair 20	5% - 20%	,53000	,07211	,04163	,35087	,70913	12,730	2	,006
Pair 21	5% - 50%	,55667	,01528	,00882	,51872	,59461	63,120	2	,000
Pair 22	5% - 100%	,95667	,07767	,04485	,76371	1,14962	21,333	2	,002
Pair 23	10% - 20%	,32667	,08737	,05044	,10963	,54370	6,476	2	,023
Pair 24	10% - 50%	,35333	,04041	,02333	,25294	,45373	15,143	2	,004
Pair 25	10% - 100%	,75333	,05132	,02963	,62586	,88081	25,427	2	,002
Pair 26	20% - 50%	,02667	,08737	,05044	-,19037	,24370	,529	2	,650
Pair 27	20% - 100%	,42667	,07638	,04410	,23694	,61640	9,676	2	,011
Pair 28	50% - 100%	,40000	,08544	,04933	,18776	,61224	8,109	2	,015

Tabel 7: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 48 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,333	1,633	1,770	1,817	1,590	1,323	1,067	0,617
Std. Deviatie	0,038	0,252	0,137	0,096	0,108	0,055	0,153	0,006

Paired Samples Test 48 uur									
		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	NEGC - POSC	-,30000	,24515	,14154	-,90899	,30899	-2,120	2	,168
Pair 2	NEGC - 2,5%	-,43667	,11590	,06692	-,72458	-,14875	-6,526	2	,023
Pair 3	NEGC - 5%	-,48333	,13317	,07688	-,81414	-,15253	-6,287	2	,024
Pair 4	NEGC - 10%	-,25667	,07506	,04333	-,44311	-,07022	-5,923	2	,027
Pair 5	NEGC - 20%	,01000	,08544	,04933	-,20224	,22224	,203	2	,858
Pair 6	NEGC - 50%	,26667	,18556	,10713	-,19430	,72763	2,489	2	,131
Pair 7	NEGC - 100%	,71667	,03215	,01856	,63681	,79652	38,615	2	,001
Pair 8	POSC - 2,5%	-,13667	,34819	,20103	-1,00161	,72827	-,680	2	,567
Pair 9	POSC - 5%	-,18333	,30860	,17817	-,94994	,58327	-1,029	2	,412
Pair 10	POSC - 10%	,04333	,28989	,16737	-,67678	,76345	,259	2	,820
Pair 11	POSC - 20%	,31000	,30116	,17388	-,43813	1,05813	1,783	2	,217
Pair 12	POSC - 50%	,56667	,37859	,21858	-,37381	1,50715	2,592	2	,122
Pair 13	POSC - 100%	1,01667	,25106	,14495	,39299	1,64035	7,014	2	,020
Pair 14	2,5% - 5%	-,04667	,20108	,11609	-,54618	,45284	-,402	2	,727
Pair 15	2,5% - 10%	,18000	,06000	,03464	,03095	,32905	5,196	2	,035
Pair 16	2,5% - 20%	,44667	,14295	,08253	,09157	,80176	5,412	2	,032
Pair 17	2,5% - 50%	,70333	,21962	,12680	,15776	1,24890	5,547	2	,031
Pair 18	2,5% - 100%	1,15333	,13317	,07688	,82253	1,48414	15,001	2	,004
Pair 19	5% - 10%	,22667	,19348	,11170	-,25396	,70729	2,029	2	,180
Pair 20	5% - 20%	,49333	,05859	,03383	,34778	,63889	14,583	2	,005
Pair 21	5% - 50%	,75000	,07000	,04041	,57611	,92389	18,558	2	,003
Pair 22	5% - 100%	1,20000	,10149	,05859	,94789	1,45211	20,480	2	,002
Pair 23	10% - 20%	,26667	,13650	,07881	-,07243	,60576	3,384	2	,077
Pair 24	10% - 50%	,52333	,23029	,13296	-,04874	1,09540	3,936	2	,059
Pair 25	10% - 100%	,97333	,10263	,05925	,71838	1,22829	16,426	2	,004
Pair 26	20% - 50%	,25667	,10017	,05783	,00784	,50549	4,438	2	,047
Pair 27	20% - 100%	,70667	,05859	,03383	,56111	,85222	20,889	2	,002
Pair 28	50% - 100%	,45000	,15716	,09074	,05959	,84041	4,959	2	,038

Tabel 8: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC proliferatie na 72 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,507	1,807	2,140	1,987	1,700	1,640	1,510	1,323
Std. Deviatie	0,095	0,015	0,053	0,021	0,017	0,050	0,040	0,117

Paired Samples Test 72 uur									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	NEGC - POSC	-,30000	,08000	,04619	-,49873	-,10127	-6,495	2	,023
Pair 2	NEGC - 2,5%	-,63333	,11590	,06692	-,92125	-,34542	-9,465	2	,011
Pair 3	NEGC - 5%	-,48000	,10149	,05859	-,73211	-,22789	-8,192	2	,015
Pair 4	NEGC - 10%	-,19333	,08083	,04667	-,39412	,00746	-4,143	2	,054
Pair 5	NEGC - 20%	-,13333	,12662	,07311	-,44788	,18122	-1,824	2	,210
Pair 6	NEGC - 50%	-,00333	,08145	,04702	-,20565	,19899	-,071	2	,950
Pair 7	NEGC - 100%	,18333	,17214	,09939	-,24429	,61096	1,845	2	,206
Pair 8	POSC - 2,5%	-,33333	,05508	,03180	-,47015	-,19652	-10,483	2	,009
Pair 9	POSC - 5%	-,18000	,02646	,01528	-,24572	-,11428	-11,784	2	,007
Pair 10	POSC - 10%	,10667	,01155	,00667	,07798	,13535	16,000	2	,004
Pair 11	POSC - 20%	,16667	,05686	,03283	,02541	,30792	5,077	2	,037
Pair 12	POSC - 50%	,29667	,03215	,01856	,21681	,37652	15,985	2	,004
Pair 13	POSC - 100%	,48333	,12014	,06936	,18489	,78177	6,968	2	,020
Pair 14	2,5% - 5%	,15333	,03215	,01856	,07348	,23319	8,262	2	,014
Pair 15	2,5% - 10%	,44000	,06557	,03786	,27710	,60290	11,622	2	,007
Pair 16	2,5% - 20%	,50000	,01732	,01000	,45697	,54303	50,000	2	,000
Pair 17	2,5% - 50%	,63000	,03464	,02000	,54395	,71605	31,500	2	,001
Pair 18	2,5% - 100%	,81667	,06506	,03756	,65504	,97829	21,740	2	,002
Pair 19	5% - 10%	,28667	,03512	,02028	,19943	,37391	14,138	2	,005
Pair 20	5% - 20%	,34667	,03055	,01764	,27078	,42256	19,654	2	,003
Pair 21	5% - 50%	,47667	,02887	,01667	,40496	,54838	28,600	2	,001
Pair 22	5% - 100%	,66333	,09609	,05548	,42463	,90203	11,957	2	,007
Pair 23	10% - 20%	,06000	,06557	,03786	-,10290	,22290	1,585	2	,254
Pair 24	10% - 50%	,19000	,04359	,02517	,08172	,29828	7,550	2	,017
Pair 25	10% - 100%	,37667	,13051	,07535	,05246	,70088	4,999	2	,038
Pair 26	20% - 50%	,13000	,04583	,02646	,01616	,24384	4,914	2	,039
Pair 27	20% - 100%	,31667	,06807	,03930	,14757	,48576	8,058	2	,015
Pair 28	50% - 100%	,18667	,09609	,05548	-,05203	,42537	3,365	2	,078

Tabel 9: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op EC proliferatie na 24 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	0,717	0,917	1,256	1,366	1,202	0,903	0,701	0,575
Std. Deviatie	0,144	0,044	0,052	0,077	0,239	0,054	0,052	0,201

Paired Samples Test na 24 uur									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	NEGC - POSC	-,199667	,181475	,104775	-,650477	,251143	-1,906	2	,197
Pair 2	NEGC - 2,5%	-,538667	,182659	,105458	-,992417	-,084916	-5,108	2	,036
Pair 3	NEGC - 5%	-,648667	,220037	,127038	-1,195269	-,102064	-5,106	2	,036
Pair 4	NEGC - 10%	-,485000	,215286	,124295	-1,019800	,049800	-3,902	2	,060
Pair 5	NEGC - 20%	-,185667	,159544	,092113	-,581996	,210663	-2,016	2	,181
Pair 6	NEGC - 50%	,016667	,138500	,079963	-,327387	,360720	,208	2	,854
Pair 7	NEGC - 100%	,142667	,243537	,140606	-,462313	,747646	1,015	2	,417
Pair 8	POSC - 2,5%	-,339000	,064117	,037018	-,498276	-,179724	-9,158	2	,012
Pair 9	POSC - 5%	-,449000	,044306	,025580	-,559062	-,338938	-17,553	2	,003
Pair 10	POSC - 10%	-,285333	,279216	,161205	-,978943	,408277	-1,770	2	,219
Pair 11	POSC - 20%	,014000	,084504	,048789	-,195921	,223921	,287	2	,801
Pair 12	POSC - 50%	,216333	,090787	,052416	-,009195	,441861	4,127	2	,054
Pair 13	POSC - 100%	,342333	,229805	,132678	-,228534	,913201	2,580	2	,123
Pair 14	2,5% - 5%	-,110000	,061579	,035553	-,262971	,042971	-3,094	2	,091
Pair 15	2,5% - 10%	,053667	,226297	,130653	-,508486	,615820	,411	2	,721
Pair 16	2,5% - 20%	,353000	,032078	,018520	,273314	,432686	19,060	2	,003
Pair 17	2,5% - 50%	,555333	,050639	,029237	,429538	,681128	18,994	2	,003
Pair 18	2,5% - 100%	,681333	,166872	,096344	,266800	1,095867	7,072	2	,019
Pair 19	5% - 10%	,163667	,287830	,166179	-,551344	,878677	,985	2	,429
Pair 20	5% - 20%	,463000	,092418	,053357	,233422	,692578	8,677	2	,013
Pair 21	5% - 50%	,665333	,107128	,061850	,399213	,931453	10,757	2	,009
Pair 22	5% - 100%	,791333	,223030	,128766	,237296	1,345370	6,145	2	,025
Pair 23	10% - 20%	,299333	,196963	,113717	-,189949	,788616	2,632	2	,119
Pair 24	10% - 50%	,501667	,188537	,108852	,033314	,970019	4,609	2	,044
Pair 25	10% - 100%	,627667	,105044	,060647	,366722	,888612	10,349	2	,009
Pair 26	20% - 50%	,202333	,021385	,012347	,149209	,255457	16,387	2	,004
Pair 27	20% - 100%	,328333	,147314	,085052	-,037614	,694281	3,860	2	,061
Pair 28	50% - 100%	,126000	,150851	,087094	-,248734	,500734	1,447	2	,285

Tabel 10: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op EC proliferatie na 48 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	0,860	1,081	1,370	1,537	1,332	1,281	1,203	0,932
Std. Deviatie	0,046	0,072	0,051	0,084	0,057	0,031	0,119	0,078

Paired Samples Test na 48 uur									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	NEGC - POSC	-,221333	,049014	,028298	-,343090	-,099577	-7,822	2	,016
Pair 2	NEGC - 2,5%	-,510000	,042438	,024502	-,615422	-,404578	-20,815	2	,002
Pair 3	NEGC - 5%	-,676667	,129454	,074740	-,998248	-,355085	-9,054	2	,012
Pair 4	NEGC - 10%	-,471667	,094246	,054413	-,705787	-,237546	-8,668	2	,013
Pair 5	NEGC - 20%	-,420667	,034530	,019936	-,506444	-,334889	-21,101	2	,002
Pair 6	NEGC - 50%	-,343333	,126271	,072903	-,657008	-,029659	-4,709	2	,042
Pair 7	NEGC - 100%	-,071667	,123062	,071050	-,377370	,234037	-1,009	2	,419
Pair 8	POSC - 2,5%	-,288667	,023007	,013283	-,345820	-,231514	-21,732	2	,002
Pair 9	POSC - 5%	-,455333	,146005	,084296	-,818029	-,092638	-5,402	2	,033
Pair 10	POSC - 10%	-,250333	,129218	,074604	-,571329	,070662	-3,355	2	,078
Pair 11	POSC - 20%	-,199333	,041405	,023905	-,302188	-,096479	-8,339	2	,014
Pair 12	POSC - 50%	-,122000	,174640	,100828	-,555829	,311829	-1,210	2	,350
Pair 13	POSC - 100%	,149667	,142339	,082179	-,203923	,503256	1,821	2	,210
Pair 14	2,5% - 5%	-,166667	,123001	,071015	-,472219	,138886	-2,347	2	,143
Pair 15	2,5% - 10%	,038333	,108542	,062667	-,231300	,307966	,612	2	,603
Pair 16	2,5% - 20%	,089333	,020306	,011724	,038890	,139776	7,620	2	,017
Pair 17	2,5% - 50%	,166667	,161500	,093242	-,234522	,567856	1,787	2	,216
Pair 18	2,5% - 100%	,438333	,119358	,068911	,141832	,734835	6,361	2	,024
Pair 19	5% - 10%	,205000	,061025	,035233	,053407	,356593	5,818	2	,028
Pair 20	5% - 20%	,256000	,107093	,061830	-,010035	,522035	4,140	2	,054
Pair 21	5% - 50%	,333333	,145342	,083913	-,027717	,694383	3,972	2	,058
Pair 22	5% - 100%	,605000	,009539	,005508	,581303	,628697	109,849	2	,000
Pair 23	10% - 20%	,051000	,088357	,051013	-,168492	,270492	1,000	2	,423
Pair 24	10% - 50%	,128333	,086431	,049901	-,086373	,343040	2,572	2	,124
Pair 25	10% - 100%	,400000	,051507	,029738	,272049	,527951	13,451	2	,005
Pair 26	20% - 50%	,077333	,143228	,082693	-,278465	,433132	,935	2	,448
Pair 27	20% - 100%	,349000	,102533	,059197	,094294	,603706	5,896	2	,028
Pair 28	50% - 100%	,271667	,135902	,078463	-,065932	,609266	3,462	2	,074

Tabel 11: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op EC proliferatie na 72 uur.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	1,071	1,244	1,549	1,888	1,728	1,589	1,335	0,984
Std. Deviatie	0,076	0,040	0,032	0,068	0,046	0,010	0,047	0,014

Paired Samples Test na 72 uur									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	NEGC - POSC	-,172333	,100818	,058207	-,422780	,078113	-2,961	2	,098
Pair 2	NEGC - 2,5%	-,477667	,043822	,025300	-,586526	-,368808	-18,880	2	,003
Pair 3	NEGC - 5%	-,817000	,138459	,079940	-1,160952	-,473048	-10,220	2	,009
Pair 4	NEGC - 10%	-,656333	,062132	,035872	-,810677	-,501990	-18,297	2	,003
Pair 5	NEGC - 20%	-,517333	,084583	,048834	-,727450	-,307217	-10,594	2	,009
Pair 6	NEGC - 50%	-,263667	,120869	,069784	-,563922	,036589	-3,778	2	,063
Pair 7	NEGC - 100%	,087667	,079034	,045630	-,108664	,283997	1,921	2	,195
Pair 8	POSC - 2,5%	-,305333	,062533	,036103	-,460673	-,149994	-8,457	2	,014
Pair 9	POSC - 5%	-,644667	,081464	,047033	-,847034	-,442300	-13,707	2	,005
Pair 10	POSC - 10%	-,484000	,045431	,026230	-,596858	-,371142	-18,452	2	,003
Pair 11	POSC - 20%	-,345000	,031432	,018148	-,423083	-,266917	-19,011	2	,003
Pair 12	POSC - 50%	-,091333	,032192	,018586	-,171303	-,011364	-4,914	2	,039
Pair 13	POSC - 100%	,260000	,026665	,015395	,193762	,326238	16,889	2	,003
Pair 14	2,5% - 5%	-,339333	,096340	,055622	-,578654	-,100012	-6,101	2	,026
Pair 15	2,5% - 10%	-,178667	,039829	,022995	-,277607	-,079726	-7,770	2	,016
Pair 16	2,5% - 20%	-,039667	,041187	,023779	-,141980	,062646	-1,668	2	,237
Pair 17	2,5% - 50%	,214000	,077929	,044993	,020413	,407587	4,756	2	,041
Pair 18	2,5% - 100%	,565333	,037448	,021620	,472308	,658359	26,148	2	,001
Pair 19	5% - 10%	,160667	,112500	,064952	-,118800	,440133	2,474	2	,132
Pair 20	5% - 20%	,299667	,064485	,037231	,139477	,459857	8,049	2	,015
Pair 21	5% - 50%	,553333	,053463	,030867	,420523	,686144	17,926	2	,003
Pair 22	5% - 100%	,904667	,075501	,043590	,717113	1,092220	20,754	2	,002
Pair 23	10% - 20%	,139000	,048042	,027737	,019658	,258342	5,011	2	,038
Pair 24	10% - 50%	,392667	,074272	,042881	,208165	,577169	9,157	2	,012
Pair 25	10% - 100%	,744000	,037027	,021378	,652020	,835980	34,803	2	,001
Pair 26	20% - 50%	,253667	,036856	,021279	,162112	,345221	11,921	2	,007
Pair 27	20% - 100%	,605000	,011269	,006506	,577005	,632995	92,985	2	,000
Pair 28	50% - 100%	,351333	,042194	,024361	,246518	,456149	14,422	2	,005

Tabel 12: Resultaten van MTS assay voor het effect van PRP op ADSC invasie.

	NEGC	POSC	2,5%	5%	10%	20%	50%	100%
Gemiddelde	0,64433	0,96633	0,99800	1,16133	1,31867	1,55633	1,94267	2,08833
Std. Deviatie	0,044061	0,012097	0,036166	0,039804	0,032347	0,047269	0,025580	0,047983

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	NEGC - POSC	-,322000	,042579	,024583	-,427773	-,216227	-13,098	2	,006
Pair 2	NEGC - 2,5%	-,353667	,080208	,046308	-,552915	-,154419	-7,637	2	,017
Pair 3	NEGC - 5%	-,517000	,005196	,003000	-,529908	-,504092	-172,333	2	,000
Pair 4	NEGC - 10%	-,674333	,054096	,031232	-,808714	-,539952	-21,591	2	,002
Pair 5	NEGC - 20%	-,912000	,017349	,010017	-,955098	-,868902	-91,048	2	,000
Pair 6	NEGC - 50%	-1,298333	,069501	,040126	-1,470982	-1,125684	-32,356	2	,001
Pair 7	NEGC - 100%	-1,444000	,083863	,048418	-1,652327	-1,235673	-29,823	2	,001
Pair 8	POSC - 2,5%	-,031667	,041429	,023919	-,134581	,071248	-1,324	2	,317
Pair 9	POSC - 5%	-,195000	,037643	,021733	-,288511	-,101489	-8,972	2	,012
Pair 10	POSC - 10%	-,352333	,020793	,012005	-,403985	-,300682	-29,350	2	,001
Pair 11	POSC - 20%	-,590000	,041243	,023812	-,692454	-,487546	-24,778	2	,002
Pair 12	POSC - 50%	-,976333	,029670	,017130	-1,050039	-,902628	-56,995	2	,000
Pair 13	POSC - 100%	-1,122000	,042462	,024515	-1,227481	-1,016519	-45,767	2	,000
Pair 14	2,5% - 5%	-,163333	,075963	,043857	-,352035	,025368	-3,724	2	,065
Pair 15	2,5% - 10%	-,320667	,050063	,028904	-,445031	-,196303	-11,094	2	,008
Pair 16	2,5% - 20%	-,558333	,082306	,047520	-,762794	-,353873	-11,750	2	,007
Pair 17	2,5% - 50%	-,944667	,011846	,006839	-,974094	-,915239	-138,121	2	,000
Pair 18	2,5% - 100%	-1,090333	,037899	,021881	-1,184480	-,996187	-49,830	2	,000
Pair 19	5% - 10%	-,157333	,048911	,028239	-,278836	-,035830	-5,571	2	,031
Pair 20	5% - 20%	-,395000	,015133	,008737	-,432592	-,357408	-45,211	2	,000
Pair 21	5% - 50%	-,781333	,065064	,037565	-,942961	-,619705	-20,800	2	,002
Pair 22	5% - 100%	-,927000	,078715	,045446	-1,122538	-,731462	-20,398	2	,002
Pair 23	10% - 20%	-,237667	,045797	,026441	-,351432	-,123901	-8,989	2	,012
Pair 24	10% - 50%	-,624000	,038974	,022502	-,720818	-,527182	-27,731	2	,001
Pair 25	10% - 100%	-,769667	,032563	,018800	-,850557	-,688776	-40,939	2	,001
Pair 26	20% - 50%	-,386333	,070727	,040834	-,562029	-,210637	-9,461	2	,011
Pair 27	20% - 100%	-,532000	,077904	,044978	-,725524	-,338476	-11,828	2	,007
Pair 28	50% - 100%	-,145667	,033307	,019230	-,228405	-,062928	-7,575	2	,017