





Appendix



Summary

Vascular tissue engineering is an advanced therapeutic approach to provide appropriate alternative grafts for blood vessel transplantation in patients with cardiovascular diseases and in particular coronary artery disease. Tissue engineering combines the engineering and biological methodologies to regulate cell behavior and tissue regeneration. Smartly designed biomaterials in combination with external stimuli provide essential cues to the physiological microenvironment of the cell to direct its position and function in tissue engineered constructs. In this study, we employed such a biomaterial, in particular one that responds to an external electrical field.

Electro-responsive hydrogels hold great potential as smart substrates and we hypothesized that application of these hydrogels improves cell function and results in desired cell seeding behavior and tissue formation upon application of electric stimuli.

A hybrid electro responsive hydrogel was designed and manufactured by combining Poly acrylic acid and Fibrin. Characterization of the prepared samples by FTIR-ATR, scanning electron microscopy and swelling measurement confirmed the incorporation of Fibrin in the hydrogel network. Electrical stimulation (0.06 v/mm, 0.0167 Hz, 2 hrs) resulted in continues bending, produced by hydrogel swelling/ deswelling. The gel was biocompatible with no cytotoxic effects on smooth muscle cells (SMCs). Electrical stimulation of PAA/Fibrin hydrogels seeded with SMCs caused Fibrin fibers and smooth muscle actin filaments to align due to swelling/deswelling of the hydrogel. Additionally, penetration of cells into the depth of the hydrogel was significantly enhanced in the stimulated hydrogels compared with non-stimulated samples. In the presence of the voltage gated calcium channel blocker Verapamil, SMCs still aligned and penetrated into the gel, suggesting that observed effect was not due to a direct effect of electrical stimulation on the cells.

We subsequently investigated if the PAA/Fibrin biomaterial in combination with alternating electrical stimulation supported long-term collagen production and remodeling of the tissue construct. Seeded hydrogels were subjected to an electrical field (0.06 v/mm, 0.0167 Hz, 2 hrs) once, twice or three times a week during 4 weeks of culturing and compared with non-stimulated control condition. Collagen morphology and production were assessed by CNA-35 probe and two-photon laser scanning microscopy. Electrical stimulation resulted in

fibrillar collagen network whereas non-stimulated samples showed local spot deposition of collagen in the structure. As expected from the cell distribution collagen production in the center of the hydrogels was increased by more than 100 fold (1x stimulation/wk) after 4 weeks of culture compared with controls. Such an increase was further confirmed by higher collagen gene expressions in the stimulated samples by PCR analysis. The enhanced collagen production and distribution resulted in significantly improved mechanical properties of the hydrogels. Elevated Matrix Metalloprotease II (MMP2) activity in stimulated samples suggests a role in reorganization of the collagen in the stimulated samples.

We hypothesized that the PAA/Fibrin scaffold in combination with electrical stimulation might change SMC phenotype other than stimulating them to produce more collagen. Western Blot analysis of the samples revealed increased SMMHC, Calponin and SM- α actin proteins expression in electrically stimulated PAA/Fibrin hydrogels, indicating a phenotype transition of SMCs into a more contractile state together with the increased collagen production this suggests a dual phenotype pattern where some SMC are contractile while others are synthetic (i.e. collagen producing).

Further exploring the mechanism of alignment, in response to electrical stimulation, we studied the same electrical conditions in a PAA gel only (without Fibrin). Conversely, we subjected PAA/Fibrin gel to cyclic stretch equivalent to the induced mechanical change by the electrical stimulus (Flexcell: 5% stretch, 0,0167 Hz, 2 hrs). In the absence of Fibrin, electrical stimulation of the SMC in PAA gel SMC no longer aligned in spite of the induced mechanical force of the gel. This indicates that the deformation of Fibrin by electrical shape change of PAA is crucial for the observed effects on SMCs. Mechanical stimulation in the Flexcell apparatus did not affect SMC phenotype either. Together, these results suggest that both mechanical alignment of Fibrin and electrical stimulation are important for the observed changes in SMC phenotype.

The enhanced cell penetration and phenotypic SMC changes prompted us to apply the PAA/Fibrin gel as coating of an electrospun PCL graft. Grafts were implanted as interposition graft in a rat abdominal aorta. Rats were exposed to electrical stimulation (1 mW/cm², 0.0167 Hz) in ventro-dorsal axis (1 hour) followed by 1 hour in bi-lateral axis, once per week during 4 and 8 weeks of implantation. Non-stimulated rats with PAA/fibrin/PCL and PCL grafts served as controls. Angiography and ultrasound showed 100% open lumen of stimulated and non-stimulated PAA/Fibrin/PCL grafts in 4 weeks and 8 weeks of implantation. In the non-stimulated grafts 3 out of 12 grafts developed an

aneurysm versus 0/12 in the stimulated group. Immunohistochemistry images of explanted vascular grafts after 4 and 8 weeks revealed higher cellular density in the stimulated grafts compared to non-stimulated ones. Stimulation of grafts also resulted in enhanced endothelial coverage during the first 4 weeks of implantation as judged by CD31 immunopositivity. CD 68 staining showed no significant difference in the foreign body reaction between stimulated and non-stimulated grafts. Promising results of electrically stimulated hybrid grafts indicated high potential of our proposed system for small-diameter vascular grafts development.

A general discussion concludes the body of work by integrating the obtained results in the research study with reference to existing evidence. We conclude that cell behavior and tissue formation in tissue engineered constructs can be controlled by micro and macro scale deformations of electro-responsive hydrogels subjected to electrical field. The proposed system has a high potential as a multi-functional smart biomaterial for biomedical applications.

Samenvatting



Tissue engineering van bloedvaten is een geavanceerde medische technologie die tot doel heeft om patiënt-eigen vaten te vervangen als graft bij diverse vormen arteriële obstructie. In tissue engineering worden chemisch-technische, fysische en biologische methoden gecombineerd om cellen te sturen zodat ze optimaal het beoogde weefsel nabootsen. Slimme biomaterialen al of niet in samenwerking met externe stimuli blijken in staat om de ligging, oriëntatie en functie van cellen te kunnen beïnvloeden. In dit project, bestaande uit een viertal studies, hebben we zo'n biomateriaal gebruikt en gekeken naar de effecten van elektrische stimulatie op gedrag van gladde spiercellen genomen uit de vaatwand.

Biomaterialen die reageren op elektrische stimuli zijn veelbelovend en we hebben daarom onderzocht of deze materialen in staat zijn om cel distributie en functie te sturen en of daarbij weefsel productie wordt verbeterd of bespoedigd. Een hybride hydrogel van Poly-acryl zuur en Fibrine die reageert op een externe elektrische spanning werd ontworpen en gemaakt. De hydrogel werd gekarakteriseerd met Fourier Transformed Infra Red spectroscopy gebruikmakend van attenuated total reflectance (FITR-ATR) en met scanning electron microscopy (SEM). Elektrische stimulatie (0.06V/mm, 0.0167 Hz) gedurende 2 uur veroorzaakte oscillerende verbuiging van de hydrogel als gevolg van alternerende zwelling en krimp. De gel was biocompatibel en niet toxisch voor cellen. In aanwezigheid van gladde spiercellen veroorzaakte de verbuiging van de hydrogel een parallelle ligging van Fibrine vezels en cellen. De ligging van de cellen werd vastgesteld door visualisatie van intracellulaire actine vezels. Tevens zorgde de elektrische stimulatie van de hydrogel voor betere penetratie van de cellen in de gel. Dit was onafhankelijk van elektrische activatie of contractie van de cellen aangezien Verapamil, een blokker van voltage afhankelijke Calcium kanalen, de geobserveerde effecten niet inhibeerde.

Vervolgens werd onderzocht of de verbeterde penetratie en de parallelle oriëntatie van de gladde spiercellen ook leidt tot betere weefsel productie, meestal gekwantificeerd aan de hand van collageen productie. Hiertoe werden de hydrogelen gezaaid met gladde spiercellen, vervolgens al of niet elektrisch gestimuleerd, en 4 weken gekweekt zodat weefsel vorming kon plaatsvinden. De stimulatie vond 1, 2, of 3 keer per week plaats om het effect van totale stimulatie duur te testen. De hoeveelheid geproduceerd collageen en de structuur van geproduceerde collageen werd onderzocht met behulp van

beeldvorming (twee foton laser scanning microscopie), waarbij collageen werd aangekleurd met een CNA-35 eiwit dat specifiek bindt aan fibrillair collageen. Elektrische stimulatie resulteerde in een netwerk van fibrillair collageen terwijl de niet gestimuleerde gekweekte hydrogelen alleen lokale niet gestructureerde eilandjes van collageen vertoonden. Als te verwachten op grond van de diepere cel penetratie in de gel was ook de collageen depositie dieper in de gel aanwezig (1x stimulation/wk), tot zelfs 100 keer zoveel als in niet-gestimuleerde hydrogelen. De grotere hoeveelheid collageen was deels het gevolg van verhoogde productie aangezien door PCR analyse een hogere transcriptie van het collageen eiwit werd aangetoond. Fibrillair collageen verleent stevigheid aan het weefsel en de stimulatie leidde dan ook tot significant sterkere weefsels, waarneembaar in mechanische testen. Afbraak van collageen gebeurt door een set enzymen, metalloproteinases genoemd. In gladde spiercellen is MMP-2 de belangrijkste. MMP-2 activiteit werd ook verhoogd door elektrische stimulatie wat er op duidt dat het neergelegde collageen actief wordt gereorganiseerd, bijvoorbeeld om een betere onderlinge structuur te kweken.

Andere gladde spiercel eigenschappen kunnen ook veranderen door kweek in de PAA/Fibrine hydrogelen die elektrisch worden gestimuleerd. Dit werd getest door te kijken naar de eiwit expressie van smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC), Calponin en Smooth muscle alpha actin (SM- α) met behulp van Western Blot analyse. Het bleek dat deze eiwitten ook werden gestimuleerd door de elektrisch geïnduceerde, mechanische vervorming van de PAA/Fibrine hydrogel, wat suggereert dat deze gladde spiercellen een meer contractiel fenotype gingen vertonen terwijl in het totale weefsel ook meer collageen werd geproduceerd, duidend op een synthetisch fenotype. In afwezigheid van Fibrine, dus alleen in de PAA gel werd geen effect van elektrische stimulatie op gladde spiercel fenotype waargenomen. Ook gaf cyclische mechanische rek van de PAA/Fibrine zonder elektrische stimulatie geen fenotypische responsen te zien. Dit betekent dat de vervorming van Fibrine door de elektrische geïnduceerde verandering van de PAA cruciaal is voor de geobserveerde effecten en dat de juiste parallelle oriëntatie van Fibrine noodzakelijk is de veranderingen in het fenotype van de gladde spiercel.

Verbeterde penetratie van gladde spiercellen in de hydrogel en hun fenotypische verandering in contractiele cellen zijn goede eigenschappen bij vaatwand genezing na stent plaatsing. In eerdere studies was een vasculaire graft getest die gemaakt is uit elektro-gesponnen Polycaprolacton draden. We veronderstelden dat coating van de PCL draden met PAA/Fibrine gel de ingroei van contractiele gladde spiercellen zou bevorderen en daarmee de intima

hyperplasie zou verminderen. Intima hyperplasie is een woekering van synthetische gladde spiercellen die het gestente bloedvat opnieuw vernauwd. De PAA/Fibrine gecoate PCL grafts werden geplaatst als interpositie grafts in de abdominale aorta van de rat. Ze werden transcutaan gestimuleerd met een elektrisch veld dat lokaal dezelfde sterkte had als in de in vitro studies. De follow up was 4 of 8 weken en gedurende de gehele periode werden ze eens per week gestimuleerd. Na 4 en 8 weken waren alle grafts open bij angiografische en echografische controle. Drie van de 12 niet gestimuleerde grafts hadden een aneurysma terwijl geen van de gestimuleerde grafts aneurysmatisch was. Zoals in vitro leidde stimulatie tot betere ingroei van gladde spiercellen en na 4 weken was ook de regeneratie van endotheel verhoogd. De vreemd lichaam reactie was gelijk in de groepen.

Deze veelbelovende resultaten met de PAA/Fibrine hydrogel die reversibel vervormd door elektrische stimulatie laten zien dat hybride hydrogelen uitstekend gebruikt kunnen worden in diverse regeneratieve geneeskunde applicaties. De ontwikkeling van een kleine diameter vasculaire graft is een van de mogelijkheden.

In een algemene discussie worden de resultaten van de vier studies geïntegreerd en gerelateerd aan vergelijkbare studies in de literatuur. Ik concludeer dat het gedrag van cellen en de resulterende weefselvorming gestuurd kan worden door reversibele vervormingen op micro en macro schaal van een elektrisch veld gevoelige hydrogel. Dit hybride biomateriaal heeft grote mogelijkheden als een multifunctioneel slim biomateriaal voor biomedische toepassingen.