

Endothelial cell function from a tissue engineering perspective

Citation for published version (APA):

Geenen, I. L. A. (2014). *Endothelial cell function from a tissue engineering perspective*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20140620ig>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20140620ig](https://doi.org/10.26481/dis.20140620ig)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.



Summary

SUMMARY

Small diameter vascular tissue-engineered grafts offer therapeutic potential for patients in need for vascular repair as a result of significant atherosclerosis, congenital defects or to create a vascular access. Current prosthetic alternatives for venous conduits are associated with high failure rates due to thrombotic and infectious complications. Autologous, cell-seeded vascular grafts grown *in vitro* on a biodegradable scaffold are considered to be less susceptible to these risks and considered a suitable alternative for clinical practice. Endothelial cells (ECs) seeded on the luminal side of such tissue-engineered grafts could provide an anti-thrombotic, anti-immunologic layer and control smooth muscle cell (SMC) function in the medial layer.

To accomplish clinical application of vascular tissue engineered grafts, several validation steps are essential that involve both animal models and patient-derived cells. A number of assays and animal models for studying endothelial function and tissue-engineered vascular grafts are described in this thesis. In *Chapter 2*, a modified thrombin generation assay is presented that allows analysis of endothelial thrombogenicity in a high-throughput manner. After removal of serum from culture medium, ECs appeared to support coagulation initiated mainly via the contact activation pathway. ECs derived from cardiovascular-diseased patients showed increased thrombin generation compared to ECs from control subjects.

The preference for venous ECs in vascular tissue engineering does no longer have to be based on practical arguments, (i.e. easier access than arterial ones) and can be justified now as well by their more beneficial anti-thrombogenic profile, as shown in *Chapter 3*. Except for migratory potential and prostacyclin production, other important cellular functions like proliferation and adhesion to fibronectin were comparable to arterial ECs, even for cells grown under arterial shear stress conditions.

To gain more insight in performance and behavior of ECs derived from diseased patients, a large study to evaluate ECs derived from two main target patient populations was initiated in *Chapter 4*. Patients undergoing coronary arterial bypass grafting (CABG) and patients with chronic kidney disease (CKD) were enrolled, and compared with control subjects. Except for higher thrombomodulin expression in CABG patients, a potential beneficial phenomenon, ECs from the two patient categories did not show inferior performance.

Studying small diameter tissue-engineered vascular grafts *in vivo* should ideally be performed in a small, uremic animal model, as vascular access in CKD patients is one of the first clinical applications of these grafts. Therefore, such a model was developed in

the rat (*Chapter 5*), and a native arteriovenous (AV) fistula was created in the neck. Fistula maturation was studied and was reduced in uremic animals due to nitric oxide (NO) resistance of SMCs, while endothelial function was normal. NO resistance could be ascribed to oxidation of the NO-receptor soluble guanylate cyclase (sGC) and could be treated by using a new pharmacological compound for oxidized sGC, BAY 60-2770. Treatment of uremic animals with BAY 60-2770 enlarged AV fistula diameters without increasing flow.

Before applying tissue-engineered vascular grafts in a clinical setting, these grafts need to be evaluated in a large animal model as well. In *Chapter 6*, grafts were implanted as carotid interposition conduits in pigs and their feasibility was evaluated. Mechanical strength of these grafts appeared to be insufficient, as shown by inferior suture strength and rupture of several grafts. Furthermore, a significant immunologic reaction occurred that resulted in luminal occlusion in most grafts. Using this model, a number of important aspects of inferior graft performance became apparent and provided leads for further improvement. A switch towards using different scaffold material (polycaprolactone) was made, and a minimal burst pressure test will be included in future *in vivo* studies.

Altogether, extensive insights in endothelial functions relevant for vascular tissue engineering are provided in this thesis. Evaluation of thrombogenicity can now be carried out in a high-throughput manner. By studying performance of patient-derived cells, an important translational step is set forward. The newly described syndrome of NO resistance in CKD is relevant for implantation of grafts in CKD patients, as smooth muscle function appears to be compromised by the presence of oxidative stress. Prevention of diminished vascular remodeling as a result of these uremic complications might be established by using sGC activators like BAY 60-2770. For further *in vivo* evaluation and optimization of tissue-engineered vascular grafts two animal models are presented, thereby bringing closer translation of tissue engineering techniques towards clinical application.



Nederlandse Samenvatting

SAMENVATTING

Veel patiënten met hart- en vaatziekten of nierfalen hebben kunstmatige vaatprotheses nodig ter vervanging van hun eigen, zieke bloedvaten. Getissue-engineerde grafts worden in het laboratorium gemaakt door middel van het zaaien van cellen op een bio-afbreekbare mal waarna deze in een bioreactor gekweekt wordt tot een kunstmatig bloedvat. In de laatste fase worden endotheelcellen, cellen die de binnenkant van bloedvaten bekleeden, in deze grafts gezaaid. Cellen die nodig zijn voor het produceren van deze grafts worden geïsoleerd uit de patiënten die uiteindelijk ook de graft zullen ontvangen.

De huidige therapieën waarbij kunststof vaatprotheses worden gebruikt, zijn geassocieerd met een hoog complicatierisico als gevolg van trombose (stolling), infecties en het ontstaan van vaatvernauwingen. Getissue-engineerde grafts bieden mogelijk een beter alternatief voor deze kunststof protheses vooral in situaties waar slagaderen met een kleine diameter moeten worden vervangen. Voor toekomstig gebruik van deze getissue-engineerde grafts in de klinische praktijk is er behoefte aan zogenaamde translationele studies, die onderzoeksresultaten uit het laboratorium kunnen vertalen naar toepassing in patiënten. In dit proefschrift worden een aantal translationele studies op het gebied van endotheelcellen gepresenteerd met als doel klinische toepassing van getissue-engineerde grafts te bevorderen.

Endotheelcellen dienen als een anti-trombotische en anti-immunologische laag om bloedstolling en ontsteking te voorkomen. In *Hoofdstuk 2* wordt de door ons ontwikkelde gemodificeerde trombine generatie assay beschreven, een methode waarmee bloedstolling op endotheelcellen kan worden gemeten in een groot aantal samples tegelijk ('high-throughput'). Hierbij bleek dat met name een specifieke route, namelijk contact activatie, van belang was om stolling te initiëren op deze endotheelcellen. Endotheelcellen van patiënten met coronairlijden (vernauwingen in de kransslagaders) bleken een hogere mate van stolling te veroorzaken dan cellen van controle personen.

Vaatprotheses worden meestal ter vervanging van een slagader gebruikt. Echter, voor onderzoek op het gebied van tissue engineering werden in het verleden altijd endotheelcellen uit aders (venes) gebruikt, in plaats van cellen uit slagaders (arteriën). In *Hoofdstuk 3* is onderzocht of deze veneuze endotheelcellen even goed functioneren als arteriële endotheelcellen. Met name functies die van belang zijn voor het gebruik van endotheelcellen in tissue engineering van bloedvaten, zoals celvermeerdering tijdens kweek, migratie van cellen, hechting

van cellen en anti-stolling werden onderzocht. Hoewel celmigratie verminderd was ten opzichte van arterieel endotheel, lieten veneuze cellen een vergelijkbare groei en hechting zien onder arteriële bloedstroomcondities. Daarnaast hadden veneuze cellen ook een gunstiger anti-stollingsprofiel dan arteriële cellen.

Voor gebruik van getissue-engineerde grafts in de kliniek is het noodzakelijk inzicht te hebben in de functie van endotheelcellen van patiënten die in de toekomst gebruikt worden voor het maken van deze grafts. Om dit te onderzoeken zijn in *Hoofdstuk 4* endotheelcellen van patiënten met coronairlijden en patiënten met nierfalen vergeleken met cellen van controle personen. Hoewel in *Hoofdstuk 2* in een kleinere groep patiënten met alleen coronairlijden en controles wel verschillen in mate van stollingsactivatie zichtbaar waren, liet een uitgebreidere analyse tussen 3 groepen geen verschil zien. Ook op het gebied van groei, genexpressie, celmigratie en productie van vaatverwijdende stoffen functioneren endotheelcellen van patiënten net zo goed als die van controle personen.

Nierpatiënten hebben dialyse nodig waarbij gebruik wordt gemaakt van een shunt (bloedvat of vaatprothese om twee bloedvaten te verbinden). Voor effectieve dialyse is een gerijpte, wijde shunt met voldoende bloeddorstrooming essentieel. Onder andere vanwege de frequente complicaties met kunststof shunts, worden getissue-engineerde grafts momenteel al in nierpatiënten getest. Voor het onderzoeken van getissue-engineerde grafts is dus een (klein) diermodel met nierfalen een zeer geschikt experimenteel model. Voor *Hoofdstuk 5* werd een rattenmodel met nierfalen ontwikkeld met een shunt in de nek. De functie van deze shunt werd na 3 weken geëvalueerd waarbij bleek dat nierfalen een negatieve invloed had op de verwijding en doorstroming van de shunt. Dit lijkt te maken te hebben met een verminderde werking van de sensor voor stikstofmonoxide (NO), een vaatverwijdende stof. Om deze sensor beter te laten functioneren werd een nieuw medicijn, BAY 60-2770, onderzocht. Dagelijkse toediening van dit medicijn leidde wel tot een grotere shunt diameter, maar niet tot een betere doorstroming van de shunt.

Tenslotte is in *Hoofdstuk 6* bekeken hoe getissue-engineerde grafts in de halsslagader van varkens functioneerden. Aangezien enkele grafts kort na implantatie scheurden, bleek de mechanische sterkte onvoldoende. Tevens was er een aanzienlijke ontstekingsreactie zichtbaar die in de meeste gevallen tot een afsluiting van de graft leidde. Op basis van deze resultaten worden momenteel nieuwe, verbeterde grafts geproduceerd, van andere materialen met een betere sterkte.

De resultaten uit de overige hoofdstukken bieden nieuwe aanknopingspunten voor het gebruik van endotheelcellen voor tissue engineering, en laten zien dat cellen van patiënten voldoende functioneren voor gebruik in toekomstige grafts. Klinische toepassing van getissue-engineerde grafts komt door de studies in dit proefschrift weer een stap dichterbij.

