

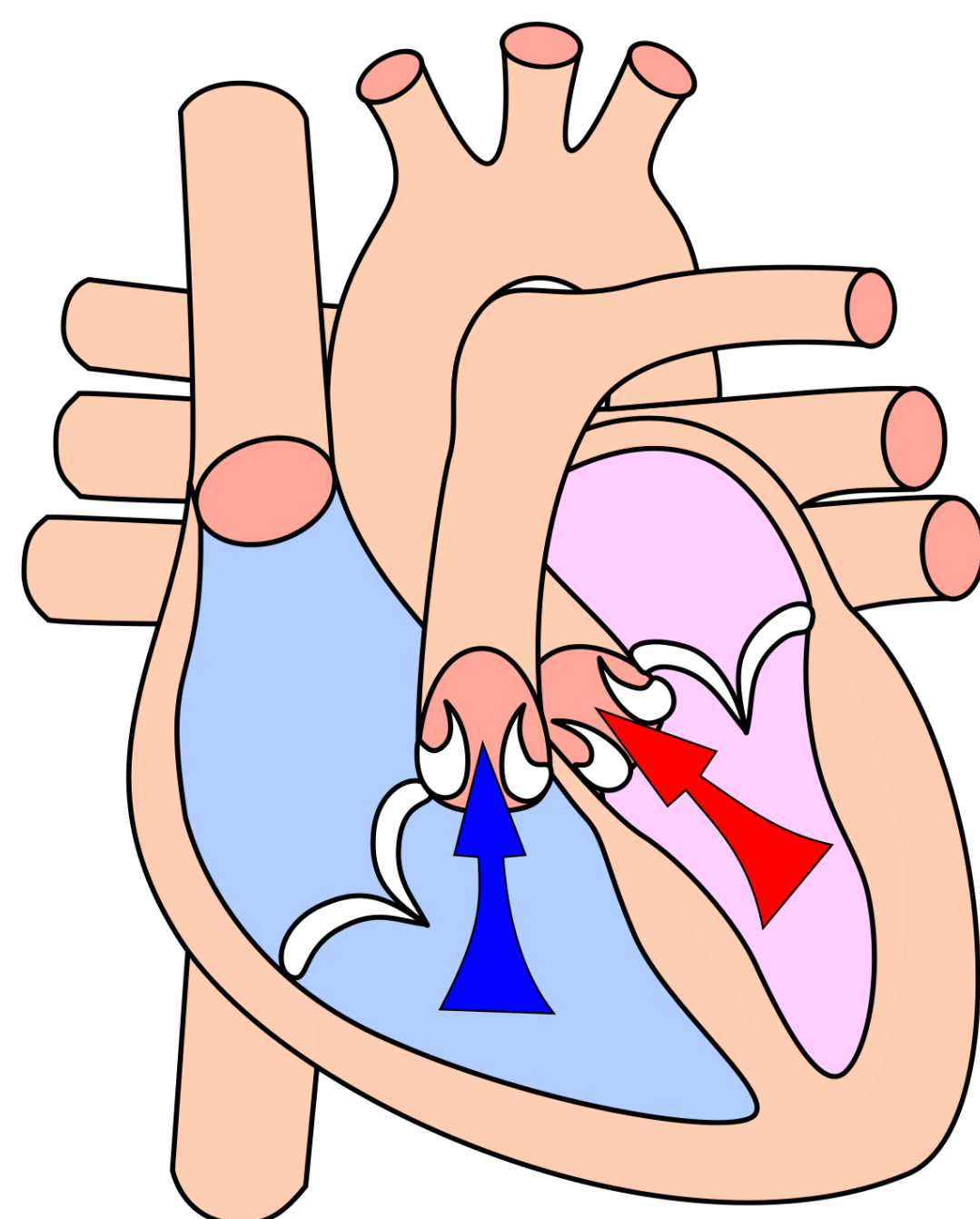
# Kwalitatieve evaluatie van hartbiopten van patiënten met aortaklepstenose

Sieme Peeters<sup>1</sup>, Ronald Driesen<sup>2</sup> en Esther Wolfs<sup>2</sup> -  
<sup>1</sup>UCLL Campus Gasthuisberg Herestraat 49, 3000 Leuven



## 1. Introductie

Aortaklepstenose is een vernauwing van de aortaklep in het hart. Dit wordt vaak veroorzaakt door de verkalking van de aortaklep en zorgt voor stijfheid en verminderde mobiliteit van de opening. Ontstekingen en lipide accumulatie zorgen in samenwerking met de verkalking voor de vernauwing [1]. Bij patiënten met aortahartklepstenose kan er interstitiële fibrose optreden in het hart. De toename van de collageen synthese wordt veroorzaakt door de myofibroblasten. Deze cellen zijn alleen maar te vinden bij pathologieën van het hart en ontstaan uit differentiatie van de fibroblasten. De toename van de collageensynthese staat direct gekoppeld met de fibroblastdifferentiatie. De interstitiële fibrose wordt geïnduceerd door de secretie van cytokines en groeifactoren zoals transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) geproduceerd door ontstekingscellen en cardiomyocyten in combinatie met mechanische stress. De stress ontstaat door een drukoverbelasting in de linkerventrikel met als gevolg ventriculaire hypertrofie. De differentiatie kan verder verspreiden door autocriene signalering naar de omliggende fibroblasten. De toename van de collageensynthese staat direct gekoppeld met de fibroblastdifferentiatie. De myofibroblasten produceren ook het enzym lxyloxidase. Dit enzym zorgt voor de crosslinking van collageen type één. Deze crosslinking zorgt voor de verstijving van de extracellulaire matrix, dit heeft een negatieve invloed op de ventriculaire functie en kan leiden tot hartfalen [2].

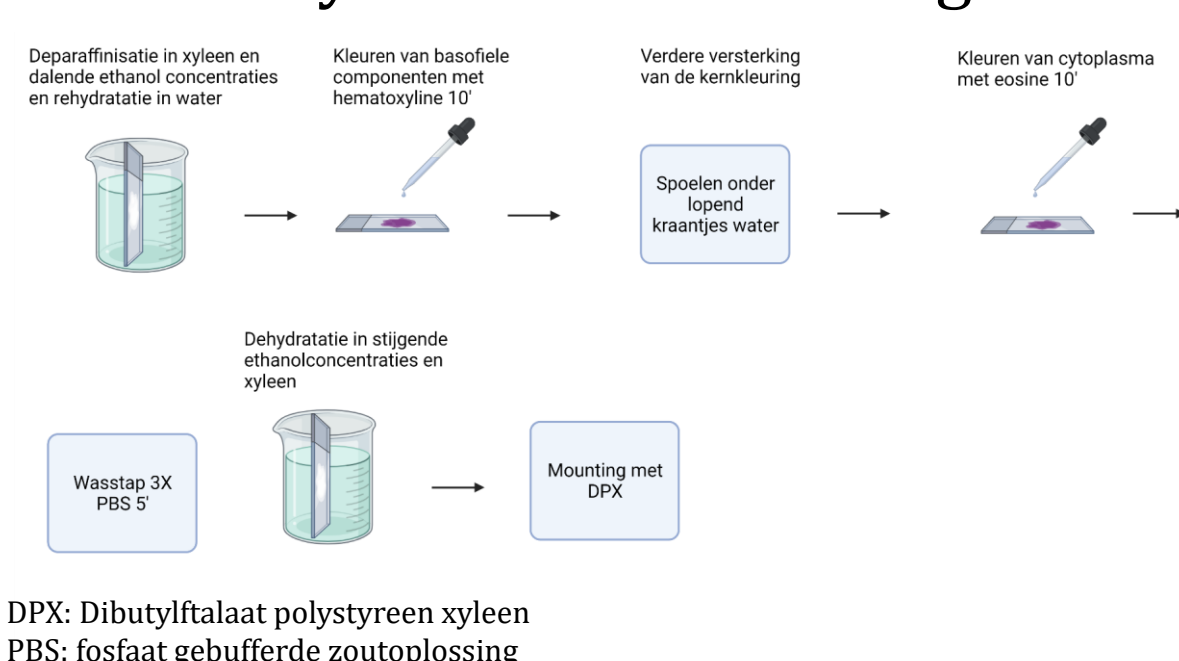


**Figuur 1:** Foto van het hart met de aortaklep aangeduid met een rode pijl en de pulmonalisklep met een blauwe pijl [3].

**Het doel van deze studie is het nakijken van de kwaliteit van stalen van patiënten met aortaklepstenose. De stalen afkomstig uit de linkerventrikel worden beoordeeld op hun fibrose, morfologie en structuur aan de hand van verschillende kleuringen.**

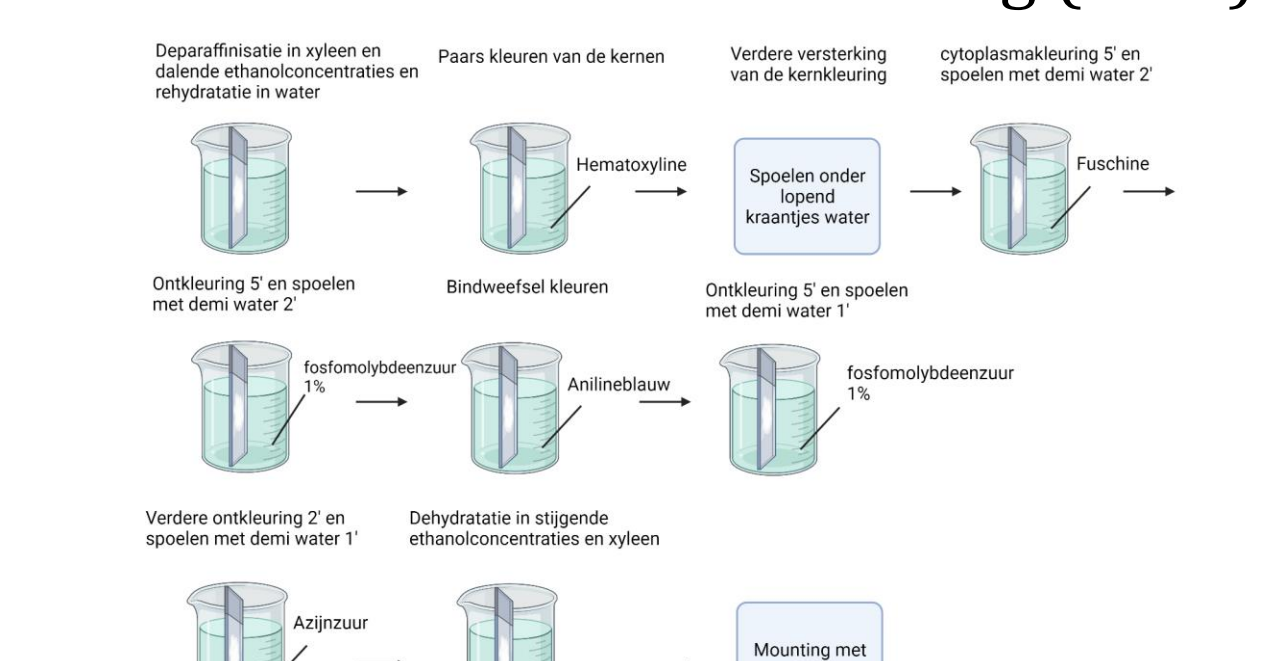
## 2. Methodologie

### Hematoxiline-eosinekleuring



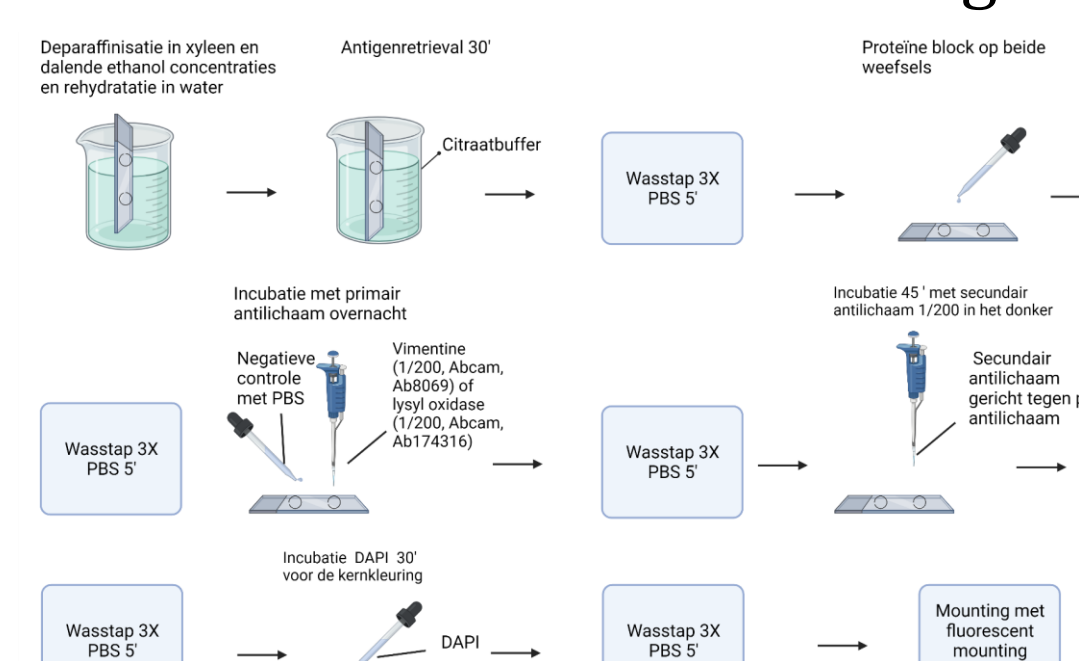
**Figuur 2:** Werkwijze Hematoxiline-eosinekleuring

### Trichroom van Massonkleuring (TCM)



**Figuur 3:** Werkwijze TCM-kleuring

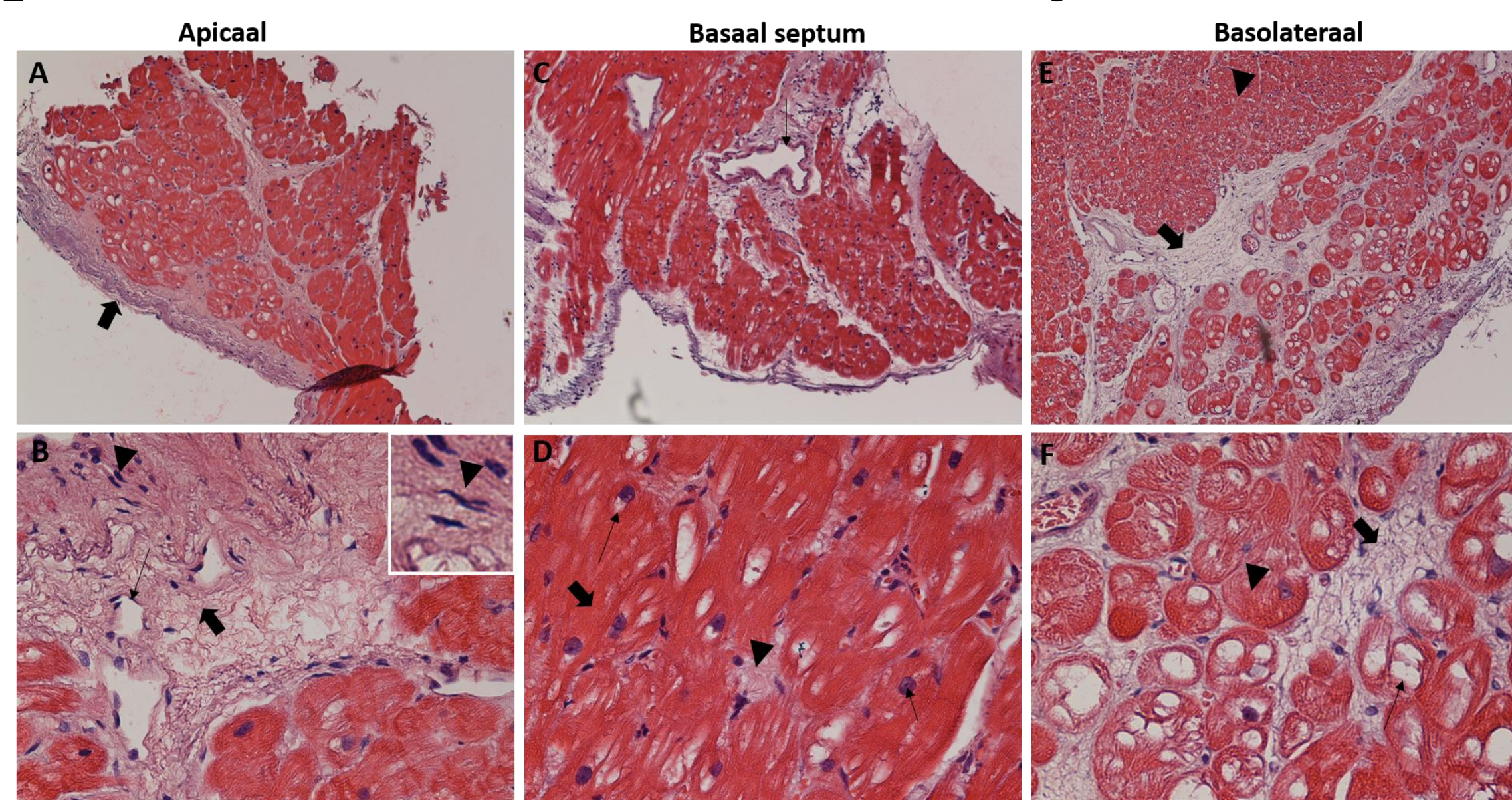
### Immunofluorescentiekleuringen



**Figuur 4:** Werkwijze immunofluorescentiekleuringen

## 3. Kwalitatieve analyse van de coupes aan de hand van hematoxiline-eosinekleuring.

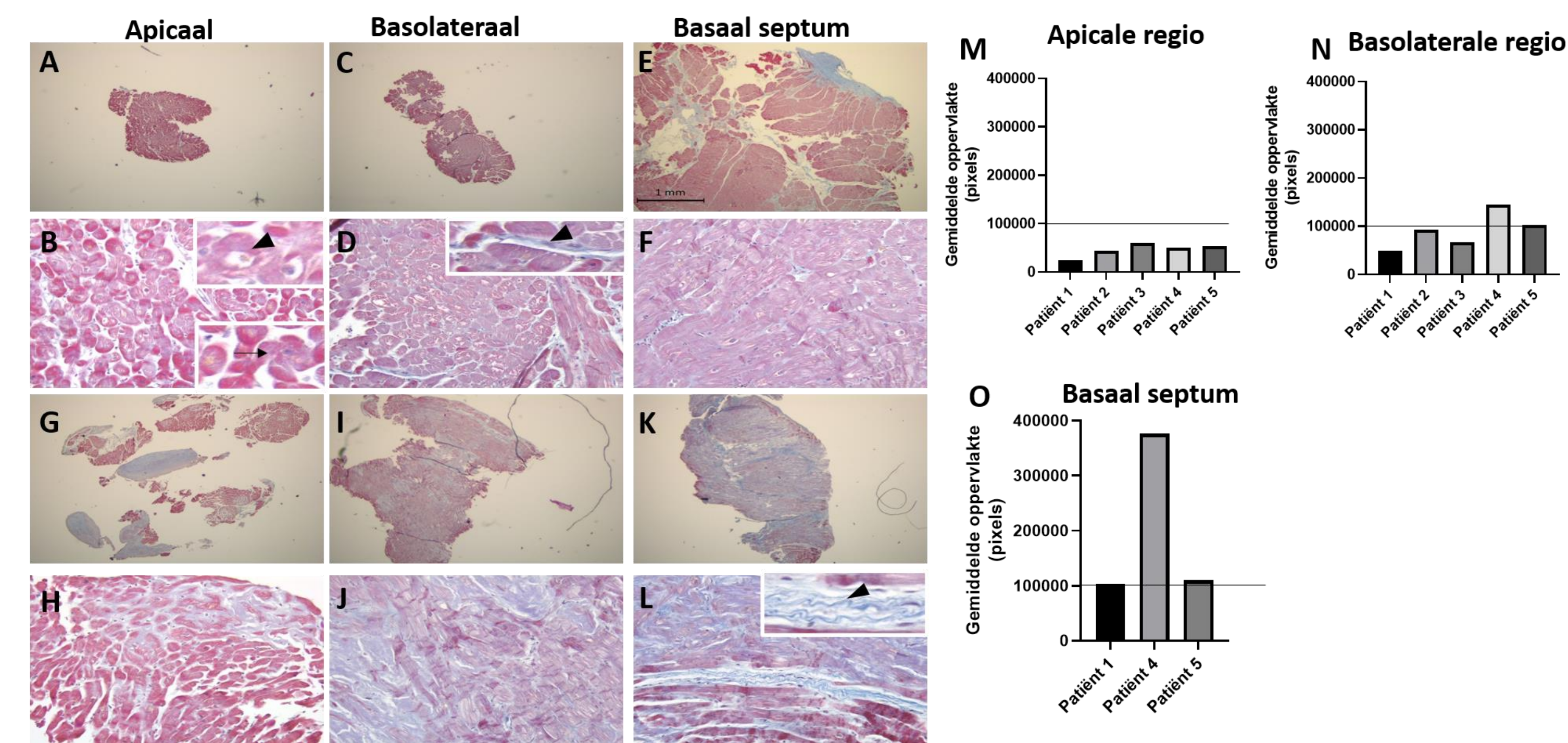
De hematoxiline-eosinekleuring wordt gebruikt om de kwaliteit van de coupes na te gaan in verband met fixatie en preservatie. Er zijn geen degeneratieve kenmerken aanwezig die niet gerelateerd zijn aan de besproken pathologie. Deze degeneratieve kenmerken uiten zich onder de vorm van vacuolen ten gevolge van zuurstofgebrek of oedeem.



**Figuur 5:** Hematoxiline eosine kleuring van de linkerventrikel. (A, B) Biopst van de apicale zijde van het hart. Volle zwarte pijl wijst het endothelium (A) en fibrose (B) aan; dunne zwarte pijl toont een capillair (B) aan. De pijlpunten in (B) duiden fibroblasten aan met een spoelvormig fenotype. (C, D) Biopst van het basaal septum. Dunne pijl wijst een bloedvat aan (C); Volle zwarte pijl wijst de cardiomyocyten aan, dunne zwarte pijl toont een kern van de cardiomyocyten aan en pijlpunt wijst interstitiële fibrose aan (D). (E, F) Biopst van de basolaterale regio. Dikke pijlen wijzen fibrose aan en pijlpunten duiden de cardiomyocyten aan. De dunne pijlen tonen een vergroete witte ruimte in de cardiomyocyten. (A, C, E) zijn vergroting 10X; (B, D, F) zijn vergroting 40X.

## 4. Kwantitatieve analyse van de hoeveelheid fibrose met de TCM-kleuring.

De kwantitatieve analyse is uitgevoerd met de TCM-kleuring. Deze kleurt de fibrose blauw en kan gekwantificeerd worden via colour threshold in ImageJ. Hierdoor kan men de oppervlakte van de fibrose meten in pixels.

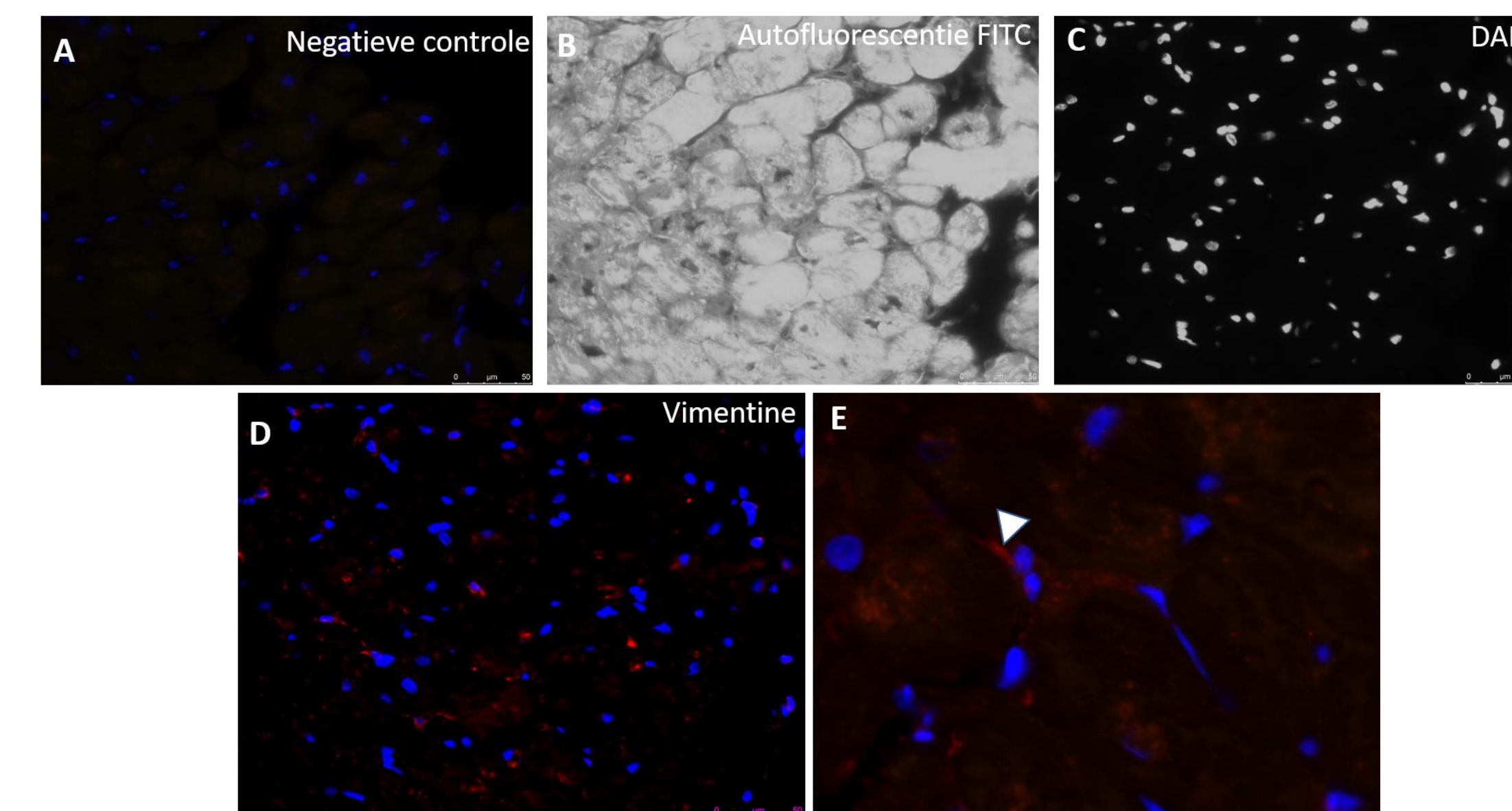


**Figuur 6:** TCM kleuring van de linkerventrikel. (A-F) biopst van patiënt 1. (B) De dunne pijl duidt een gezonde cel aan en de pijlpunt een perinucleaire halo. (D) Pijlpunt wijst de interstitiële fibrose aan. (G-L) biopst van patiënt 4. (L) De typische vorm van collageen wordt aangeduid met een pijlpunt. (A, C, E, I, K) zijn vergroting 2,5X; (B, D, F, H, J, L) zijn vergroting 20X. (M-O) Kwantificatie van fibrose in de verschillende regio's van het hart. (A, B, G, H, M) Zijn biopsten uit de apicale regio, (C, D, I, J, N) de basolaterale regio en (E, F, K, L, O) het basaal septum.

## 5. Immunofluorescentiekleuringen

### Visualisatie van de fibroblasten en myofibroblasten met de vimentinekleuring.

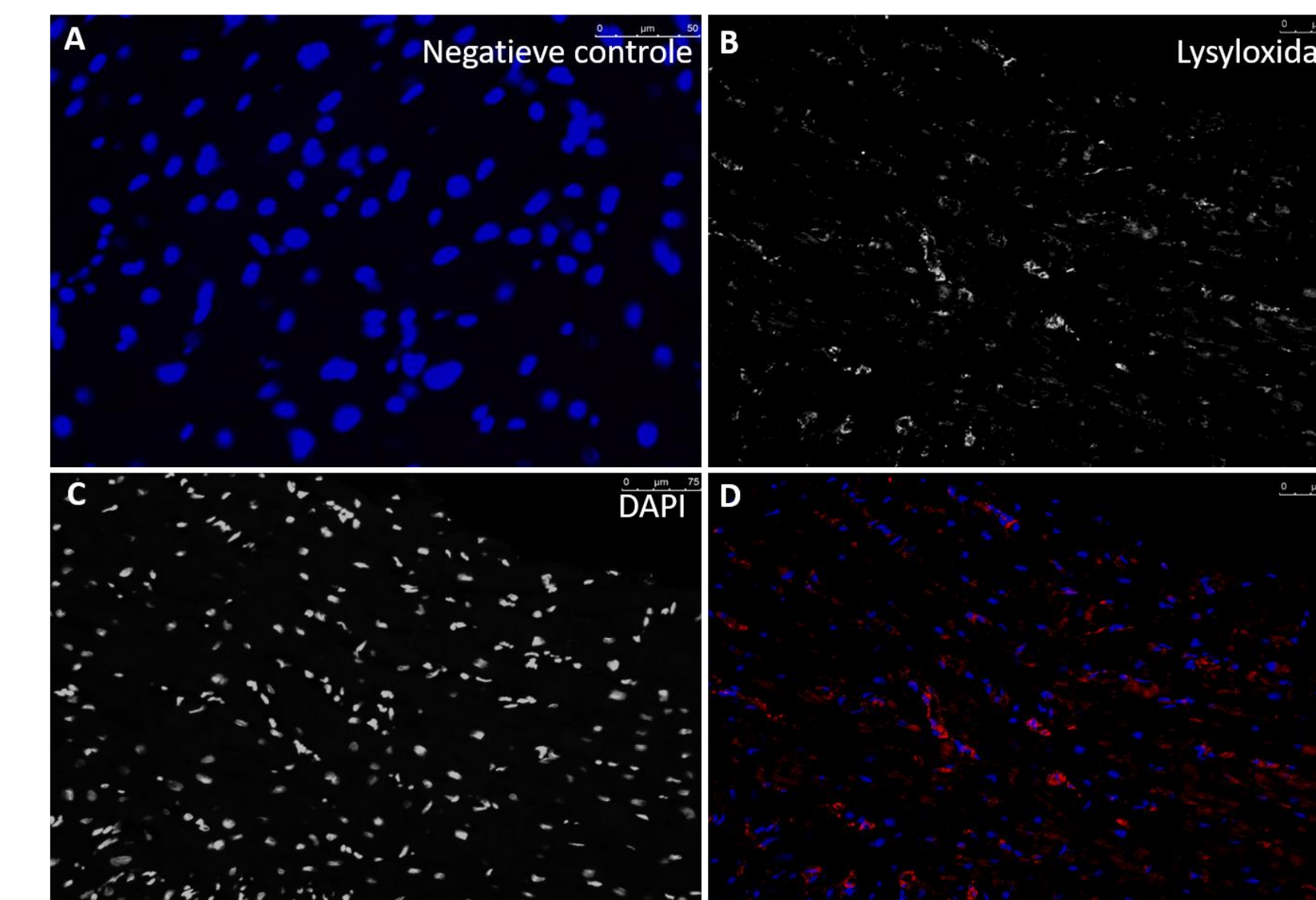
De fibrose wordt veroorzaakt door de fibroblasten en myofibroblasten. De visualisatie hiervan gebeurt met een vimentinekleuring aangezien dit in beide aanwezig is. De pijlpunt (Figuur 7E) duidt een fibroblast aan met het rode vimentinesignaal en bevestigt de aanwezigheid van de fibroblasten of myofibroblasten.



**Figuur 7:** immunofluorescentiekleuring van vimentine in een basaal lateraal biopst van de linkerventrikel. (A) Negatieve controle. (B) Groen kanaal. (C) Dapi kernkleuring. (D) Gemengd kanaal vimentine (rood) kernen (blauw) cellen (groen) de pijlpunt duidt een fibroblast aan. (A-D) Vergroting 20X en (E) vergroting 40X.

### Opsporen van crosslinking met een lxyloxidasekleuring.

Het lxyloxidase enzym is verantwoordelijk voor de crosslinking van het collageen. Uit het gemengde kanaal kan men besluiten dat het lxyloxidase interstitieel voorkomt doordat het lxyloxidase zich tussen de kernen bevindt. Het lxyloxidase is ook aanwezig rond de kernen. Dit betekent dat het zich ook in de cellen bevindt (Figuur 8D).



**Figuur 8:** Immunofluorescentie kleuring van lxyloxidase in een biopst van de linkerventrikel in de basaal lateraal regio. (A) Negatieve controle. (B) Lxyloxidase. (C) DAPI kernkleuring. (D) Gemengd kanaal van lxyloxidase (rood) en kernen (blauw). (A-D) vergroting 20X.

## 7. Conclusie

De stalen genomen uit de linkerventrikel zijn adequaat voor het verder onderzoek naar de reversibiliteit van de myofibroblasten. De vimentinekleuring vereist nog verdere een optimalisatie voor de autofluorescentie in het FITC-kanaal te verminderen.

## 8. Referenties

- Thaden J J et al. Prog Cardiovasc Dis. 2014; 56(6): 565-71
- Nagaraju CK et al. J Am Coll Cardiol. 2019;73(18): 2267-2282
- [https://nl.wikipedia.org/wiki/Systole\\_\(hart\)](https://nl.wikipedia.org/wiki/Systole_(hart))