

Angiogeneze a cévní endotel

Využití mikrofluidních systémů pro studium funkcí cév

Lukáš Kubala

kubalal@ibp.cz

Angiogeneze vs. vaskulogeneze

Vaskulogeneze (neovaskularizace) = tvorba nových cév během vývoje zárodku

- *de novo* vznik primárního cévního plexu
- začátek 3. týden vývoje zárodku
- endoteliální prekursori – hemangioblasty

Angiogeneze = tvorba nových cév větvením z existujících cév

- angiogenní x angiostatické faktory

rovnováha – angiogeneze neprobíhá

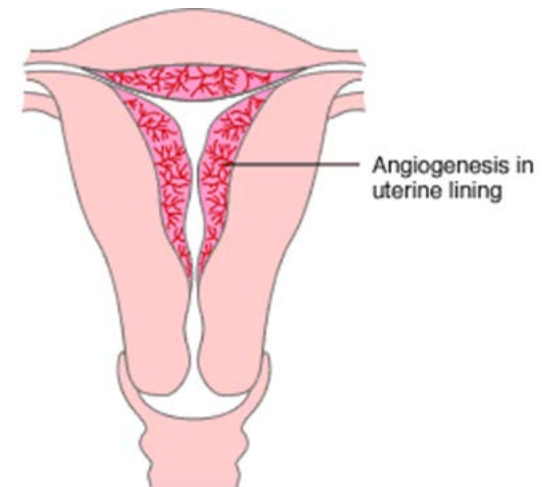
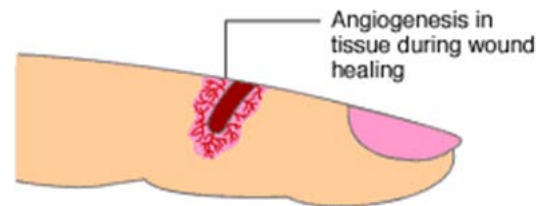
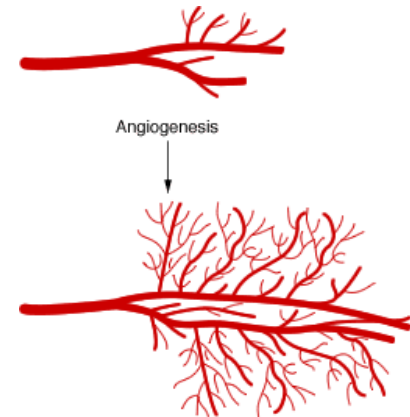


porušení rovnováhy

A) fyziologické situace (např. těhotenství – změny v děložní sliznici)

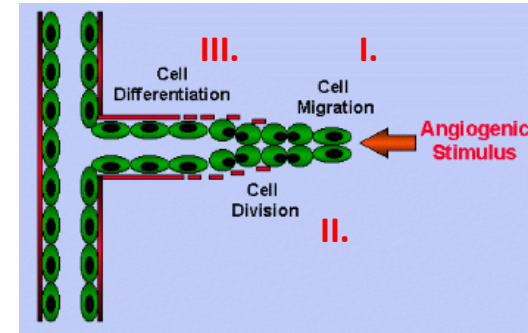
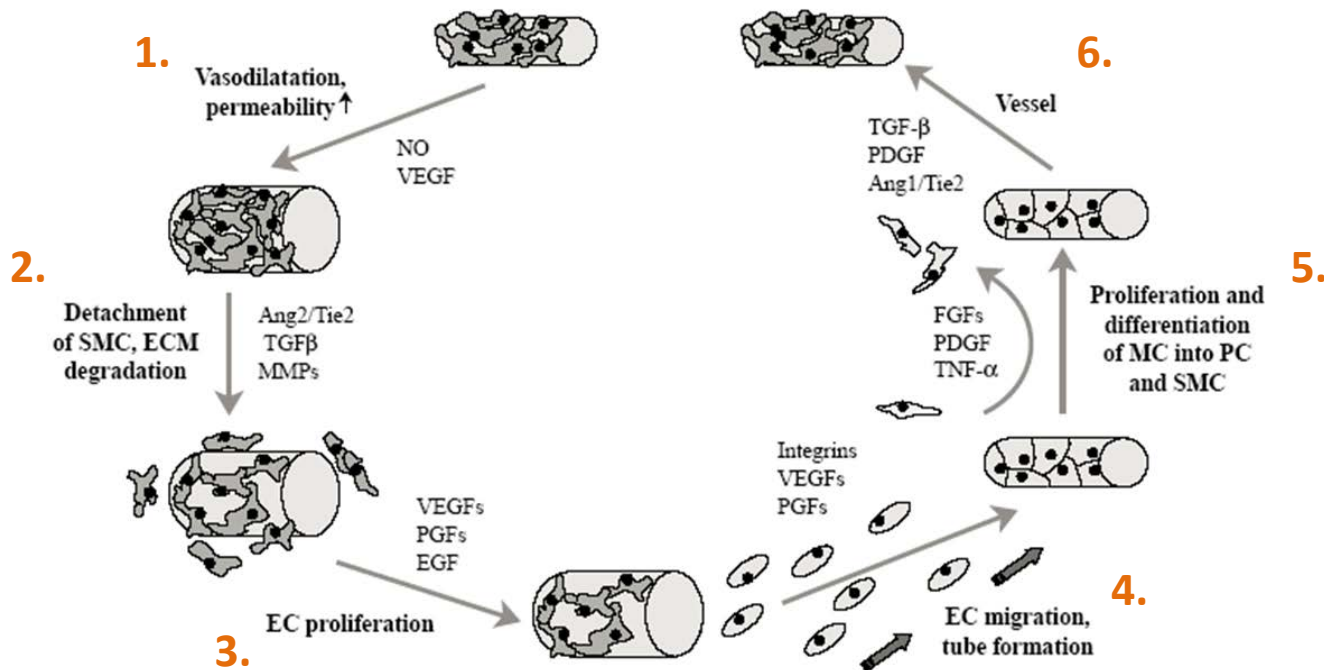
B) patologické stavy

- pozitivní (např. hojení ran)
- negativní (např. retinopatie, nádory, lupénka)



Etapy angiogeneze

1. Vazodilatace cév, zvýšení permeability (VEGFs, NO)
2. Destabilizace cév, degradace bazální membrány a ECM, uvolňování buněk, apoptóza EC (proteázy – aktivátory plasminogenu, chymázy, MMPs, Ang2, TGF- β)
3. Migrace a proliferace EC (VEGFs, PDGF, EGF, integriny)
4. Tvorba nových cév, změna tvaru buněk (VEGFs, PDGF, integriny)
5. Proliferace mezenchymálních buněk, vznik SMC a PC obklopujících EC (FGFs, PDGF, TNF- α)
6. Zastavení proliferace, vznik funkční cévy (TGF- β , PDGF, Ang1)



Angiogenní faktory

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF; „Vascular Endothelial Growth Factor“)

Fibroblastový růstový faktor (FGF; „Fibroblast Growth Factor“)

Angiopoetin (Apo)

Růstový faktor pocházející z destiček (PDGF; „Platelet-derived Growth Factor“)

Transformující růstový faktor beta (TGF- β ; „Transforming Growth Factor beta“)

Faktor nekrotizující nádor alfa (TNF- α ; „Tumor Necrosis Factor alpha“)

CXC-chemokiny

Angiostatické faktory

Angiostatin

Endostatin

Tumstatin

Trombospondin (TSP)

„Pigment epithelium-derived factor“ (PEDF)

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)

VEGF je součástí rodiny angiogenních faktorů. Další členy rodiny jsou VEGF-B, C, D a E s 20-50% homologií s VEGF.

VEGF má 6 různých izoform vážících se k různým receptorům. Různé izoformy mohou mít i protichůdné působení.

Deregulace:

- snížení/zvýšení exprese VEGF během embryogeneze => letální poruchy vývoje orgánů
- VEGF důležitý v růstu a fertilitě – inhibice VEGF vede k redukci výšky a neplodnosti

Receptory:

- tyrozinkinázové VEGF-R1, 2, 3 + další receptory, např. neuropilin
- vysoce exprimované během embryogeneze, u dospělého omezeně: VEGF-R1 a 2 na EC krevních cév, VEGF-R3 na EC lymfatických cév
- mutace v jediné alele VEGF nebo VEGF-R2/3 je letální již ve stadiu embryogeneze

VEGF během angiogeneze:

- počáteční vazodilatace – zvýšení tvorby NO
- zvýšení permeability EC – tvorba speciálních transportních vakuol
- stimulace exprese plasminogenových aktivátorů a MMPs (hlavně MMP-1) v EC
- stimulace proliferace a migrace EC *in vitro*
- stimulace větvení cév během *in vivo* testů

Fibroblastový růstový faktor (FGF)

Popsáno 20 různých FGF a 4 různé tyrozinkinázové FGF receptory.

Nejdůležitější je FGF-1 (tzv. kyselý FGF) a FGF-2 (tzv. zásaditý FGF). Sekretovány jsou celou řadou různých typů buněk.

Deregulace:

- mutace FGF není letální
- poruchy hojení v dospělosti

FGF během angiogeneze:

- stimulace proliferaci a migraci EC
- zvýšení exprese VEGF a proteáz (urokinázy)
- indukce exprese integrinů na EC
- stimulace tvorby cév v 3-D kolagenové matrici *in vitro*

Angiopoetiny (Apo)

Popsány Angiopoetiny 1, 2, 3, a 4. Receptorem pro Angiopoetiny je Tie-2 (tyrosinkinázový).

Angiopoetin 1:

- sekretován periendotheliálními buňkami (např. buňkami hladké svaloviny)
- stimuluje větvení cév
- mutace vede k letálním endokardiálním a myokardiálním defektům během embryogeneze
- nadměrná exprese způsobuje hypervaskularizaci

Angiopoetin 2:

- působí komplexně podle přítomnosti dalších stimulatorů angiogeneze
 - v nepřítomnosti VEGF stimuluje apoptózu EC a regresi krevních cév
 - v přítomnosti VEGF stimuluje proliferaci a migraci EC, větvení a zvětšení průměru cév *in vivo* a stimuluje tvorbu cév v 3-D kolagenové matrici *in vitro*

Růstový faktor pocházející z destiček (PDGF)

Exprimován a sekretován nejen destičkami, ale i např. fibroblasty a keratinocyty.

PDGF receptory jsou homo či heterodimery exprimované na EC a jiných buňkách.

PDGF stimuluje tvorbu a větvení cév *in vitro*. Stimuluje proliferaci SMC. Stimuluje expresi VEGF a VEGF-R2 na EC.

Mutace PDGF nebo jeho receptoru je letální během embryogeneze.

Transformující růstový faktor beta (TGF- β)

Exprimován různými buňkami včetně EC. Sekretován neaktivní, nutná aktivace proteázami.

TGF- β receptory jsou i na stejných buňkách => para- i autokrinní působení.

TGF- β působí jak angiogenně, tak angiostaticky, např. nízké koncentrace TGF- β 1 podporují proliferaci EC a tvorbu cév *in vitro*, vysoké koncentrace opak. Významně ovlivňuje diferenciaci EC a SMC.

Stimuluje angiogenezi i nepřímo – stimuluje leukocyty, a ty pak produkují pro-angiogenní cytokiny.

Faktor nekrotizující nádor alfa (TNF- α)

Pro-zánětlivý cytokin sekretovaný zejména monocyty a makrofágy, ale i fibroblasty i epiteliálními buňkami.

TNF- α působí jak angiogenně, tak angiostaticky: nízké koncentrace podporují proliferaci EC a tvorbu cév, vysoké koncentrace inhibují angiogenezi.

Jeho působení je významně inhibováno interferonem- γ .

CXC-chemokiny

Protikladné působení záleží na chemické struktuře.

IL-8 nebo „Granulocyte Chemoattractant Protein-2“ (GCP-2) mají chemotaktický efekt na EC a stimulují angiogenezi. „IFN-inducible Protein-10“ a „Platelet Factor 4“ jsou naopak inhibitory angiogeneze.

Ostatní angiogenní faktory

Epidermální růstový faktor (EGF) a Transformující růstový faktor alfa (TGF- α):

- oba se váží na EGF receptor
- stimulují proliferaci EC a tvorbu cév *in vivo* a *in vitro* X důležité faktory vyvolávající patologickou tvorbu cév v rámci tvorby nádorů

Faktory stimulující růst kolonií granulocytů/granulocytů a makrofágů (G-CSF, GM-CSF):

- stimulují proliferaci a diferenciaci prekurzorů (hemangioblastů, angioblastů) do EC

Angiogenin a Angiotropin:

- stimulují tvorbu cév a adhezi EC (ne migraci či proliferaci)

Inzulinu podobný růstový faktor (IGF):

- stimuluje syntézu VEGF

Hepatocytární růstový faktor (HGF):

- indukuje migraci, proliferaci a prevenci apoptózy u EC a SMC

Placentální růstový faktor (PIGF):

- stimuluje tvorbu cév a adhezi EC

Tkáňový faktor a Faktor V:

- stimulují tvorby cév

Erytropoetin:

- stimuluje proliferaci EC a formaci cév

Angiogenní faktory

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF; „Vascular Endothelial Growth Factor“)

Fibroblastový růstový faktor (FGF; „Fibroblast Growth Factor“)

Angiopoetin (Apo)

Růstový faktor pocházející z destiček (PDGF; „Platelet-derived Growth Factor“)

Transformující růstový faktor beta (TGF- β ; „Transforming Growth Factor beta“)

Faktor nekrotizující nádor alfa (TNF- α ; „Tumor Necrosis Factor alpha“)

CXC-chemokiny

Angiostatické faktory

Angiostatin

Endostatin

Tumstatin

Trombospondin (TSP)

„Pigment epithelium-derived factor“ (PEDF)

Angiostatin

Vzniká z plasminogenu štěpením různými proteázami (MMP) a následně cirkuluje v krvi.

Blokuje proliferaci, migraci, diferenciaci EC a SMC. Blokuje tvorbu cév, neovaskularizaci a metastáze. Inhibuje efekt HGF a tvorbu ATP v buňkách

Endostatin

Vzniká z kolagenu XVIII štěpením různými proteázami (elestáza).

Blokuje proliferaci a migraci EC. Vyvolává apoptózu EC. Inhibuje efekt FGF-2 a VEGF zejména u nádorových buněk.

Tumstatin

Vzniká z kolagenu podobně jako endostatin štěpením z ECM.

Trombospondin (TSP)

Rodina proteinů extracelulární matrix TSP-1 až 5.

TSP-1 a TSP-2 mají silné angiostatické působení *in vivo*. TSP-1 *in vitro* inhibuje migraci a proliferaci EC, stimuluje apoptózu u EC a inhibuje tvorby cév. Dochází tak ke snížení četnosti a průměru cév nádorů.

„Pigment epithelium-derived factor“ (PEDF)

Produkován epiteliálními buňkami rohovky

Blokuje proliferaci a migraci EC. Inhibuje angiogenezi vyvolanou FGF-2, VEGF a pro-zánětlivými cytokiny.

Neutralizační protilátky proti PEDF způsobují invazi cév v rohovce

Buněčné receptory klíčové v angiogenezi

Integriny:

- rodina adhezivních receptorů vážících proteiny ECM (např. kolagen)
- exprese se zvyšuje u proliferujících EC (např. po VEGF)
- inhibiční protilátky inhibují proliferaci EC a vyvolávají apoptózu EC

VE-cadherin:

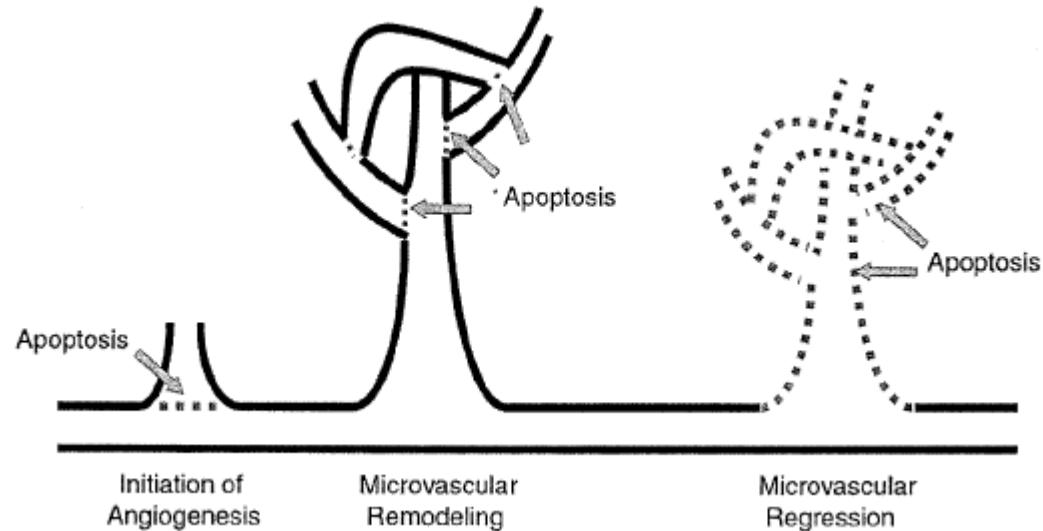
- EC-specifický cadherin lokalizovaný v intercelulárních spojích
- stimulace EC VEGF způsobuje modifikaci VE-cadherinu, uvolnění buněčných spojů a umožnění proliferace EC
- po dosažení konfluence EC, zpětná modifikace VE-cadherinů a zpevnění vazby mezi EC

„Platelet endothelial cell adhesion molecule 1“ (PECAM-1, CD31):

- adheziny patřící do velké rodiny imunoglobulinů
- stejně jako VE-cadherin ovlivňuje mezibuněčné spoje EC

Apoptóza EC

- Inicializace angiogeneze
- Remodelace cév
- Regrese cévních struktur



Nor et al.
Angiogenesis 1999

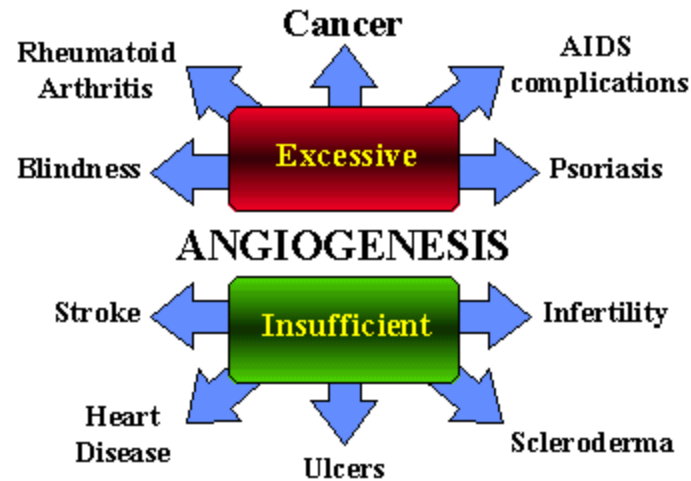
Pro-apoptické stimuly:

- TSP-1
- Angiostatin
- TNF- α
- TGF- β

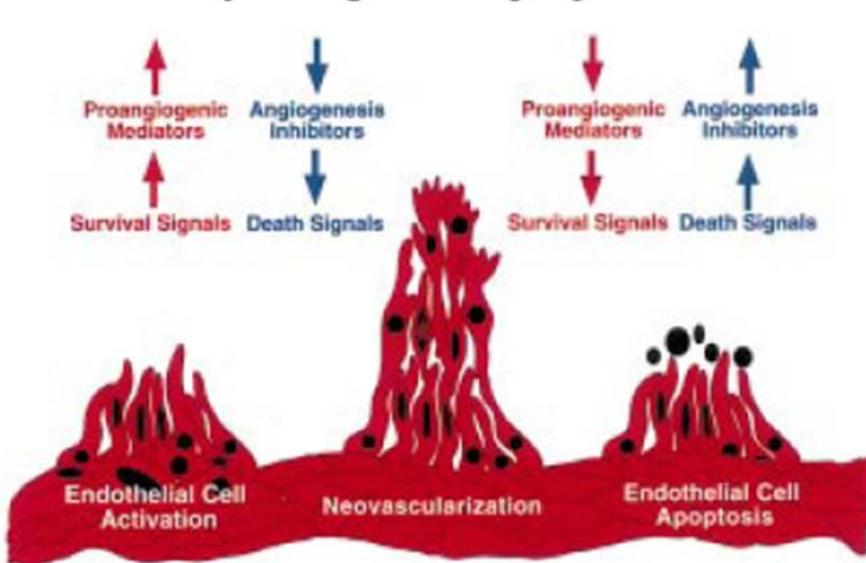
Anti-apoptické stimuly:

- VEGF
- FGF
- NO
- integriny => ztráta kontaktu s ECM = „anoikis“

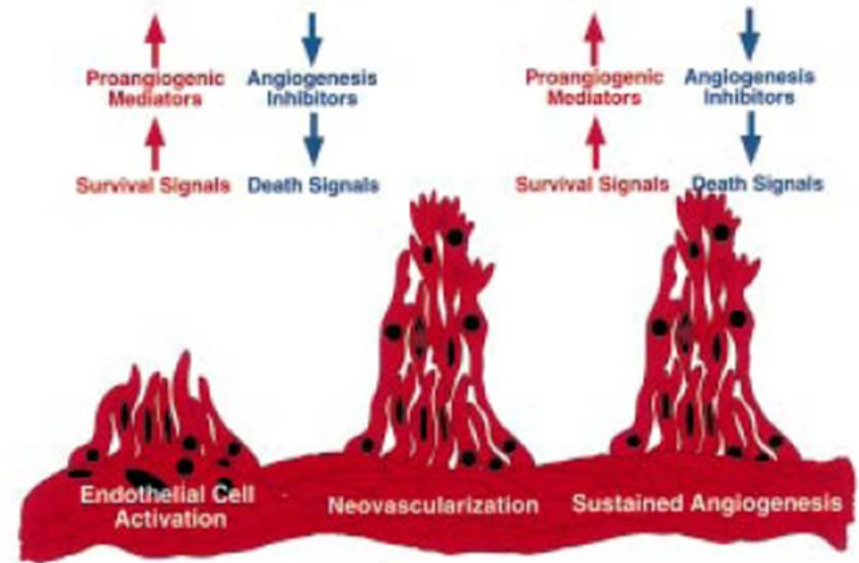
Patogenní angiogeneze



A Physiological Angiogenesis



B Pathological Angiogenesis



Retinopatie u předčasně narozených novorozenců

Expozice vysokým hladinám kyslíku
=> **masivní apoptóza EC v cévách sítnice.**

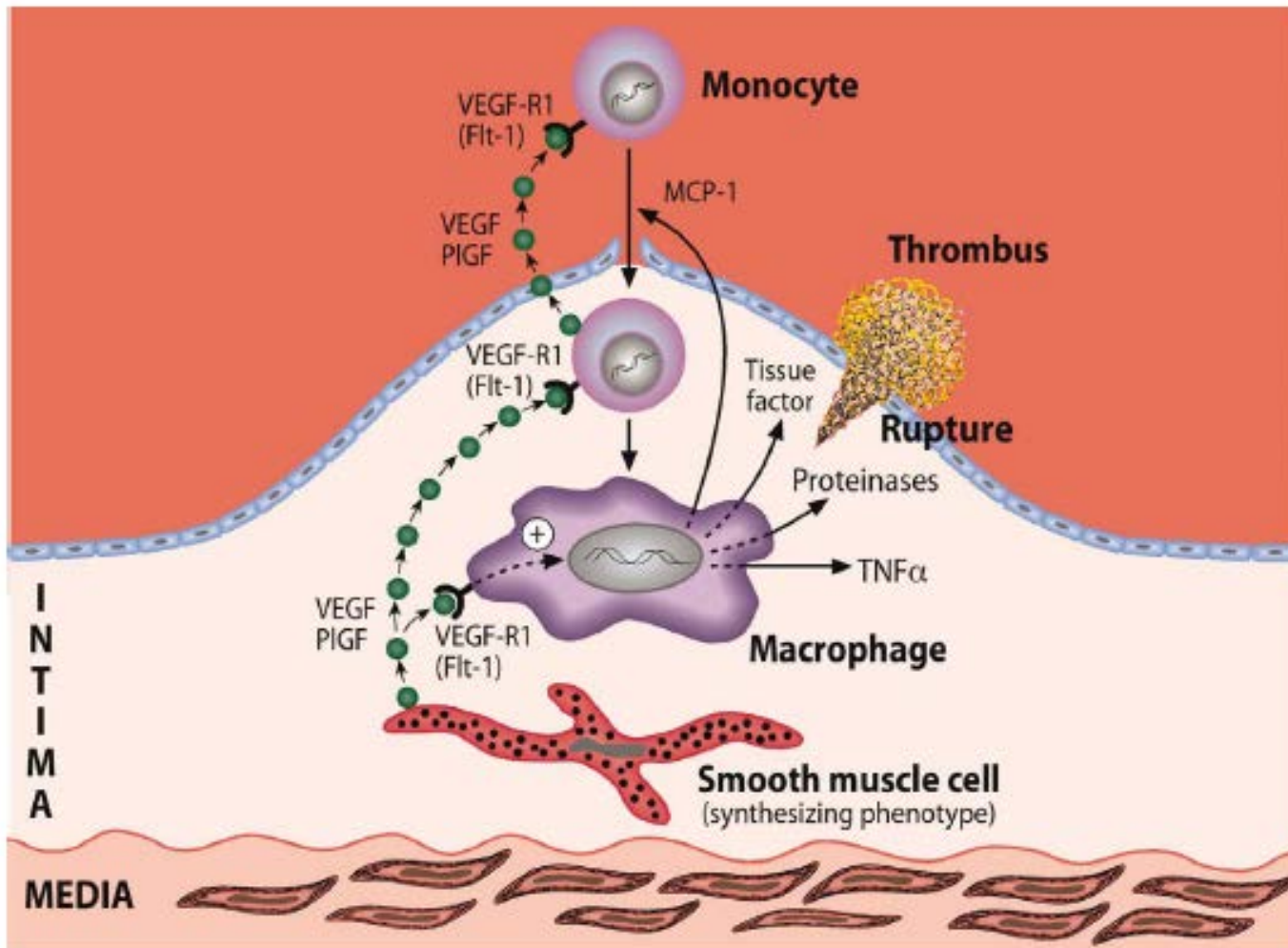


Po přechodu do prostředí s normální tenzí kyslíku
=> **intenzivní neovaskularizace.**

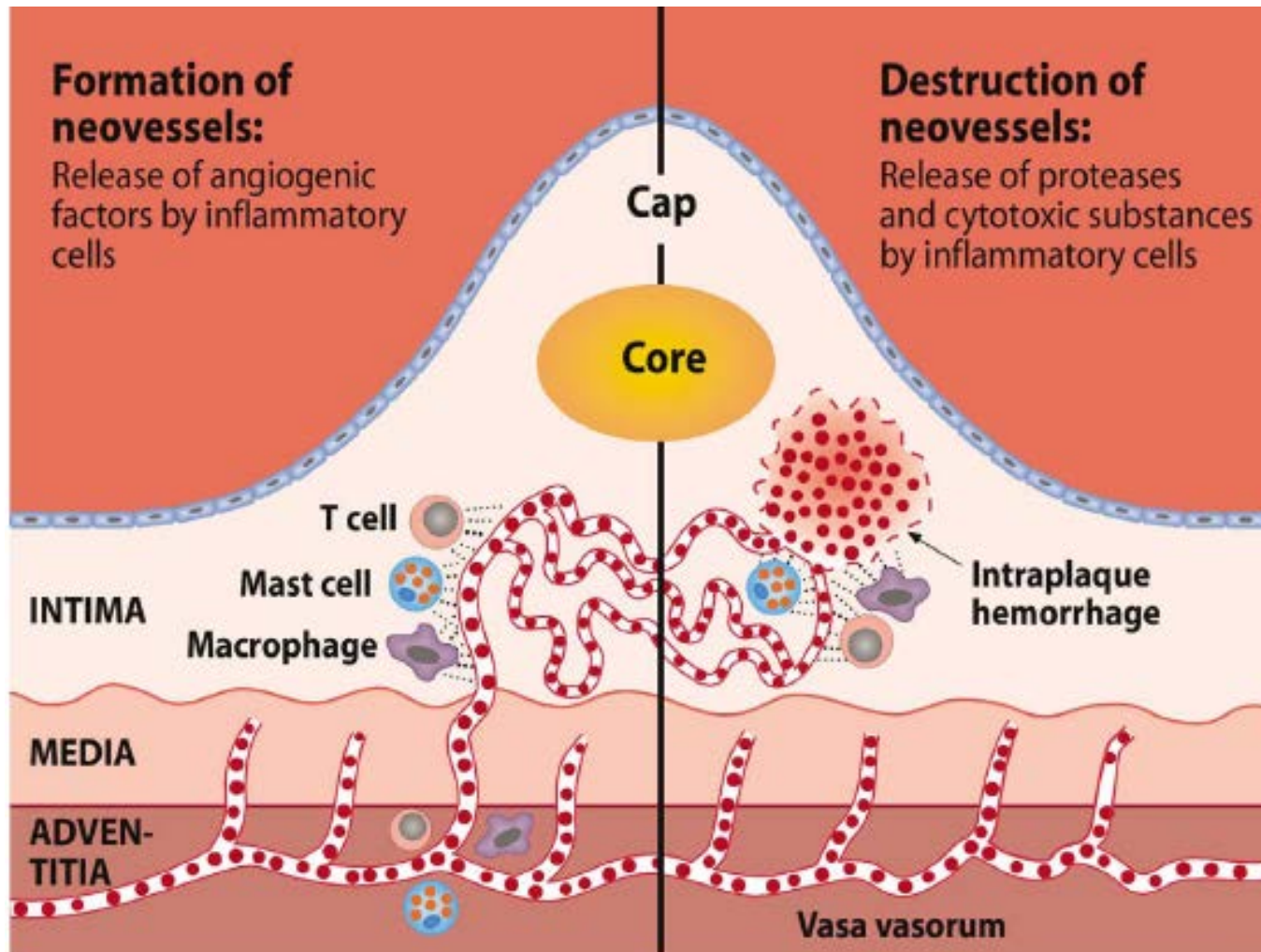


Abnormální neovaskularizace
=> **vážné poruchy zraku.**

Angiogeneze v patologii aterosklerózy

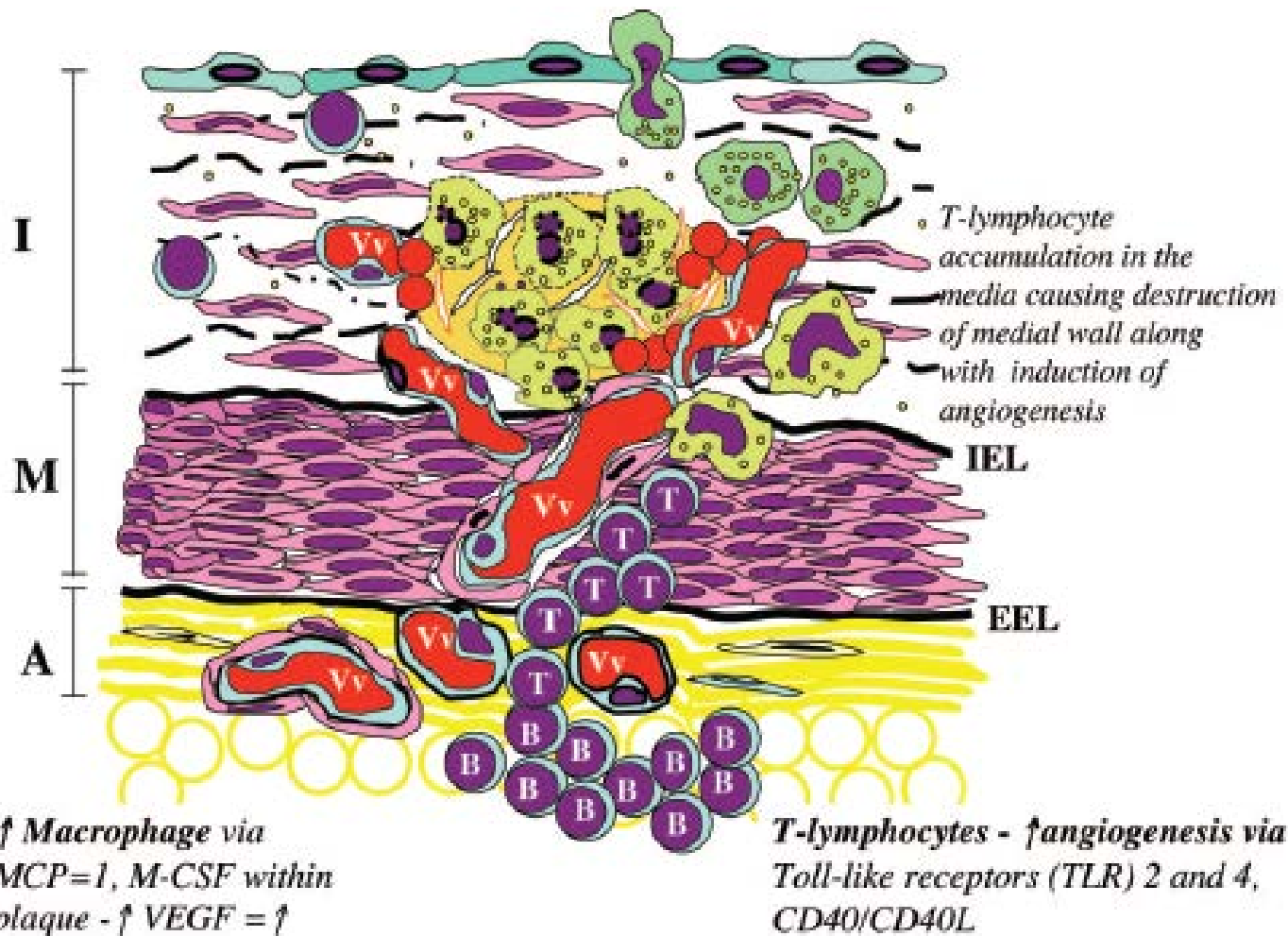


Angiogeneze v patologii aterosklerózy



Ribatti 2008 „Inflammatory angiogenesis in atherogenesis - a double-edged sword“ Annals of Medicine

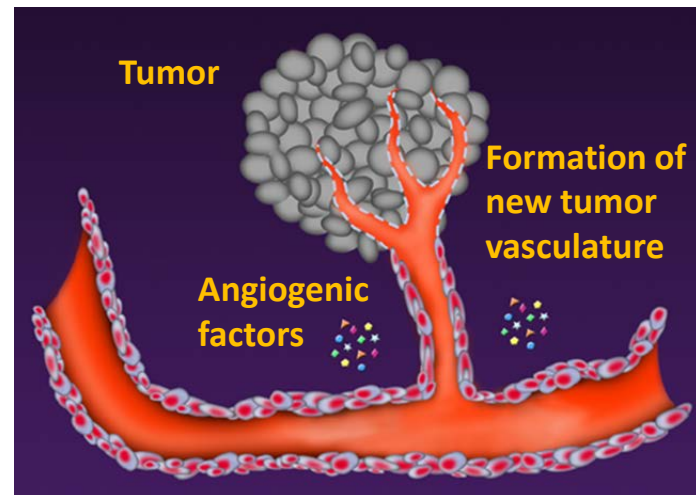
Regulace angiogeneze v aterosklerotickém plaku přítomnými imunitními buňkami



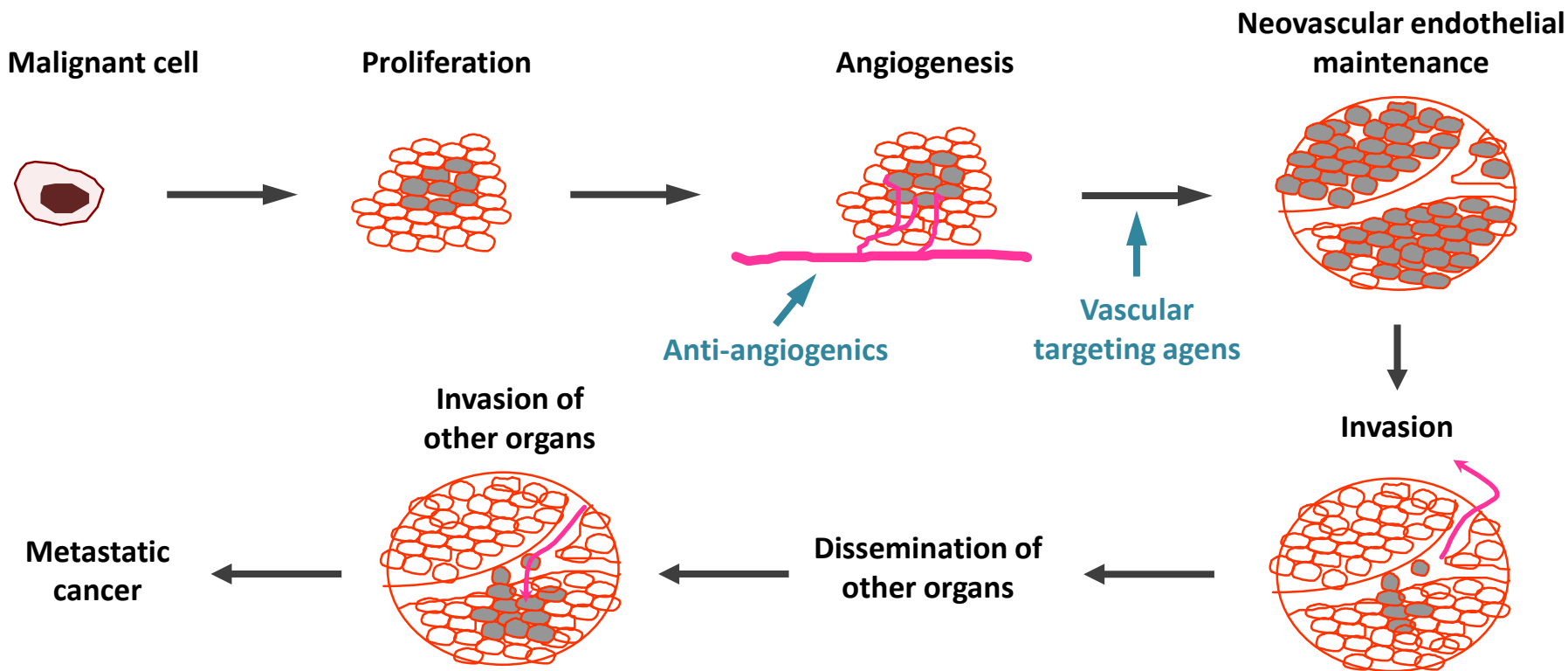
Angiogeneze solidních nádorů

Nádorové buňky produkují velké množství celé řady angiogenních faktorů, které stimulují angiogenezi.

=> Solidní tumory si tak vybudují svůj vlastní systém krevních cév pro nezbytné zásobení kyslíkem a živinami.



Stádia vývoje nádorů



Angiogenní terapie

Inhibitory modifikace ECM:

- inhibují rozklad ECM, syntézu a depozici kolagenu
- př. Inhibitory MMP, uPA, kolagenáz

Inhibitory adhesivních molekul:

- blokují adhezi EC a indukují jejich apoptózu

Inhibitory aktivovaných EC:

- inhibují migraci a proliferaci EC
- př. endostatin, angiostatin, INF- α a IFN- γ

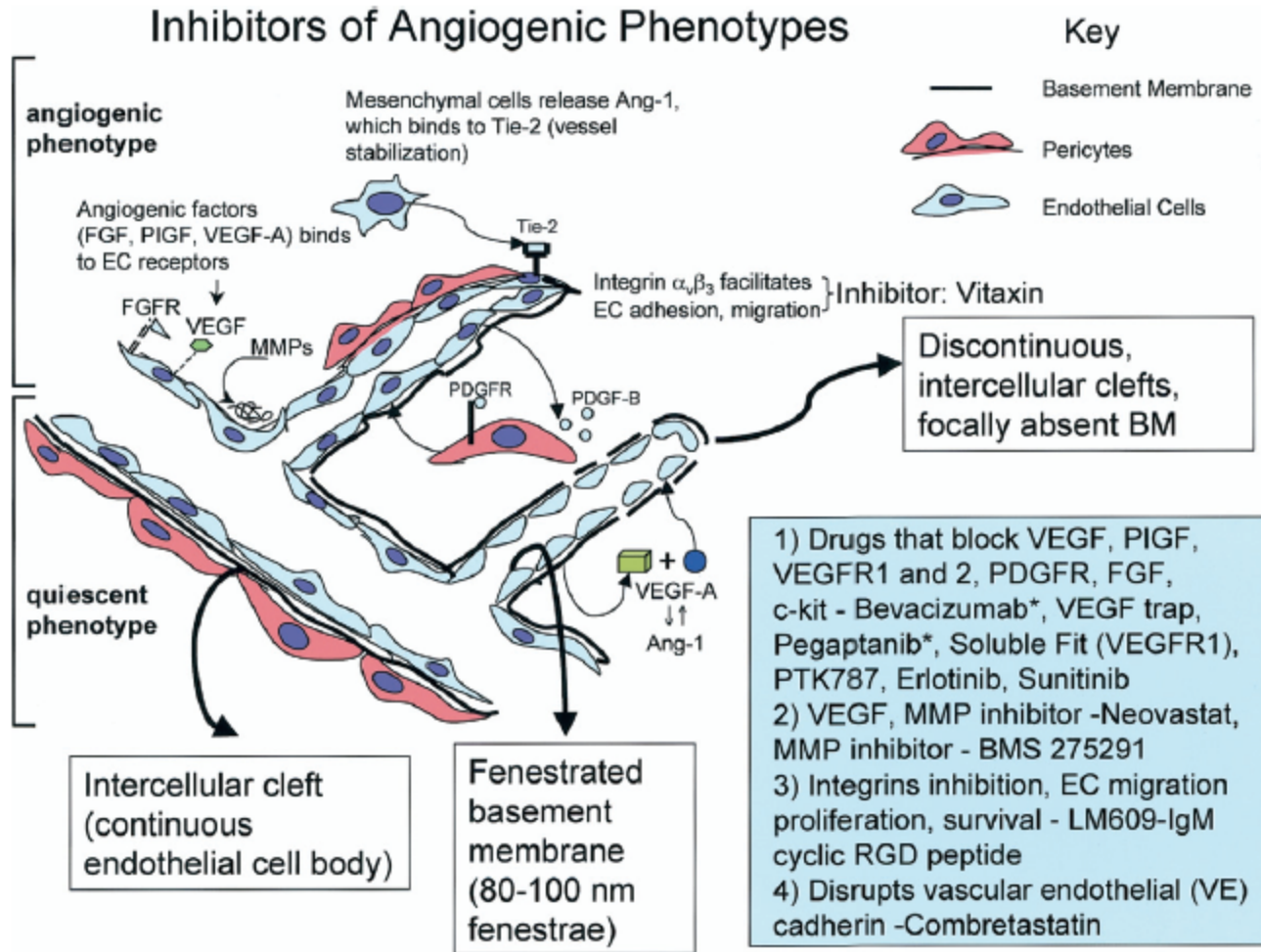
Inhibitory intracelulárního signálování EC:

- inhibitory tyrozinkináz
- př. genistein a lavendustin A

Inhibitory angiogenních mediátorů a jejich receptorů

- inhibitory FGF-2, VEGF, PDGF, COX

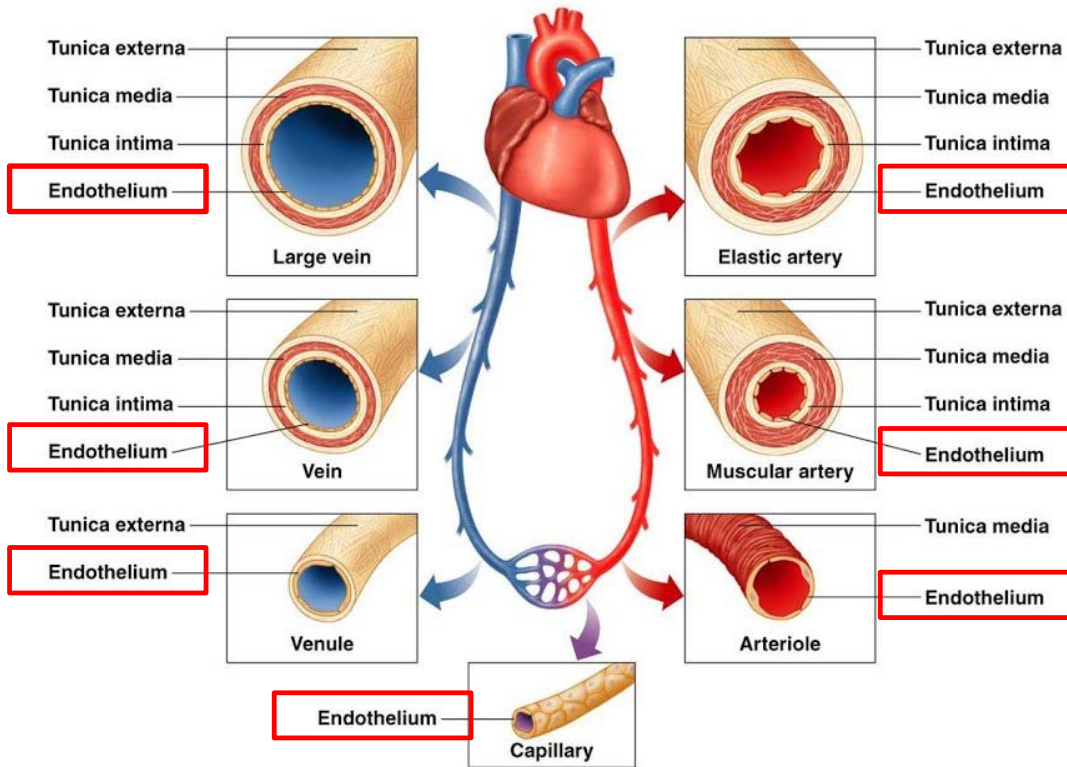
Angiogenic therapy



Endotelilální buňky

**Studium funkce cév pomocí
mikrofluidních systémů**

Endoteliální buňky

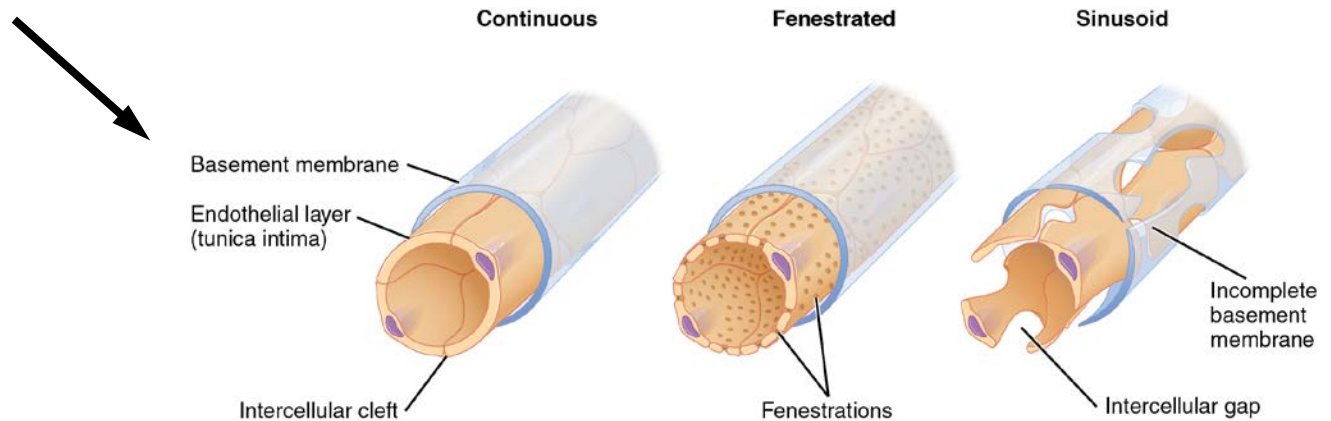


Copyright © 2009 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Výstelka všech cév:
endoteliální buňky = endotel

Dospělý člověk:
1,5 kg
700 m²

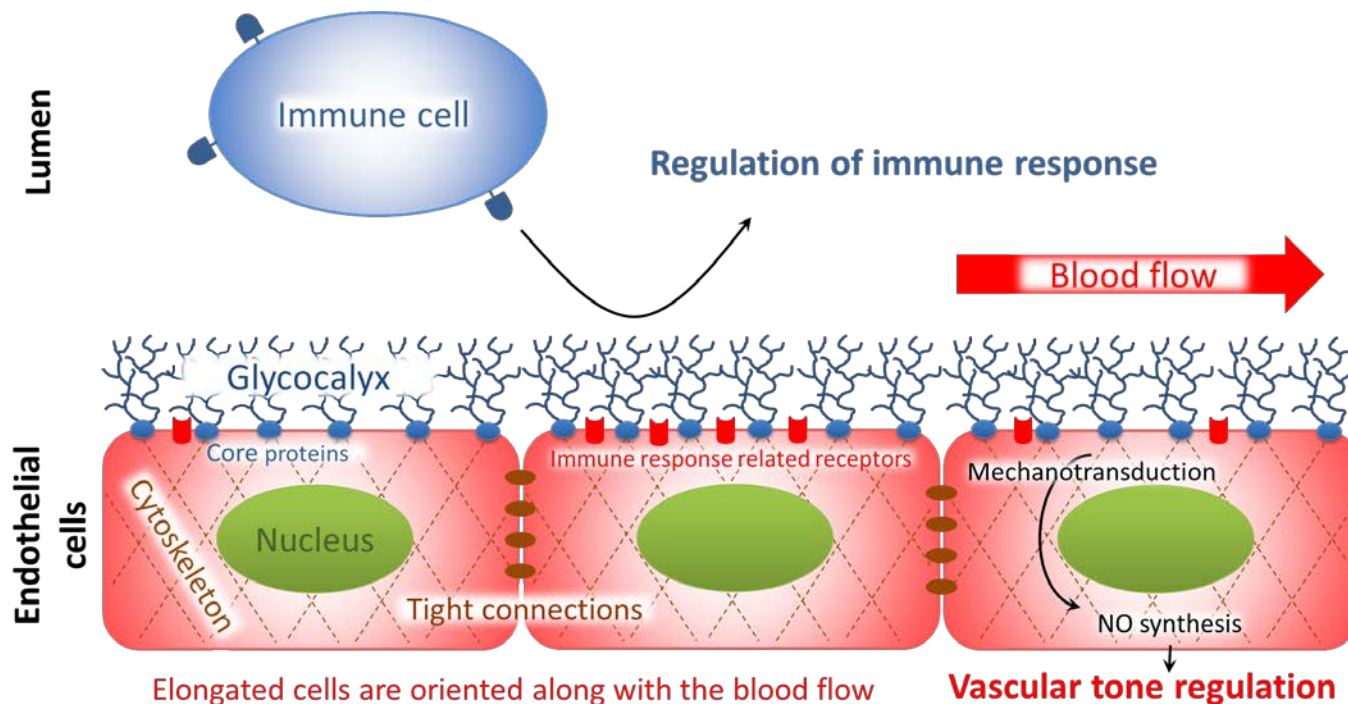
Různé typy endotelu:
ledviny x plíce x játra
x střeva x kostní dřeň



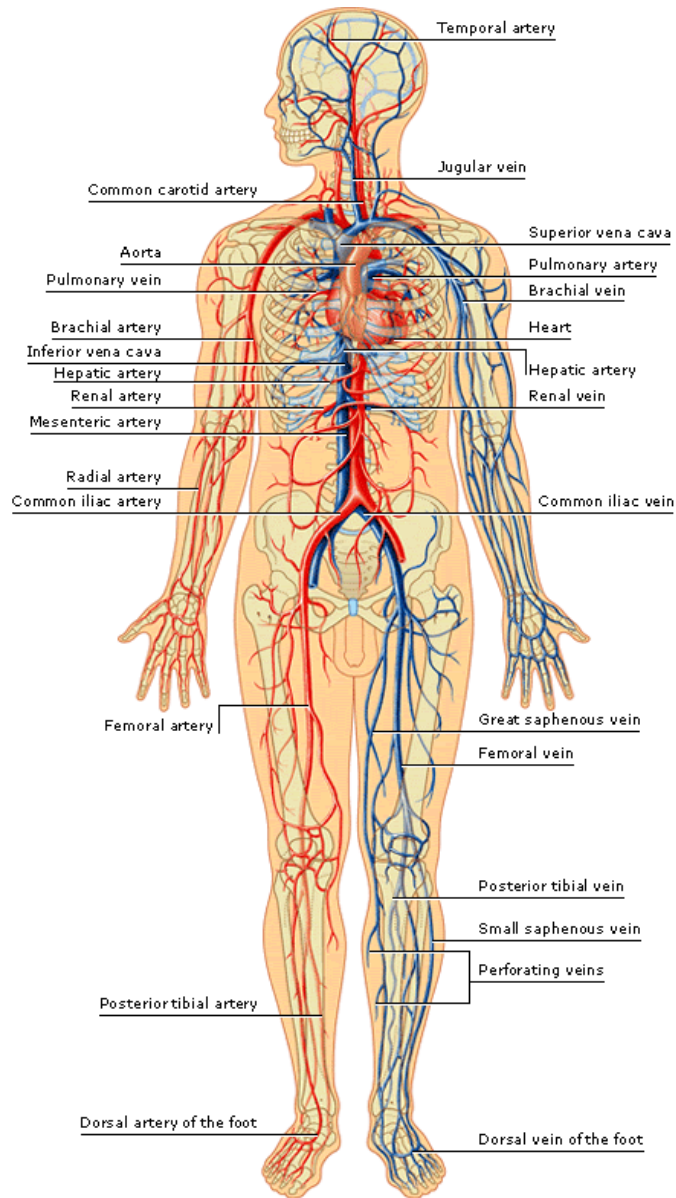
Funkce endoteliálních buněk

Endoteliální buňky se aktivně podílejí na regulaci funkce cév:

- bariérová funkce
- protisrážlivé povrchové vlastnosti
- regulace cévního tonu (vazokonstrikce, vazodilatace)
- angiogeneze
- imunitní reakce (adheze imunitních buněk během zánětlivého procesu)



Cévní systém



průměr tlak krve

Aorta

Tepna

Tepénka

Kapilára

Žilka

Žíla

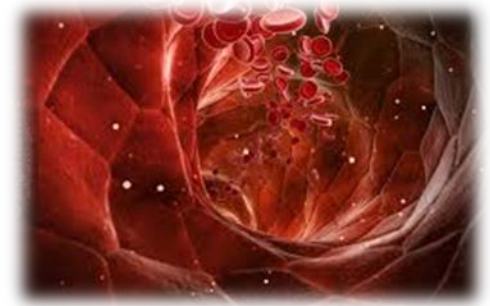
Dutá žíla



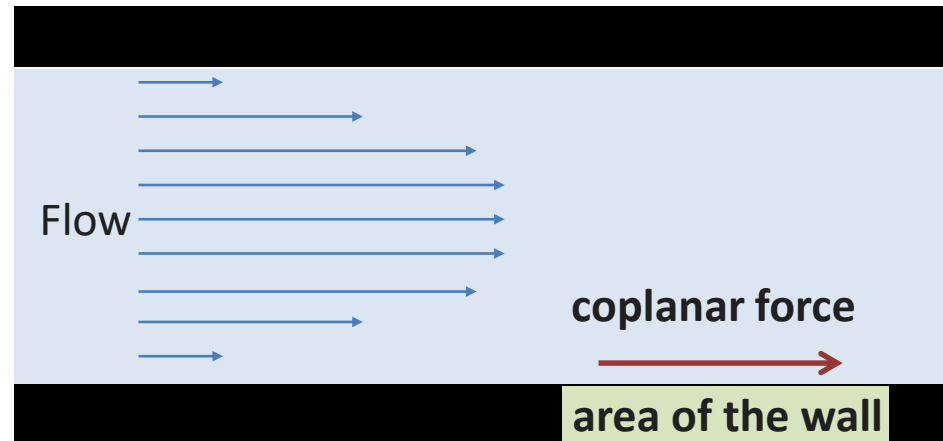
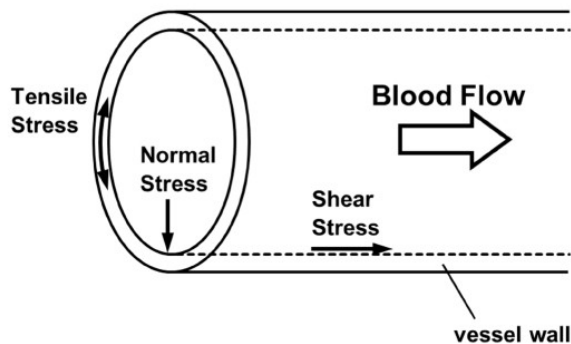
Endoteliální buňky *in vivo*

In vivo v cévě:

- kruhový průřez a pružný/poddajný podklad, specifická extracelulární matrix
- vystaveny působení proudící tekutiny => vytváří smykové napětí, tzv. shear stress



Proudění – laminární x turbulentní x pulsatilní

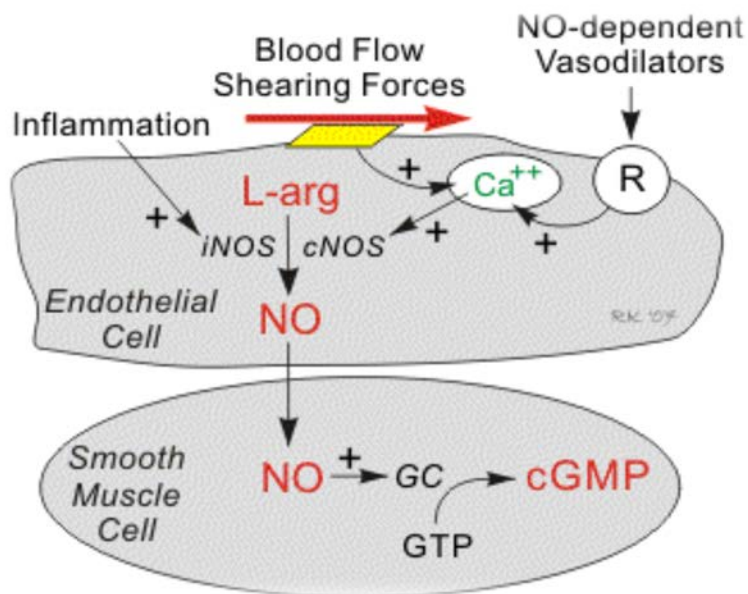


$$\text{Smykové napětí} = \frac{\text{rychlost} \times \text{viskozita krve}}{\text{průměr}} \quad (\text{dyne/cm}^2)$$

Vliv smykového napětí na endoteliální buňky

Smykové napětí ovlivňuje:

- morfologii
- genovou expresi
- aktivaci eNOS a produkci NO
- aktivaci membránových receptorů, integrinů, G-proteinů, iontových kanálů...



=> Vrstva endoteliálních buněk je nezbytnou součástí každé cévy.

Současné *in vitro* modely pro studium endotelu

Modely *in vitro* x fyziologický stav

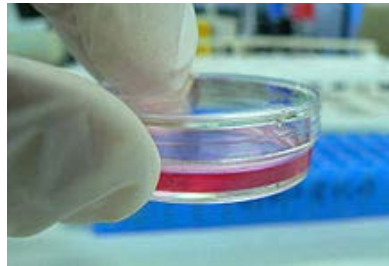


- intersticiální tok a gradient růstových faktorů
- vysoké koncentrace růstových faktorů v séru
- vyšší hladina kyslíku

Současné modely:

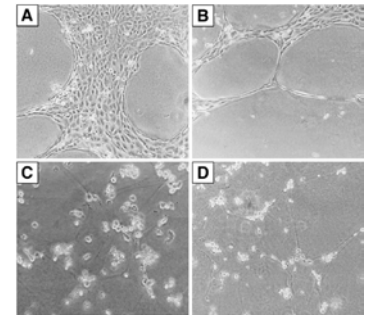
A) statický: 2D na miskách

plastový podklad,
tužší než nativní tkáň



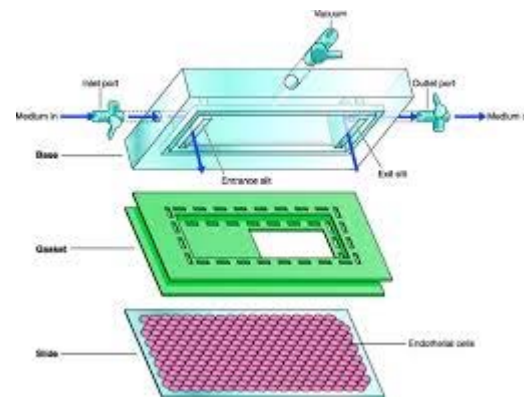
3D v gelech

nefyziologická
porozita a složení



B) v proudových podmínkách

„Parallel-plate flow chambers“



Mikrofluidika a cévní biologie

Zájem:

- cirkulace krve na úrovni mikrokapilár → výzkum hemodynamiky na úrovni kapilár, modulace toku krve
- chování endoteliálních a krevních buněk pod vlivem smykového napětí
- angiogeneze pod vlivem definovaného gradientu růstových faktorů
- vaskularizace mikrofluidních scaffoldů → vznik a udržitelnost mikrovaskulatury v biomateriálech

Proudění a smykové napětí

Reynoldsovo číslo

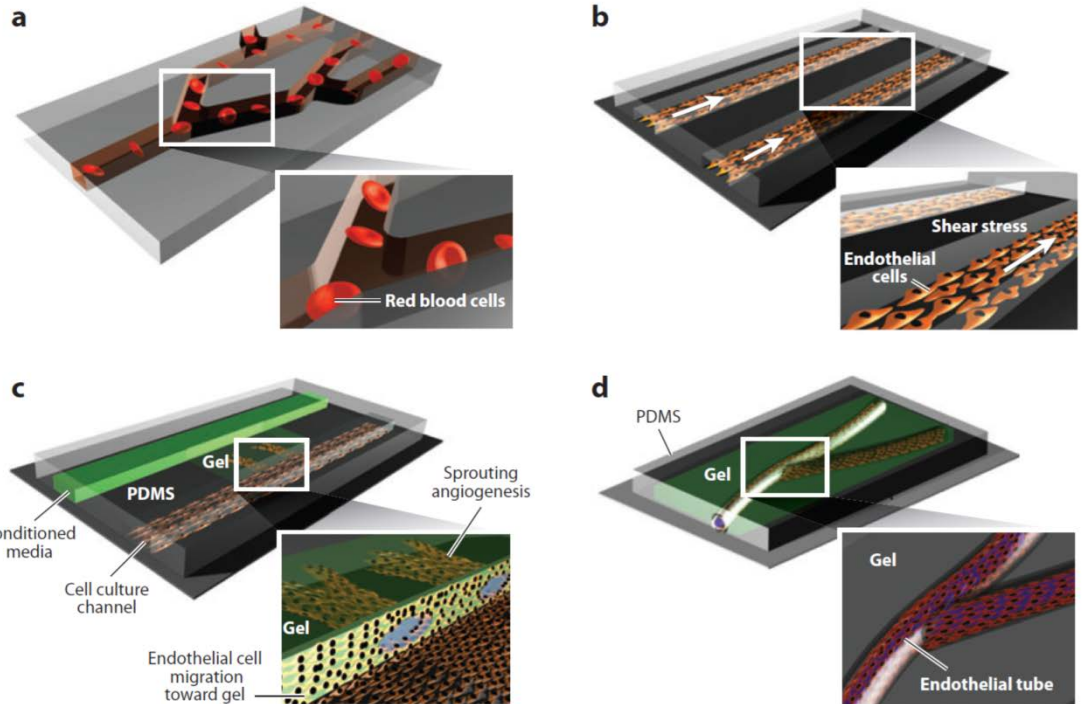
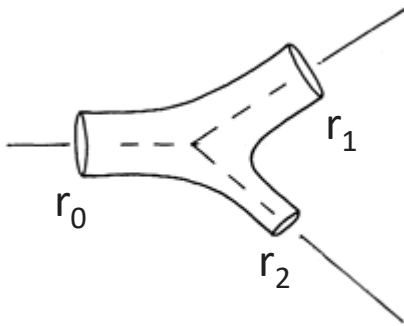
$$Re = \frac{v_s d}{\nu}$$

- d hydraulický průměr
- v_s střední hodnota rychlosti proudění tekutiny
- ν kinematická viskozita

Murrayho zákon

$$r_0^k = r_1^k + r_2^k$$

$$k = 2 \text{ až } 3$$

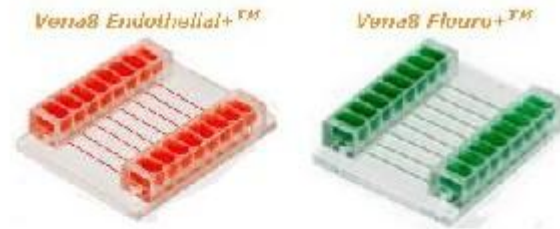


=> Rozlišení laminárního a turbulentního proudění.

Jaké máme k dispozici mikrofluidní zařízení?

Cellix

- Čipy
- Kima Pump
- VenaFlux Platform



IBIDI

Vlastní výroba



Cellix

Čipy Vena8 Endo+/Fluoro+

Materiál – akrylový/topas

Podklad – plastová fólie

Napojení – osmicestný konektor/“jehličky“

Rozměry kanálku:

délka 28 mm

šířka 0,8/0,4 mm

výška 0,12/0,1 mm

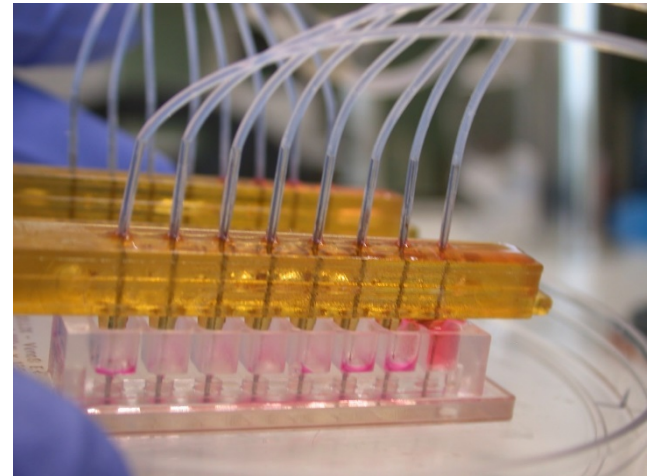
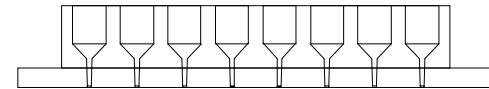
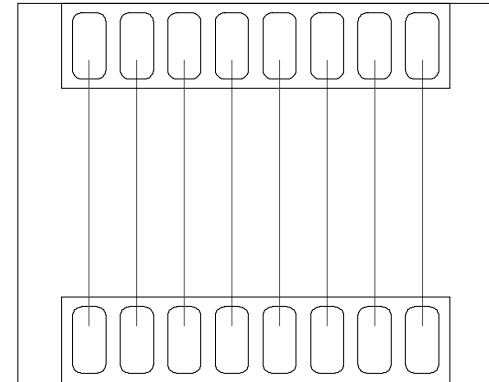
Rozměry celého čipu:

50 x 40 mm

Účel:

Endo+: dlouhodobá kultivace EC, sledování interakcí imunitních buněk na EC

Fluoro+: sledování vzniku thrombů a adheze lymfocytů uvnitř koutovaného kanálku



Čipy Vena4Y

Materiál – akrylový/topas

Podklad – plastová fólie

Napojení – osmicestný konektor/“jehličky“

Rozměry kanálku:

délka 28 mm

šířka 0,4 mm

výška 0,1 mm

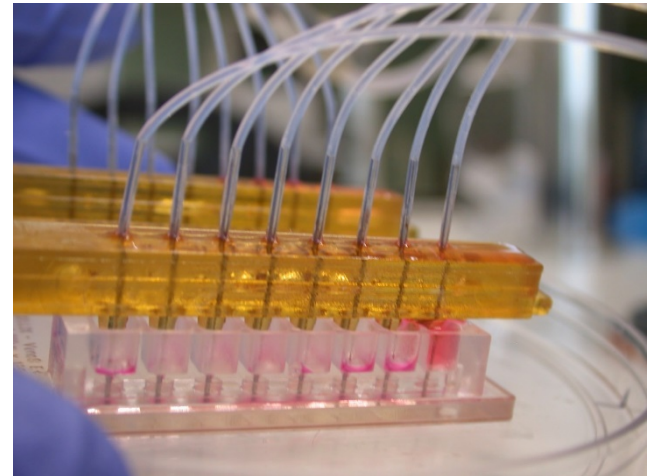
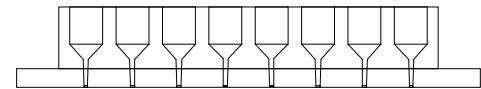
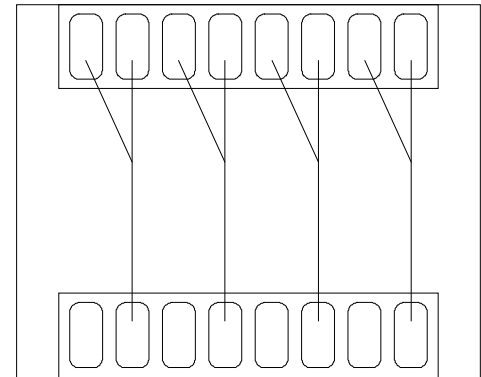
délka větve 12 mm

Rozměry celého čipu:

50 x 40 mm

Účel:

sledování **vzniku thrombů** na povrchu koutovaného kanálku **v místě jeho větvení**



Kima Pump



Video

<http://cellixltd.com/index.php/2013-09-13-12-10-06/2013-09-13-12-10-57/2013-09-13-12-12-29/pumps/kima>

VenaFlux Platform

Poloautomatická mikrofluidní platforma umožňující:

- rolování buněk
 - adhezi buněk
 - migraci buněk
- } pod vlivem smykového napětí



Rozmezí smykového napětí pro buněčnou suspenzi:
0.05 - 10 dyne/cm²
steps of 0.05 dyne/cm² (100 µL syringe)

Rozmezí smykového napětí pro plnou krev:
2.25 - 450 dyne/cm² (1 mL syringe)

Mirus Evo Nanopump and MultiFlow8

Princip:

Adheze destiček a formace trombů je vyhodnocována na základě sledování migrace destiček v reálném čase.



„Steady flow“

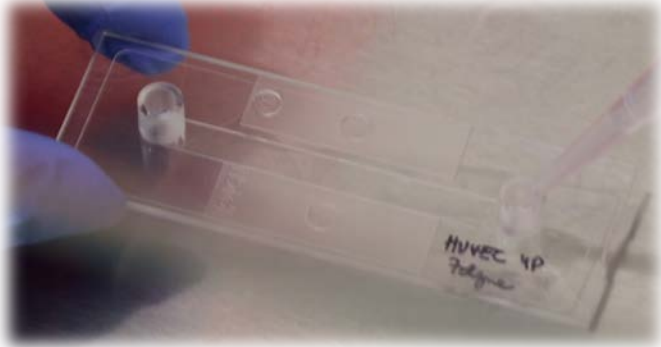
precision, ability to aspirate and dispense microlitre sample volumes

„Pulsatile flow“

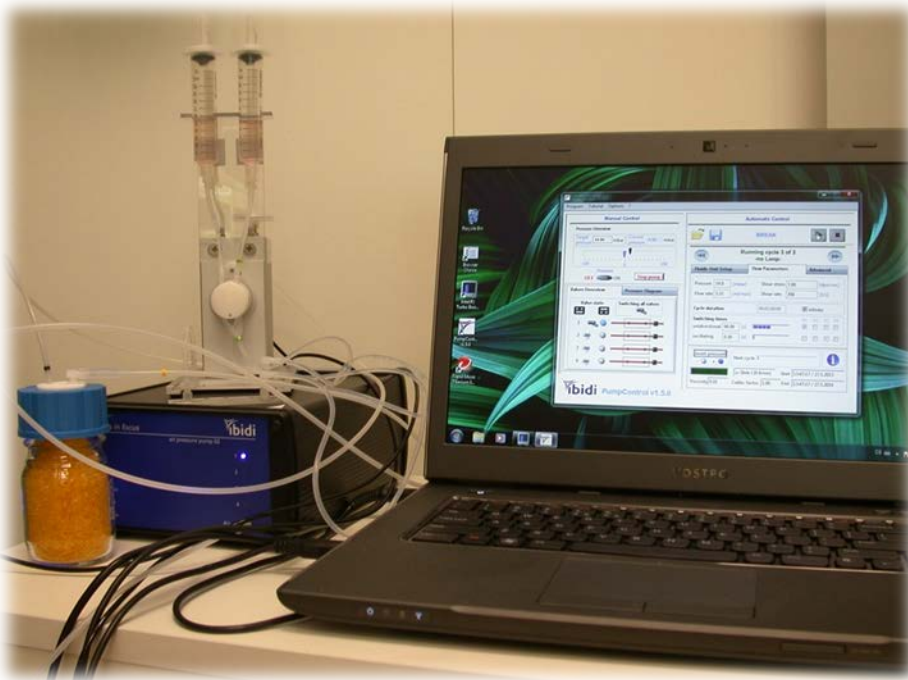
investigation of effects of pulsatile flow on morphology and orientation of cells and subsequent integrin expression

IBIDI

IBIDI Pump System



μ -slide



pumpa + software



fluidní jednotka + perfuzní set

Video

<http://ibidi.com/xtproducts/en/Instruments-Accessories/Pump-Systems/ibidi-Pump-System>

μ-slide I Luer

Materiál – mikroskopický plast

Podklad – tenká fólie

Napojení – Luer Connector

Rozměry kanálku:

délka 50 mm

šířka 5 mm

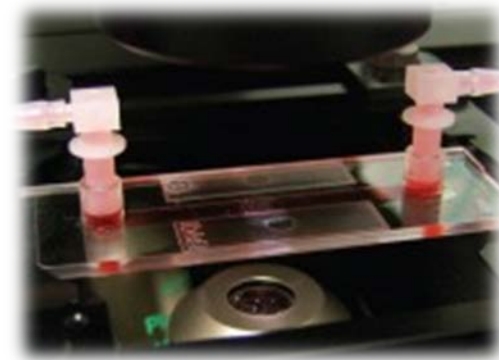
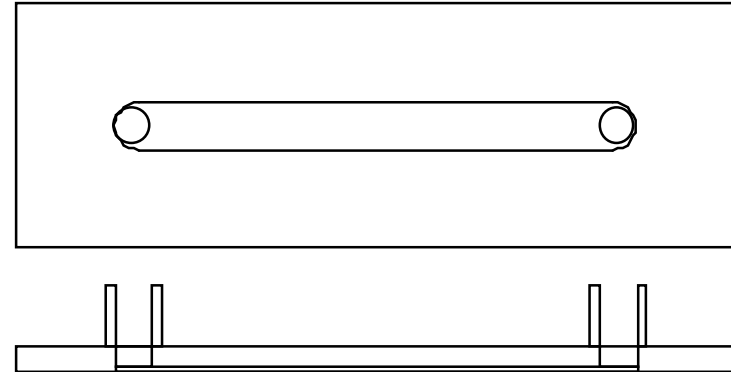
výška 0,4 mm

Rozměry celého čipu:

75,8 x 25,9 mm

Účel:

kultivace endoteliálních (a jiných) buněk
v proudových podmínkách, výtěžek buněk



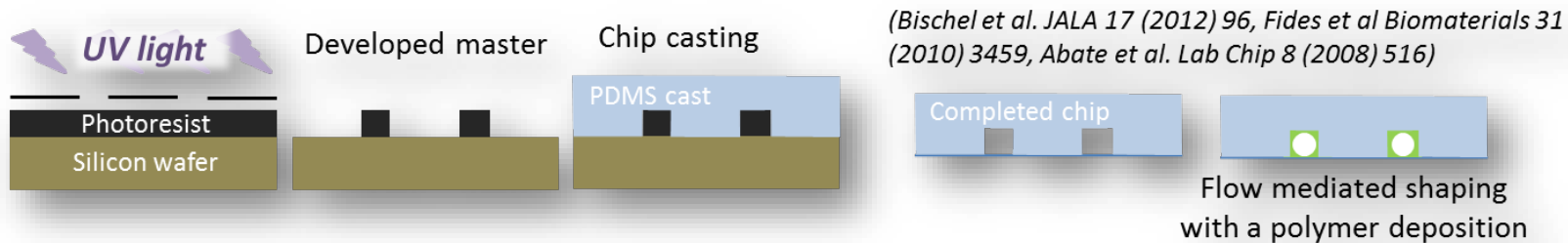
Vlastní výroba

Metodiky pro výrobu mikrofluidních čipů

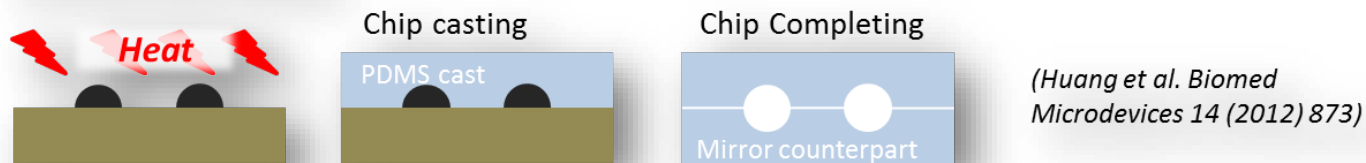
Materiál

- kolagen
- PDMS

Princip výroby:



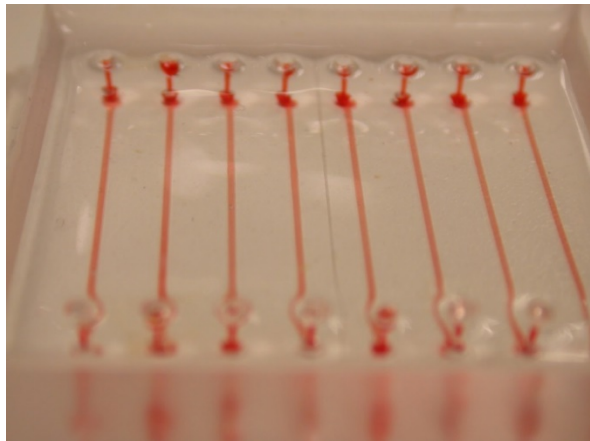
Photoresist reflow



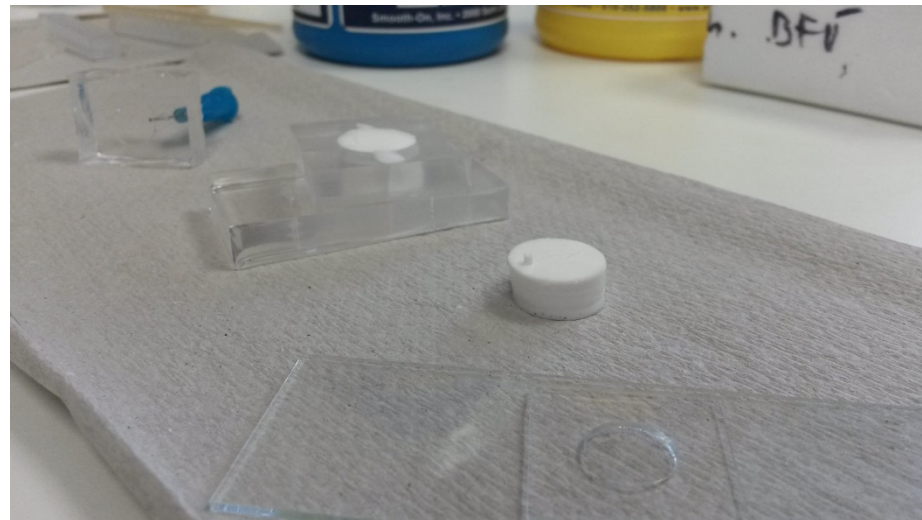
Extrusion or micromolding of sacrificed elements



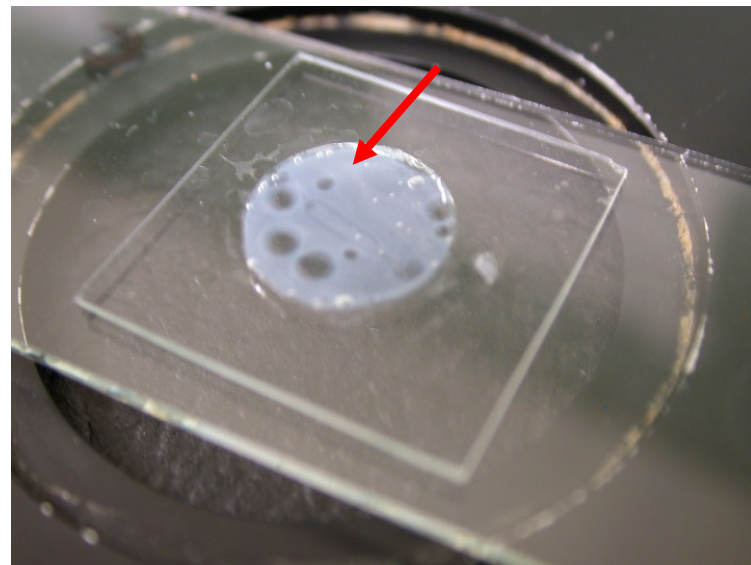
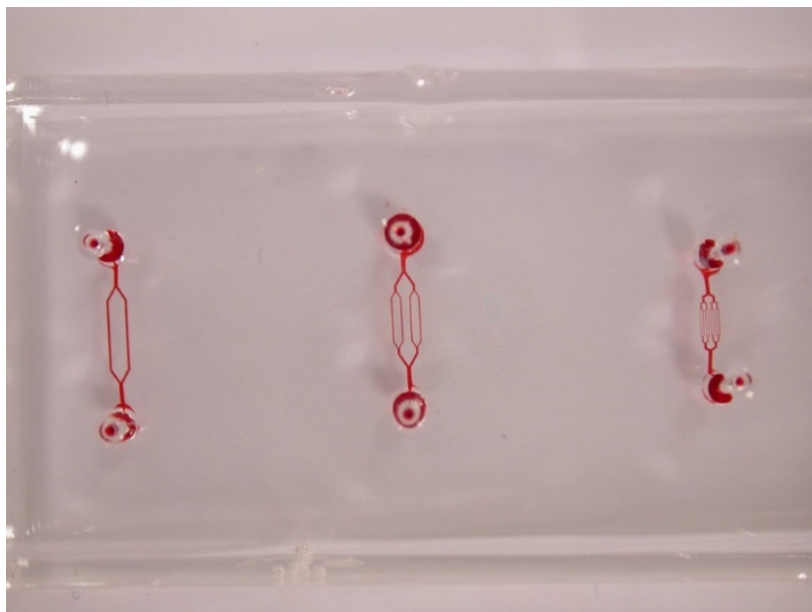
Vývoj nových, fyziologicky relevantních mikrofluidních čipů



silikon

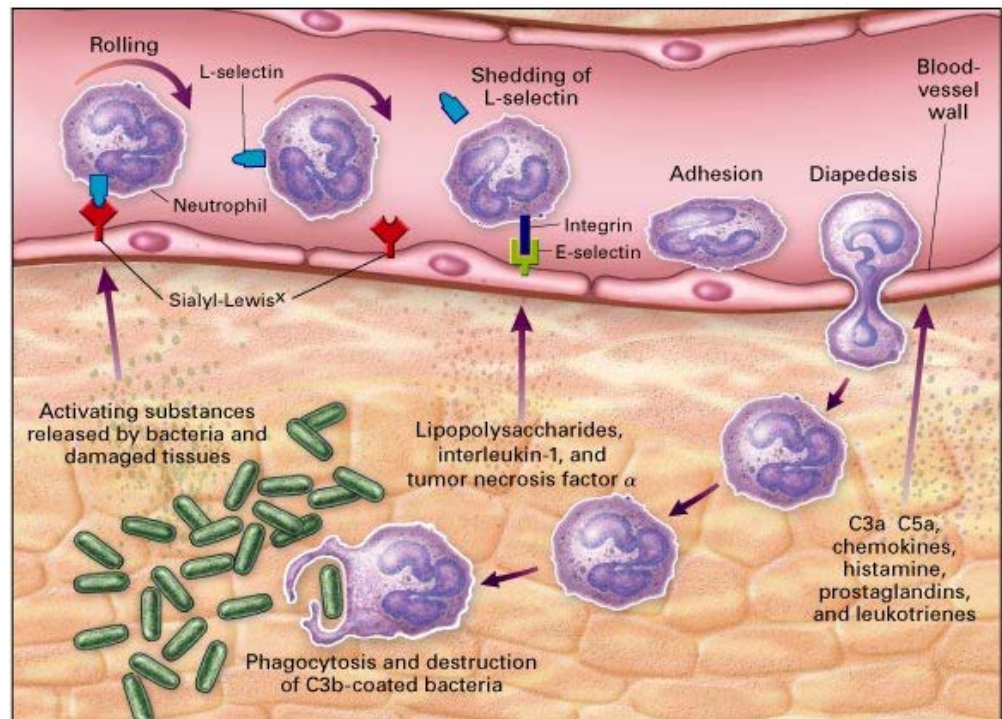


kolagen

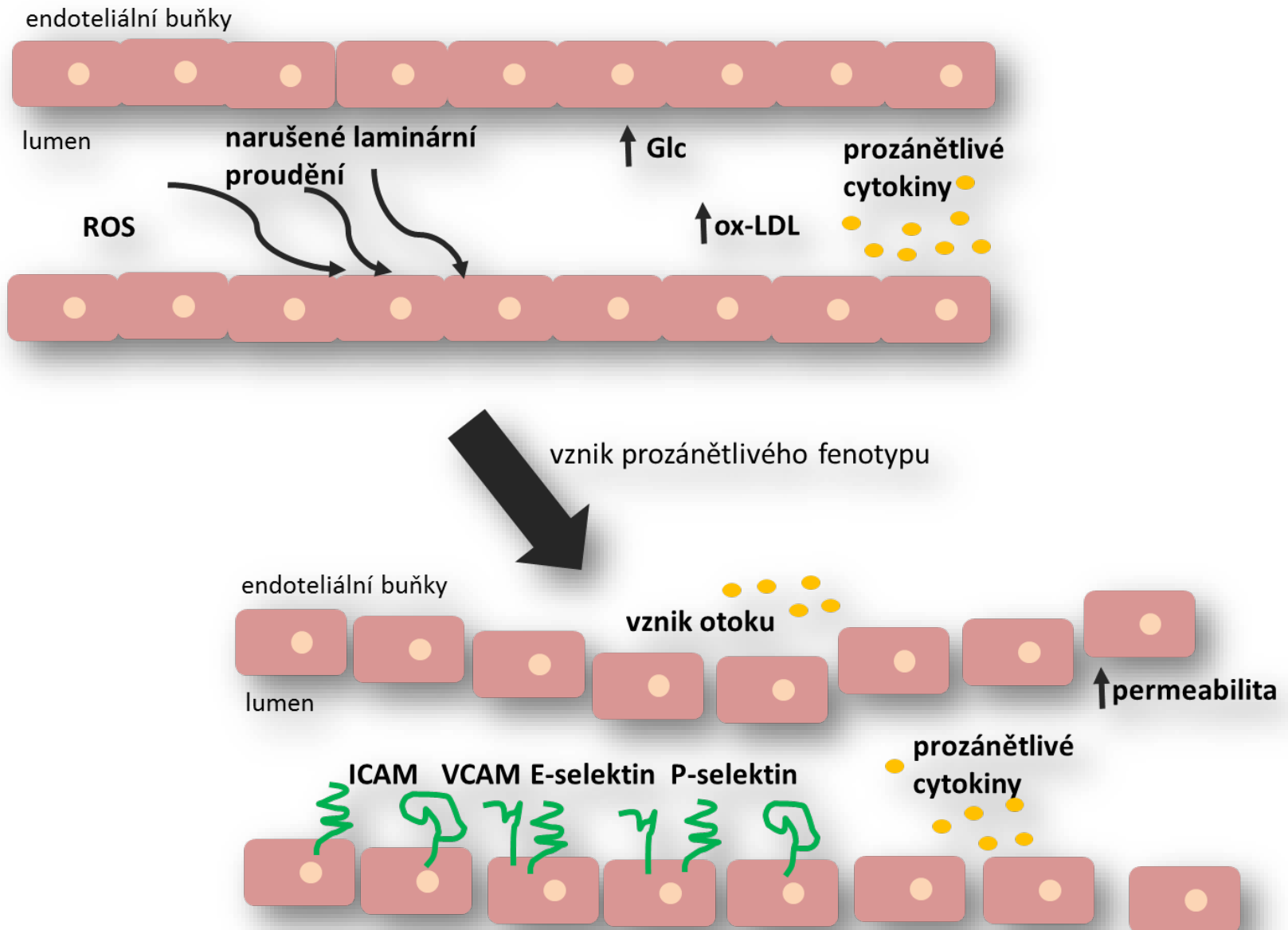


Náš výzkum

- Endoteliální buňky v zánětlivém procesu



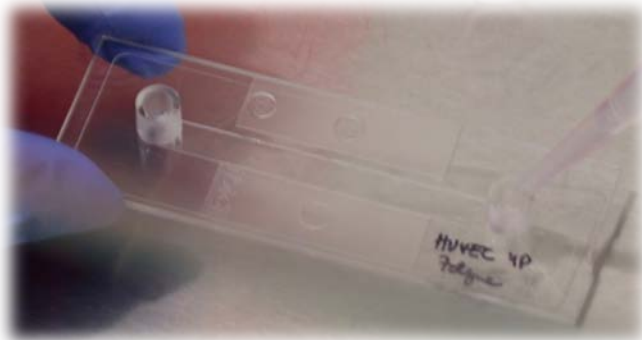
Vznik prozánětlivého fenotypu



Vliv smykového napětí na morfologii endoteliálních buněk

Mikrofluidní systém IBIDI:

kanálky s obdélníkovým průřezem

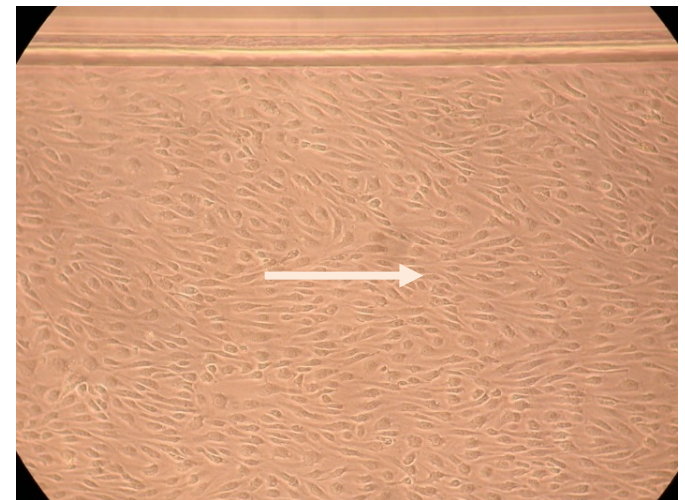


HUVEC

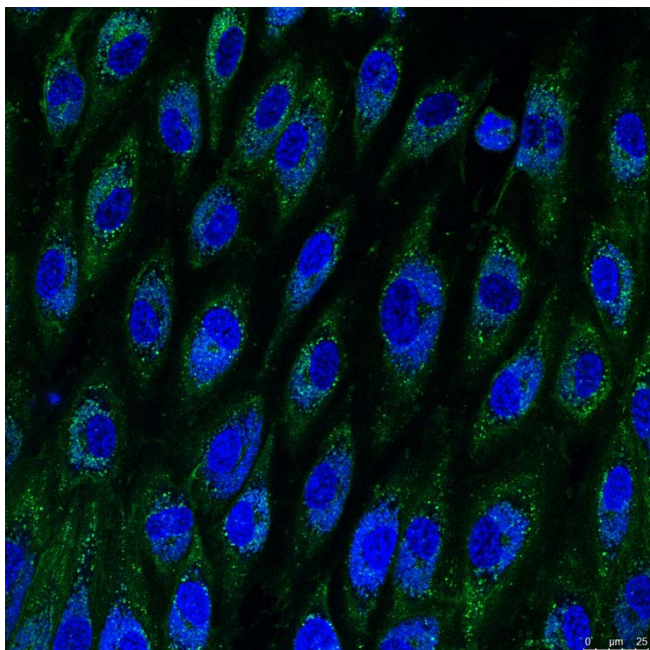
statická kultivace, 48 h



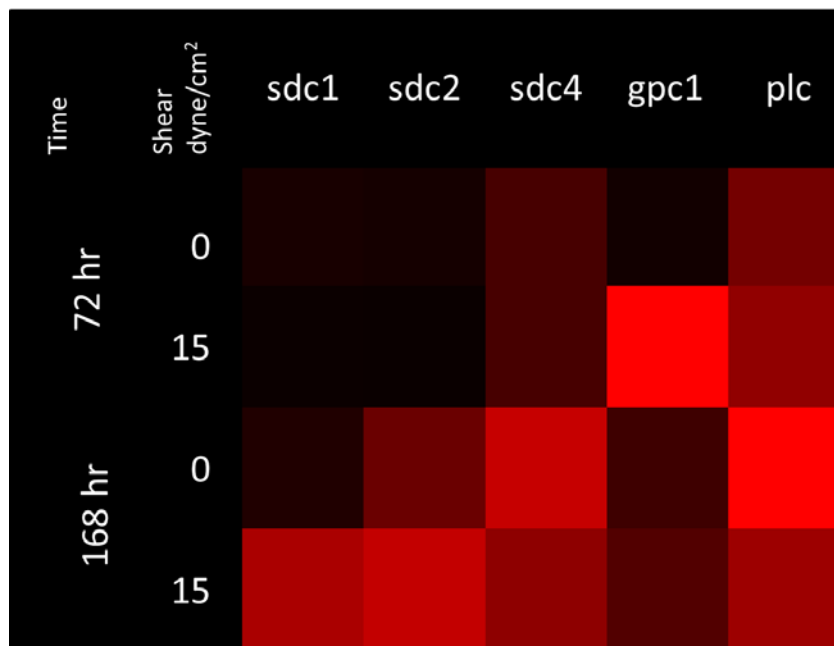
smykové napětí 15 dyne/cm², 48 h



Vliv smykového napětí na endoteliální glykokalyx



Distribuce glykokalyx na povrchu HUVEC po 7-denní kultivaci HUVEC pod vlivem smykového napětí (15 dyne/cm²).



Změna exprese vybraných genů významných složek glykokalyxu na povrchu HUVEC po 7-denní kultivaci EB pod vlivem smykového napětí (15 dyne/cm²).

Kolářová H, Ambrůzová B et al.

Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions.

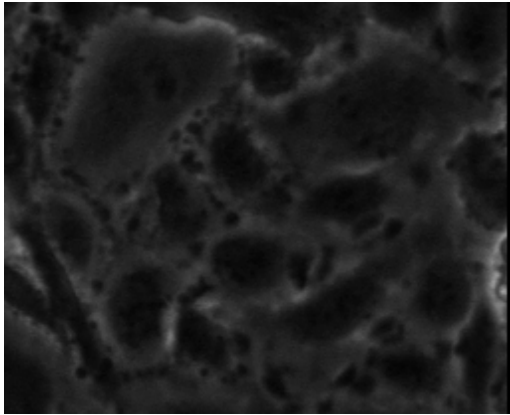
Mediators of Inflammation 2014; ID 694312.

Ambruzova et al. (2013) **Use of microfluidics to achieve native phenotype of endothelial cells.**

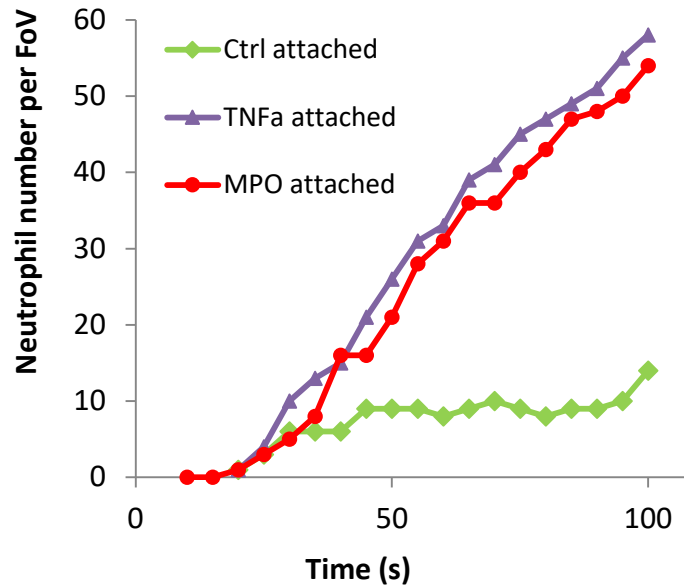
GRC Research conference, Barga, Italy.

Adheze neutrofilů k endoteliálním buňkám v proudových podmínkách

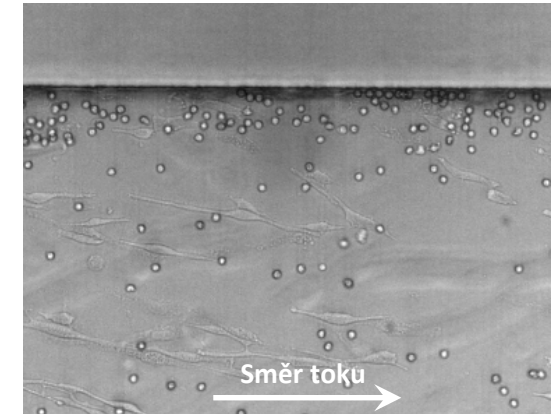
Endoteliální buňky (HUVEC)
aktivované TNF- α



Smykové napětí 15 dyne/cm²

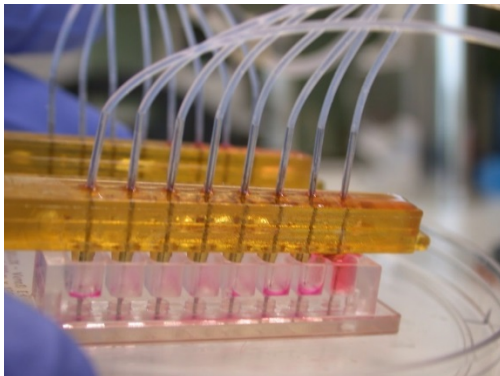


Akumulace neutrofilů
při krajích kanálku



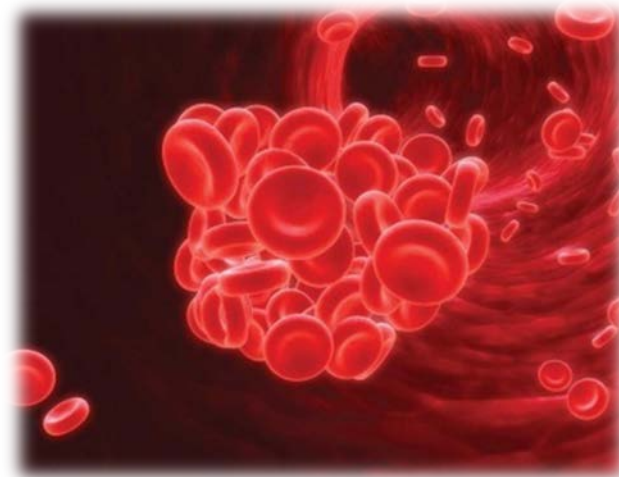
Smykové napětí 15 dyne/cm²

Mikrofluidní systém Cellix
kanálky s obdélníkovým průřezem



Náš výzkum

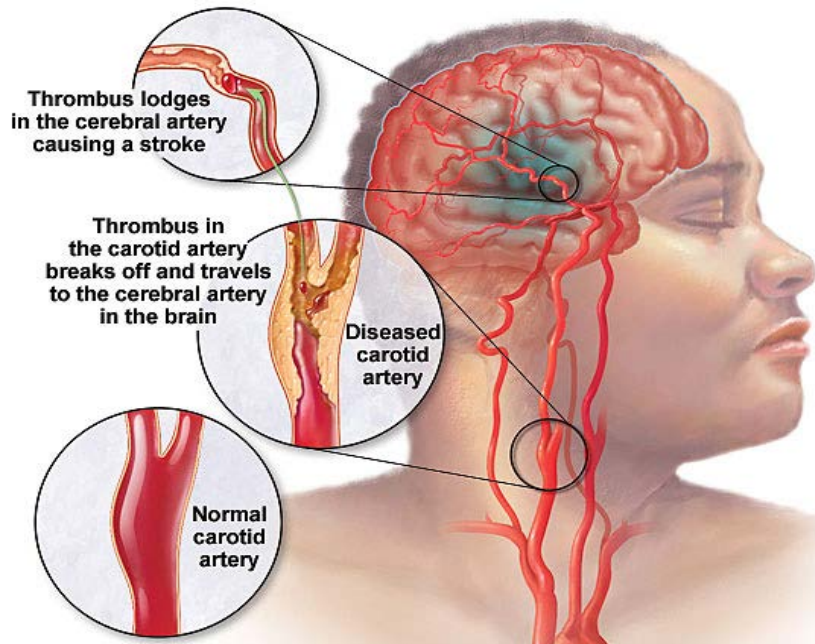
- Výzkum formace a degradace trombů v proudových podmínkách



Trombolýza

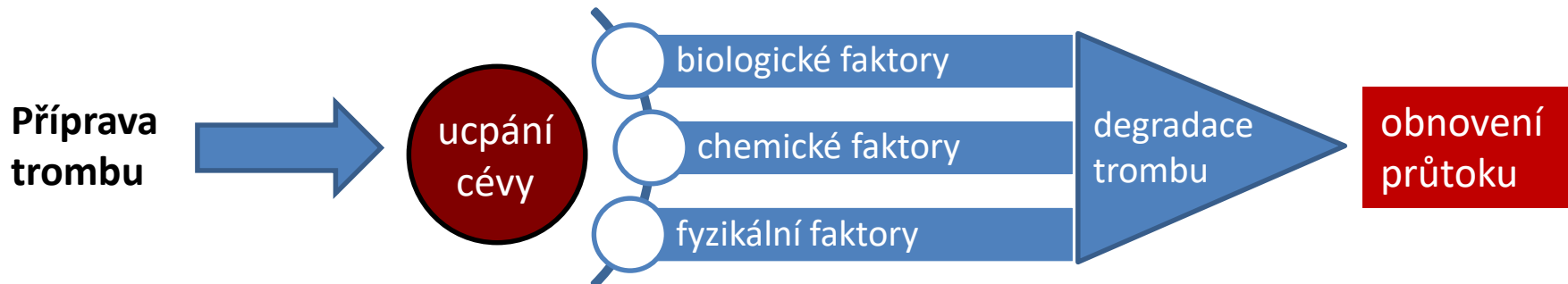
Důležitá pro léčbu celé řady nemocí:

mrtvice, infarkt myokardu, plicní embolie, žilní trombóza

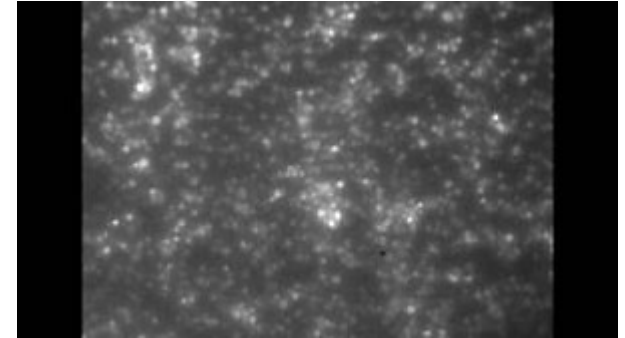
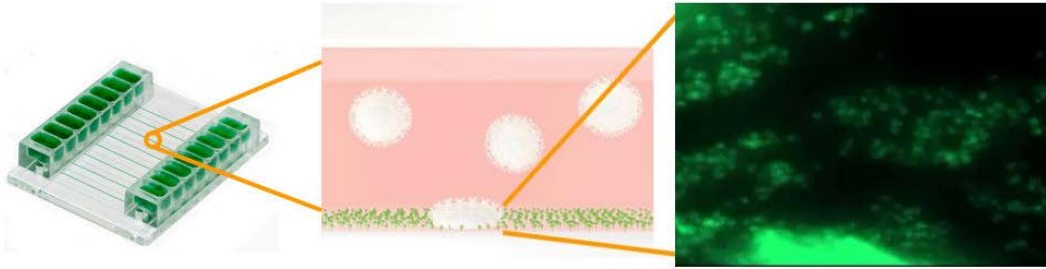


Fluidní *in vitro* model:

- jednokanálkový model
- systém větvených kanálků



Vena8 Fluoro+ Biočip – formace trombu *in vitro*

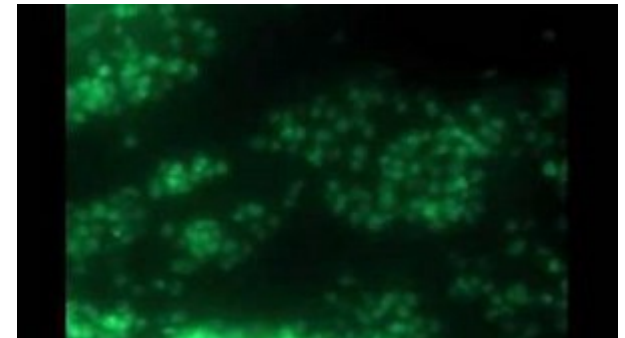


Trombóza: Adheze destiček na biočip koutovaný vWF při napětí 60 dyne/cm²
<http://1url.cz/8wEs>



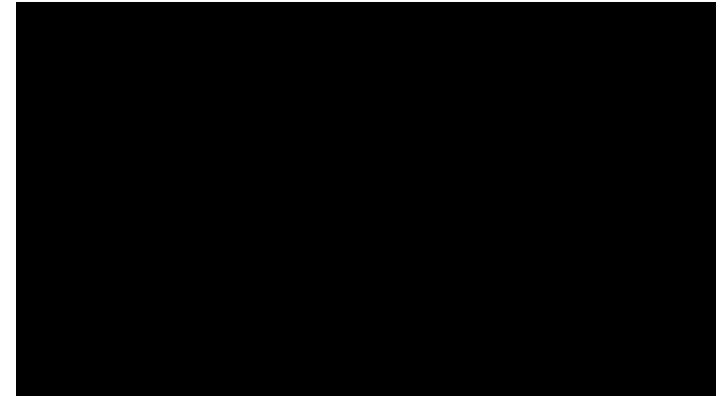
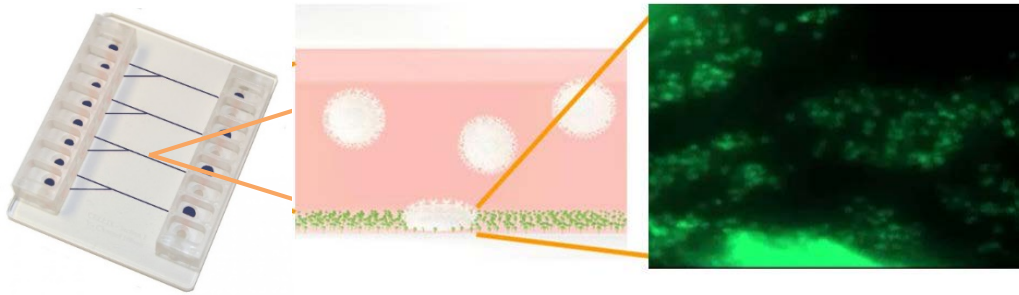
8 kanálů:

- hloubka 0,1 mm
- šířka 0,4 mm
- délka 28 mm
- objem 1,12 μ l
- tloušťka substrátu na dně 0,17 mm
- vWF, kolagen, fibrinogen



Trombóza: Adheze destiček z plné krve na biočip koutovaný kolagenem při napětí 30 dyne/cm²
<http://1url.cz/MwET>

Vena4Y Biočip – formace trombu *in vitro*



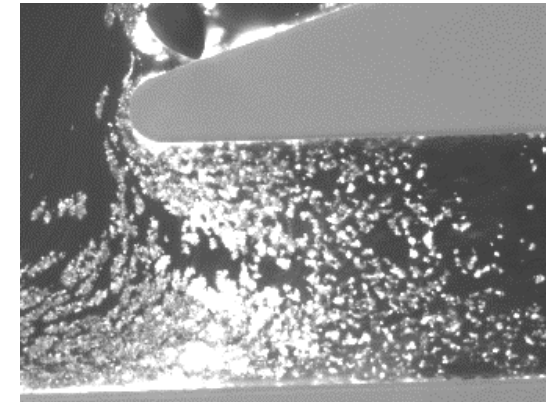
Vena4Y Flow Assay
<http://1url.cz/Hw2R>

4 kanály:

- hloubka 0,1 mm
šířka 0,4 mm
délka 28 mm
- objem 1,6 μ l
objem větve 0,48 μ l
- tloušťka substrátu na dně 0,5 mm
- vWF, kolagen, fibrinogen

První pokus:

- koutování:
lidský kolagen
bovinní kolagen
100/250 μ g/ml
- promytí PBS
- plná krev, destičky
– kalcein
- 120/60 dyne/cm²



Formace trombu *in vitro* – statické podmínky

