

# The endothelial glycocalyx in early atherogenesis : role in platelet adhesion?

## Citation for published version (APA):

Reitsma, S. (2012). *The endothelial glycocalyx in early atherogenesis : role in platelet adhesion?*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2012

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

**Summary**

**Samenvatting**

**About the author**

**Dankwoord**

8



## Summary

The circulation of blood is of pivotal importance to homeostasis of the body. Circulating plasma and blood cells support cell and organ metabolism. The smallest blood cells, blood platelets (about 1-2  $\mu\text{m}$ ), are mainly known for their role in aggregation and coagulation in the case of vessel damage. However, platelets are involved in many other processes as well. One of the pathological conditions to which platelets contribute is atherosclerosis.

Atherosclerosis is a wide-spread condition in Western societies, which is marked by the formation of so-called plaques in the vessel wall of larger arteries at predilection sites (e.g., arterial bifurcations) under conditions of hyperlipidemia. It is regarded to be an inflammatory process. The formation of these plaques (atherogenesis) starts in the first decades of life. Early during atherogenesis platelets adhere to the vessel wall of larger arteries and contribute to the inflammatory response leading to plaque formation. It is unknown what property of the endothelium attracts platelets to these predilection sites. In this thesis, the possibility is explored that changes in the endothelial glycocalyx, the luminal cover of endothelial cells, underlie platelet adhesion in early atherogenesis.

Chapter 2 provides an overview of the current knowledge on the structure and function of the endothelial glycocalyx, which appears to be actively involved in many processes affecting the vessel wall, such as vascular permeability, blood cell-vessel wall interactions, thrombogenicity and mechanotransduction. In this chapter, several techniques for visualization and quantification of the endothelial glycocalyx are addressed as well.

Chapter 3 describes our newly developed *ex vivo* imaging and quantification protocol for assessing the thickness and coverage of the endothelial glycocalyx in the isolated mouse carotid artery (diameter about 500  $\mu\text{m}$ ), flushed with a fluorescently labeled lectin. Imaging was performed through the vessel wall using two-photon laser scanning microscopy. This methodological protocol leads to less damage to the glycocalyx during the preparation process than most other reported preparation and visualization techniques. The thickness of the common carotid artery endothelial glycocalyx as measured in this way appeared to be about 2.3  $\mu\text{m}$ . The lectin-based approach provides a general impression of the glycocalyx, as approximately 90% of the endothelial surface area was labeled in the common carotid

artery. Interestingly, in the atherogenesis-prone internal carotid artery only about 70% of the endothelial surface area was labeled, while the thickness of the labeled glycocalyx was comparable (2.5  $\mu\text{m}$ ). This suggests that spatial differences in the glycocalyx can be related to a different propensity of the vessel wall for (platelet adhesion in) atherogenesis.

In Chapter 4, the effect of hyperlipidemia on both platelet-vessel wall interactions and endothelial glycocalyx thickness in the atherogenesis-prone carotid artery bifurcation is explored using intravital microscopy and ex vivo two-photon microscopy approaches in atherogenic mice and wild-type controls. In control animals, hardly any adhesion of platelets to the wall of the carotid artery bifurcation was seen, regardless of age. The thickness of the endothelial glycocalyx at this location was 2.5  $\mu\text{m}$  on average. Interestingly, in controls glycocalyx thickness increased with age from 2.4  $\mu\text{m}$  in young mice to 3.0  $\mu\text{m}$  in aged ones. In atherogenic mice higher levels of platelet adhesion were observed, with a clear age-dependency (from 24 platelets/ $\text{mm}^2$  in young to 64 platelets/ $\text{mm}^2$  in aged mice). In contrast, the age-dependent growth of the endothelial glycocalyx as seen in controls was lacking. As a result, the thickness of the glycocalyx in the atherogenic bifurcation was constant at about 2.2  $\mu\text{m}$  and, as such, less thick than in control bifurcations. This lack of growth of glycocalyx might explain the increasing numbers of platelet adhesion to the vessel wall.

However, glycocalyx dimensions in the atherogenic bifurcation were still comparable to those found in the common carotid artery of both atherogenic mice (1.9  $\mu\text{m}$ ) and wild-type controls (2.2  $\mu\text{m}$ ), while hardly any platelet adhesions occurred in the common carotid artery in either strain. In other words, no straight-forward relation between the thickness of the endothelial glycocalyx and the number of platelet-vessel wall interactions was observed.

To gain more insight in the possible role of the glycocalyx in platelet adhesion in the carotid artery, an ex vivo flow model was developed, which is described in Chapter 5. Platelet solutions were flushed through isolated, mounted carotid arteries, while wide-field fluorescence microscopy was applied to visualize platelet-vessel wall interactions in the common carotid artery and carotid artery bifurcation. Interestingly, the flow profile needed a certain length of the proximal common carotid artery to develop into a pattern with axially oriented flow lines. The area exposed to developing flow (entrance length) was prone to platelet-vessel wall interactions. Longer entrance lengths induced platelet pre-activation, which resulted in high numbers of platelet adhesion (> 160 platelets/ $\text{mm}^2$ ) as well as

aggregation downstream. In vessels with low platelet pre-activation hardly any platelet adhesions were observed either in the common carotid artery or the carotid bifurcation. This is comparable to data from the *in vivo* studies presented in Chapter 4. Enzymatic breakdown of the endothelial glycocalyx in these vessels increased platelet adhesion in the bifurcation (nonaxial flow) to 32 platelets/mm<sup>2</sup>, while in the common carotid artery (axial flow) no effect of reduction of the endothelial glycocalyx thickness could be observed. This way, a relation between the local flow profile (axial or nonaxial), the thickness of the endothelial glycocalyx and the number of platelet adhesions could be established. Thus, the endothelial glycocalyx acts as a modulator of platelet adhesion in areas exposed to nonaxial flow. Therefore, the previously described reduction in glycocalyx thickness at the carotid bifurcation of atherogenic mice (Chapter 4) might explain the increase in platelet adhesion at this site during atherogenesis.

To further address the role of the endothelial glycocalyx in atherogenesis, an *in vivo* imaging method is required. Chapter 6 reports that it is possible to image thin layers in the vessel wall using two-photon laser scanning microscopy *in vivo*. The key to stable imaging in these vessels was found to be the combination of adjusted imaging speeds and triggered image acquisition based on the respiratory and cardiac cycles. As a proof of principle, the subendothelial collagen layer (about 1  $\mu\text{m}$ ) was fluorescently labeled and stably visualized at an acceptable sampling rate (about 1 – 4 Hz). Although the fluorescent labeling protocol for the glycocalyx used in this thesis is not applicable *in vivo*, the techniques described in this chapter form the basis for *in vivo* imaging of the endothelial glycocalyx in large arteries in the future.

The results of this thesis are discussed in Chapter 7, thus giving an overview of new insights provided by our work on the role of the endothelial glycocalyx in platelet adhesion during early atherogenesis.

## Samenvatting

Veel mensen in onze westerse cultuur ontwikkelen gedurende hun leven de ziekte vaatverkalking, ook wel bekend als atherosclerose. Dit is een aandoening waarbij er in grote bloedvaten (slagaders) een ontstekingsproces op gang komt. Hierbij hoopt ontstekingsmateriaal zich op in de wand van het bloedvat en vormt een zogenaamde plaque. Het kan na verloop van tijd voorkomen dat een dergelijke plaque scheurt, waardoor er een acute stollingsreactie van het bloed optreedt, met vorming van bloedpropen. Dit leidt dan tot aandoeningen als een hart- of herseninfarct. Daarmee vormt atherosclerose een van de grootste onderliggende oorzaken van sterfte in de westerse beschaving.

Om de ontwikkeling van atherosclerotische plaques goed te kunnen begrijpen, is inzicht in de structuur en functie van de wand van slagaders essentieel. Deze vaatwand kent drie lagen. De buitenste laag bestaat uit bindweefsel en bindweefselvormende cellen, en zorgt hiermee voor de verankering van het vat in zijn omgeving. De middelste laag bestaat uit spiercellen omgeven door elastisch bindweefsel. Hierdoor kan het vat enerzijds oprekken en anderzijds een bepaalde weerstand bieden als er bloed met een hoge druk doorheen wordt gepompt. De binnenste laag bestaat uit zogenaamde endotheelcellen. Deze zorgen er onder andere voor dat bloed in het vat niet gaat stollen.

In dit proefschrift wordt een specifiek onderdeel van de vaatwand belicht: de endotheliale glycocalyx. Dit is een laag met speciale suiker- en eiwitdeeltjes die vanuit de endotheelcellen groeit en in contact staat met stromend bloed. Doordat er vocht en andere deeltjes vanuit het bloed de glycocalyx binnendringen, ontstaat er een soort gelei. Een overzicht over de huidige kennis van de structuur en functie van de endotheliale glycocalyx wordt gegeven in hoofdstuk 2. In hoofdstuk 3 wordt aangetoond dat de endotheliale glycocalyx in intacte halsslagaders van muizen door middel van geavanceerde twee-foton microscopie in beeld gebracht kan worden. In deze vaten blijkt de endotheliale glycocalyx enkele micrometers dik te zijn. Ter vergelijking: de onderliggende endotheelcellen zijn zelf meestal niet eens een halve micrometer dik!

We hebben in dit proefschrift ook nagedacht over een functioneel belang van de endotheliale glycocalyx. Hierbij hebben we gekeken naar het gedrag van bloedplaatjes. Bloedplaatjes zijn de kleinste cellen in het bloed (ca. 1 micrometer in

doorsnee) en zijn betrokken bij het vormen van een stolsel in geval van schade aan een bloedvat. In normale omstandigheden blijven bloedplaatjes in het stromende bloed aanwezig zonder in contact te komen met de vaatwand. In de wetenschappelijke literatuur was reeds beschreven dat bloedplaatjes vroeg in het ontstaan van atherosclerotische plaques aan de vaatwand van slagaders blijven plakken (adhesie). Wanneer hun binding aan de vaatwand wordt voorkomen, worden de plaques minder groot. De vraag komt dan op waarom bloedplaatjes blijven plakken? En ook: hoe is dit mogelijk als er een glycocalyx 'in de weg zit' die enkele malen groter is dan het bloedplaatje zelf? Om hier meer inzicht in te krijgen hebben we zowel het gedrag van bloedplaatjes als de dikte van de glycocalyx bestudeerd bij gezonde muizen en bij muizen die plaques ontwikkelen. De resultaten van deze studies worden in hoofdstuk 4 beschreven. Op plaatsen waar zich plaques vormen is de glycocalyx van de zieke dieren dunner terwijl er daar meer bloedplaatjes blijven plakken. Deze bevinding pleit voor een beschermende rol van de glycocalyx. Toch blijkt de zaak iets ingewikkelder. Op plaatsen waar geen plaques ontstaan werden geen plakkende bloedplaatjes gevonden, terwijl hier de glycocalyx even dun was als op plekken waar wel plaques ontstaan in zieke dieren. Er lijkt derhalve geen eenduidige relatie te bestaan tussen de dikte van de glycocalyx en de hoeveelheid plakkende bloedplaatjes.

Om meer duidelijkheid te krijgen over de rol van de glycocalyx in bloedplaatjesadhesie hebben we een model ontwikkeld waarbij zowel de halsslagaders als bloedplaatjes uit muizen werden geïsoleerd (hoofdstuk 5). De slagaders werden in een vaatbakje opgespannen, waarna de bloedplaatjes erdoorheen werden gespoeld. Tegelijkertijd werd met een microscoop naar het plakgedrag van de bloedplaatjes gekeken. Hierbij bleek dat er op plekken waar zich plaques vormen een verstoord stroomprofiel is, wat inhoudt dat de stromingsrichting niet volledig parallel aan de vaatwand loopt. Afbraak van de glycocalyx op deze plekken leidde wel tot een verhoging van het aantal plakkende bloedplaatjes, terwijl dit op plaatsen met een normaal (parallel) stroomprofiel niet het geval was. Uit deze experimenten konden we concluderen dat de glycocalyx wel degelijk een beschermende rol lijkt te hebben door op plaatsen met een verstoord stroomprofiel bloedplaatjesadhesie tegen te gaan.

Dit inzicht kan de basis zijn waarop we in de toekomst mogelijk met behulp van glycocalyx-versterkende strategieën (zoals medicijnen) de ontwikkeling van vaatverkalking tegen kunnen gaan. Om het succes van dergelijke interventies goed te kunnen evalueren is er een manier nodig om de structuur van de glycocalyx in het levende dier te onderzoeken. In hoofdstuk 6 wordt een opzet hiertoe beschreven. We laten zien dat het mogelijk is om zeer fijne structuren (laagjes van een micro-



meter dik) in grote slagaders van muizen en ratten in beeld te brengen. De grootste uitdaging hierbij is om deze structuren onbewogen af te beelden, ondanks de natuurlijke beweging van het bloedvat ten gevolge van de hartslag en de ademhaling. Deze beweging zorgt ervoor dat de structuur waarin we geïnteresseerd zijn voortdurend beweegt en steeds uit beeld verdwijnt. Dit effect kan sterk verminderd worden door het moment van afbeelding op een gunstig moment tijdens de hartslag en ademhaling te laten plaatsvinden. Ook beschrijven we welke winst verwacht mag worden van het veranderen van instellingen van de twee-foton microscopie opstelling.

Tot slot wordt in hoofdstuk 7 een algemene uiteenzetting gegeven van de belangrijkste bevindingen in dit proefschrift en van de wetenschappelijke waarde hiervan. Dit alles mondt uit in een beschrijving van de verschillende factoren die van invloed zijn op plaatjesadhesie aan de wand van grote slagaders en de rol van de endotheliale glycocalyx hierin.