

Two-photon microscopic imaging of neo-vasculature in atherosclerotic plaques and tumors

Citation for published version (APA):

Douma, K. (2009). *Two-photon microscopic imaging of neo-vasculature in atherosclerotic plaques and tumors*. Mediview BV.

Document status and date:

Published: 01/01/2009

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

Neo-vascularization, more specifically angiogenesis, contributes to growth of atherosclerotic plaques and solid tumors by providing conduits for transport and microvasculature for exchange of nutrients, oxygen, and waste products to the increasing cell mass. The shoulders of advanced atherosclerotic plaques are characterized by a network of microvessels predominantly originating from the vasa vasorum, whereas solid tumors are provided with an internal and peripheral microvascular network. Visualization and quantification of neo-vascular morphology and of angiogenic activity would allow monitoring of the development of (vulnerable) atherosclerotic plaques and (malignant) tumors. Therefore, in this thesis, two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) and magnetic resonance imaging (MRI) were utilized to visualize angiogenic activity in atherosclerotic mice and in tumor-bearing mice and to quantify neo-vascular morphology in tumor-bearing mice. The sub-micrometer spatial resolution of TPLSM also enables validation of the MRI observations.

In **chapter 2**, a brief overview is provided on the mechanisms of angiogenesis and hypoxia as its main initiator. The processes of atherogenesis and carcinogenesis are shortly described, followed by the contribution of the vasa vasorum (VV) and intraplaque microvasculature to the growth and rupture of atherosclerotic plaques and the contribution of microvasculature to tumor growth. Animal models for atherosclerosis and cancer are described and methods to visualize morphology, permeability, and angiogenic activity are provided. This chapter concludes with the basic principles of two-photon laser scanning microscopy (TPLSM), its application to visualizing and quantifying neo-vasculature, and the application of TPLSM as high resolution imaging validation method.

Molecular imaging methods currently under development may contribute to future personalized medicine in treating cardiovascular disease. Endoscope-compatible optical techniques, including TPLSM,

Raman microspectroscopy (RMS), optical coherence tomography (OCT), and photoacoustic tomography (PAT) would allow intravascular molecular imaging of vulnerable atherosclerotic lesions. Efficient optical visualization of molecular epitopes specific for vulnerable atherosclerotic lesions requires targeting of high quality optical contrast-enhancing nanoparticles. In **chapter 3**, a review is provided on current optical nanoparticles, confined to quantum dots (QDs), gold nanoparticles (AuNPs), diamond nanoparticles (DNPs), carbon nanoparticles (CNPs), and silica nanoparticles (SNPs), and targeting ligands for optical molecular imaging of atherosclerotic lesions. It is concluded that, based on the limited toxicity and favorable optical properties, AuNPs and SNPs provide the most promising perspective for future optical molecular imaging of atherosclerosis in the clinical environment.

Atherosclerotic plaques are constantly evolving structures, which are associated with an increase in vasa vasorum (VV) density, as shown by several histological and micro-computed tomography (micro-CT) studies of ApoE^{-/-} mice. However, these methods require tissue processing, thereby affecting tissue integrity and morphology. Therefore, in **chapter 4** we investigated the feasibility of TPLSM to *ex vivo* image the VV of intact atherosclerotic aortas of ApoE^{-/-} mice. Vascular endothelial cells (VECs) were fluorescently labeled via intravenous injection of α CD31-FITC, whereas angiogenic activity of VECs was assessed by *in vivo* targeting with QDs of CD13, expressed by angiogenic VECs, by binding cyclic Ans-Gly-Arg (cNGR) to the QD surface (cNGR-QDs). VV were observed in the aortic abdominal bifurcation of ApoE^{-/-} mice fed a Western type diet for 20 weeks, abluminal from the atherosclerotic lesion, with microvessels penetrating the media up to 60 μ m. Interestingly, VV were not observed in other aortic segments of these mice. cNGR-QDs colocalized with 30% of the ApoE^{-/-} VV, indicating angiogenic activity. The sporadically observed adventitial microvessels of

the abdominal aorta of control C57BL/6J mice displayed no angiogenic activity. This study indicates a higher plaque-associated VV prevalence in the abdominal aorta bifurcation of ApoE^{-/-} mice than of control C57BL/6J mice. TPLSM proved a practical tool in visualizing the VV of intact arterial segments and may be employed to evaluate the contribution of the VV and intraplaque microvessels underlying the potential destabilization of atherosclerotic lesions in longitudinal studies.

Non-invasive assessment of microvascular morphology and density would allow estimation of disease progression, i.e., development of vulnerable atherosclerotic plaques and tumor growth and metastasis formation, and the response to anti-angiogenic therapy. Magnetic resonance vessel size imaging (MR-VSI) non-invasively provides measures for the microvessel radius and fractional blood volume of biological tissue. In **chapter 5**, the validity of *in vivo* MR-VSI in assessing these measures for tumor and muscle tissue of mice was evaluated using *ex vivo* 3D TPLSM. Dedicated image processing was applied to the acquired TPLSM datasets to quantify microvessel radius, density, and length of microvasculature of these excised, but intact tissues. TPLSM data displayed a randomly oriented tumor microvasculature, whereas muscle microvessels were mainly oriented parallel to each other. For both MR-VSI and TPLSM, a larger vessel radius and fractional blood volume were found in the tumor rim than in the core. Compared with TPLSM, MR-VSI resulted in a large overestimation of the average vessel radius index, whereas the fractional blood volume was slightly lower. However, the trends for both techniques were the same: morphologic measures were higher for tumor than for muscle tissue, and higher for tumor rim than for the core. Thus, although MR-VSI is not suitable for absolute quantification of vessel radius and blood volume, it may be used to assess the heterogeneity in microvascular morphology within tissue. In addition, MR-VSI may be suitable to

investigate relative inter-tissue microvascular differences and intra-tissue effects of anti-angiogenic therapy in longitudinal studies.

In addition to the morphological characteristics of microvasculature, the angiogenic activity of solid tumors provides information on the expansive capability of their microvascular network. For the study described in **chapter 6**, cNGR-labeled paramagnetic quantum dots (cNGR-pQDs) were developed and applied to non-invasively assess tumor angiogenic activity using quantitative *in vivo* molecular MRI. Intravenous injection of the cNGR-pQDs in tumor-bearing mice resulted in an increased quantitative MRI contrast, comprising both increased longitudinal relaxation and decreased proton visibility, in the tumor rim but not in the tumor core or control muscle tissue. Thus, cNGR-pQDs allow *in vivo* quantification and localization of angiogenic activity with MRI. Validation of the MRI results with *ex vivo* TPLSM showed that cNGR-pQDs colocalized primarily with the tumor VEC membrane, were to a lesser extent found in the vessel lumen, and were not internalized by VECs. In contrast, unlabeled pQDs were not or only sparsely detected with both MRI and TPLSM. These results indicate a high specificity of cNGR-pQDs for angiogenic tumor vasculature.

Numerous studies have established that neo-vasculature affects the development of atherosclerotic plaques and solid tumors and tentatively contributes to plaque destabilization and spread of metastasis. The studies presented in this thesis demonstrate that two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) and magnetic resonance imaging (MRI), at different levels of spatial resolution and sensitivity, enable visualization and quantification of microvascular morphology and angiogenic activity in murine models of atherosclerosis and cancer. However, as described in the general discussion (**chapter 7**), several biological and technical limitations may apply to the presented studies, including the use

of CD31 as beacon for demarcation of VECs (chapters 4, 5, and 6), the relatively low incidence of VV microvessels in atherosclerotic mice (chapter 4), and the limited penetration depth of TPLSM in atherosclerotic plaques and tumor tissue (chapter 4, 5, and 6). Nevertheless, TPLSM has offered the ability to visualize and, with dedicated image processing, quantify microvasculature in associated with atherosclerotic plaques and tumors. Recent developments in endoscope-based TPLSM may widen the scope of these optical diagnostics to clinical applications.

Samenvatting

Nieuwvorming van kleine bloedvaten (angiogenese) levert een belangrijke bijdrage aan de ontwikkeling van atherosclerose (“aderverkalking”) en kanker, de twee voornaamste doodsoorzaken in de Westerse maatschappij. Atherosclerotische plaques en tumoren kunnen namelijk groeien doordat nieuw gevormde bloedvaten het weefsel voorzien van voedingsstoffen en zuurstof en afvalstoffen afvoeren. Bloedvaatjes in atherosclerotische plaques ontstaan voornamelijk uit de vasa vasorum, een netwerk van bloedvaten in de (atherosclerotische) vaatwand, terwijl tumoren door zowel een centraal als perifere netwerk van bloedvaten wordt gevoed. De klinische relevantie van atherosclerotische plaques en tumor kan in kaart worden gebracht door de morfologie, denk aan de straal en dichtheid van de vaten, en de angiogene activiteit van deze bloedvaten af te beelden en te kwantificeren. In dit proefschrift werden twee-foton laser scanning microscopie (TPLSM) en magnetische resonantie beeldvorming (MRI) gebruikt om in atherosclerotische muizen en in tumordragende muizen angiogene activiteit van de nieuw gevormde bloedvaatjes aan te tonen. Vanwege de sub-micrometer resolutie, maakt TPLSM het mogelijk de MRI resultaten met grote nauwkeurigheid te valideren. Daarnaast werden deze technieken gebruikt om in tumor-dragende muizen de morfologie van de nieuw gevormde bloedvaatjes te kwantificeren.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de mechanismen achter angiogenese en de rol die een lage zuurstofspanning (hypoxie) hierin speelt. Daarnaast wordt de ontwikkeling van atherosclerotische plaques (atherogenese) en tumoren (carcinogenese) beschreven en wordt er aandacht besteed aan de bijdrage die nieuwvorming van bloedvaatjes in en rond atherosclerotische plaques levert aan de mechanische instabiliteit van plaques en de groei van tumoren. Verder worden enkele diermodellen van atherosclerose en kanker beschreven en worden technieken gepresenteerd om morfologie, permeabiliteit en angiogene activiteit van bloedvaten af te beelden.

Het hoofdstuk eindigt met de basis principes van TPLSM, de mogelijkheden die deze techniek biedt om nieuw gevormde bloedvaten af te beelden en te kwantificeren, en om als validatie van andere beeldvormingstechnieken te dienen.

Detectie van moleculaire veranderingen (moleculaire beeldvorming) in weefsel maakt het mogelijk om ziektes in een vroeger stadium te diagnosticeren dan met conventionele middelen. Hierdoor kan mede de behandeling van bijvoorbeeld cardiovasculaire aandoeningen op individueel niveau worden aangepast. Naast de bestaande klinische beeldvormingstechnieken kan de verhoogde ruimtelijke resolutie en gevoeligheid van optische beeldvormingstechnieken hier een aanzienlijke bijdrage aan leveren. Met name de technieken die endoscopisch toepasbaar zijn zoals TPLSM, Raman microspectroscopie (RMS), optische coherentie tomografie (OCT) en fotoakoestische tomografie (PAT) zijn geschikt voor moleculaire beeldvorming van atherosclerotische plaques vanuit het lumen van het atherosclerotische bloedvat. Echter, optische moleculaire beeldvorming vereist contrastverhogende deeltjes (nanopartikels) die specifiek aan het pathologische molecuul binden. In **hoofdstuk 3** wordt een literatuur overzicht gegeven van enkele, mogelijk klinisch toepasbare, optische nanopartikels en liganden, welke specifiek zijn voor atherosclerotische plaques. De nanopartikels zijn quantum dots (QDs), goud nanopartikels (AuNPs), diamant nanopartikels (DNPs), koolstof nanoparticles (CNPs) en silica nanopartikels (SNPs). Op basis van de minimale toxiciteit bij langdurige blootstelling en de gunstige optische eigenschappen zijn AuNPs en SNPs veelbelovend voor toekomstige optische moleculaire beeldvormingstechnieken in de kliniek.

Atherosclerotische ApoE^{-/-} muizen worden veelvuldig gebruikt in onderzoek naar atherosclerose. In deze dieren gaat de ontwikkeling van atherosclerotische plaques gepaard met een toename in vasa vasorum dichtheid, zoals gebleken is uit studies met positron emissie

tomografie (PET) en histologische technieken. In **hoofdstuk 4** is onderzocht of middels TPLSM (angiogene activiteit van) de vasa vasorum van intacte atherosclerotische aorta's van ApoE^{-/-} muizen afgebeeld kunnen worden. De endotheelcellen van de bloedvaten werden fluorescerend gelabeld door intraveneus α CD31-FITC toe te dienen. De angiogene activiteit van deze endotheelcellen werd bepaald door QDs specifiek te laten binden aan CD13 door middel van het cyclische tripeptide Ans-Gly-Arg (cNGR) aan het QD oppervlak (cNGR-QDs). Vasa vasorum werden gevonden in de bifurcatie van de abdominale aorta van ApoE^{-/-} muizen die 20 weken een hoogcholesterol dieet hadden gekregen. Enkele kleine bloedvaatjes, ontsprongen uit de vasa vasorum, drongen in de media van de vaatwand door tot een diepte van 60 μ m. Vasa vasorum werden niet gevonden in andere slagaders van deze muizen. De cNGR-QDs hechtten aan de endotheelcellen bij 30% van de vasa vasorum, wat erop duidde dat de endotheelcellen daar angiogene activiteit vertoonden. Bloedvaatjes in de adventitia van bloedvaten waren weliswaar sporadisch aanwezig in de abdominale aorta van controle C57BL/6J muizen, maar vertoonden geen angiogene activiteit. Deze studie wijst daarmee op hogere prevalentie van vasa vasorum in de abdominale aorta van ApoE^{-/-} muizen dan in controle C57BL/6J muizen. TPLSM is een goede techniek om de vasa vasorum van intacte arteriën af te beelden en kan mogelijk gebruikt worden in longitudinale studies ter bepaling van de bijdrage van de vasa vasorum aan de mechanische instabiliteit van atherosclerotische plaques.

Een niet-invasieve bepaling van de morfologie en dichtheid van bloedvaatjes zou het mogelijk maken om ziekteverloop te voorspellen, bijvoorbeeld de ontwikkeling van (instabiele) atherosclerotische plaques, tumor groei en vorming van uitzaaiing, en de effecten van anti-angiogene therapie vast te stellen. Met behulp van MRI is het mogelijk om niet-invasief een schatting te maken

van de straal van de bloedvaten en het fractioneel bloedvolume van biologisch weefsel. In **hoofdstuk 5** werd de nauwkeurigheid van deze techniek geëvalueerd door TPLSM. Hiertoe werden de straal en dichtheid van bloedvaten in tumoren en spierweefsel van muizen middels beide technieken bepaald. Digitale beeldbewerking werd toegepast op de verkregen TPLSM gegevens om de straal, dichtheid en de totale lengte van bloedvaten in intact weefsel te bepalen. In tumor weefsel waren de bloedvaten willekeurig georiënteerd, terwijl in spierweefsel de bloedvaatjes sterk parallel georiënteerd waren. Middels beide technieken werd een grotere straal van de bloedvaten en een groter fractioneel bloed volume gevonden in de tumor periferie dan in de kern. In vergelijking met TPLSM, liet de MRI techniek een sterke overschatting zien van de straal van de bloedvaten, maar een lager fractioneel bloed volume. Echter, beide technieken lieten eenzelfde trend zien: de morfologische grootheden in de tumor waren groter dan in de spier en groter in de tumor periferie in vergelijking met de kern. Uit deze studie kan geconcludeerd worden dat de MRI techniek niet geschikt is voor absolute bepaling van de straal van de bloedvaten en het fractioneel bloed volume, maar wel gebruikt worden ter bepaling van de heterogeniteit in bloedvat morfologie en relatieve verschillen tussen weefsels en binnen een weefsel in de tijd.

Naast detectie van de morfologie biedt het afbeelden van de angiogene activiteit van tumoren de mogelijkheid om veranderingen in bloedvat dichtheid vast te stellen. Voor de studie beschreven in **hoofdstuk 6** werden cNGR-QDs zichtbaar gemaakt voor MRI door ze paramagnetisch te maken. Deze paramagnetische cNGR-QDs (cNGR-pQDs) werden toegepast in tumordragende muizen om niet-invasief angiogene activiteit te kwantificeren met *in vivo* MRI. Na intraveneuze toediening zorgden de cNGR-pQDs voor een verandering in contrast in de tumor periferie, maar niet in de kern van de tumor of in het spierweefsel. Validatie van de MRI resultaten met

ex vivo TPLSM liet zien dat cNGR-pQDs voornamelijk gebonden waren aan endotheelcellen van de bloedvatjes, in mindere mate aanwezig waren in het bloed en niet door de endotheelcellen waren opgenomen. Controle pQDs werden nauwelijks tot niet gedetecteerd met MRI en TPLSM, wat wijst op een hoge specificiteit van cNGR-pQDs voor angiogene bloedvaten in tumoren.

Wetenschappelijke studies hebben veelvuldig aangetoond dat nieuw gevormde bloedvaten de groei van atherosclerotische plaques en tumoren beïnvloeden. Daarnaast dragen de bloedvaten bij aan een mechanische instabiliteit van atherosclerotische plaques en vergroten ze de kans op uitzaaiing van tumoren. De in dit proefschrift beschreven studies laten zien dat twee-foton laser scanning microscopie (TPLSM) en magnetische resonantie beeldvorming (MRI) het afbeelden en kwantificeren van de morfologie en angiogene activiteit van nieuw gevormde bloedvaten mogelijk maken in muismodellen van atherosclerose en kanker. Zoals beschreven in de algemene discussie (**hoofdstuk 7**) zijn enkele mogelijke biologische en technische beperkingen van toepassing op de opzet van de experimenten: mogelijk is er een betere marker voor endotheelcellen dan CD31 voor het onderscheiden van bloedvaten in biologisch weefsel (hoofdstukken 4, 5 en 6), moet er naar een diermodel gezocht worden met een hogere vasa vasorum dichtheid om deze te kunnen kwantificeren (hoofdstuk 4), en zal de doordringdiepte van TPLSM in atherosclerotische plaques en tumoren vergroot moeten worden (hoofdstukken 4, 5 en 6). Desalniettemin, TPLSM maakt het mogelijk om, in combinatie met daartoe ontwikkelde beeldbewerkingssoftware, nieuw gevormde bloedvaten rond atherosclerotische plaques en in tumoren af te beelden en te kwantificeren. Recente ontwikkelingen in endoscopische TPLSM maakt deze techniek mogelijk geschikt voor toekomstige wetenschappelijke en klinische *in vivo* toepassingen.

