

Predictive models of tumor angiogenesis

Citation for published version (APA):

Barendsz-Janson, A. F. (1998). *Predictive models of tumor angiogenesis*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1998

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.

Samenvatting

Tumoren zijn voor hun groei afhankelijk van de nieuwvorming van bloedvaten. Uitzaaïngen van de primaire tumor zullen evenmin tot nieuwe gezwellen kunnen uitgroeien zonder aanleg van nieuwe bloedvaten. Avasculaire tumoren kunnen maximaal 1 à 2 mm³ groot worden aangezien de toevoer van voedingsstoffen en zuurstof door middel van diffusie bij verdere expansie gelimiteerd is. Het proces van vaatnieuwvorming uit reeds bestaande capillairen wordt angiogenese genoemd. Tumoren zijn in staat dit proces te activeren. Onder normale (gezonde) omstandigheden zijn zowel angiogenese remmers als stimulators aanwezig waarvan de verhouding in balans is. Wanneer een tumor groeit en diffusie gelimiteerd wordt ontstaat een necrotische kern. De hypothese is dat ten gevolge van de necrotische kern en de daardoor ontstane hypoxie een angiogene switch optreedt in het voordeel van de stimulators waardoor endotheelcellen geactiveerd worden om nieuwe vaten te vormen.

Het remmen van de angiogenese zou een goede therapie kunnen zijn voor de behandeling van tumoren. Tumoren worden gedurende behandeling met de huidige therapie vaak resistent ten gevolge van de hoge mutatie mogelijkheid van de tumoren. Mogelijk kan dit probleem ondervangen worden met een angiogenese gerichte therapie aangezien in endotheelcellen, voor zover op het moment bekend, geen drug-resistentie wordt geïnduceerd. Tevens is er sprake van een grote toepasbaarheid aangezien elke tumor met dezelfde therapie behandeld zou kunnen worden en men bovendien niet afhankelijk is van de slechte toegankelijkheid in de tumor.

In dit proefschrift zijn twee modellen beschreven die bruikbaar zijn voor onderzoek naar tumor geïnduceerde angiogenese. De toepasbaarheid van beide modellen voor het bestuderen van tumor geïnduceerde angiogenese en de ontwikkeling van mogelijke nieuwe therapieën is eveneens beschreven.

Voor het ontwikkelen van een predictief angiogenese model waarbij de vaatvorming wordt geïnduceerd door tumor cellen is het van belang de karakteristieken van de tumor cellen te kennen om het model goed te kunnen interpreteren. In hoofdstuk 3 staan de groei karakteristieken beschreven van 3 borstkanker cellijnen. Aangezien de groei van deze tumoren in vivo onder andere bepaald wordt door de aan- of afwezigheid van de oestrogeen- en progesteron-receptor, is gekozen voor twee oestrogeen- en progesteron-receptor positieve cellijnen namelijk T47D en MCF-7 en een oestrogeen- en progesteron-receptor negatieve cellijn Hs578T.

In de meeste in vitro systemen worden de cellen als monolaag (twee dimensionaal model) gekweekt, maar in vivo groeien de cellen in een drie dimensionale omgeving als kolonies ingebed in een extracellulaire matrix. In vitro kunnen cellen ook als multicellulaire celkolonies (sferoïden) gekweekt worden, en zo'n model

benadert de in vivo situatie beter. Hoofdstuk 3 beschrijft de invloed van configuratie (monolaag versus sferoïde) en matrix (collageen versus agarose) op de proliferatie, apoptose, expressie van stollingsfactoren en de expressie van proteolytische enzymen van de drie tumor cellijnen. Het blijkt dat configuratie en matrix geen invloed hebben op de proliferatie en apoptose van de cellen maar wel van belang zijn voor de expressie van stollings parameters en de proteolytische enzymen. Beide modellen, sferoïde kweek en monolaag kweek, kunnen gebruikt worden voor verder onderzoek, echter niet iedere cellijn kan als sferoïden gekweekt worden.

In hoofdstuk 4 wordt, in vitro, tumor geïnduceerde angiogenese beschreven. In het model zijn runder bijnierschors endotheelcellen (BMEC) gekweekt op een collageen type I matrix. Verschillende wijzen van angiogenese stimulatie zijn getest. Er is een vergelijking gemaakt tussen de gekarakteriseerde tumor cellijnen, een darm tumor cellijn en tumor biopten van patiënten. Allereerst zijn zowel de biopten als de cellijnen ingebed in de matrix en gebruikt als angiogenese stimulus. Daarnaast zijn experimenten uitgevoerd waarbij aan het kweek medium van de endotheelcellen een geconditioneerd medium, verkregen van de cellijnen en biopten, is toegevoegd. De angiogene capaciteit van de verschillende stimuli is vergeleken met het effect geïnduceerd door de bekende angiogenese stimulator basic fibroblast growth factor (bFGF). Van de geteste cellijnen blijkt het geconditioneerde medium van de cellijn Hs578T de beste stimulator te zijn. Het gebruik van tumor biopten is beperkt tot het gebruik van geconditioneerd medium aangezien de biopten zelf een te hoge proteolytische activiteit hebben waardoor de matrix waarin ze gekweekt worden volledig wordt gedegradeerd en het niet mogelijk is de gevormde spruiting te kwantificeren.

De bruikbaarheid van het model waarbij spruitvorming wordt geïnduceerd door het geconditioneerde medium van de cellijn Hs578T is aangetoond met behulp van de bekende angiogenese remmer LBS-1 (angiostatine). Het blijkt dat angiostatine in staat is de spruitvorming volledig te blokkeren, zelfs bij concentraties waarmee angiostatine niet in staat is om de endotheelcel proliferatie te remmen.

In hoofdstuk 5 staan de resultaten beschreven van de cytostatica docetaxel, suramine en tamoxifen op vaatnieuwvorming welke is vergeleken met het effect van de angiogenese remmers interferon- α , AGM-1470 en marimastat. Op suramine en AGM-1470 na zijn alle middelen in staat in vitro angiogenese te remmen. Docetaxel is zelfs in staat de vaatvorming volledig te blokkeren.

Mogelijke mechanismen van angiogenese remming zijn de remming van de cel proliferatie en de inductie van cel apoptose. Om die remmingseffecten te meten werden verschillende soorten cellen gebruikt: humane microvasculaire- (MVEC), macrovasculaire- (HUVEC) en runder bijnierschors endotheelcellen (BMEC). De

effecten op de endotheelcellen zijn vergeleken met de effecten op de tumor cellijnen T47D, Hs578T en LS174T (darm tumor) om zo de mogelijke cytotoxiciteit te bepalen. Uit de proliferatie en apoptose experimenten blijkt dat de bekende angiogenese remmers een groter effect hebben op de endotheelcellen terwijl cytostatica de tumor cellen sterker beïnvloeden. De remming van de spruiting blijkt deels veroorzaakt te worden door de toename in apoptose in de endotheelcellen.

Het cytostaticum suramine wordt bij de behandeling van verschillende soorten tumoren toegepast. Helaas liggen de effectieve behandelings- en de toxische dosis dicht bij elkaar. Een middel met dezelfde anti-neoplastische activiteit maar een lagere toxiciteit zou de voorkeur verdienen. Onderzocht is of suradista, een analoog van suramine, aan deze voorwaarden voldoet. Voor beide middelen is het effect op proliferatie en apoptose van endotheelcellen en tumorcellen bestudeerd, alsmede het effect op in vitro angiogenese (hoofdstuk 6). Uit het onderzoek blijkt dat suradista inderdaad dezelfde anti-neoplastische activiteit heeft als suramine maar een verlaagde toxiciteit induceert in vergelijking met suramine. Het effect op de in vitro angiogenese is voor beide cytostatica vergelijkbaar.

Hoofdstuk 7 beschrijft een in vivo angiogenese model. In dit model is een 'kamer' gemaakt op de rug van een muis. De huid op de rug van een immuun deficiënte muis is geklemd tussen een titanium frame, één zijde van de huid is weg geprepareerd zodat tegen de binnenzijde van de achtergebleven huid gekeken wordt. De kamer wordt vervolgens gesloten met een dekglaasje zodat de vaatnieuwvorming vervolgd kan worden zonder dat de kamer geopend hoeft te worden. Op deze wijze kan de angiogenese inducerende capaciteit worden bestudeerd. In deze kamer zijn nu verschillende stukjes humaan borstweefsel getransplanteerd. De volgende soorten zijn vergeleken: gezond weefsel verkregen bij borst reducties, weefsel met een hyperplasie, maligne tumor weefsel en van dezelfde patiënt histologisch normaal weefsel een paar centimeter verwijderd van de tumor. Deze weefsels blijken een andere angiogenese inducerende capaciteit te hebben waarbij het hyperplastische en tumor weefsel de grootste en het controle weefsel de laagste angiogenese inducerende capaciteit hebben. Ook in de groep met maligne weefsel zijn verschillen waarneembaar die niet veroorzaakt worden door de variabiliteit van het bio-assay model. Dit model zou dus ook voor screening van biopten gebruikt kunnen worden en voor het evalueren van mogelijke nieuwe anti-tumor middelen.

Samengevat kan worden opgemerkt dat zowel het in vitro als het in vivo model toepasbaar zijn voor het bepalen van tumor geïnduceerde angiogenese en de ontwikkeling van mogelijke nieuwe therapieën.