

Macrophage heterogeneity in neovascularization

Citation for published version (APA):

Jetten, N. (2014). *Macrophage heterogeneity in neovascularization*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20140509nj>

Document status and date:

Published: 01/01/2014

DOI:

[10.26481/dis.20140509nj](https://doi.org/10.26481/dis.20140509nj)

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

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide, mostly manifested as stroke and myocardial infarction often caused by ruptured fat accumulations in the vessel wall (atherosclerotic plaque). Progression of plaque phenotype is not only driven by environmental risk factors such as smoking, stress, increased fat intake, but also by accumulation of macrophages and the formation of plaque microvessels.

The formation of new vasculature, or neovascularization, is essential for embryonic development (angiogenesis) and adult homeostasis (arteriogenesis). Vascular endothelium is quiescent in adult life, yet can be activated again by a disturbed balance of pro-and anti-angiogenic factors leading to the 'angiogenic switch'. Angiogenesis describes the formation of new microvasculature out of pre-existing blood vessels by capillary sprouting and is associated with development of cardiovascular disease. Plaque infiltrating microvessels enable a constant supply of oxygen and nutrients further aggravating plaque phenotype. Whereas angiogenesis is associated with disease progression, arteriogenesis functions as a natural compensation mechanism. Narrowing or occlusion of the vasculature by plaque formation results in a lack of oxygen in the underlying tissue and in an increased blood pressure in the collaterals. In response to this increased shear stress, outward remodeling of small capillaries into larger arterioles restores blood flow and protects the tissue from necrosis.

Macrophages are key for tissue homeostasis and host defense, but also contribute to the progression of diseases. For several years it is recognized that macrophages can be divided into different subsets characterized by their function, which is induced by micro-environmental triggers. By the expression pattern of cytokines and chemokines we can roughly distinguish between pro-inflammatory M1 macrophages and anti-inflammatory M2 macrophages, of which the latter further can be subdivided into M2a (IL-4/IL-13), M2b (IC/LPS) and M2c macrophages (IL-10). Recent studies have observed an association between tumor angiogenesis and the accumulation of M2-like macrophages, however, a causal effect was not clearly investigated. In this thesis, we investigated the effect of different macrophage subsets on neovascularization. We hypothesized that the M2 subset promotes neovascularization.

In chapter 2, the effect of macrophage subsets on angiogenesis was studied in vivo by means of injection of Matrigel mixed with different subsets

of macrophages. Under the influence of M2a and M2c macrophages significantly more microvessels were observed. Using a co-culture of endothelial cells and macrophages in an in vitro a tube formation assay we observed significantly more tubes in the presence of M2a and M2c macrophages, whereas tube formation was inhibited by the presence of the M1 subset. Gene expression analysis showed that M2 macrophages highly express pro-angiogenic growth factor genes, amongst others FGF2 and PlGF. Neutralizing the FGF and PlGF signaling in vitro reduced the stimulatory effect of both M2a and M2c macrophages, suggesting that these macrophages stimulate angiogenesis in a paracrine fashion.

In chapter 3, the effect of macrophage subsets on arteriogenesis during reperfusion recovery was investigated in a hind limb ischemia model. Mice underwent femoral artery ligation and were treated with different macrophage subsets. Local intramuscular injection of both M1 and M2 macrophages, improved the reperfusion recovery significantly. Temporary depletion of circulating monocytes using clodronate liposomes did not influence the stimulatory effect of locally injected macrophages. To differentiate between the effect of the exogenously injected macrophages and endogenously M2c polarized macrophages, we induced hind limb ischemia in mice with a macrophage specific deficiency of the IL10 receptor. Reperfusion recovery was not influenced by this deletion, however, the improvement on reperfusion recovery was still present after local treatment with M2c macrophages suggesting that the stimulatory effect is caused only by the exogenous administration of macrophages.

In chapter 4, the effect of MIF was investigated as potential stimulator of arteriogenesis. Mice underwent hind limb ischemia and were treated with PBS, recombinant MIF or anti-MIF antibody. Treatment with recombinant MIF inhibited reperfusion recovery, whereas under influence of the antibody reperfusion recovery was improved. Furthermore, treatment with recombinant MIF reduced the accumulation of MAC2⁺ macrophages, the number of circulating CD11b⁺ monocytes as well as the transmigrating capacity of macrophages in vitro. However, MIF did not affect macrophage polarization. Thus, blocking MIF signaling enhanced arteriogenesis likely by affecting the circulating monocyte population.

In chapter 5, the therapeutic effect of M2 macrophages on wound healing was investigated. Full-thickness skin wounds were inflicted on the back of wildtype C57Bl6 mice and different subsets of macrophages were injected at 3 sites around the wound area. An additional effect of macrophage treatment on wound healing was not detected, as in all groups the wound area was reduced by ~70% after 3 days, meaning that the healing response occurred very fast. Since diabetics suffer from a delayed wound healing response, we used diabetic db/db mice and performed the same wounding procedure and treatment regimen. Interestingly, compared to treatment with PBS or M0 macrophages, wound healing was even further delayed after treatment with M2 macrophages accompanied by significantly increased numbers of neutrophils. Future experiments should show whether timing of treatment is of essence and could suppress sustained inflammation in diabetic wounds.

In chapter 6, the results described in this thesis were discussed and put in perspective. Implications of the study were made and new ideas for therapeutic options for treatment of cardiovascular disease with macrophage subsets were suggested. In conclusion, this thesis provides new insight in the relation between macrophage subsets and neovascularization.

Samenvatting



Hart- en vaatziekten zijn de grootste doodsoorzaak wereldwijd, die zich manifesteren als een beroerte of hartinfarct vaak veroorzaakt door een losgeschoten vetophoping in de vaatwand (atherosclerotische plaque). Progressie van plaque fenotype wordt niet alleen bevorderd door milieufactoren zoals roken, stress en vet eten, maar ook door ophoping van macrofagen en het binnendringen van microvaatjes in de plaque.

Het ontstaan van nieuwe bloedvaten, ofwel neovascularisatie, is essentieel voor de embryonale ontwikkeling (angiogenese) en homeostase in het volwassen stadium (arteriogenese). Normaal gezien is vasculair endotheel in het volwassen stadium in rust, maar kan opnieuw worden geactiveerd door verstoring van het evenwicht van pro- en anti-angiogene factoren, wat resulteert in de zogenaamde 'angiogenic switch'. Angiogenese is het ontstaan van nieuwe capillairen uit reeds bestaande bloedvaten en wordt geassocieerd met de ontwikkeling van hart- en vaatziekten. Microvaatjes die de plaque zijn binnen gedrongen zorgen voor constante toevoer van zuurstof en voedingsstoffen en verslechteren op deze manier de toestand van de plaque. Waar angiogenese geassocieerd wordt met progressie van de ziekte, fungeert arteriogenese als een natuurlijk compensatie mechanisme. Vernauwing of verstopping van een bloedvat door plaquevorming resulteert in een zuurstofgebrek in het onderliggende weefsel en een verhoogde bloeddruk in de omliggende collateralen. In reactie op deze verhoogde bloeddruk, vormen kleinere collateralen zich om tot functionele arteriolen om zo de bloedstroom te herstellen en het weefsel te beschermen tegen necrose.

Macrofagen zijn essentieel in de afweer tegen ziekteverwekkers en voor het onderhoud van weefsel, maar dragen ook bij aan de progressie van ziekten. Sinds enkele jaren is erkend dat er verschillende subtypen macrofagen bestaan, gekarakteriseerd op basis van hun functie die bepaald wordt door factoren uit hun directe omgeving. Op basis van het expressiepatroon van cytokines en chemokines kunnen we ruwweg onderscheid maken tussen pro-inflammatoire M1 macrofagen en anti-inflammatoire M2 macrofagen, welke laatste verder onderverdeeld worden in M2a (IL-4/IL-13), M2b (IC/LPS) en M2c macrofagen (IL-10). Recente studies hebben een correlatie tussen tumor angiogenese en de accumulatie van M2-achtige macrofagen waargenomen, maar een causaal effect werd tot nu toe nog niet duidelijk onderzocht. In dit proefschrift hebben we het effect van verschillende macrofaag subtypes op

neovascularisatie nader onderzocht met de hypothese dat M2 macrofagen neovascularisatie stimuleren.

In hoofdstuk 2 is het effect van verschillende macrofaag subtypen op angiogenese in vivo onderzocht door muizen te injecteren met Matrigel gemengd met verschillende subtypen macrofagen. Onder invloed van M2a en M2c macrofagen konden significant meer microvaatjes waargenomen worden. Een co-cultuur van endotheelcellen en macrofagen in een in vitro tube formation assay toonde aanzienlijk meer tubes in de aanwezigheid van M2a en M2c macrofagen, terwijl de vorming van tubes werd geremd door de aanwezigheid van M1 macrofagen. Met behulp van genexpressie vonden we verhoogde expressie van pro-angiogene groeifactor genen zoals FGF2 en PIGF in M2 macrofagen. Door FGF en PIGF signalering in vitro te neutraliseren werd het stimulerende effect van zowel M2a en M2c macrofagen gereduceerd, wat suggereert dat deze macrofagen angiogenese paracrien stimuleren door het uitscheiden van groeifactoren.

In hoofdstuk 3 is het effect van macrofaag subtypen op arteriogenese onderzocht in een muis model waarbij ischemie in de achterpoot werd geïnduceerd. Muizen ondergingen ligatie van de femorale arterie en werden behandeld met verschillende subtypen macrofagen. Lokale intramusculaire injectie van zowel M1 en M2 macrofagen, verbeterde het reperfusie herstel aanzienlijk. Tijdelijke depletie van circulerende monocytten onder invloed van clodronaat liposomen had geen invloed op het stimulerende effect van lokaal geïnjecteerde macrofagen. Om onderscheid te maken tussen het effect van de exogeen geïnjecteerde macrofagen en endogeen M2c gepolariseerde macrofagen hebben we ischemie geïnduceerd in muizen met een macrofaag specifiek deficiëntie van IL10 receptor. Reperfusie herstel werd niet beïnvloed door deze deletie, echter, de verbetering van reperfusie herstel was nog aanwezig na lokale behandeling met M2c macrofagen, wat erop wijst dat het stimulerende effect veroorzaakt wordt door de exogene toediening van macrofagen.

In hoofdstuk 4 hebben we het effect van MIF als potentiële stimulator van arteriogenese onderzocht. Muizen ondergingen een operatie om ischemie in de achterpoot te creëren en werden behandeld met PBS, recombinant MIF of een anti-MIF antilichaam. Reperfusie herstel werd geremd na behandeling met recombinant MIF, terwijl onder invloed van anti-MIF antilichaam

reperfusie hertel werd verbeterd. Daarnaast verminderde de accumulatie van MAC2+ macrofagen, het aantal circulerende CD11b+ monocytten en de transmigratie capaciteit van macrofagen in vitro onder invloed van recombinant MIF. Echter, MIF had geen invloed op macrofaag polarisatie. Het blokkeren van MIF signalering bevordert arteriogenese waarschijnlijk door de populatie circulerende monocytten te beïnvloeden.

In hoofdstuk 5 werd het therapeutische effect van M2 macrofagen op wondgenezing onderzocht. Huidwonden werden aangebracht op de rug van C57Bl6 wildtype muizen en verschillende subtypen macrofagen werden geïnjecteerd op 3 locaties in het wondgebied. Een positief effect van de behandeling met macrofagen kon niet worden waargenomen, omdat al na 3 dagen het wondoppervlak verminderd was met ~70% in alle groepen. Omdat diabetici lijden aan een verstoorde wondgenezing, hebben we het experiment herhaald in diabetische db/db muizen. Opvallend genoeg werd door de behandeling met M2 macrofagen de wondgenezing verder vertraagd in vergelijking met de behandeling met PBS of M0 macrofagen. Dit ging daarnaast gepaard met significant verhoogde aantallen neutrofielen, wat wijst op een aanhoudende ontsteking. Toekomstige experimenten moeten uitwijzen of de timing van de behandeling met M2 macrofagen essentieel is en aanhoudende ontsteking bij diabetische wonden alsnog kan onderdrukken.

In hoofdstuk 6 zijn de resultaten van dit proefschrift besproken en in perspectief gezet. Implicaties van de studie werden bediscussieerd en nieuwe ideeën voor therapeutische inzet van macrofaag subtypen voor de behandeling van hart- en vaatziekten werden voorgesteld. Dit proefschrift geeft nieuwe inzichten in de relatie tussen macrofaag subtypen en neovascularisatie.

