



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Angionesis and the inception of pregnancy

Kapiteijn, C.J.

Citation

Kapiteijn, C. J. (2006, June 12). *Angionesis and the inception of pregnancy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4421>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4421>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

10

**SUMMARY &
SAMENVATTING**

Summary

In [Chapter 1](#), the background is given of the studies in which it is hypothesized that negative effects prior or during implantation may lead to aberrant placenta development and/or fetal development, which may give rise to diseases later in life. Maternal angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, plays a key role in the process of implantation and placentation, whereas endothelial (dys)function might represent a link to fetal programming.

The first part of this thesis consists of two epidemiological studies which refer to the abovementioned. The main part of this thesis is about the process of endometrial angiogenesis in relation to implantation and placentation.

In the development towards a successful outcome of human procreation, implantation seems to be a highly inefficient process. Assisted procreation may compensate for the inefficiency to some extent. This compensation can be reached by selection of gametes and embryos and the induction of, regrettably, multiple pregnancy. For selection of the best oocytes, controlled ovarian hyperstimulation (COHS) is required. However, it adversely affects perinatal outcome in some cases and might do this by exerting a negative influence on the implantation process. The Barker hypothesis proposes that several diseases later in life are related to low birth weight, which is the result of intra-uterine undernourishment. The underlying biological mechanisms behind the association of low birth weight and adult disease have not been explained yet: endothelial dysfunction might play a role in this association.

An important function of the endothelium is angiogenesis. The different phases of angiogenesis are described in [Chapter 1](#). The angiogenic capacity of endothelial cells depends largely on the ability to degrade and remodel its extracellular matrix. Two known main proteolytic enzymes systems are involved in this process: the urokinase-type plasminogen activator (u-PA)/plasmin cascade and the matrix-metalloproteinase (MMP) system. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), which was detected in endometrium in *in vivo* studies, is the growth factor that is generally assumed to play a stimulating role in angiogenesis. The ovarian steroids have the overall orchestration of endometrial angiogenesis. However, whether they exert their influence directly on the endothelium is unclear.

Most studies in which the Barker hypothesis is challenged, are cohort studies carried out in different countries. In [Chapter 2](#), we performed a case-control study amongst Dutch women, in whom an association between low birth weight and myocardial infarction later in life was investigated.

A nationwide population-based case-control study was used. The study included

152 patients with a first myocardial infarction before the age of 50 years and 568 control women who had not had a myocardial infarction. Patients and their controls were matched for age, calendar year of the index event, and area of residence.

The results showed that birth weight in the patient group was significantly lower than in control women (3214 g vs. 3370 g, mean difference 156.3 g (95%CI -9.5 to -303.1 g). The odds ratio (OR) for myocardial infarction in patients with a birth weight lower than 3000 gram (20th percentile in controls) as compared to higher than 3000 g, was 1.7 (95%CI 1.1-2.7). The OR for myocardial infarction in patients with a low birth weight (<2000 g) as compared to a birth weight $\geq$ 2000 g, was 2.4 (95%CI 1.0-5.8). Both these outcomes did not change after adjustment for putative confounders (age, education level, body mass index, waist-hip ratio, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, smoking, and family history of cardiovascular disease).

The conclusion of this study was that low birth weight is associated with an increased risk of myocardial infarction before the age of 50 years in Dutch women. As such, these results support the Barker hypothesis.

In [Chapter 3](#), our primary objective was to investigate whether subfertility explains poor perinatal outcome after assisted conception. A secondary objective was to test the hypothesis that ovarian hyperstimulation, rather than the IVF procedure itself, may influence the perinatal outcome.

For this purpose, data of a Dutch population-based historical cohort of 26,428 women treated for subfertility was used. We compared perinatal outcome of singletons conceived after COHS and IVF (IVF+COHS; n=2,239) with perinatal outcome of singletons in subfertile women who conceived spontaneously (subfertile controls; n=6,343) and in women who only received COHS (COHS-only, n=84). Furthermore, we compared perinatal outcome of singletons conceived after transfer of thawed embryos with (Stim+Cryo; n=66) and without COHS (Stim-Cryo; n=73).

The OR for very low birth weight (<1500 g) was 2.8 (95% confidence interval (CI) 1.9-3.9) in the IVF+COHS group as compared to the subfertile control group. The ORs for low birth weight (<2500 g), very preterm birth (<32 weeks) and for preterm birth (<37 weeks) were 1.6 (95%CI 1.3-1.8), 2.0 (95%CI 1.4-2.9) and 1.5 (95%CI 1.3-1.8), respectively. Adjustment for confounders did not change these risk estimates. The difference in risk between the COHS-only group and the subfertile group was significant only for very low birth weight (OR 3.5; 95%CI 1.1-11.4), but the association became weaker after adjustment for maternal age and primiparity (OR 3.1 (95%CI 1.0-10.2). No significant difference in perinatal outcome was found between the group of children conceived after embryo transfer of thawed embryos either in a cycle with ovarian stimulation / ovulation induction (Stim+Cryo) or in a spontaneous cycle (Stim-Cryo).

In conclusion, the association between assisted conception and poor perinatal outcome could not be explained by subfertility in this study.

The following two chapters focus on the establishment of an optimal intra-uterine environment of which the basis is formed by a well functioning, receptive endometrium with angiogenesis as the most important factor in this process.

In [Chapter 4](#), the isolation and (angiogenic) characterization of human endometrial microvascular endothelial cells (hEMVEC) derived from premenopausal endometrium is described.

Unlike human foreskin microvascular endothelial cells (hFMVEC), which proliferated better upon stimulation by basic fibroblast growth factor (bFGF), hEMVEC were much more sensitive to VEGF-A stimulation. This is probably due to enhanced VEGF receptor 2 expression. In addition, hEMVEC displayed an enhanced expression of u-PA as compared to hFMVEC. No differences were found in tissue-type PA, PA inhibitor-1, and u-PA receptor expression. The high *in vitro* expression of u-PA by hEMVEC was also found *in vivo*, in tissue sections.

hEMVEC formed capillary-like structures when cultured in 20% human serum on top of three-dimensional (3D) fibrin matrices. VEGF-A and bFGF increased this tube formation. This was in contrast to hFMVEC, which formed tubes only after simultaneous stimulation by a growth factor and tumor necrosis factor- α . The high basal level of u-PA contributed to and may explain the high angiogenic properties of hEMVEC (*in vitro*).

In [Chapter 5](#), we further investigated the proteolytic properties of hEMVEC as this might explain their typical angiogenic behavior. We studied the expression of proteases by hEMVEC and their involvement in the formation of capillary tubes, and compared these requirements with those of hFMVEC.

Inhibition of urokinase and MMPs both reduced tube formation in a fibrin or fibrin/collagen matrix. Cultured hEMVEC expressed various MMP mRNAs and proteins; in particular, MMP-1, MMP-2, MT1-, MT3- and MT4-MMPs. MT3- and MT4-MMP mRNA levels were significantly higher in hEMVEC than in hFMVEC. Other MT-MMP mRNAs and MMP-9 were hardly detectable. Immunohistochemical analysis confirmed the presence of MT3-MMP in endothelial cells of endometrial tissue. Overexpression of TIMP-1 or TIMP-3 by adenoviral transduction of hEMVEC reduced tube formation to the same extent, whereas only TIMP-3 was able to inhibit tube formation by hFMVEC. Tube formation by hEMVEC was partly inhibited by the presence of anti-MT-3-MMP antibodies.

Thus, in contrast to tube formation by hFMVEC, which largely depends on MT1-MMP, capillary-like tube formation by hEMVEC is, at least partly, regulated by MT3-MMP. Sex-steroid hormones affect angiogenesis in the endometrium during the menstrual

cycle. Little information has been available regarding the exact mechanisms by which these steroids exert their function on the process of angiogenesis.

In [Chapter 6](#), a survey is given on factors important for endometrial angiogenesis that have been found (or suggested) to respond to ovarian steroids. These factors include VEGF, fibroblast growth factors (FGFs), tumor necrosis factor α (TNF- α), erythropoietin (Epo) and trombospondin-1 (TSP-1). In addition, the influence of steroids on the expression of matrix-degrading proteases, in particular the u-PA/plasmin system and MMPs, are reviewed.

Since it was not clear whether the ovarian steroids regulate endometrial angiogenesis directly or indirectly via adjacent cells, the influence of 17 β -estradiol (E_2) and progesterone on hEMVEC and human endometrial stromal cells (hESC) was examined.

The results, as described in [Chapter 7](#), show that hEMVEC express estrogen receptor (ER) β , whereas hESC express ER α , ER β (detected at its C-terminal part) and progesterone receptor (PR). This was revealed by immunohistochemical staining of steroid receptors and RT-PCR. Functional ER and PR activities were confirmed by the abilities of E_2 and progesterone (10^{-11} - 10^{-8} M) to reduce IL-6 production. The addition of E_2 and progesterone had no significant effect on basal and VEGFA-enhanced proliferation of hEMVEC. The formation of capillary tubular structures was evaluated with hEMVEC grown on a 3D-fibrin matrix. Basal tube formation was enhanced 3.8-fold by VEGF-A. E_2 and progesterone had no significant effect, neither under the basal conditions nor in the presence of VEGF-A. However, both progesterone and E_2 stimulated VEGF-A production by hESC 9- to 29-fold. Furthermore, co-culture of hESC with hEMVEC improved the maintenance of hEMVEC.

In conclusion, ovarian steroids did not have a major effect on proliferation and tube formation by hEMVEC, although they express ER β . However, E_2 and progesterone stimulate VEGF-A production by hESC markedly. It is proposed that ovarian steroids have an indirect effect on regulation of endometrial angiogenesis.

In [Chapter 8](#), we studied the direct influence of the human embryo on *in vitro* endometrial angiogenesis. Conditioned media (CM) of human embryos were used to stimulate hEMVEC grown in an *in vitro* angiogenesis model.

It was shown that CM of human embryos, containing significant amounts of VEGF-A as determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), caused an increase in hEMVEC tube formation. This effect was prevented by soluble VEGFR-1, which quenches VEGF-A activity. Recombinant EGF, alone and leukemia inhibitory factor in combination with VEGF-A, stimulated hEMVEC tube formation. None of the other tested recombinant mediators, which have been described to be produced by the early embryo/trophoblast

(interleukin (IL) 10, transforming growth factor (TGF) β , placental growth factor (PLGF), hCG, colony-stimulating factor 1, interferon- γ , insulin-like growth factor I and II, IL-6, platelet-derived growth factor, and TGF α), had an effect on tube formation by hEMVEC.

For the first time, it was shown that the human embryo is able to stimulate *in vitro* endometrial angiogenesis at the time of implantation. This process was shown to be mediated by VEGF-A.

In [Chapter 9](#), the results of the studies are summarized and discussed in a broader perspective. In short, vascular maladaptation prior and during implantation may lead to serious complications during pregnancy, perinatally, but also later in life (Barker hypothesis). The consequences later in life often appear to be related to endothelial dysfunction, which is in agreement with our results. Furthermore, we have shown that COHS adversely affects pregnancy outcome. Whether COHS negatively affects the endometrial vasculature needs further study.

The experiments have shown that the isolated human endometrial endothelial cells display a high angiogenic capacity, which is further enhanced by exposition to VEGF-A. The u-PA/plasmin system and MT3-MMP play an important role in this process and the ovarian steroids overall regulate this process indirectly via the endometrial stromal cells. During implantation, the embryo takes over as the main (local) regulator by inducing angiogenesis at its implantation site through the expression of VEGF. With the results described in this thesis, we provide more insight in the (patho)physiology of endometrial angiogenesis and in the role of the embryo in this process.

Samenvatting

Tijdens de innesteling (implantatie) vindt er communicatie over en weer plaats tussen het embryo en de implantatieplaats (endometrium; baarmoederslijmvlies). Als deze communicatie, welke plaats vindt door middel van biochemische signalen, niet goed verloopt, kan dit leiden tot een verstoorde implantatie en moederkoekvorming (placentatie). Dit kan een miskraam tot gevolg hebben, maar ook een verstoorde foetale ontwikkeling, leidend tot intra-uteriene groeivertraging.

Barker stelt in zijn hypothese 'fetal origins of adult disease' dat een laag geboortegewicht, veroorzaakt door intra-uteriene ondervoeding, gerelateerd is aan het meer voorkomen van bepaalde (voornamelijk hart -en vaat-) ziekten op latere leeftijd.

Een goed verlopend implantatieproces is dus van groot belang. Angiogenese, de vorming van nieuwe bloedvaatjes uit reeds bestaande bloedvaatjes, aan de maternale zijde van de placenta, speelt een essentiële rol tijdens de implantatie en placentatie. Endotheelcellen bekleden de binnenzijde van bloedvaten. Een verstoorde endotheelfunctie, met dienstegevolge een verstoorde angiogenese, zou mogelijk een rol kunnen spelen bij "fetal programming" (Barker hypothese).

In dit proefschrift worden in het eerste deel twee epidemiologische studies beschreven die betrekking hebben op de Barker hypothese. Het andere deel van het proefschrift bestrijkt het onderzoek naar het proces van angiogenese.

In Hoofdstuk 1 wordt de achtergrond gegeven van de Barker hypothese en van het proces van implantatie en angiogenese. In de voortplanting van de mens blijkt het proces van implantatie zeer inefficiënt te zijn. Geassisteerde conceptie kan dit enigszins beïnvloeden door selectie van gameten en embryo's, maar mede ook, door iatrogene meerlingzwangerschappen. Gecontroleerde ovariële hyperstimulatie (COHS) is nodig voor selectie van de beste oöcyten. Daarnaast kan COHS, mogelijk via zijn invloed op de implantatie, de perinatale uitkomst negatief beïnvloeden. Er zijn nog geen duidelijke biologische mechanismen bekend die de associatie tussen implantatie, geboortegewicht en ziekten op latere leeftijd kunnen verklaren. Een verstoorde endotheelfunctie kan hierbij een rol spelen.

Een belangrijke functie van endotheelcellen is angiogenese. De verschillende fases van angiogenese worden beschreven in Hoofdstuk 1. De angiogene capaciteit van de endotheelcellen hangt grotendeels samen met hun vermogen tot het degraderen en herschikken van hun extracellulaire matrix. Twee belangrijke proteolytische systemen spelen hierbij een belangrijke rol: het urokinase-type plasminogeen activator (u-PA)/plasmin systeem en het matrix-metalloproteinase (MMP) systeem. Een groeifactor die in *in vivo* studies is aangetoond in het endometrium, is "vascular endothelial growth factor-A"

(VEGF-A). Van VEGF-A is bekend dat deze een stimulerende rol in de angiogenese heeft. De ovariële steroïden besturen het proces van angiogenese in het endometrium, maar of zij een directe invloed uitoefenen op het endotheel is onbekend.

De meeste studies waarin de Barker hypothese is getest, betreffen cohort studies die zijn uitgevoerd in verschillende landen. In [Hoofdstuk 2](#) beschrijven wij een case-control studie met vrouwen, waarin de associatie tussen een laag geboortegewicht en een myocardinfarct op latere leeftijd wordt beschreven.

De case-control studie is gedaan in een Nederlandse populatie. Honderdtweënvijftig patiënten met een eerste myocardinfarct voor hun 50^e levensjaar en 568 controle vrouwen die nog nooit een myocardinfarct hadden gehad, werden bestudeerd. Patiënten en hun controles werden gematched voor leeftijd, index datum en postcode.

De resultaten laten zien dat het geboortegewicht van de vrouwen in de patiëntengroep significant lager was dan in de controle groep (3214 g vs. 3370 g, gemiddeld verschil 156,3 g (95% betrouwbaarheidsinterval (BI) -9,5 tot -303,1 g). De odds ratio (OR) voor een myocardinfarct in de geboortegewicht groep < 3000 g (20^e percentiel in de controle groep), vergeleken met de geboortegewicht groep $\geq$ 3000 g, was 1,7 (95%BI 1,1-2,7). De OR voor het krijgen van een myocardinfarct voor vrouwen met een geboortegewicht < 2000 g ten opzichte van een geboortegewicht $\geq$ 2000 g, was 2,4 (95%BI 1,0-5,8). Deze resultaten veranderden niet na correctie voor eventueel verstorende factoren (leeftijd, opleiding, "body mass index", middel-heup ratio, hypertensie, diabetes, hypercholesterolemie, roken en een positieve familie anamnese voor cardiovasculaire aandoeningen).

De conclusie van de studie was dat een laag geboortegewicht geassocieerd is met een toegenomen risico op een myocardinfarct voor het 50^e levensjaar in Nederlandse vrouwen. Deze bevindingen zijn in overeenstemming met de hypothese van Barker.

Bij geassisteerde conceptie, waarbij men gebruik maakt van COHS eventueel in combinatie met IVF of ICSI, is gebleken dat de perinatale uitkomsten slechter zijn. Dit uit zich in lagere geboortegewichten en/of vroeggeboorten (partus prematurus). In [Hoofdstuk 3](#) hebben we ten eerste onderzocht of subfertiliteit, gedefinieerd als het uitblijven van een zwangerschap na één jaar regelmatig onbeschermd coïtus, de slechtere perinatale uitkomst kan verklaren na geassisteerde conceptie. Ten tweede hebben we gekeken of ovariële hyperstimulatie, en niet zozeer de IVF procedure zelf, de perinatale uitkomst beïnvloedt.

Hiervoor hebben we data gebruikt uit een Nederlandse retrospectieve cohort studie bestaande uit 26.428 vrouwen die onder controle waren in verband met subfertiliteit. We hebben de perinatale uitkomsten (geboortegewicht en partus prematurus) van eenlingen die geboren waren na het gebruik van COHS en IVF ("IVF+COHS"; n=2.239) vergeleken

met perinatale uitkomsten in een groep van subfertiele vrouwen die uiteindelijk spontaan zwanger waren geworden ("subfertile controls"; n=6.343) en een groep vrouwen die zwanger waren geworden na het gebruik van alleen COHS ("COHS-only", n=84). Verder hebben we de perinatale uitkomsten bestudeerd tussen eenlingzwangerschappen, die ontstaan zijn na het terugplaatsen van een ontdooid embryo in een met COHS gestimuleerde ("Stim+Cryo"; n=66), en ongestimuleerde cyclus ("Stim-Cryo"; n=73).

De OR van zeer laag geboortegewicht (< 1500 g) was 2,8 (95%BI 1,9-3,9) ten opzichte van de "IVF+COHS" groep, vergeleken met de "subfertile control" groep. De OR's voor laag geboortegewicht (<2500 g), zeer preterme geboorte (<32 weken) en preterme geboorte (<37 weken) waren achtereenvolgens 1,6 (95%BI 1,3-1,8), 2,0 (95%BI 1,4-2,9) en 1,5 (95%BI 1,3-1,8). Correctie voor mogelijke versturende factoren deed deze resultaten niet veranderen. Er was een significant verschil in risico op een zeer laag geboortegewicht tussen de "COHS-only" groep en de "subfertile" groep (OR 3,5; 95%BI 1,1-11,4). Na correctie voor maternale leeftijd en primipariteit werd het risico minder (OR 3,1 (95%BI 1,0-10,2)). In de groepen met ovariële stimulatie/ovulatie inductie gestimuleerde cyclus ("Stim+Cryo") of ongestimuleerde spontane cyclus ("Stim-Cryo"), werden geen significante verschillen gevonden in geboortegewicht en voorkomen van een partus prematurus.

Concluderend, de slechtere perinatale uitkomsten na geassisteerde conceptie kunnen niet verklaard worden door de factor subfertiliteit.

De volgende twee hoofdstukken richten zich op het creëren van een optimale intra-uteriene omgeving voor het embryo. Angiogenese is essentieel voor een goed functionerend en receptief endometrium.

In Hoofdstuk 4 wordt de isolatie en (angiogene) karakterisering van humane endometriale microvasculaire endotheelcellen (hEMVEC), afkomstig uit premenopauzaal endometrium, beschreven.

In tegenstelling tot humane voorhuid microvasculaire endotheelcellen (hFMVEC), die het beste prolifereren na stimulatie met "basic fibroblast growth factor" (bFGF), reageerden hEMVEC veel beter op stimulatie met VEGF-A. Dit is waarschijnlijk te verklaren door de verhoogde expressie van VEGF receptor 2 op hEMVEC. Een ander verschil met hFMVEC was dat hEMVEC het "urokinase type plasminogeen activator" (u-PA) in veel hogere mate uitscheidde. Er werden geen verschillen gevonden in expressie van "tissue-type PA", "PA inhibitor-1" en u-PA receptor. De hoge u-PA expressie door hEMVEC *in vitro* kon ook worden aangetoond *in vivo* in endometrium coupes.

Als we hEMVEC lieten groeien op een drie-dimensionale (3D) fibrine matrix in de aanwezigheid van 20% humaan serum, vormden zij spontaan capillair-achtige structuren

(verder “vaatjes” te noemen). VEGF-A en bFGF zorgden voor verdere stimulatie van deze vaatvorming. Dit in tegenstelling tot bij hFMVEC, waarbij pas vaatjes werden gevormd nadat de cellen gestimuleerd waren met een groeifactor en “tumor necrosis factor- α ”. De hoge basale u-PA expressie zal zeker bijgedragen hebben aan de sterke angiogene eigenschappen van hEMVEC (*in vitro*).

In Hoofdstuk 5 zijn we verder ingegaan op de proteolytische eigenschappen van hEMVEC, aangezien dit hun typische angiogene gedrag kan verklaren. We hebben gekeken naar de expressie van verschillende proteasen door hEMVEC en hun rol in de vaatvorming. De resultaten van hEMVEC hebben we vergeleken met die van hFMVEC.

Blokkade van u-PA en/of MMP's remde de vaatvorming in een fibrine en fibrine/collageen matrix. Gekweekte hEMVEC brachten verschillende MMP mRNA's en eiwitten tot expressie. Duidelijk tot expressie kwamen: MMP-1, MMP-2, MT1-, MT3- en MT4-MMP's. De hoeveelheid MT3- en MT4-MMP mRNA was significant hoger in hEMVEC dan in hFMVEC. MT2-, MT5-, MT6-MMP en MMP-9 mRNAs, waren nauwelijks detecteerbaar. Immunohistochemische analyse bevestigde de aanwezigheid van MT3-MMP in endotheelcellen in het endometrium. Overexpressie van TIMP-1 en TIMP-3 door adenovirale transductie gaf een identieke remming van de vaatvorming door hEMVEC, terwijl alleen TIMP-3 in staat was om de vaatvorming door hFMVEC te remmen. Vaatvorming door hEMVEC kon deels worden geremd door toevoegen van anti-MT-3-MMP antilichamen.

Dus, in tegenstelling tot de vaatvorming door hFMVEC, die grotendeels afhankelijk is van MT1-MMP, wordt de vaatvorming door hEMVEC, in ieder geval gedeeltelijk, gereguleerd door MT3-MMP.

Ovariële steroïden beïnvloeden de angiogenese in het endometrium tijdens de menstruele cyclus. Er is weinig bekend over de manier waarop de steroïden hun invloed uitoefenen op het proces van angiogenese.

In Hoofdstuk 6 wordt een overzicht gegeven van de factoren die de angiogenese in het endometrium stimuleren of remmen en die onder invloed staan van steroïden. Deze factoren zijn: VEGF, fibroblast growth factors (FGFs), tumor necrosis factor α (TNF- α), erythropoietine (Epo) en trombospodine-1 (TSP-1). Daarnaast wordt de invloed van de steroïden op de expressie van matrix-afbrekende proteasen, zoals het u-PA/plasmine systeem en de MMP's, beschreven.

Het was tot voor kort nog onduidelijk of de ovariële steroïden direct danwel indirect (via andere endometriale cellen) de angiogenese in het endometrium reguleren. Om dit te onderzoeken werd in hoofdstuk 7 de invloed van 17β -oestradiol (E_2) en progesteron op hEMVEC en humane endometriale stromale cellen (hESC) onderzocht.

De resultaten laten zien dat hEMVEC oestrogeen receptor (ER) β tot expressie brengen, terwijl hESC ER α , ER β en progesteron receptor (PR) tot expressie brengen. Dit kon worden aangetoond door middel van immunohistochemische kleuring van de steroidreceptoren en RT-PCR. Dat de ER en PR op de cellen ook functioneel actief waren, werd bevestigd doordat zowel E₂ als progesteron (10^{-11} - 10^{-8} M), de interleukine-6 (IL-6) productie deden verminderen. Het toevoegen van E₂ en progesteron aan hEMVEC had geen significant effect op de basale en VEGF-A-geïnduceerde proliferatie. Tevens werd de invloed van steroiden op de vaatvorming door hEMVEC op een 3D-fibrine matrix onderzocht. De basale vaatvorming nam met een factor 3.8 toe indien VEGF-A was toegevoegd. E₂ en progesteron hadden geen significant effect; niet onder basale condities, maar ook niet in combinatie met VEGF-A. Echter, zowel progesteron als E₂ stimuleerden de VEGF-A productie (9- tot 29-voudig) door hESC. Tevens viel op dat als hEMVEC in co-culture met werd gebracht met hESC, de conditie van hEMVEC werden verbeterd.

Concluderend, de ovariële steroiden hadden geen grote invloed op de proliferatie en vaatvorming door hEMVEC, ondanks dat ze ER β tot expressie brengen. E₂ en progesteron stimuleerden de VEGF-A productie door hESC wel evident. Aldus lijkt een indirecte regulatie van de endometriale angiogenese door ovariële steroiden aannemelijk.

In Hoofdstuk 8 hebben we de directe invloed van het humane embryo op de *in vitro* endometriale angiogenese onderzocht. In een *in vitro* angiogenese model werd geconditioneerd medium (CM) van humane embryo's gebruikt om hEMVEC te stimuleren.

Het CM van humane embryo's bleek significante hoeveelheden VEGF-A te bevatten, hetgeen kon worden aangetoond met behulp van "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Dit veroorzaakte een toename in vaatvorming door hEMVEC. Dit effect werd tegengegaan door "soluble VEGFR-1", dat VEGF wegvangt. Recombinant "epidermal growth factor" (EGF) alleen en "leukemia inhibitory factor" (LIF) in combinatie met VEGF-A, stimuleerden vaatvorming door hEMVEC. Andere geteste recombinant factoren waren "interleukin (IL) 10", "transforming growth factor" (TGF) β , "placental growth factor" (PLGF), hCG, "colony-stimulating factor 1", "interferon- γ ", "insulin-like growth factor I en II", IL-6, "platelet-derived growth factor" en TGF α . Van deze factoren is beschreven dat zij geproduceerd worden door het vroege embryo en/of eerste trimester trofoblast. Echter, deze factoren hadden in onze studie geen effect op de vaatvorming door hEMVEC.

Voor het eerst werd in deze studie aangetoond dat het humane embryo, door de expressie van VEGF-A, in staat is om *in vitro* endometriale angiogenese te stimuleren.

In Hoofdstuk 9 zijn de resultaten van de verschillende studies samengevat en bediscussieerd. Een verstoorde vasculaire ontwikkeling voorafgaand aan en tijdens de implantatie, kan leiden tot ernstige complicaties met gevolgen voor de vrucht tijdens de

graviditeit, voor de neonat perinataal, maar mogelijk ook later in het kind zijn/haar leven. De aandoeningen die later in het leven optreden blijken vaak gerelateerd te zijn aan het disfunctioneren van het endotheel. Dit komt overeen met onze bevindingen. We hebben laten zien dat COHS de perinatale uitkomst negatief beïnvloed. Of dit komt doordat COHS een negatieve invloed uitoefent op de endometriale vaten moet verder onderzocht worden.

De experimenten laten zien dat geïsoleerde humane endometriale endotheelcellen grote angiogene capaciteiten hebben, vooral wanneer ze blootgesteld worden aan VEGF-A. Het u-PA/plasmine en het MT3-MMP systeem spelen een belangrijke rol in de endometriale angiogenese waarvan de ovariële steroïden de aanvoerders zijn. E_2 en progesteron reguleren het proces indirect via de endometriale stromacellen. Tijdens de implantatie neemt het embryo de aanvoerdersrol over door de angiogenese ter plaatse van zijn implantatie te stimuleren door de expressie van VEGF.

De resultaten beschreven in dit proefschrift geven ons meer inzicht in de (patho)fysiologie van de angiogenese in het endometrium en de rol van het embryo hierin.