



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Intraplaque angiogenesis and therapeutic targeting of angiogenesis

Parma, L.

Citation

Parma, L. (2020, October 15). *Intraplaque angiogenesis and therapeutic targeting of angiogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137747>

Version: 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/1887/137747>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137747> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Parma, L.

Title: Intraplaque angiogenesis and therapeutic targeting of angiogenesis

Issue date: 2020-10-15

Riassunto in Italiano

L'aterosclerosi è una malattia progressiva caratterizzata dalla formazione di placche aterosclerotiche nell'intima delle arterie principali con accumulo di lipidi, infiammazione, fibrosi, morte cellulare e calcificazione. La stabilità delle placche aterosclerotiche, piuttosto che la loro dimensione, è il principale fattore determinante per l'insorgere di implicazioni cliniche acute. Quando una placca diventa instabile, è più fragile e può rompersi più facilmente causando infarto del miocardio, ictus e morte improvvisa. Le principali caratteristiche delle placche instabili sono la formazione di nuovi vasi (angiogenesi) ed emorragia intrapacca, un esteso nucleo lipidico, un alto contenuto di macrofagi e un sottile cappuccio fibroso. Nel corso degli anni, grazie ai farmaci per abbassare il colesterolo, la durata della vita e il benessere dei pazienti affetti da aterosclerosi sono notevolmente migliorati. Tuttavia, un ampio gruppo di pazienti non trae pienamente beneficio dalle attuali strategie di riduzione dei lipidi e la rottura della placca aterosclerotica rimane la principale causa di eventi cardiovascolari acuti. Pertanto, nuove terapie sono necessarie per stabilizzare le placche aterosclerotiche e prevenire la loro rottura. Alcuni nuovi possibili bersagli terapeutici sono ipotizzabili.

L'angiogenesi all'interno della placca aterosclerotica è un processo complesso che dipende dall'equilibrio tra molecole pro e anti-angiogeniche. L'ipossia, nel tentativo di creare nuovi vasi sanguigni per ripristinare i livelli di ossigeno nella placca, e l'infiammazione rappresentano le principali fonti di segnali pro-angiogenici. Diverse molecole pro-angiogeniche possono anche aumentare la permeabilità dei vasi, contribuendo all'infiltrazione dei leucociti nel nucleo infiammatorio della placca, provocando quindi un processo di infiammazione cronica. Questi fattori contribuiscono all'instabilità della placca e alla sua successiva rottura.

È stato dimostrato che la neovascolarizzazione all'interno della placca aterosclerotica contribuisce al processo aterosclerotico e alla destabilizzazione della placca nell'uomo. Per questo motivo lo scopo della prima parte di questa tesi è stato quello di studiare se l'inibizione della neovascolarizzazione intrapacca potesse essere un nuovo approccio terapeutico per la stabilizzazione delle placche aterosclerotiche. Nella seconda parte di questa tesi ci siamo concentrati su una nuova strategia per indurre l'angiogenesi in vitro.

Nel **capitolo 2** illustriamo come angiogenesi ed emorragia intraplaacca siano fortemente correlate con la progressione, l'instabilità e la rottura della placca aterosclerotica stessa. Descriviamo anche in dettaglio i meccanismi cellulari e molecolari alla base della neovascolarizzazione all'interno della placca. Segnaliamo che l'ipossia è la forza principale che guida l'angiogenesi promuovendo la trascrizione di geni pro-angiogenici e mediando l'infiammazione tramite l'espressione di citochine pro-infiammatorie e il reclutamento di cellule infiammatorie. Riportiamo anche che i capillari di nuova formazione hanno una struttura incompleta. Infatti le giunzioni tra le cellule endoteliali dei vasi intraplaacca sono frammentarie e la copertura da parte dei periciti è insufficiente e disorganizzata. Queste caratteristiche danno origine al fenomeno dell'emorragia intraplaacca, che consiste nello stravasamento di globuli rossi e cellule infiammatorie dai vasi sanguigni appena formati verso l'interno della placca. L'emorragia intraplaacca promuove l'instabilità della placca, sia nei modelli sperimentali murini sia nell'uomo. Inoltre, in questo capitolo vengono discusse diverse opzioni per evidenziare l'angiogenesi intraplaacca con tecniche di imaging favorendo il suo utilizzo come bersaglio terapeutico.

A causa del ruolo dell'ipossia come principale fattore scatenante dell'angiogenesi intraplaacca, nel **capitolo 3** abbiamo ipotizzato che la riossigenazione della placca aterosclerotica avrebbe potuto favorire una riduzione della formazione di angiogenesi e quindi una riduzione dell'emorragia e dell'infiammazione con conseguente aumento della stabilità. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo utilizzato il gas carbogen, un gas composto al 95% di O₂ e al 5% di CO₂. Abbiamo utilizzato topi ApoE3*Leiden ipercolesterolemici sottoposti a chirurgia per innesto venoso e studiato l'effetto della riossigenazione sul rimodellamento vascolare, la neovascolarizzazione intraplaacca, l'infiammazione e la viabilità dell'innesto. Inoltre, poiché l'iperossia, cioè l'esposizione prolungata a livelli elevati di ossigeno, può generare specie reattive dell'ossigeno (ROS) in una quantità superiore a quella che può essere eliminata dagli antiossidanti, abbiamo studiato l'effetto dei ROS sulla composizione della placca *in vivo* e sui macrofagi *in vitro*. La somministrazione del gas carbogen in un esperimento a breve termine ha determinato una profonda riduzione dell'ipossia intraplaacca nelle lesioni aterosclerotiche murine *in vivo*. Il trattamento a lungo termine ha comportato un aumento della vitalità dell'innesto venoso negli animali trattati, ma sorprendentemente non ha avuto alcun effetto sull'ipossia e su

angiogenesi ed emorragia intraplaacca. Allo stesso tempo, il trattamento a lungo termine ha provocato l'accumulo di ROS. Questo ha portato a un conseguente aumento dei livelli di mRNA di HIF1a. Un'altra conseguenza del trattamento a lungo termine è stata l'apoptosi dei macrofagi, probabilmente a causa del loro elevato consumo di ossigeno. Per studiare il sopramenzionato effetto dei ROS sui macrofagi abbiamo imitato l'induzione dei ROS *in vitro* usando il ROS-mimic t-BHP nei macrofagi derivati da midollo osseo murino e abbiamo osservato un forte aumento del danno al DNA e dell'apoptosi. Complessivamente, nonostante l'effetto benefico del trattamento di iperossigenazione sulla viabilità dell'innesto venoso, il trattamento ha indotto anche l'accumulo di ROS e apoptosi. Sia l'accumulo di ROS sia l'apoptosi potrebbero essere dannosi per la placca aterosclerotica in questo modello murino nelle condizioni attuali. Ciò indica che, al fine di definire i potenziali benefici terapeutici della terapia di iperossigenazione, sono necessarie ulteriori ricerche per definire le condizioni ottimali per il trattamento dell'aterosclerosi.

Nella cascata di trasduzione del segnale a seguito di ipossia e stabilizzazione di Hif1a, il reclutamento del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF-A) svolge un ruolo fondamentale nel promuovere l'angiogenesi. Infatti, il legame di VEGF-A con il suo recettore, il recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR2) innesca l'avvio di una cascata di trasduzione intracellulare del segnale che ha un effetto pro-angiogenico. Pertanto, nel **capitolo 4**, utilizzando l'anticorpo DC101, abbiamo studiato gli effetti del blocco di VEGFR2 sull'angiogenesi intraplaacca, sullo stato di maturazione dei vasi e sulla dimensione e la composizione delle lesioni aterosclerotiche nei topi ApoE3*Leiden sottoposti ad innesto venoso nella carotide. Abbiamo osservato una riduzione della dimensione della lesione negli animali trattati rispetto ai controlli. Allo stesso tempo, il contenuto di collagene e di cellule muscolari lisce (SMCs) è aumentato e il contenuto di macrofagi è stato ridotto, indicando nell'insieme una maggiore stabilità della placca. Sorprendentemente il trattamento non ha comportato una riduzione dei vasi sanguigni intraplaacca CD31⁺. Tuttavia, osservando lo stato di maturazione di questi vasi sanguigni, è stato possibile osservare che il gruppo trattato con DC101 ha mostrato una diminuzione dell'emorragia intraplaacca rispetto ai controlli. Per approfondire questo aspetto, abbiamo esaminato l'espressione di geni coinvolti nella maturazione dei vasi sanguigni e abbiamo scoperto che Ang-2, il fattore destabilizzante dei vasi, era diminuito con il trattamento con

DC101. Inoltre, abbiamo osservato un aumento del livello di mRNA di Cx40, coinvolto nelle connessioni tra le cellule endoteliali, come conseguenza del blocco di VEGFR2. Abbiamo poi usato un aortic ring test per studiare l'effetto del blocco di VEGFR2 sulla maturazione dei vasi a livello cellulare e abbiamo scoperto che il trattamento con DC101 aumenta la copertura dei periciti intorno allo strato endoteliale nei vasi formati. Questo studio indica che la maturazione vascolare rappresenta un bersaglio promettente per stabilizzare le lesioni aterosclerotiche. In particolare, VEGFR2 rappresenta un potenziale bersaglio per indurre la stabilizzazione della placca aterosclerotica.

Un altro importante fattore di crescita che promuove l'angiogenesi intrapacca nell'aterosclerosi è il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF). Nel **capitolo 5** abbiamo studiato l'effetto del blocco di bFGF sull'angiogenesi intrapacca, sul contenuto di cellule muscolari lisce e sull'infiammazione nelle lesioni aterosclerotiche nei topi ApoE3*Leiden sottoposti a innesto venoso. Per raggiungere questo obiettivo, abbiamo sintetizzato K5, una piccola molecola che si lega a bFGF. Questo previene il legame tra bFGF e il suo recettore e di conseguenza provoca il blocco della trasduzione intracellulare del segnale che porta allo stimolo dell'angiogenesi. Abbiamo scoperto che l'inibizione di bFGF aumenta la stabilità della placca aterosclerotica riducendo fortemente l'angiogenesi e l'emorragia intrapacca. Inoltre, il trattamento con K5 riduce il numero di monociti circolanti e diminuisce l'espressione della molecola di adesione VCAM-1 e della proteina chemoattraente Ccl2, insieme con una conseguente riduzione del contenuto di macrofagi nelle lesioni aterosclerotiche. In precedenza, era stato dimostrato che il blocco di bFGF influenzava la proliferazione e la migrazione delle SMCs. Sorprendentemente non siamo stati in grado di osservare alcun effetto di K5 sulle cellule muscolari lisce nel modello di aterosclerosi accelerata con innesto venoso né nel modello dell'arteria femorale in topi C57BL/6 utilizzato per studiare l'effetto isolato di K5 sulla migrazione e sulla proliferazione delle SMCs. Abbiamo anche esaminato più in profondità l'effetto di K5 sul processo di angiogenesi e abbiamo scoperto che K5 riduce fortemente l'angiogenesi in vivo in un modello murino con impianti di Matrigel sottocute. Abbiamo dimostrato anche che *in vitro* K5 è in grado di compromettere la migrazione, la proliferazione e la formazione di strutture tubulari delle cellule endoteliali a causa di una ridotta attivazione del recettore del fattore di crescita dei fibroblasti-1 (FGFR1). K5 è in grado di migliorare la stabilità della placca riducendo

angiogenesi ed emorragia intraplaacca. Inoltre, riduce il numero dei monociti circolanti a livello sistemico e riduce l'infiltrazione di macrofagi nella placca e quindi diminuisce l'infiammazione nelle lesioni aterosclerotiche. Nel loro insieme, i nostri risultati dimostrano che il blocco di bFGF tramite K5 è un promettente candidato terapeutico per il trattamento di placche aterosclerotiche instabili.

Il targeting del metabolismo delle cellule endoteliali è stato principalmente esplorato per il cancro e altre malattie caratterizzate da un aumento dell'angiogenesi, ad esempio degenerazione maculare e malattia infiammatoria intestinale. Spingere le cellule endoteliali in uno stato più quiescente, prendendo di mira gli enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare, potrebbe potenzialmente rallentare la loro proliferazione, stabilizzare le giunzioni endoteliali e ridurre l'espressione delle molecole di adesione cellulare. Pertanto, nel **capitolo 6** abbiamo studiato come l'inibizione della transchetolasi (TKT), un enzima metabolico chiave coinvolto nella via del pentoso fosfati (PPP), influisca sulle cellule endoteliali (ECs) e i macrofagi. TKT è un enzima nel ramo non ossidativo del PPP che controlla la biosintesi dei nucleotidi e la produzione di energia e dipende dal legame con la tiamina per il suo funzionamento. Sia le ECs sia i macrofagi si affidano a questa via metabolica per la proliferazione. A causa della stretta relazione tra angiogenesi e infiammazione nell'aterosclerosi, abbiamo studiato l'effetto del blocco di TKT *in vitro* usando ossitiamina, un analogo della tiamina, su ECs e macrofagi. Abbiamo scoperto che TKT è abbondantemente presente nelle lesioni aterosclerotiche umane, in particolare nelle cellule endoteliali e nei macrofagi. Il blocco di TKT comporta una riduzione della proliferazione e della migrazione di ECs *in vitro*. Abbiamo anche scoperto che TKT è sovraespressa nei macrofagi con un fenotipo pro-infiammatorio (macrofagi M1) rispetto ai macrofagi M0 (a riposo). Il blocco di TKT nei macrofagi M1 riduce i livelli di espressione dell'mRNA di citochine pro-infiammatorie e pro-angiogeniche rispetto ai macrofagi M1 non trattati. Sorprendentemente abbiamo scoperto che questa riduzione delle molecole pro-angiogeniche ha un effetto funzionale. Infatti, cellule endoteliali derivate da cordoni ombelicali umani (HUVECs) stimulate con il surnatante di macrofagi M1 trattati con ossitiamina hanno una ridotta capacità migratoria rispetto alle cellule stimulate con surnatante di macrofagi M1 non trattati. Questi risultati preliminari *in vitro* mostrano che il

blocco di TKT può essere un target interessante per ridurre l'angiogenesi e l'infiammazione nelle placche aterosclerotiche.

Nella seconda parte di questa tesi abbiamo esaminato l'effetto del bis(maltolato) oxovanadio (IV) (BMOV) sull'angiogenesi *in vitro*. Il legame di VEGF-A con VEGFR2, induce l'attivazione del recettore e la sua fosforilazione in diversi residui tirosinici innescando l'inizio della cascata di trasduzione intracellulare del segnale che porta alla promozione dell'angiogenesi. Ogni residuo tirosinico promuove diverse risposte cellulari tra cui, permeabilità cellulare, proliferazione e migrazione. La fosforilazione di questi residui è strettamente regolata dalle proteine tirosin fosfatasi (PTPs). Le proteine tirosin fosfatasi defosforilano VEGFR2 o gli enzimi a valle della cascata di trasduzione del segnale, e di conseguenza riducono l'angiogenesi. Nel **capitolo 7** abbiamo esaminato l'effetto del blocco delle PTPs sul processo di angiogenesi usando HUVECs in coltura *in vitro* trattate con BMOV, un inibitore non selettivo delle proteine tirosin fosfatasi. Sulla base della nostra scoperta che le HUVEC producono una quantità basale di VEGF-A endogena con conseguente attivazione di VEGFR2 e una angiogenesi limitata, abbiamo ipotizzato che dopo l'attivazione endogena di VEGFR2 tramite VEGF-A, BMOV potrebbe aumentare l'angiogenesi *in vitro*. Inoltre, abbiamo ipotizzato che l'aggiunta di VEGF-A esogeno avrebbe migliorato l'effetto di BMOV con conseguente aumento dell'attivazione di VEGFR2 e successiva angiogenesi. Abbiamo scoperto che BMOV da solo aumenta fortemente la migrazione delle cellule endoteliali, la proliferazione e la formazione di strutture tubulari. Inoltre, in un esperimento di aortic ring *ex vivo*, BMOV stimola la formazione di vasi sanguigni maturi, formati da cellule endoteliali ricoperte da periciti. Inoltre, aumenta anche il numero di questi vasi rispetto alle colture di controllo non trattate. Per studiare la trasduzione intracellulare del segnale coinvolta nell'effetto osservato sull'angiogenesi, abbiamo studiato l'attivazione di VEGFR2 indotta da BMOV in HUVECs. Abbiamo trovato che il trattamento con BMOV induce un aumento della fosforilazione del residuo di tirosina Y951 e un aumento della fosforilazione dell'enzima p38MAPK rispetto ai controlli non trattati. È interessante notare che l'enzima ERK1/2 non è attivato dal trattamento con BMOV, il che indica che il residuo di tirosina Y1175 non è alterato dal trattamento. Nei test *in vitro* eseguiti abbiamo scoperto che BMOV e VEGF-A non funzionano in modo sinergico nell'aumentare l'angiogenesi. Infatti, nella proliferazione cellulare, nella formazione di strutture tubulari e nel test aortic ring, l'effetto

pro-angiogenico di BMOV si è rivelato superiore al suo effetto quando somministrato in associazione con VEGF-A esogeno. I nostri risultati mostrano che l'inibizione delle PTPs mediata da BMOV è quindi una nuova strategia promettente per indurre e stimolare l'angiogenesi.

In conclusione, questa tesi presenta una approfondita visione del ruolo dell'angiogenesi e dell'emorragia intrapacca nel processo di aterosclerosi. Inoltre, gli studi inclusi in questa tesi hanno identificato nuovi potenziali bersagli terapeutici per stabilizzare le lesioni aterosclerotiche a rischio di rottura. Ulteriori ricerche mostreranno se questi bersagli possono essere utilizzati con successo in pazienti affetti da malattie cardiovascolari.

