

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138650> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Junaid, A.O.

Title: Microengineered human blood vessels for next generation drug discovery

Issue date: 2020-12-16

Nederlandse samenvatting

In de laatste decennia zijn microvasculaire aandoeningen wereldwijd een belangrijke oorzaak van sterfte. Chronische activering van de endotheelcellen door cardiovasculaire risicofactoren kan leiden tot het verlies van pericyten die een cruciale rol spelen bij microvasculaire stabilisatie. Om microvasculaire aandoeningen te identificeren en behandelen, willen we de associatie van circulerende plasmafactoren met microvasculaire integriteit onderzoeken. Aangezien de huidige menselijke 2D-modellen met gekweekte endotheelcellen onvoldoende complexiteit bevatten om de functie van interacties van microvasculaire endotheel-pericyte te beoordelen, hangt het onderzoek naar microvasculair verlies grotendeels af van diermodellen. Om de microarchitectuur en functies van het menselijk bloedvat op een efficiëntere manier na te bootsen voor het ontwikkelen van geneesmiddelen, wordt de 'organen-op-chips' voorgesteld als een geavanceerd 3D-kweekstelsel, zoals geïntroduceerd in **Hoofdstuk I**. Het doel van dit proefschrift is het ontwikkelen van een menselijke microvaat-op-een-chip die mechanische vloeistofstroom ervaart, biologische en omgevingsdetectie, die analyse van de vatfysiologie en pathofysiologie op orgaaniveau mogelijk maken. Bovendien heeft dit apparaat een hoge doorvoersnelheid en kan het worden gebruikt als een diagnostisch en medicijnscreeningsinstrument voor het ontwikkelen van geneesmiddelen.

In **Hoofdstuk II** hebben we de orgaan-op-een-chip uitvindingen van de afgelopen twee jaar besproken in het licht van gebruiksvriendelijkheid, compatibiliteit, experimentele testvermogen en productgereedheid. Deze review is geschreven om organen-op-chips te introduceren aan wetenschappers uit verschillende onderzoeksgebieden. Elegante platformen van een enkele chip tot microtiterplaatformaat met verschillende geïntegreerde sensoren werden besproken. Daarnaast werden functionele testen voor angiogenese, calciumbeeldvorming van neuronen en neurospiercontractiliteit besproken. Het systeem wint zijn momentum in compatibiliteit met standaardanalysetechnieken zoals sequencing, fluorescent geactiveerde celsortering en massaspectrometrie. Organen-op-Chips verschuiven snel van academische 'proof-of-concept' studies naar oplossingen in de praktijk.

De ontwikkeling van modellen die het menselijke bloedvat effectief na bootsen is belangrijk voor het bestuderen van de pathologie en therapeutische behandelen van microvasculaire aandoeningen. Om dit te doen, construeren we in **Hoofdstuk III** een perfuseerbare menselijke microvaat-op-een-chip met menselijke navelstreng endotheelcellen die gedeeltelijk omgeven

is met extracellulaire matrix (ECM). De perfusie van VEGF, histamine en TNF α leidt tot een toename van de permeabiliteit van het vat, waardoor de *in vivo* waargenomen microvasculaire lekkage wordt nagebootst. Om microvasculaire destabilisatiefactoren in bloed te screenen, hebben we plasmamonsters uit volbloed bereid en behandeld met hirudine, maïs-trypsineremmer en compstatin. Gezonde vrijwillige plasmamonsters verrijkt met VEGF, histamine en TNF α leiden tot microvasculaire lekkage in het microvaat-op-een-chip. Deze bevindingen versterken het idee dat onze model kan worden gebruikt voor het analyseren van menselijke microvasculaire pathofysiologie en mogelijk preklinische geneesmiddelenevaluaties.

Als voorbeeld laten we in **Hoofdstuk IV** zien dat een perfuseerbare, endotheel microvaat-op-een-chip met collageenhydrogel die de ECM van gastheerweefsel minimaal nabootst, het modelleren van door Ebola veroorzaakte vasculaire fenotypes mogelijk maakt en een *in vitro* platform voor geneesmiddelen studies aanbiedt. Luminal infusie van Ebola-virusachtige deeltjes leidt tot albumine-lekkage uit de geconstrueerde vaten. Mechanisch laten we zien dat dit proces het Rho/ROCK signaalweg omvat. Het Ebola-glycoproteïne (GP1,2) speelt een belangrijke rol in dit proces. Ten slotte tonen we de toepasbaarheid van dit platform voor het bestuderen van de werkzaamheden van potentiële medicijnen door het meten van de potentie van het recent ontwikkelde experimentele medicijn FX06 en melatonine, voor fenotypische redding.

Naast beeldvormende analyses van fenotypische veranderingen in de microvaten, kan metabolomics een meer informatieve uitlezing van de endotheel functie leveren. Als een verkennend onderzoek hebben we in **Hoofdstuk V** beoordeeld of de 3D-microvaten een minder inflammatoir fenotype vertonen in vergelijking met 2D-endotheelcelculturen. Om dit te doen, gebruiken we een geoptimaliseerde gerichte vloeistofchromatografie - tandem massaspectrometriemetingen van een paneel van ontsteking bioactieve lipiden om expressieprofielen te genereren, zowel in TNF α behandelde microvaten als in 2D-endotheelcelculturen. We tonen aan dat bioactieve lipidenprofielen gemakkelijk kunnen worden gedetecteerd uit 3D-microvaten-op-een-chip en een meer dynamische, minder ontstekingsreactie door TNF α vertonen, die meer op de menselijke situatie lijkt in vergelijking met klassieke 2D-endotheelcelculturen.

In vivo, ervaren de microvaten fysieke stress geassocieerd met laminaire bloedstroom en het speelt een centrale rol bij het handhaven van vasculaire integriteit en homeostase. **Hoofdstuk VI** beschrijft de microvaten-op-een-chip met geïntegreerd geminiaturiseerd pomp en zuurstofmonitorsysteem *in situ*. Dit systeem wordt gebruikt om het effect van stroming op de remodelering van het cytoskelet en de expressie van stromingsgevoelige genen in de microvaten-op-een-chip te bestuderen. Onze resultaten tonen aan dat de gegenereerde unidirectionele stroom het oriëntatie van de hoek van endotheelcellen veranderen en de expressie van stroomgevoelige genen *in vitro* verhoogt in vergeleken met bidirectionele stroom.

Concluderend, zoals geïllustreerd in dit proefschrift, kunnen de microvaten-op-chips dienen als een uniek hulpmiddel om microvasculaire destabilisatie te onderzoeken en voor het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën om microvasculaire complicaties te bestrijden. In de toekomst, met het ontwikkelde methode om plasmamonsers in de microvaten te perfuseren, kan een destabiliserend profiel van patiënten worden weergegeven om voortdurende microvasculaire rarefactie en het risico op microvasculaire complicaties te voorspellen.