

In vivo modulation of leukocyte-endothelium interactions

Citation for published version (APA):

Tromp, S. C. (1999). In vivo modulation of leukocyte-endothelium interactions. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1999

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

Leukocytes play a pivotal role in host defence reactions. To this purpose, they have to travel via the blood to the area in the body where they are needed and, subsequently, they have to leave the circulation. The process of leukocyte-endothelium interactions that precedes this extravasation is a multistep cascade; the rolling of leukocytes along the vessel wall and the adhesion of leukocytes to the endothelial cells are the first steps. It was the aim of the present study to investigate ways in which these leukocyte-endothelium interactions can be modulated *in vivo*, more specifically how they can be induced or inhibited. Induction of leukocyte-endothelium interactions is desired when the defence reaction of the body against invading microorganisms or substances is inadequate. Inhibition of leukocyte rolling and/or adhesion may be beneficial when leukocyte infiltration into tissue has to be prevented, for instance in diseases in which leukocytes are pathogenic.

Methods of local administration are used to study the effects of substances that are scarce and/or expensive, or which might have detrimental or toxic effects when administered systemically. To this purpose, substances can be either infused into the local circulation or topically superfused on the tissue of observation. We determined which of these two routes of administration is preferable in studies focussing on leukocyte rolling in rabbit mesenteric venules (chapter 4). A commonly used vehicle, saline, was either infused through a small side-branch of a feeding artery of the mesenteric segment under observation, or superfused on the segment, and the effects of both ways of administration on leukocyte rolling was studied. To our surprise, we observed that local infusion of saline decreased the level of leukocyte rolling and increased leukocyte rolling velocity, whereas superfusion of saline had no such effects. Therefore, in the studies presented in this thesis local superfusion of substances on the mesentery was the preferred route of administration.

In the experimental studies described in the chapters 5 and 6 the role of mast cells in the induction of leukocyte rolling in mesenteric venules was investigated. Mast cells are packed with granules that contain mediators like histamine, which are rapidly released upon cell activation and degranulation. In addition, mast cell release a variety of other, newly synthesized and biologically active mediators upon activation. The cells are present throughout the body, especially in loose connective tissue and skin. Mast cell degranulation and the consequent release of histamine has been suggested to induce leukocyte rolling in mesenteric venules of Sprague-Dawley rats. We investigated whether this applies to rabbits and four different rat strains. In rabbits, the influences of mast cell stabilization by cromoglycate, of mast cell degranulation by compound 48/80, and of histamine receptor blockade on leukocyte rolling were studied: no effects were found. These findings were not surprising in view of our histological data: hardly any mast cells are present in the rabbit mesentery (chapter 5). Although mast cells are abundantly present in the mesentery of Brown Norway, Lewis, Sprague-Dawley, and Wistar rats, the mast cell stabilizer cromoglycate did not affect leukocyte rolling in any of these strains, either.

After mast cell stabilization, topical administration of histamine increased leukocyte rolling in Sprague-Dawley rats only, while leukocyte adhesion was only increased in Brown Norway rats (chapter 6). We conclude, therefore, that the role of mast cells in the induction of leukocyte-endothelium interactions, if any, is strain and species dependent.

Reduction of leukocyte rolling has been observed downstream of a thromboembolic reaction in rabbit mesenteric venules. The mechanism behind this reduction is at present unknown. Chapter 7 describes the possible involvement of selectins, i.e., adhesion molecules involved in leukocyte rolling, in this phenomenon. Thus far, 3 selectins have been identified: L-selectins on leukocytes, and P- and E-selectin on endothelial cells. A thromboembolic reaction was induced in rabbit mesenteric venules in the presence of a monoclonal antibody against each of the 3 selectins and the level of leukocyte rolling downstream of the thrombus was compared to that upstream. We showed that P-selectin appears to be the only selectin involved in leukocyte rolling in the first hour after exteriorization of the mesentery (the early time phase), while E- and L-selectin mediate leukocyte rolling about two hours after exteriorization (the late time phase). In the early time phase the thromboembolism induced reduction in leukocyte rolling downstream of a thrombus appears to be partly due to inhibition of P-selectin and partly due to diminished involvement in leukocyte rolling of adhesion molecules other than selectins. In the later phase the reduction results from inhibition of other adhesion molecules than the selectins studied, although partial downregulation of E- and L-selectin cannot be excluded (chapter 7).

Prostaglandins (PGs) or their chemical analogues have been shown to be beneficial in several vascular diseases. They are thought to exert their influence through several effects: vasodilation, reduction of platelet aggregation and inhibition of leukocyte functions. The reported effects of prostaglandins on leukocyte functions, however, are variable and most of the studies were performed *in vitro*. In chapter 8 we investigated the *in vivo* effects of PGE₁, PGE₂, PGI₂, and a combination of these prostaglandins on leukocyte rolling and FMLP induced leukocyte adhesion in rabbit mesenteric venules. Neither PGE₁, PGE₂, or PGI₂, nor the combination of the three reduced leukocyte rolling or FMLP induced leukocyte adhesion. Instead of an inhibiting effect on leukocyte-endothelium interactions, PGE₂ appeared to have a stimulating effect on FMLP induced leukocyte adhesion. Overall, these findings suggest that leukocyte related beneficial effects of prostaglandins in various vascular diseases are due to other effects than inhibition of leukocyte rolling and adhesion.

It has been demonstrated previously that in tumor endothelial cells the expression of adhesion molecules, involved in leukocyte-endothelium interactions, is suppressed. In addition, the upregulation of endothelial adhesion molecules in response to inflammatory cytokines in tumors appears to be markedly hampered. Exposure of endothelial cells to tumor derived angiogenic factors may be responsible for these phenomena. Since this knowledge is primarily based on studies performed *in vitro* we developed a model to selectively study the effects of

single tumor derived factors on leukocyte-endothelium interactions *in vivo* (chapter 9). Slow releasing pellets containing either basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial cell growth factor (VEGF), or vehicle were placed in the scrotum of mice. After 3 days, an intrascrotal injection of the cytokine interleukin-1 β was given 4 hours before vessels of the cremaster muscle were observed with intravital microscopy. Exposure to either bFGF or VEGF resulted in markedly decreased levels of cytokines leukocyte adhesion. Suppression of leukocyte rolling was not observed. Hence, *in vivo* angiogenic factors significantly reduce leukocyte adhesion, the final step preceding leukocyte infiltration. This observation may explain how tumors escape from immune surveillance, and may be helpful in the development of new anti-cancer modalities.

In conclusion, the present thesis shows that leukocyte-endothelium interactions can be modulated *in vivo* by several cells and substances. Knowledge of these modulating effects is of importance for the development of new anti- and proinflammatory drugs.

SAMENVATTING

Leukocyt-vaatwand interacties

Witte bloedcellen (leukocyten) spelen een belangrijke rol bij de afweerreactie van ons lichaam tegen bijvoorbeeld bacteriën, virussen, of tumorcellen. Om deze organismen of cellen te attaqueren moeten de leukocyten zich via het bloed verplaatsen naar de gebieden waar ze nodig zijn. Vervolgens moeten ze de bloedbaan verlaten (diapedese) om in het omliggende weefsel hun taken uit te kunnen oefenen. Aan het proces van diapedese gaat een aantal stappen vooraf. Allereerst komen er bij een ontstekingsreactie stoffen vrij die de binnenste laag vaatwandcellen (endotheelcellen) kunnen stimuleren tot de expressie van bindingseiwitten, de zogenaamde adhesie-molekulen. Als leukocyten in aanraking komen met die adhesie-molekulen kunnen er zwakke bindingen ontstaan. Omdat de leukocyten echter door de bloedstroom ook een voorwaartse kracht ervaren, gaan ze rollen: de cellen bewegen zich al rollend voort langs de vaatwand met een snelheid die beduidend lager is dan de snelheid van de bloedstroom zelf. Op deze wijze verblijven de leukocyten gedurende relatief lange tijd in het ontstekingsgebied; zij kunnen daardoor zelf ook geactiveerd worden door stoffen die in dit gebied zijn vrijgekomen. Geactiveerde leukocyten gaan zich vervolgens stevig hechten aan de endotheelcellen en bewegen zich niet meer voort; dit wordt adhesie genoemd. Na de adhesie volgt de diapedese: de leukocyten bewegen zich door de vaatwand heen en verplaatsen zich in het omliggende weefsel naar de plek met de hoogste concentratie van ontstekingsfactoren, waar ze hun uiteindelijke taak gaan vervullen.

De adhesie-molekulen die het rollen van leukocyten mediëren, zijn de selectines. We onderscheiden drie selectines: L-, P- en E-selectine. L-selectine is aanwezig op de Leukocyten, maar kan worden losgelaten als de cellen geactiveerd worden. P-selectine zit normaliter in bloedplaatjes en endotheelcellen opgeslagen in granules. Na activatie van een cel kunnen deze granules binnen minuten fuseren met de celwand, waardoor het P-selectine op het buitenoppervlak van de cel tot expressie komt. E-selectine wordt aangemaakt door geactiveerde Endotheelcellen. De maximale expressie van E-selectine wordt pas 2 tot 6 uur na activatie bereikt.

De adhesie-molekulen die een rol spelen bij de adhesie van leukocyten aan de vaatwand zijn enerzijds integrines op de leukocyten en anderzijds leden van de immunoglobuline superfamilie op het endotheel. Alhoewel de integrines (zoals LFA-1 en Mac-1) op ongeactiveerde leukocyten aanwezig zijn, neemt hun bindingscapaciteit sterk toe na activatie van de cel. De integrines kunnen dan met hoge affiniteit binden aan leden van de immunoglobuline superfamilie, bijvoorbeeld ICAM-1 en ICAM-2, op het endotheel. De concentratie van deze adhesie-molekulen neemt sterk toe na activatie van het endotheel.

Leukocyt-vaatwand interacties vinden voornamelijk plaats in de afvoerende, kleine bloedvaten (venulen). Het rollen en de adhesie van leukocyten in venulen kan geobserveerd worden in levende organismen (*in vivo*) door middel van een intravitaal microscoop. In dit proefschrift worden studies beschreven, waarin leukocyt-vaatwand interacties worden bestudeerd in het darmvlies (mesenterium)

van verdoofde konijnen en ratten en in de balzakspier (cremasterspier) van verdoofde muizen. Deze weefsels zijn dun en doorzichtig en zijn daardoor zeer geschikt om processen, die zich afspelen in bloedvaten, microscopisch te bestuderen.

Doel van het proefschrift

Het doel van dit proefschrift was te bestuderen hoe leukocyt-vaatwand interacties *in vivo* gemoduleerd kunnen worden, en meer specifiek hoe ze kunnen worden geïnduceerd of geïnhibeerd. Inductie van leukocyt-vaatwand interacties is namelijk gewenst als de afweerreactie van het lichaam niet adequaat verloopt. Inhibitie van het rollen of de adhesie van leukocyten is gewenst als de infiltratie van leukocyten in weefsel voorkomen moet worden, bijvoorbeeld in ziektes waarbij leukocyten een belangrijke pathogenetische rol spelen.

Methoden van toediening stoffen

Als de effecten bestudeerd worden van stoffen die duur of zeldzaam zijn, of die schadelijk zijn als ze in het hele lichaam terecht komen, worden die stoffen vaak lokaal toegediend. Hiertoe kunnen dergelijke stoffen geïnfundeerd worden in bloedvaten in of in de buurt van het geobserveerde weefsel of kunnen ze direct op het weefsel gedruppeld worden (superfusie). Wij hebben bestudeerd welke van deze twee lokale toedieningsmethodes te prefereren is tijdens studies naar leukocyt-vaatwand interacties (hoofdstuk 4). Een vaak gebruikt oplosmiddel, fysiologisch zout, werd óf geïnfundeerd door een kleine zijtak van een arterie die het te observeren weefsel van bloed voorzag, óf op het weefsel gesuperfundeerd; de effecten van beide toedieningsvormen op het rollen van leukocyten werd bestudeerd. Tot onze verrassing vonden we dat het aantal rollende leukocyten verminderde na infusie van fysiologisch zout en dat de snelheid van de rollende leukocyten toenam, terwijl superfusie van fysiologisch zout geen effect had. Vanwege deze resultaten hebben we besloten om in de rest van de studies in dit proefschrift stoffen lokaal toe te dienen via superfusie op het te bestuderen weefsel.

Mestcellen

In de experimentele studies die beschreven zijn in de hoofdstukken 5 en 6 is de rol van mestcellen in de inductie van het rollen van leukocyten in venulen van het mesenterium bestudeerd. Mestcellen zitten vol met granules die verschillende mediators bevatten, zoals bijvoorbeeld histamine. Activatie van mestcellen kan leiden tot het vrijkomen van de inhoud van de granules (degranulatie). Mestcellen zijn in het hele lichaam aanwezig, vooral in losmazig bindweefsel en in de huid. Er is gesuggereerd dat de degranulatie van mestcellen, en met name het daardoor vrijkomende histamine, het rollen van leukocyten in mesenteriale venulen stimuleert in Sprague-Dawley ratten. We hebben onderzocht of dit ook zo werkt in konijnen en vier verschillende rattenstammen. In konijnen werden de effecten van mestcel stabilisatie door cromoglycaat, van mestcel degranulatie door compound 48/80, en van histamine receptor blokkade bestudeerd: het rollen van de leukocyten werd niet

beïnvloed. Deze bevindingen waren echter niet verwonderlijk in het licht van de histologische data: er zijn nauwelijks mestcellen aanwezig in het mesenterium van konijnen (hoofdstuk 5). Hoewel er wel veel mestcellen aanwezig zijn in het mesenterium van Brown Norway, Lewis, Sprague-Dawley en Wistar ratten, werd het rollen van leukocyten in deze dieren ook niet beïnvloed door de mestcel stabilisator cromoglycaat. Daarop volgende superfusie van het weefsel met histamine stimuleerde het rollen van leukocyten alleen maar in Sprague-Dawley ratten, terwijl de adhesie van leukocyten alleen in Brown Norway ratten werd gestimuleerd (hoofdstuk 6). Deze resultaten betekenen dat, als het al aanwezig is, de rol van mestcellen in het induceren van leukocyt-vaatwand interacties afhankelijk is van de diersoort en de stam die bestudeerd worden.

Thrombo-embolische reactie

Een interactie tussen geactiveerde bloedplaatjes en een beschadigde vaatwand, een zogenaamde thrombo-embolische reactie, blijkt van invloed te zijn op leukocyt-vaatwand interacties: stroomafwaarts van een venulaire thrombus is er sprake van een reductie in het rollen van leukocyten. In hoofdstuk 7 wordt de mogelijke betrokkenheid van de verschillende selectines, adhesie molekulen betrokken bij het rollen van leukocyten (zie boven), bij dit fenomeen bestudeerd. In venulen van het mesenterium van het konijn werd een thrombo-embolische reactie geïnduceerd door de vaatwand aan te prikken met een glazen micropipet met een tipdiameter van circa 6 μm . Op de plek van de beschadiging werd snel een prop van bloedplaatjes gevormd (thrombus), die vervolgens meestal langzaam doorgroeide aan stroomafwaartse zijde; van tijd tot tijd brak zo'n nieuw gevormd stuk van de thrombus af (embolisatie). Deze thrombo-embolische reactie werd geïnduceerd in aanwezigheid van monoclonale antilichamen tegen elk van de drie selectines. Vervolgens werd het aantal rollende leukocyten stroomafwaarts van de thrombus vergeleken met het aantal stroomopwaarts. Uit ons onderzoek bleek dat P-selectine de enige selectine is die betrokken is bij het rollen van leukocyten in het eerste uur van observatie (vroeg fase), terwijl E- en L-selectine het rollen van leukocyten mediëren in het tweede uur (late fase). De daling in het rollen van leukocyten, stroomafwaarts van de thrombus, bleek in de vroeg fase deels het gevolg te zijn van een verminderde beschikbaarheid en/of functie van P-selectine en deels van een verminderde betrokkenheid van adhesie-molekulen die niet tot de selectine familie behoren. In de late fase bleek de daling voornamelijk voort te komen uit inhibitie van andere adhesie molekulen dan P-, E- en L-selectin, alhoewel een gedeeltelijke remming van E- en L-selectine niet uitgesloten kan worden.

Prostaglandines

Prostaglandines (PGs) zijn metaboliëten van arachidonzuur, een stof die na activatie van een cel kan worden vrijgemaakt uit de celmembraan. In de (micro)circulatie kunnen een groot aantal cellen prostaglandines produceren na stimulatie: vaatwandcellen (endotheelcellen, spiercellen), bloedcellen (leukocyten en bloedplaatjes) en cellen in het weefsel rondom de vaten (mestcellen). Er is

aangetoond dat prostaglandines en hun chemische analogen een gunstig effect hebben in verschillende vaatziekten. Dit positieve effect zou het gevolg kunnen zijn van verschillende activiteiten: inductie van vaatverwijding, remming van aggregatie van bloedplaatjes en remming van de functies van leukocyten. De beschreven effecten van prostaglandines op de functies van leukocyten zijn echter niet eenduidig en de meeste studies op dit gebied zijn *in vitro* uitgevoerd. In hoofdstuk 8 hebben we de *in vivo* effecten van 3 verschillende prostaglandines (PGE₁, PGE₂, en PGI₂) afzonderlijk en van een combinatie van deze prostaglandines op leukocyt-vaatwand interacties bestudeerd in venulen van het mesenterium van het konijn; daarbij lag de nadruk op het rollen van leukocyten en op de door het eiwit FMLP geïnduceerde adhesie van leukocyten. PGE₁, PGE₂, PGI₂, noch de combinatie van de drie verminderde het rollen of de FMLP geïnduceerde adhesie van leukocyten. PGE₂ bleek zelfs een stimulerend effect op FMLP geïnduceerde leukocyt adhesie te hebben. Deze bevindingen suggereren dat leukocyt gerelateerde, gunstige effecten van prostaglandines in verschillende vaatziekten het gevolg zijn van andere effecten dan het remmen van leukocyt rollen en adhesie.

Angiogene factoren

Endotheelcellen in bloedvaten in tumoren hebben een lager expressie niveau van adhesie-molekulen, die een rol spelen bij leukocyt-vaatwand interacties, dan niet-tumor gerelateerde endotheelcellen. Bovendien blijkt de stijging in expressie van endotheliale adhesie-molekulen als reactie op ontstekingsfactoren verminderd te zijn in tumoren. Dit fenomeen zou het gevolg kunnen zijn van blootstelling van deze endotheelcellen aan groeifactoren geproduceerd door tumorcellen. Van groeifactoren die de bloedvat nieuwgroei stimuleren, de zogenaamde angiogene factoren, is inderdaad aangetoond dat ze *in vitro* de expressie van adhesie molekulen remmen. Wij hebben een model ontwikkeld om de effecten van uit tumoren afkomstige, angiogene factoren op leukocyt-vaatwand interacties te bestuderen *in vivo* (hoofdstuk 9). Pellets die heel langzaam stoffen uitscheiden werden gevuld met basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial cell growth factor (VEGF), of met het oplosmiddel. Vervolgens werden deze pellets geplaatst in de balzak van muizen. Drie dagen later werd in het scrotum het cytokine interleukine-1 β geïnjecteerd, ongeveer 4 uur voordat de vaten van de cremasterspier onder de intravitaal microscoop geobserveerd werden. Blootstelling van het weefsel aan bFGF of VEGF resulteerde in een sterk gedaald niveau van cytokine-geïnduceerde leukocyt adhesie. Het rollen van leukocyten was niet verminderd. Samenvattend tonen deze resultaten aan dat angiogene factoren *in vivo* een remmend effect hebben op de adhesie van leukocyten, de laatste stap die vooraf gaat aan de infiltratie van leukocyten in het omliggende weefsel. Deze bevinding kan verklaren hoe tumoren als het ware ontsnappen aan het immuunsysteem. Tevens geeft deze bevinding een goed aanknopingspunt voor de ontwikkeling van nieuwe anti-kanker therapieën.

Conclusie

Concluderend toont dit proefschrift duidelijk aan dat leukocyt-vaatwand interacties *in vivo* gemoduleerd kunnen worden door verschillende cellen en substanties. We hebben aangetoond dat een thrombo-embolische reactie het rollen van leukocyten remt door een verminderde beschikbaarheid van P-selectine en/of andere adhesie-molekullen. Daarnaast hebben we laten zien dat angiogene factoren *in vivo* de adhesie van leukocyten remmen, waarschijnlijk ook door verminderde beschikbaarheid of expressie van adhesie molekullen. Daarentegen hebben mestcellen en prostaglandines, waarvan in de literatuur wordt verondersteld dat ze leukocyt-vaatwand interacties kunnen moduleren, geen effect op het rollen of de adhesie van leukocyten *in vivo*, in venulen van het mesenterium. Kennis van modulerende effecten van factoren op leukocyt-vaatwand interacties is van belang voor de ontwikkeling van nieuwe ontstekingsremmende of -stimulerende medicijnen.