

UITNODIGING OPENBARE VERDEDIGING

A tale of blood vessels, mononuclear phagocytes
and chicken embryos:

The chick chorioallantoic membrane assay as model to
study macrophages and angiogenesis

Hanna Tay
23/9/2021

PROMOTOREN

Prof. dr. W. De Spiegelaere
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Prof. dr. W. Van den Broeck
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Prof. dr. P. Cornillie
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Curriculum Vitae

Hanna Ailie Tay werd op 1 oktober 1989 geboren in Antwerpen. Na het beëindigen van haar secundair onderwijs aan het Onze-Lieve-Vrouwe college in Antwerpen, startte ze de studies Diergeneeskunde aan de Universiteit Antwerpen in Wilrijk. Daar behaalde ze haar bachelor in 2010, waarna ze haar masterstudies verderzette aan de Universiteit Gent (UGent). Het masterdiploma Diergeneeskunde, specialisatie Herkauwers, behaalde ze met grote onderscheiding in 2013. Na 2 jaar als dierenarts te hebben gewerkt, startte Hanna in oktober 2015 als academisch assistent aan de Vakgroep Morfologie van de faculteit Diergeneeskunde, UGent. Haar onderzoek combineerde ze met een rol in het praktisch onderwijs voor de vakken Anatomie, Histologie, en Embryologie. Daarnaast begeleidde ze ook een aantal bachelor – en masterstudenten bij hun thesis.

In het kader van haar onderzoek kreeg Hanna de mogelijkheid om 4 weken in de Verenigde Staten te werken aan Vanderbilt University in Nashville, Tennessee. Daar leerde ze de fijne kneepjes van het 'ex ovo chick embryo choriollanatoic membrane (CAM) model', een onderzoeksmodel dat essentieel was voor haar doctoraat en die ze na haar buitenlands verblijf ook succesvol implementeerde op de vakgroep. Daarnaast nam Hanna tijdens haar mandaat deel aan verscheidene nationale en internationale congressen, volgde ze verschillende opleidingen in het kader van Doctoral of Schools, en trad ze een aantal keer op als reviewer voor wetenschappelijke tijdschriften. Haar onderzoek leidde uiteindelijk tot meerdere publicaties in internationale peer-reviewed tijdschriften.

Waar?

De verdediging vindt plaats op donderdag 23 september 2021 om 17 uur

Auditorium Maximum
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent
Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke

Na de verdediging volgt een receptie met hapjes en drankjes

Inschrijven

Indien u aanwezig zal zijn op de openbare verdediging en/of de receptie wenst bij te wonen, gelieve in te schrijven vóór 10 september 2021 per e-mail op Hanna.Tay@UGent.be.

Leden examencommissie

Prof. dr. E. Meyer
Voorzitter van de examencommissie,
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Prof. dr. B. Devriendt
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Prof. dr. A. Bronckaers
Faculteit Geneeskunde en Levenswetenschappen, UHasselt

Prof. dr. H. Declercq
Faculteit Geneeskunde, KULeuven

Prof. dr. S. Van Vlierberghe
Faculteit Wetenschappen, UGent

Prof. dr. G. Antonissen
Faculteit Diergeneeskunde, UGent

Samenvatting proefschrift

Angiogenese wordt gedefinieerd als de ontwikkeling en herschikking van bloedvaten uit het reeds bestaande vaatstelsel. Dit proces neemt voornamelijk plaats tijdens de embryonale ontwikkeling, alhoewel er bepaalde fysiologische en pathologische toestanden zijn in het volwassen leven waar angiogenese wel redelijk actief is zoals wondheling en chronische inflammatie. Angiogenese is een erg complex proces dat gereguleerd wordt door verscheidene stimuli en voornamelijk beïnvloed wordt door cellen die aanwezig zijn in het weefsel dat gevasculariseerd moet worden. Eén van die celtypes zijn macrofagen, fagocyterende cellen die voornamelijk geassocieerd worden met hun essentiële rol in het immuunsysteem van het lichaam. Echter, het wordt meer en meer duidelijk dat deze veelzijdige cellen ook van belang zijn in de bloedvatvorming, zowel in volwassen als in embryonaal weefsel. Er is echter niet veel geweten over hun rol in het kippenembryo, een veel gebruikt model in het onderzoek naar bloedvatvorming.

Het doel van dit doctoraat is het onderzoeken van de rol van de embryonale kipmacrofagen tijdens het proces van angiogenese en dit aan de hand van een depletie van de macrofagenpopulatie. Dit zal niet enkel kennis verschaffen over deze macrofagen, maar zal ook de drempel verlagen om het kip allantochorion (CAM) model te gebruiken in macrofagen-gerelateerd onderzoek. Aangezien de CAM assay ook aan populariteit wint, wilden we nagaan hoe we het model konden toepassen in andere onderzoeksdisciplines zoals weefselreconstructie.

Het **eerste hoofdstuk** van de dissertatie is een literatuurstudie dat de nodige wetenschappelijke achtergrond verschaft om het doctoraatsonderzoek in context te kunnen plaatsen. Eerst wordt er dieper ingegaan op het proces van angiogenese waarbij er onder andere wordt gekeken naar de verschillende vormen van bloedvatvorming. Vervolgens wordt er meer info gegeven over macrofagen en hoe zij een rol kunnen spelen tijdens angiogenese. Ten slotte wordt er ingezoomd op het CAM model, een populair model in angiogenese-onderzoek. Er worden verschillende facetten van de assay belicht waaronder de voor- en nadelen, een aantal technische specificaties, en het gebruik ervan in verschillende onderzoeksdisciplines waaronder angiogenese, tumorvorming, en weefselreconstructie.

Het **tweede hoofdstuk** geeft een overzicht van de doelen van het doctoraat.

Het **derde hoofdstuk** beschrijft de ontwikkeling en validatie van een techniek dat een succesvolle vermindering van de macrofagen in het kippenembryo zou toelaten. Deze techniek zou dan toegepast kunnen worden in macrofagen-gerelateerd onderzoek met het CAM model. Clodronaat liposomen werden intravenous geïnjecteerd in de CAM, waarna immunohistochemie en flow cytometrie werden toegepast om de depletie van macrofagen kwalitatief en kwantitatief te analyseren. Kleuring van de embryonale macrofagen werd uitgevoerd met KULO1, een specifieke merker voor kip-macrofagen. Beide methodes toonden een significante reductie aan van de macrofagenpopulatie 3 dagen na injectie van clodronaat liposomen in de CAM, zodat onze resultaten bevestigden dat de injectie van clodronaat liposomen een werkzame techniek is om de macrofagenpopulatie in het kippenembryo te reduceren.

Het **vierde hoofdstuk** bekijkt het effect van de macrofagendepletie op de bloedvatvorming. Om de bloedvatvorming te kunnen onderzoeken, werden collageen type I plugs op een dubbele laag nylon gaas geplaatst op de CAM. De dubbele laag gaas was noodzakelijk om de angiogenese op een correcte manier te analyseren aangezien enkel de bloedvaten die groeiden doorheen de bovenste laag gaas werden meegerekend als nieuwe bloedvaten. Twee groepen collageen plugs werden op de CAM geplaatst: de eerste bevatte geen cellen, de tweede bevatte zeer angiogene humane fibrosarcoma (HT1080) cellen die zorgden voor een gegarandeerde vascularisatie van de collageen plugs. In beide groepen leidde de depletie van macrofagen tot een significante vermindering van de bloedvatgroei in de plugs. Dit toont aan dat macrofagen een noodzakelijke rol spelen tijdens angiogenese. Echter, verder onderzoek is nodig om te achterhalen met behulp van welke mechanismen macrofagen hun functie uitoefenen in de angiogenese.

De focus van het **vijfde hoofdstuk** ligt op de ontwikkeling van experimentele protocols die het toelaten om de CAM assay ook te kunnen gebruiken als model om de vasculaire permeabiliteit te onderzoeken. Dit zou het immers mogelijk maken om het belang van embryonale kipmacrofagen in de doorlaatbaarheid van bloedvaten te analyseren. De doorlaatbaarheid van bloedvaten werd geanalyseerd volgens twee methoden: de eerste was gebaseerd op de Miles Assay waarbij Evan's Blue werd geïnjecteerd om vervolgens diens lekkage in de embryonale weefsels te achterhalen; in de tweede methode werden fluorescente dextranen geïnjecteerd en hun lekkage uit de bloedvaten in het CAM-weefsel opgevolgd doorheen de tijd. Beide technieken toonden echter geen verschil in lekkage, zelfs na het toedienen van VEGF waarvan bewezen is dat deze de vasculaire doorlaatbaarheid sterk beïnvloed. Dit wijst erop dat de CAM assay mogelijk geen betrouwbaar model is om de vasculaire permeabiliteit te onderzoeken, en dat meer optimalisatie nodig is van onze aanpak om de bloedvatlekkage te analyseren.

In het **zesde hoofdstuk** wordt beschreven hoe het CAM model wordt toegepast om de vascularisatie te onderzoeken van biomaterialen. De doorbloeding van gereconstrueerd weefsel is immers een vereiste voor een succesvolle implementatie ervan in het herstel van weefsels. Onze resultaten toonden aan dat het mogelijk is voor bloedvaten om te groeien in de matrix van biomaterialen, alhoewel het grootste deel van de materialen hun matrix-structuur reeds had verloren op het moment van analyse. Dit was wellicht het gevolg van hun biodegradatie, hetgeen sneller optrad dan was verwacht. Verdere optimalisatie van de biomaterialen is bijgevolg noodzakelijk voordat nieuwe in vivo experimenten ingepland kunnen worden. Deze resultaten benadrukken het belang van een goedkoop en snel in vivo model zoals de CAM assay.

Hoofdstuk zeven is een algemene discussie van het gehele werk waarbij de verschillende resultaten en gebruikte technieken kritisch onder de loep worden genomen aan de hand van de relevante wetenschappelijke literatuur. Onze resultaten en ervaringen tonen aan dat het CAM model zijn waarde behoudt in angiogenese en gerelateerd onderzoek maar ook dat er genoeg technische uitdagingen zijn die de assay sterk kunnen beïnvloeden. Toch kan als conclusie gesteld worden dat het CAM model veel potentieel heeft als preklinisch model in reeds gevestigde maar ook opkomende onderzoeksdisciplines. Aangezien we hebben aangetoond dat een succesvolle reductie van de macrofagenpopulatie in het kippenembryo mogelijk is, zou het model aangewend kunnen worden in macrofagen-gerelateerd onderzoek, niet enkel met betrekking tot angiogenese maar bijvoorbeeld ook in de ontwikkeling van tumoren. Verder zijn er zeker genoeg mogelijkheden voor samenwerkingen in de toekomst, hetgeen zal verzekeren dat het CAM model nog vele jaren relevant zal blijven.