



Samenvatting proefschrift Meriem Khairoun

“Microvascular alterations in transplantation”

**Promotie: 14 januari 2015
Universiteit Leiden**

Promotor:
Prof. dr. T.J. Rabelink
Prof. dr. A.J. van Zonneveld

Co-promotor:
Dr. M.E.J. Reinders

In de ontwikkeling van nierziekten en afstotingsreactie na niertransplantatie, spelen endotheel schade en herstel en de ontwikkeling van nierfibrose (bindweefselvorming) een belangrijke rol. Endotheel cellen (EC) vormen de binnenste laag van onze bloedvaten in de nieren. Het concept dat het begin van nierfibrose zou kunnen ontstaan door beschadiging aan EC, suggereert dat interventies om vasculaire integriteit in stand te houden essentieel zijn voor het behoud van nierfunctie. Door beter te begrijpen welke mechanismen betrokken zijn bij EC schade tijdens nierziekten en na niertransplantatie, is het wellicht mogelijk om hierop in te grijpen en therapeutische interventies te ontwikkelen. In dit proefschrift is onderzocht welke factoren van belang zijn in het proces van EC schade en herstel in chronische nierfalen (CKD), diabetes mellitus (DM) type 1, Ischemie/Reperfusie schade (I/R schade) en na transplantatie.

I/R schade van de nier ontstaat na transplantatie en is een belangrijke voorspeller voor nierfalen na een niertransplantatie. Tot dusver is niet geheel bekend welke mechanismen bijdragen aan I/R schade. Steeds meer studies wijzen in de richting van EC schade en een gestoord capillair herstel als vroege mechanismen die betrokken zijn bij I/R schade. De microvasculaire EC schade die optreedt is geassocieerd met profibrotische veranderingen van het nierweefsel. Het begin van deze microvasculaire schade zou kunnen ontstaan doordat EC niet meer op normale wijze signaleren naar pericyten (de steuncellen van de bloedvaten). Deze interactie tussen pericyten en EC wordt gereguleerd door verschillende angiogene factoren, waaronder angiopoietine-1 (beschermend/anti-inflammatoir) en angiopoietine-2 (pro-inflammatoir). In hoofdstuk 2, werd gebruik gemaakt van een rat model waar I/R schade van de nieren geïnduceerd werd en 9 weken daarna vervolgd is. In deze periode werd op verschillende tijdstippen het effect van nier I/R schade op veranderingen in angiopoietines expressie bestudeerd. Daarnaast werd de associatie met microvasculaire remodelling, pericyten expressie en ontwikkeling van nierfibrose bestudeerd. Uit deze studie bleek dat verlies



van peritubulaire capillaire EC vroeg na I/R schade in de nier gepaard ging met een gestoorde Ang-2/Ang-1 balans, toename in pericyten en ontwikkeling van interstitiële fibrose. Negen weken na inductie van I/R schade trad er een verbetering op in de Ang-2/Ang-1 balans welk gepaard ging met herstel in aantal EC en pericyten. Deze data ondersteunen de hypothese dat angiopoietines en pericyten een belangrijke rol spelen in de microvasculaire EC schade en in het herstel van de nierschade.

Hoewel deze experimentele bevindingen een functionele rol suggereren van angiopoietines in EC schade in de nieren, is er weinig bekend of de rol van angiopoietines bij humane I/R schade in de nieren. Onze hypothese was dat de inflammatoire cascade in humane nier I/R schade geïnitieerd wordt door EC activatie en daaropvolgend angiopoietine-2 (Ang-2) afgifte. In hoofdstuk 3, werd deze hypothese bestudeerd in klinische nier transplantatie (zowel levende als overleden donoren), door gebruik te maken van arterioveneuze metingen over de gereper-fundeerde nier. Gepaarde arteriële en veneuze bloedsamples uit de nieren werden verzameld opeenvolgende tijdstippen gedurende de vroege fase van reperfusie. Deze studie liet zien dat nieren van zowel levende als overleden donoren Ang-2 afgeven. Dit ging gepaard met verlies van ECs in de nieren, wat bleek uit daling in CD34 en vWF expressie en verminderde angiopoietine-1 (Ang-1) eiwit en mRNA expressie. Onze bevindingen suggereren dat angiopoietines en pericyten een belangrijke rol spelen in microvasculaire remodeling tijdens I/R schade in de nier.

In hoofdstuk 4, werd onze studie naar lokale vasculaire EC schade voortgezet in vroege DM. Microvasculaire afwijkingen in de nieren zijn veel voorkomende histopathologische bevindingen bij diabetische nephropathie (DN). In humane DN worden morfologische veranderingen in capillairen gevonden, zoals elongatie en toename in aantal glomerulaire capillairen. Veranderingen in angiogene factoren zoals VEGF-A en angiopoietines zouden betrokken zijn bij de progressie van DN. Door gebruik te maken van een streptozotocine geïnduceerd diabetes model in varkens met een atherogeen dieet, is onderzocht of het vroege stadium van DM geassocieerd is met systemische microvasculaire schade. Daarnaast is onderzocht welke vroege factoren betrokken zijn bij de ontwikkeling van diabetische nefropathie. Hiervoor werd een varkensmodel gebruikt met een follow-up periode van 15 maanden na inductie van DM. Deze studie liet zien dat vroege atherogene DM leidt tot systemische microvasculaire afwijkingen, weerspiegeld door toegenomen capillaire kronkeligheid gemeten met de niet-invasieve sidestream darkfield techniek (SDF). Daarnaast werden er glomerulaire afwijkingen gevonden passend bij vroege DN en een dysbalans in angiopoietines in de nieren van diabetische atherogene varkens. Dit ging gepaard met een verhoogde urine albumine/creatinine ratio. De dysbalans in angiopoietines was geassocieerd met toegenomen capillaire kronkeligheid. Dit suggereert een relatie tussen toegenomen systemische microvasculaire kronkeligheid en veranderde expressie van angiopoietines in de nieren. Samenvattend wijzen deze bevindingen erop dat systemische microvasculaire schade en angiopoietine dysbalans de eerste gebeurtenissen zijn in het initiëren van nierschade in de vroege fase van DN. In de vorige hoofdstukken lag de focus vooral op microvasculaire schade in de nieren na I/R schade en DM type 1. Om te onderzoeken of deze beschadigingen aan het



endotheel zich ook systemisch manifesteren hebben wij de microcirculatie in beeld gebracht met SDF techniek in DN en CKD patiënten (niet-diabeten).

In hoofdstuk 5, werden de effecten van gecombineerde nier-pancreas transplantatie op microvasculaire schade in DM type 1 patiënten, met en zonder DN, bestudeerd in cross-sectionele en longitudinale studies. Daarnaast werd systemische capillaire kronkeligheid gecorreleerd met markers voor endotheelschade in het bloed, inclusief soluble thrombomoduline (sTM) en Ang-2/Ang-1. Vergelijkbaar met andere studies, liett deze studie toegenomen capillaire kronkeligheid zien in DM type 1 patiënten ten opzichte van gezonde controles. Dit ging gepaard met Ang-2/Ang-1 dysbalans en een toename in sTM. Een interessante bevinding van deze studie is dat er een verbetering werd gezien van capillaire kronkeligheid en normalisatie van Ang-2/Ang-1 balans na nier-pancreas transplantatie, maar niet na niertransplantatie alleen. Dit suggereert dat zowel β -cel functie als herstel van nierfunctie noodzakelijk zijn om systemische microvasculaire schade te verbeteren na transplantatie. Tevens werd er een correlatie gevonden tussen microvasculaire kronkeligheid en toegenomen Ang-2/Ang-1 ratio. In de longitudinale studie werden reversibiliteit van zowel microvasculaire schade als afname in sTM en Ang-2/Ang-1 dysbalans waargenomen binnen het eerste jaar na nier-pancreas transplantatie. Beoordeling van de mate van capillaire kronkeligheid, als marker voor microvasculaire schade, door gebruik te maken van de SDF techniek en angiopoietine waardes in het serum, zouden belangrijke hulpmiddelen kunnen zijn om de mate van microvasculaire verstoringen in DM patiënten in te schatten voor en na nier-pancreas transplantatie.

Naast onze bevindingen in nier-pancreas transplantatie patiënten, werden in hoofdstuk 6 de resultaten van SDF metingen en endotheel dysfunctie marker bepalingen vergeleken in niet-diabetische CKD patiënten en gezonde controles. Daarnaast werd het effect van niertransplantatie bestudeerd. Onze eerste bevinding was dat niet-diabetische CKD patiënten een gestoorde systemische microvasculatuur hebben met toegenomen kronkeligheid en verhoogde Ang-2 en sTM waardes in het serum in vergelijking met gezonde vrijwilligers. Dus naast toegenomen capillaire kronkeligheid in DN patiënten, zoals besproken in hoofdstuk 5, lieten niet-diabetische CKD patiënten ook systemische microvasculaire schade zien. De groep CKD patiënten werd vervolgens gedurende 12 maanden na nier transplantatie vervolgd om het effect van transplantatie op microvasculaire veranderingen te onderzoeken. Interessant is dat niertransplantatie leidt tot verbetering van microvasculaire kronkeligheid en normalisatie in Ang-2 en sTM binnen 6 maanden na transplantatie. Dus, herstel van uremie in niet-diabetische CKD patiënten leidt in deze patiënten tot verbetering van de microvasculaire schade.

Tot slot werden in hoofdstuk 7 microvasculaire veranderingen bestudeerd in niertransplantatie patiënten na acute rejectie (AR). Het is bekend dat herhaalde episodes van AR de EC beschadigen en tot destabilisatie van peritubulaire capillairen in de nieren. Echter, of AR na niertransplantatie geassocieerd is met systemische microvasculaire schade is nog niet eerder onderzocht. Uit onze studie bleek dat AR tot gestoorde systemische microvasculaire schade leidt met toegenomen capillairen kronkeligheid, in vergelijking met stabiele nier transplantatie patiënten. De capillaire kronkeligheid bleef aanhouden tot 1 jaar na AR. Daarnaast was er een stijging in



circulerende Ang-2/Ang-1 ratio, VEGF-A en sTM. Deze angiogene factoren, zouden een rol kunnen spelen in de pathogenese van microvasculaire schade tijdens inflammatoire processen en acute rejectie in de nieren. Sinds EC activatie/schade de kans op overleving van het transplantaat beïnvloedt, zouden therapeutische interventies gericht op behoud van microvasculaire integriteit een gunstig effect kunnen hebben op de lange termijn transplantaat overleving na AR. Monitoring van de microcirculatie middels SDF techniek zou een nieuwe niet-invasieve methode kunnen zijn om in een vroeg stadium microvasculaire schade te detecteren tijdens AR.

Concluderend lieten de resultaten van dit proefschrift zien dat EC schade en herstel een belangrijke rol spelen in nierziekten en na transplantatie. Zowel nier I/R schade als DM induceerden systemische microvasculaire schade wat blijkt uit in toegenomen capillaire kronkeligheid, gemeten met SDF techniek, en een dysbalans in angiopoietines. Tevens vertoonden patiënten met nierziekten en rejectie na niertransplantatie systemische microvasculaire afwijkingen. Transplantatie liet herstel zien van systemische microvasculaire verstoringen in diabetische en niet-diabetische CKD patiënten. De resultaten in dit proefschrift suggereren dat angiopoietines belangrijke factoren zijn in het reguleren van microvasculaire homeostase. Toekomstig onderzoek gericht op therapeutische interventies is noodzakelijk om een oorzakelijk verband aan te tonen tussen de rol van angiopoietines en pericyten in EC stabilisatie en herstel. Agentia om de Ang-2/Ang-1 balans te moduleren zouden een gunstig effect kunnen hebben als therapeutisch middel voor microvasculaire stabilisatie in nierziekten. Het gebruik van SDF techniek en markers voor endotheel dysfunctie zouden als diagnostisch middel gebruikt kunnen worden voor en na transplantatie.