

University of Groningen

Addressing liver fibrosis with lipid-based drug carriers targeted to hepatic stellate cells

Adrian, Joanna Ewa

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2006

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Adrian, J. E. (2006). *Addressing liver fibrosis with lipid-based drug carriers targeted to hepatic stellate cells*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

chapter 7



samenvatting

Leverfibrose ontstaat als gevolg van schade aan het orgaan. Dit leidt tot de vorming van littekenweefsel, wat onder normale omstandigheden essentieel is voor het genezingsproces van de lever. Wanneer het proces van littekenvorming echter chronisch geactiveerd wordt, kan dat leiden tot blijvende schade. Deze activatie kan verschillende oorzaken hebben: chronische infecties, zoals door het hepatitis B of C virus, chronisch alcoholisme of langdurige blootstelling aan andere toxische stoffen, ernstige zwaarlijvigheid en overdadige consumptie van vetten (resultierend in niet-alcoholische steatohepatitis, NASH), erfelijke stofwisselingsziekten, zoals de ziekte van Wilson, of leverontsteking als gevolg van auto-immuunziekten.

Het littekenweefsel dat ontstaat na deze chronische beschadiging bestaat uit diverse extracellulaire matrix (ECM) componenten, met name collageen type I en III. Leverfibrose is een dynamisch proces, waarbij de excessieve productie van ECM samenvalt met een verminderde afbraak hiervan. Tevens verandert de samenstelling van ECM; er ontstaat een stugge structuur. Uiteindelijk kan fibrose zich ontwikkelen tot een potentieel dodelijke ziekte die bekend staat als levercirrose die door veel mensen geassocieerd wordt met alcoholisme. Het is echter ook mogelijk dat de ontwikkeling van fibrose stagneert, en dat de lever uiteindelijk zelfs goeddeels geneest en weer normaal gaat functioneren. De lever heeft een zeer goed herstellend vermogen, maar een chronische schade kan ernstige en blijvende pathologische veranderingen induceren.

Hoe levercirrose zich klinisch manifesteert hangt af van de ernst van de primaire oorzaak, maar ook van de mate waarin fibrose al is opgetreden. Dit heeft tot gevolg dat men een grote verscheidenheid aan ziektebeelden ziet; zowel volledige afwezigheid van symptomen als volledige leverfalen komen voor. Leverfibrose is dan ook ziekte die zich in een laat stadium manifesteert. Tot veertig procent van mensen met leverfibrose heeft nog geen duidelijke klachten en het kan langer dan tien jaar duren voordat die ontstaan. Daarom is het van groot belang dat de diagnostiek ontwikkeld wordt, vooral om op een betrouwbare wijze een indicatie te kunnen krijgen van de vroege fases van het fibrose proces. Op dat moment zal de lever in het algemeen nog in staat om te herstellen wanneer de oorzaak weggenomen wordt. Ook wanneer de ziekte zich verder ontwikkeld heeft, kan het fibrose proces nog vertraagd worden, en soms kan zelfs genezing optreden wanneer de oorzaak van de chronische beschadiging weggenomen wordt. Voor een adequate behandeling is dan echter therapeutische interventie nodig. Onderzoek naar medicijnen en therapieën voor de behandeling van leverfibrose vindt plaats in laboratoria en klinieken wereldwijd, maar op dit moment zijn er nog geen behandelingen die goedgekeurd zijn voor algemene klinische toepassing. Daarmee is levertransplantatie op dit moment de enige effectieve behandeling van ernstige leverfibrose en cirrose. Echter aan transplantaties kleven ernstige bezwaren zoals de risicovolle operatie, en het tekort aan donor levers.

Zowel in Europa als in de Verenigde Staten is levercirrose, na kanker, de meest voorkomende doodsoorzaak binnen de groep van lever- en maag-darmziekten. Daar komt bij dat uit epidemiologische prognoses blijkt dat leverfibrose in de nabije toekomst steeds vaker voor zal komen als gevolg van een toenemend voorkomen van infecties met het hepatitis C virus (zowel toename van het aantal infecties, als het steeds ouder worden van reeds geïnfecteerden). Ook zal NASH vaker voorkomen als gevolg van het toenemende probleem van obesitas.

In de vroege jaren negentig van de vorige eeuw identificeerde men de lever stellaatcel (hepatic stellate cell, HSC) ofwel stervormige levercel als het celtype dat cruciaal is in

de ontwikkeling van leverfibrose. In een gezonde lever hebben stellaatcellen een rustend fenotype en verzorgen de opslag van vitamine A. Bij leverschade komen groeifactoren en signaalstoffen vrij uit andere levercellen, zoals de hepatocyten, Kupffer cellen en de leverendotheelcellen (LEC), die de HSC activeren. In deze toestand verliezen de HSC het opgeslagen vitamine A en gaan grote hoeveelheden collageen produceren. De toename van de hoeveelheid collageen in de lever verstoort de lever architectuur en bemoeilijkt vervolgens de leverfunctie. Daarnaast gaan de geactiveerde HSC zich vermenigvuldigen en migreren ze in de richting van de beschadiging. Ze produceren dan ook zelf signaalstoffen, die cellen uit het immuunsysteem aantrekken en een ontstekingsproces in gang zetten. Het gevormde littekenweefsel en de HSC die zich kunnen samentrekken, veroorzaken een hoge weerstand in de lever waardoor er een bloeddrukverhoging ontstaat in de aanvoerende bloedvaten (de vena porta). Dit is een ernstig symptoom bij patiënten met levercirrose want het leidt tot veel klinische problemen. Op basis van deze gegevens is het aannemelijk dat een therapie die in staat is om de activering van HSC en de overmatige productie van collageen te stoppen een bijzonder waardevolle bijdrage kan leveren aan de behandeling van patiënten met leverfibrose.

Voor een dergelijke therapie is het noodzakelijk om medicijnen met een anti-fibrotisch effect met behulp van geneesmiddeldragers zo specifiek mogelijk in de HSC af te leveren (targeting). Op deze manier kan men hoge concentraties van het medicijn in deze celpopulatie bereiken, zonder dat het middel elders in het lichaam ophoopt en daar ongewenste toxische effecten heeft.

Liposomen zijn een voorbeeld van geneesmiddeldragers. Liposomen zijn vet bolletjes bestaande uit een dubbellaag van fosfolipiden die een waterige ruimte omsluiten waarin wateroplosbare medicijnen ingesloten kunnen worden. Vetoplosbare medicijnen daarentegen, kunnen worden opgeslagen in de lipide dubbellaag die het membraan van de liposoom vormt. In beide gevallen kan een hoge concentratie geneesmiddelen in het liposoom gebracht worden. Liposomen, toegepast voor het afleveren van medicijnen, worden vaak gemaakt van fosfolipiden die niet of negatief (anionisch) geladen zijn. Hieraan wordt cholesterol toegevoegd om de stabiliteit van de membraan te vergroten. Het membraan van liposomen lijkt sterk op dat van een gewone lichaamscel. Hierdoor zijn liposomen bio-compatibel, wat betekent dat ze afbreekbaar, niet immunogeen en niet giftig zijn.

In het onderzoek beschreven in dit proefschrift hebben we liposomen gebruikt om medicijnen selectief in HSC af te leveren en gekeken of het mogelijk is om op deze manier een antifibrotische therapie te ontwikkelen. Om ervoor te zorgen dat de liposomen na injectie ook daadwerkelijk naar de HSC gaan, hebben we een eiwit, aangeduid als M6P-HSA, gekoppeld aan het oppervlak van de liposomen. Dit eiwit, humaan serum albumine (HSA) gemodificeerd met mannose-6-fosfaat (M6P), wordt herkend door geactiveerde HSC in een fibrotische lever, doordat het bindt aan een receptor (de mannose-6-fosfaat/insuline-achtige groeifactor type II receptor, ofwel M6P/IGF II receptor) op het oppervlak van deze cellen.

In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift laten we zien dat M6P-HSA daadwerkelijk gekoppeld kan worden aan liposomen, waarbij deeltjes worden verkregen met een diameter van zo'n honderd nanometer d.w.z. klein genoeg om fenestraties in het leverendotheel te passeren en HSC te bereiken. Incubatie van deze liposomen met gekweekte HSC leidde inderdaad tot een verhoogde celbinding en opname van de M6P-HSA liposomen. Het was opmerkelijk

dat de M6P-HSA liposomen ook sterk bonden aan niet geactiveerde HSC, alhoewel deze cellen niet de eerder genoemde M6P/IGF II receptoren tot expressie brengen. Uit deze en andere experimenten werd geconcludeerd dat er een tweede type receptor is die de M6P-HSA liposomen herkent. Omdat M6P groepen een negatieve lading geven aan het albumine, is het mogelijk dat M6P-HSA ook bindt aan de zogenaamde scavenger receptoren, waarvan bekend is dat zij anionische macromoleculen binden. Alhoewel er weinig bekend is over het voorkomen van scavenger receptoren op HSC, wijzen onze resultaten erop dat deze cellen scavenger receptoren tot expressie kunnen brengen.

Na injectie van M6P-HSA liposomen in ratten met een geïnduceerde leverfibrose (BDL ratten), bleken deze liposomen daadwerkelijk te worden opgenomen door HSC in de fibrotische lever.

In **hoofdstuk 3** werden M6P-HSA liposomen verder gekarakteriseerd in een rattenmodel voor leverfibrose. Het bleek dat liposomen met daaraan M6P-HSA gekoppeld snel uit de bloedsomloop van BDL ratten verdwenen en dan voornamelijk in de lever teruggevonden werden. Deze snelle verdwijning uit het bloed kon geremd worden door de pré-injectie met vrij M6P-HSA, terwijl vrij (ongemodificeerd) HSA geen effect had. Daaruit kan worden afgeleid dat de waargenomen kinetiek van de M6P-HSA liposomen verklaard kan worden door de aanwezigheid van M6P-HSA groepen in het liposoom. Behalve HSC bleken ook de Kupffer cellen en LEC M6P-HSA liposomen op te nemen. Aangezien van deze beide celtypen bekend is dat ze de scavenger receptoren hebben, was deze opname, met het oog op de in vitro resultaten, te verwachten. Wanneer ratten een pré-injectie met van polyinosine zuur, een remmer van de scavenger receptor gemedieerde opname, kregen, bleek dat de M6P-HSA liposomen veel minder snel uit de bloedsomloop verdwenen en bleek ook de opname door Kupffer cellen en LEC sterk geremd. Verdere analyse van HSC toonde aan dat deze cellen scavenger receptor type A tot expressie brachten. De expressie van die receptor was echter sterk verminderd in geactiveerde HSC.

Samenvattend laten de resultaten uit deze hoofdstukken zien dat M6P-HSA liposomen snel door de lever worden opgenomen maar dat er meerdere receptoren betrokken zijn bij de herkenning van deze liposomen. Het gaat hierbij om de M6P/IGF II receptor en de scavenger receptor. De consequentie daarvan is dat de M6P-HSA liposomen niet alleen door HSC maar ook door andere celtypen in de lever zoals Kupffer- en endotheel cellen worden opgenomen. Bij de keuze van het medicijn dat ingesloten wordt in het liposoom moet hier terdege rekening mee worden gehouden. Een hoge opname in de doelcel kan worden verkregen, maar het middel mag niet toxisch zijn voor deze andere celtypen.

In **hoofdstuk 4** worden de effecten beschreven van liposomen die het bioactieve vet dilynoleoylfosfatidylcholine (DLPC) bevatten. Dit effect is onderzocht op gekweekte HSC en in fibrotische BDL ratten. Eerder was al aangetoond dat DLPC de activatie van HSC kan remmen en dat het de progressie van leverfibrose kan verminderen. In onze aanpak werd DLPC geïntegreerd in het membraan van de liposomen. Dit biedt de mogelijkheid om ook nog medicijnen in het liposoom in te sluiten waardoor de DLPC liposomen een tweeledig anti-fibrotisch effect zouden kunnen hebben; naast een functie als geneesmiddeldrager heeft het liposoom dan ook een direct effect in de doelcel.

In vitro studies lieten zien dat DLPC liposomen zowel met als zonder M6P-HSA gekoppeld aan het lipiden membraan, een anti-fibrotisch effect hebben. De expressie van een aantal pro-fibrotische genen werd geremd. In vivo daarentegen, waren de effecten van DLPC liposomen op leverfibrose minder uitgesproken. Anti-fibrotische effecten werden alleen

waargenomen in dieren die behandeld werden met DLPC liposomen waaraan geen M6P-HSA gekoppeld was, terwijl liposomen met M6P-HSA nauwelijks een anti-fibrotisch effect in BDL ratten lieten zien. Om de oorzaak van de verschillen tussen de in vitro en in vivo situatie te achterhalen werden effecten van DLPC liposomen op gekweekte Kupffer cellen en LEC bestudeerd. Het bleek dat in deze cellen de expressie van diverse genen die ontstekingsprocessen regelen werd beïnvloed door de opgenomen DLPC liposomen. Hoewel het netto effect van DLPC liposomen op Kupffer cellen, LEC en HSC niet duidelijk is, lijkt er een duidelijke invloed van de DLPC liposomen op de cel reacties in de fibrotische lever. Opmerkelijk was dat de DLPC liposomen de opslag van glycogeen in hepatocyten bevorderen. Het verlies van hepatocyten en functieverlies van de overblijvende cellen zijn belangrijke gevolgen van leverfibrose. De hoeveelheid glycogeen die in de hepatocyten is opgeslagen is mogelijk een goede indicatie van de algehele conditie van hepatocyten. Over het algemeen resulteert leverfibrose in het verlies van cytoplasmatisch glycogeen. De toename van glycogeen in de hepatocyten na injectie met DLPC liposomen duidt derhalve op een beschermende werking van deze liposomen bij leverfibrose.

Hoofdstuk 5 behandelt de toepassing van M6P-HSA liposomen in combinatie met het hemagglutinerend virus van Japan (HVJ) voor het afleveren van therapeutische genen of antisense oligonucleotiden in HSC. Voor HVJ is aangetoond dat het zowel in vivo als in vitro heel efficiënt cellen kan transfecteren, maar de opname in bepaalde doelcellen in vivo blijft een probleem. Op dezelfde manier waarmee het virus kan fuseren met het celmembran, kan het virus echter ook fuseren met liposomen. In deze studie werd een plasmide met luciferase als reporter gen, geïncorporeerd in geïnactiveerd HVJ, waarbij een zogenaamde HVJ envelop wordt gevormd. Deze HVJ enveloppen werden vervolgens gefuseerd met M6P-HSA liposomen. De verkregen partikels werden vervolgens gekarakteriseerd en hun efficiëntie om de HSC in de fibrotische lever te bereiken werd bepaald. De gevormde deeltjes werden inderdaad selectief door HSC opgenomen. In vitro was de transfectie efficiëntie van de M6P-HSA-HVJ liposomen echter laag. Dit is mogelijk een gevolg van een verlies aan plasmide DNA gedurende de fusie, of van een veranderde infectieroute van het virus via de M6P/IGF II receptor. Additionele experimenten zijn nodig om het transfectiemechanisme van M6P-HSA-HVJ liposomen te verduidelijken. Het uiteindelijke doel van deze studie is aan te tonen dat genen kunnen worden afgeleverd met behulp van M6P-HSA-HVJ liposomen in HSC teneinde het proces van leverfibrose te remmen. Hiervoor zijn echter meer vervolgstudies noodzakelijk.

Samenvattend kan gesteld worden dat het gebruik van selectief gestuurde of getargete liposomen als dragers van medicijnen naar de HSC in de leverfibrose een reële optie is om een therapie te ontwerpen voor deze ziekte. We hebben aangetoond dat de liposomen snel accumuleren in de lever en de doelcel bereiken, hoewel ook andere lever celtypen de gemodificeerde liposomen opnemen. De doelcellen zijn te beïnvloeden door de lipid samenstelling van het liposoom en ook een modulatie van genen met behulp van viruspartikels geïncorporeerd in de liposomen lijkt mogelijk. De kennis gegenereerd in dit project kan de aanzet zijn voor een nieuwe, rationele farmacotherapie gebaseerd op liposomen die selectief farmacologisch actieve stoffen afleveren in cellen betrokken bij leverfibrose waaronder de zo belangrijke HSC.



Stelling 12 in practice.