

University of Groningen

The design of a liver-selective form of interleukin-10

Rachmawati, Heni

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:

2005

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

Citation for published version (APA):

Rachmawati, H. (2005). *The design of a liver-selective form of interleukin-10: a new strategy for the treatment of liver fibrosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

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 - 9

Samenvatting

Leverfibrose: oorzaak en behandeling

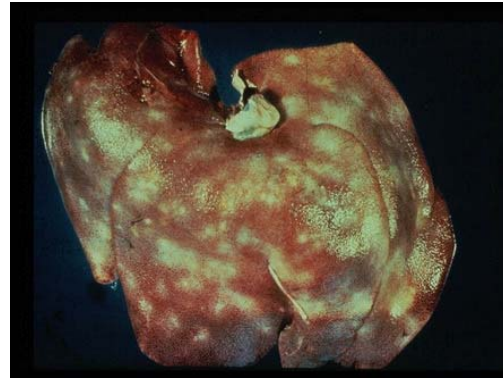
Lever fibrose is een chronisch ziekteproces dat ontstaat als gevolg van een langdurige schadelijke prikkel. Deze prikkel kan variëren van infectie met een hepatitis virus (hepatitis A of C), vetzucht, bepaalde genetische defecten waardoor toxische afvalstoffen zich ophopen in de lever, tot chronisch alcohol misbruik, of gebruik van een hepatotoxisch geneesmiddel. Het zijn vooral de hepatocyten, die meer dan 80% van de levermassa vormen, die hierdoor beschadigd raken en als gevolg hiervan treedt (zoals altijd na weefselschade) een wondgenezingsproces op. Dit proces in de lever is vergelijkbaar met de littekenvorming in bijvoorbeeld de huid. Het wondgenezingsproces is uiteraard nuttig om de functie van het orgaan te behouden, maar als dit proces herhaald en langdurig optreedt, kan het zichzelf in stand houden, ook nadat de oorzaak ervan geheel is weg genomen. De excessieve bindweefsel vorming kan uiteindelijk leiden tot een volledige verstoring van het functioneren van de lever. Bij het proces van leverfibrose ontstaat de littekenvorming door activatie van de zogenaamde 'hepatische stellaat cellen'. Geactiveerde stellaat cellen kunnen op hun beurt weer andere celtypen op vele manieren activeren. Zo kan het proces zichzelf in stand houden waardoor het ziekteproces vaak jarenlang kan doorgaan. De ziekte wordt meestal pas in een vrij laat stadium ontdekt omdat de patiënt in het begin geen klachten heeft. Zo kan na een hepatitis C besmetting het 10 tot 15 jaar duren voordat er klinische symptomen optreden. Het eindstadium, gekenmerkt door een ernstig leverfalen heet cirrhose en is in principe lethaal. Tot op heden is er geen effectief geneesmiddel beschikbaar dat het excessieve fibroseproces kan tegen gaan. Een lever transplantatie is thans de enige mogelijkheid voor herstel van de patiënt. Door al de eerder genoemde factoren wordt geschat dat ongeveer 1% van de populatie in de VS aan lever fibrose lijdt (in dit land is vetzucht, althans nu nog, een groter probleem dan in Europa). In de gehele westerse wereld is dit ziekteproces doodsoorzaak nummer 8.

Het is dus van groot belang een effectief geneesmiddel te vinden voor lever fibrose. In principe is littekenvorming een onomkeerbaar proces (net zoals de littekens in de huid niet verdwijnen) maar de meest recente mening hierover is dat leverfibrose in een vrij laat stadium toch nog omkeerbaar is indien men therapeutisch ingrijpt. Het herstelvermogen van de lever is groot. Parallel hieraan

is het van belang dat ook betere diagnostische middelen gevonden worden voor een vroege detectie van het ziekteproces om de kans van slagen van een therapie te verhogen.



normale lever



fibrotische lever

Er zijn een aantal redenen aan te wijzen waarom er nog geen effectief geneesmiddel voor leverfibrose gevonden is. Ten eerste is het opbouwen en afbreken van bindweefsel een algemeen proces dat na weefselbeschadiging in ieder orgaan en op ieder willekeurig tijdstip optreedt. Remming van dit algemene proces leidt dus tot schadelijke bijeffecten in het hele lichaam. Ten tweede neemt de lever vele geneesmiddelen op maar deze opname gebeurt vaak door de hepatocyten die hiervoor goed uitgerust zijn en nauwelijks door de cellen die de ziekte veroorzaken; de hepatische stellaat cellen. Tot slot is levercirrhose een zeer langzaam voortschrijdend proces dat pas in een vergevorderd stadium ontdekt wordt. Ten vierde is er een grote groep al ontwikkelde geneesmiddelen niet inzetbaar omdat deze in de lever wellicht wel een nuttig effect hebben, maar daarbuiten zeer schadelijk kunnen zijn voor de patiënt. Voorbeelden hiervan zijn vasoactieve stoffen en immuunsuppressieve middelen. Vooral geneesmiddelen die de bloeddruk in de lever en in het aanvoerende vat (de vena porta) reguleren zijn zeer nuttig omdat leverfibrose gepaard gaat met een verhoogde lokale bloeddruk als gevolg van de hoge weerstand in de aangetaste lever. Buiten de lever is er echter vaak sprake van een verlaagde bloeddruk. Daar heeft een bloeddruk verlagend middel dus een schadelijk effect. In de lever is ook sprake van een chronische ontsteking, maar een immuunsuppressief middel kan vaak niet zonder gevolgen voor de patiënt langdurig worden ingezet, zeker als een hepatitis virus infectie de onderliggende oorzaak is. Zelfs een reactivatie van de virus replicatie

kan dan worden waargenomen. Ook in de lever zelf kan een geneesmiddel tegengestelde werkingen hebben. Voorbeelden hiervan zijn cyclo-oxygenase remmers, apoptose-inducerende en cytostatische geneesmiddelen en corticosteroiden. Een cyclo-oxygenase remmer heeft bijvoorbeeld via remming van de ontsteking een anti-fibrotisch effect in Kupffercellen, maar in hepatische stellaat cellen werkt het pro-fibrotisch door een stimulatie van de groei van dit celtype. Het netto resultaat van farmacotherapie is dan ook weinig optimaal.

Op grond van al deze redenen denken wij dat het selectief sturen van een geneesmiddel naar bepaalde doelcellen ('drug targeting') in de lever een goede strategie is om het proces van leverfibrose te remmen en dus een belangrijke eerste stap kan zijn naar een effectief en veilig geneesmiddel voor deze ziekte.

De doelcel

Zoals eerder genoemd is primaire schade aan hepatocyten vaak een cruciale factor in het ontstaan van leverfibrose. Toxische stoffen, metabolieten en virussen beschadigen rechtstreeks de hepatocyten maar ook de hierop volgende activatie van het immuunsysteem in de lever leidt vaak weer tot indirecte schade aan deze cellen. Celbeschermende stoffen (o.a. anti-oxidantia) of anti-virale middelen dienen dus selectief in dit celtype terecht te komen. Om het herstel van de lever te bevorderen en de ontstane "gaten" te dichten zou de groei van hepatocyten ook bevorderd kunnen worden. De schade aan de hepatocyten veroorzaakt op zijn beurt weer een activatie van de lever macrofagen ('Kupffer' cellen) en endotheelcellen. Deze twee celtypen reguleren de immunoreactie hetgeen op zich zeer nuttig is voor het opruimen van toxische stoffen, bacteriën, viruspartikels of celpuin. Maar een chronische activatie van het immuunsysteem stimuleert helaas de bindweefselvorming weer sterk. Ontstekingsremmers kunnen wel anti-fibrotisch werken en Kupffer cellen en endotheelcellen zijn daarbij de voornaamste doelcellen. Activatie van hepatocyten, endotheelcellen en Kupffer cellen leidt namelijk tot afgifte van allerlei producten zoals groeifactoren en cytokines die de hepatische stellaat cellen in de lever activeren.

In de normale lever slaan hepatische stellaat cellen vooral vitamine A op en heten daarom ook wel 'fat-storing cell'. Na activatie stoten deze cellen echter hun vitamine A uit, nemen ze zeer sterk in aantal toe (proliferatie), en verkrijgen ze geheel andere eigenschappen. In hun cytoplasma komen vanaf dat moment

bijvoorbeeld contractiele elementen voor (α -smooth muscle actin) waardoor ze kunnen samentrekken en zo sterk bijdragen aan de verminderde bloeddorstrooming door de fibrotische lever. Bovendien gaan hepatische stellaatcellen bindweefsel (collagenen) en andere extracellulaire matrix eiwitten maken die het uiteindelijke litteken vormen dat bij overproductie ervan de architectuur en bloedvoorziening verstoord. Tevens zetten deze cellen andere celtypen aan tot actie waardoor het proces in een cirkelgang versterkt door kan gaan. Het zijn met name de hepatische stellaatcellen die verantwoordelijk zijn voor het uiteindelijke leverfalen. Dit celtype is dan ook de belangrijkste doelcel voor potentiële geneesmiddelen die de collageen productie remmen en ook voor vasoactieve middelen. Ook geneesmiddelen die de stellaatcel proliferatie remmen of die apoptose ervan induceren dienen aan te grijpen op dit celtype. Bij voorkeur dienen deze middelen geen effect te hebben in hepatocyten.

Ons onderzoek heeft zich dan ook vooral gericht op het afleveren van anti-fibrotische middelen naar de hepatische stellaatcellen tijdens leverfibrose.

Het geneesmiddel

In het hierboven staande zijn een aantal geneesmiddelen en strategieën genoemd die gebruikt kunnen worden om het proces van leverfibrose te remmen. In de studies beschreven in dit proefschrift hebben we gekozen voor het sturen van een cytokine naar de stellaat doelcel. Cytokines zijn endogene regulatoren van de immuunrespons en het wondgenezingsproces. Het zijn veelal potente stoffen die een scala aan activiteiten bezitten en aangrijpen op vele verschillende celtypen. Juist vanwege het gebrek aan selectiviteit zijn ze vaak moeilijk therapeutisch inzetbaar.

Interleukine-10 (IL-10) is een cytokine dat een belangrijke rol speelt bij de regulatie van het leverfibrose proces. Hepatische stellaat cellen bezitten receptoren voor IL-10 en *in vitro* bleek IL-10 een remmend effect te hebben op de activatie, groei en eiwitproductie van deze cellen. Muizen waarbij het gen voor IL-10 was uitgeschakeld zijn ook gevoeliger voor fibrotische stimuli en laten een versneld fibroseproces zien. Bovendien remde de toediening van IL-10 aan ratten met nier- of leverfibrose het ziekte proces significant. Om deze redenen is het anti-fibrotische effect van IL-10 uitgebreid getest in “clinical trials” bij patiënten met leverfibrose. De resultaten waren in sommige studies redelijk goed, in andere

echter veel minder. Bovendien kregen sommige patiënten problemen met hun afweer waardoor virale infecties (die juist de oorzaak waren van de problemen) weer de kop opstaken.

Deze problemen zijn zeer waarschijnlijk het gevolg van het afweeronderdrukkende effect van IL-10 als gevolg van binding aan andere cellen dan hepatische stellaat cellen. Bovendien is IL-10, net als de meeste cytokines, een klein eiwit dat snel uit het bloed wordt geëlimineerd via de nier. Om een effect vast te stellen moet het frequent en in hoge dosis worden gegeven en dan komen de bijwerkingen ook sterker tot uiting. Zeker bij chronische ziekten is dit een probleem.

Interleukine-10 is vanwege deze eigenschappen een uitermate geschikt therapeutisch eiwit om selectief af te leveren in of bij de doelcel. Bij het begin van ons onderzoek waren er geen studies bekend om IL-10 selectief af te leveren in organen of doelcellen. Voor een aantal andere cytokines waren dergelijke pogingen echter wel ondernomen (TNF- α , IL-2, IL-6, en IL-12). Pogingen om de effectiviteit van cytokines te verhogen hadden vooral betrekking op een verlenging van de plasma halfwaardetijd door een koppeling van het cytokine aan macromoleculen (bijv. PEG) waardoor de expositie tijd toeneemt. Het is echter zeer moeilijk gebleken om een eiwit gericht te sturen naar de juiste cel zonder de activiteit van dat eiwit te verliezen door dergelijke manipulaties. Bovendien zijn specifieke receptoren die gebruikt kunnen worden voor het selectief afleveren van geneesmiddelen vaak niet bekend.

Drug targeting naar de hepatische stellaat cel.

In de afgelopen jaren is binnen het laboratorium van de Farmacokinetiek & Drug Delivery van de RuG veel werk verricht aan het sturen van eiwitten naar doelcellen in de lever. In de meeste gevallen werd hierbij humaan serum albumine (HSA) gebruikt als geneesmiddel drager ('drug carrier'). Er worden in het algemeen zeer verschillende carriers voor drug targeting doeleinden gebruikt. Meestal worden polymeren, liposomen of antilichamen hiervoor ingezet. In ons laboratorium is in het verleden kozen voor albumine omdat het de juiste grootte heeft, gemakkelijk verkrijgbaar is en bovendien goed modificeerbaar is. Albumine is bovendien een endogeen eiwit in het bloed en blijft daar ook na inspuiting langdurig aanwezig. De lading en de suikersamenstelling van HSA kan zodanig

worden gemodificeerd dat het specifiek wordt herkend door bepaalde receptoren op doelcellen. Op deze wijze kon het albumine selectief naar Kupffer cellen, endotheel cellen of hepatocyten in de lever gestuurd worden. Tot een aantal jaren geleden was het onmogelijk om de hepatische stellaat cel op deze wijze te bereiken, maar in 1998 zijn in ons laboratorium een aantal gemodificeerde albumines ontwikkeld die selectief werden opgenomen door dit celtype. Hiermee openden we de weg voor de selectieve beïnvloeding van deze cel.

Een van de gevonden mogelijkheden was het koppelen van mannose-6-fosfaat aan het eiwit. Wanneer een bepaalde hoeveelheid van dit suikermolecuul aan albumine werd gekoppeld werd een leveropname van ongeveer 70% van de dosis verkregen (voor ongemodificeerd albumine is dat < 5%), waarbij ongeveer 2/3 deel van de lever-inhoud door de hepatische stellaat cel bleek te zijn opgenomen. Het eiwit werd vooral opgenomen door geactiveerde stellaat cellen omdat deze cellen na activatie de receptor voor Mannose-6-Fosfaat/Insuline-Like Growth Factor II in hoge mate tot expressie brengen. Deze receptor speelt een belangrijke rol tijdens het ziekteproces maar bleek voor ons een effectieve poort om het Paard van Troje binnen te smokkelen. Het gemodificeerde albumine kan vervolgens gebruikt worden om er een geneesmiddel aan te koppelen maar het is natuurlijk ook mogelijk om het albumine te vervangen door een ander eiwit. In het huidige onderzoek is albumine vervangen door het therapeutische eiwit IL-10.

Het doel van dit onderzoek was het onderzoeken of het mogelijk is IL-10 zodanig te manipuleren dat het selectief door de hepatische stellaatcellen in de lever wordt opgenomen en te testen of dit gemodificeerde cytokine biologisch actief is *in vitro* en *in vivo*. Er is in deze studies gekeken naar de therapeutische effecten van mannose-6-fosfaat-IL-10 in gekweekte cellen en in ratten met leverfibrose geïnduceerd door ligatie van de galgang. Dit experimentele model kenmerkt zich door een zeer snelle en massieve fibrose in de lever binnen 3 weken. Ook zijn de anti-fibrotische effecten van IL-10 onderzocht in een model van nierfibrose omdat het ongemodificeerde IL-10 daar accumuleert.

Het onderzoek

Allereerst hebben wij een literatuurstudie gedaan naar het succes van “clinical trials” met cytokines en de problemen die daarbij naar voren komen. Daarnaast hebben we alle modificaties van cytokines die zijn uitgevoerd om het

therapeutisch effect van deze eiwitten te verhogen of de bijwerkingen te verminderen op een rijtje gezet. Deze literatuurstudie is samengevat in een review over het gebruik cytokines en gemodificeerde cytokines als therapeutisch middel (**Hoofdstuk 2**). Het blijkt dat er veel pogingen zijn ondernomen met verschillende cytokines, maar dat het succes zeer wisselend is. Er zijn veelal problemen door een lage effectiviteit en een scala aan bijwerkingen. Sommige trials zijn echter zeer succesvol waarbij het vooral gaat om de gemodificeerde cytokines. Gepegyleerd Interferon α bijvoorbeeld is een zeer succesvol middel en is ook al op de markt verkrijgbaar als middel tegen hepatitis C. “Clinical trials” met IL-10 kennen vele problemen maar modificaties van dit cytokine zijn nog niet uitgevoerd. Het doel van ons onderzoek was om IL-10 te modificeren met mannose-6-fosfaat-groepen en wel zodanig dat een accumulatie in de hepatische stercellen in de lever kan worden verkregen zonder daarbij de therapeutische effecten van IL-10 te verliezen (**Hoofdstuk 1**).

Vervolgens hebben we gekeken naar het gedrag van IL-10 *in vivo* in gezonde ratten en in ratten met leverfibrose evenals naar de expressie van de IL10 receptoren tijdens deze ziekte. Het farmacokinetisch profiel van natief IL-10 is beschreven in **hoofdstuk 3**. IL-10 blijkt een plasma halfwaardetijd te hebben van slechts 2 minuten waarbij het vooral door de nieren wordt opgenomen. De verdeling naar de lever is daarentegen laag maar neemt iets toe tijdens leverfibrose. Dit laatste is geassocieerd met een toename in IL-10 receptor expressie in de lever in ratten met leverfibrose, hoewel deze receptor expressie ook dan niet erg hoog is.

Omdat IL-10 vooral in de nier accumuleert hebben we de anti-fibrotische eigenschappen van IL-10 eerst onderzocht in een experimenteel model van nierfibrose bij de rat (anti-Thy 1 model). De ophoping van IL-10 in de nier zegt nog niets over een mogelijke therapeutische effectiviteit, omdat de accumulatie van dit laagmoleculaire eiwit waarschijnlijk alleen in de tubuli optreedt, waar kleine eiwitten normaliter worden weggewerkt. Anti-Thy 1 nephritis kenmerkt zich door een acute ontsteking in glomeruli binnen 24 uur gevolgd door een meer chronisch fibrotisch proces (glomerulosclerose) waarbij de acute ontsteking snel minder wordt. In deze processen kunnen we ook onderscheid maken tussen de anti-inflammatoire en de anti-fibrotische effecten van IL-10. Er werden duidelijke anti-inflammatoire effecten van IL-10 waargenomen in de nier tijdens een acute

ontstekingsreactie in de glomeruli van de nier (**Hoofdstuk 4**). Dus, ondanks het feit dat IL-10 een halfwaardetijd heeft van slechte enkele minuten in plasma, had een enkele intraveneuze injectie een sterk remmend effect op de infiltratie van ontstekingscellen in glomeruli, 24 uur na toediening van dit IL-10.

Normaliter wordt IL-10 geproduceerd door de cellen in of rondom het ontstoken weefsel. Deze productie is lokaal hoog en constant gedurende een langere tijd en dus is de korte halfwaardetijd in plasma geen probleem. Wij vroegen ons dan ook af of enkele herhaalde intraveneuze injecties voldoende waren om een chronisch fibrose proces te remmen. In de literatuur was het effect van IL-10 in dierexperimentele modellen onderzocht met viraal getransfecteerde cellen en met name in studies waarbij direct vanaf het begin van de ziekte regelmatig IL-10 werd geïnjecteerd. Dan is er sprake van een constante productie door de viraal geïnfecteerde cel, terwijl in andere gevallen niet kon worden vastgesteld of het antifibrotisch effect kwam door het wegnemen van de oorzaak (het ontstekingsproces) dan wel of het fibrose proces zelf werd geremd. Daarom hebben wij proeven gestart waarbij we ratten met experimentele glomerulosclerose behandelden middels een eenmalige dagelijkse intraveneuze injectie met IL-10 in een fase van het ziekteproces waarbij de inductiefase (d.w.z. het ontstekingsproces) al was afgelopen. In **hoofdstuk 5** worden de effecten van IL-10 beschreven op het fibrose proces in glomeruli na een dagelijkse intraveneuze injectie 4 tot 7 dagen na de inductie van glomerulosclerose. De resultaten van deze studie tonen aan dat een intraveneuze behandeling met IL-10 duidelijke effecten heeft op diverse parameters die het fibroseproces weerspiegelen. Ondanks de korte halfwaardetijd van IL-10 heeft dit cytokine dus wel degelijk effect op een chronisch proces.

De volgende stap in het onderzoek betrof de modificatie van het IL-10. Er werd mannose-6-fosfaat gekoppeld aan humaan recombinant IL-10. Problemen hierbij waren dat IL-10 in tegenstelling tot albumine een klein eiwit is, niet goedkoop in grote hoeveelheden verkrijgbaar is en zijn biologische functie na eiwit modificatie kan verliezen. Het bleek chemisch mogelijk om mannose-6-fosfaat te koppelen aan recombinant humaan interleukine en dit gemodificeerde IL-10 bleek biologische activiteit te vertonen *in vitro*, vergelijkbaar met IL-10 (**Hoofdstuk 6**). Als parameter voor de anti-inflammatoire activiteit gebruikten we de mate van activatie van een macrofaag cellijn en voor de het meten van de anti-fibrotische activiteit van gemodificeerd IL-10 bepaalden we de matrix modulerende activiteit,

d.w.z. de ratio van mRNA spiegels van collagenase (MMP-13) en collagenasereemers (TIMP-1) evenals de collageen depositie in cultures van primaire hepatische stellaat cellen *in vitro*. Door de kleine hoeveelheid eiwit die we in handen hadden konden we het eiwit moeilijk volledig karakteriseren maar we konden wel een duidelijke verandering van het gedrag *in vivo* vaststellen: het gemodificeerde eiwit accumuleerde in tegenstelling tot natief IL-10 in de lever (60% van de dosis versus 25% voor IL-10 zelf). Deze lever opname bleek rembaar met mannose-6-fosfaat-HSA en met negatief geladen HSA waardoor we indirect konden vaststellen dat *in vivo* naar alle waarschijnlijkheid een mannose-6-fosfaat herkende receptor en een scavenger receptor bij de lever opname waren betrokken. Daarnaast is waarschijnlijk een andere receptor betrokken die het conjugaat specifiek herkende maar niet rembaar was door beide eiwitten: hoogstwaarschijnlijk de IL-10 receptor. Uit de literatuur en onze eigen studies was bekend op welke cellen deze receptoren zich bevinden en zo konden we indirect vaststellen dat het gemodificeerde IL-10 werd opgenomen door Kupffer cellen, endotheelcellen en de hepatische stellaat cellen. Een directe detectie van het cytokine in de lever bleek niet mogelijk omdat de kleine hoeveelheid eiwit zich *in vivo* verdeelt over een groot aantal cellen.

In **hoofdstuk 7** hebben we tenslotte bestudeerd of het mannose-6-fosfaat gemodificeerde IL-10 therapeutische effecten bezit *in vivo* in een diermodel voor leverfibrose. Via een gamma-camera konden we een snelle opname van dit IL-10 in fibrotische levers visualiseren en vervolgens zijn we een behandeling gestart. Ratten met leverfibrose geïnduceerd door galgangligatie werden gedurende drie achtereenvolgende dagen behandeld met natief of gemodificeerd IL-10. Daarna werd de ontstekingsactiviteit en het fibrotische proces in de lever gemeten aan de hand van diverse parameters. De resultaten toonden aan dat zowel IL-10 als mannose-6-fosfaat-IL-10 een ontstekingsremmend effect hadden in de lever; er waren minder ontstekingscellen in de lever aanwezig dan in de behandelde groepen. Ook bleken zowel IL-10 als het gemodificeerde IL-10 de activatie van hepatische stellaat cellen te remmen (minder α -smooth muscle expressie) en de collageen depositie te verminderen (o.a. minder collageen depositie). Een dag na injectie van de laatste dosis was er geen effect (meer) op de mRNA niveaus van diverse parameters die het ontstekingsproces dan wel het fibrose proces weerspiegelden. Uit deze data werd geconcludeerd dat IL-10 na modificatie met

mannose-6-fosfaat snel door cellen in de fibrotische lever wordt opgenomen en daar farmacologisch actief is. Hoewel mannose-6-fosfaat IL-10 op enkele punten beter scoorde dan natief IL-10 kan nog niet met zekerheid worden vastgesteld dat het gemodificeerde IL-10 ook effectiever is dan IL-10 zelf. Hiervoor zullen nog additionele dosis-response studies moeten worden uitgevoerd. Ook de bijwerkingen van natief en gemodificeerd IL-10 zullen nog nader vergeleken moeten worden. Feit blijft dat deze studies een eerste hepatische stellaat cel-selectieve cytokine hebben opgeleverd. Deze studies openen nieuwe wegen voor het therapeutisch gebruik van IL-10 en mogelijk ook voor het therapeutisch gebruik van cytokines in het algemeen. Gelet op de effecten van IL-10 in onze en andere studies, biedt dit onderzoek ook nieuwe kansen voor het vinden van een effectief geneesmiddel tegen leverfibrose (**Hoofdstuk 8**).

