

University of Groningen

Angiopoietins in renal replacement therapy

Westendorp, Welmoet Hillegonda

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:
2015

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

Citation for published version (APA):

Westendorp, W. H. (2015). *Angiopoietins in renal replacement therapy*. [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.

Nederlandse samenvatting

Voor patiënten met ernstig chronisch nierfalen is nierfunctievervangende behandeling noodzakelijk. Niertransplantatie is hiervoor de meest effectieve behandeling. Vergeleken met dialyse resulteert transplantatie in minder mortaliteit en een betere kwaliteit van leven. In niertransplantatie zijn donornieren afkomstig van levende of postmortale (overleden) donoren. Postmortale donornieren kunnen afkomstig zijn van hersendode oftewel deceased brain dead (DBD) donoren of van een donor die overleden is aan een hartstilstand, een zogenaamde deceased circulatory dead (DCD) donor. Hoewel nieren afkomstig van levende donoren een betere functie en graft survival (transplantaat overleving) hebben dan nieren afkomstig van postmortale donoren, zijn ze maar beperkt beschikbaar. Ondanks dat de acceptatiecriteria voor postmortale donoren de afgelopen jaren verruimd zijn, is de wachtlijst voor het ontvangen van een donornier de laatste jaren nauwelijks afgenomen. Jaarlijks overlijden honderden patiënten met chronisch nierfalen terwijl ze op de wachtlijst staan omdat er niet op tijd een donornier beschikbaar is. Het is daarom van groot belang het donoraanbod, de orgaankwaliteit en de transplantatie-uitkomst te verbeteren.

Nieren afkomstig van levende donoren hebben een betere graft survival vergeleken met postmortale donornieren. Om het donoraanbod zo volledig mogelijk te kunnen gebruiken zijn er interventies nodig, bijvoorbeeld door hersendood geïnduceerde ontsteking te verminderen, om de transplantatie-uitkomst te verbeteren. De beschreven rol van het Angiopoietine/Tie2-systeem ter plaatse van het endotheel in sepsis en endotoxemie wekte onze interesse gezien de rol van endotheelactivatie in dialyse, de DBD donor en andere aspecten van niertransplantatie.

Angiopoietines zijn groeifactoren die een belangrijke rol spelen bij de vaatnieuwvorming, angiogenese. De receptoren waar ze aan binden, Tie1 en Tie2, bevinden zich op het endotheel, de binnenste bekleding van de bloedvaten. Het endotheel speelt een belangrijke rol in de uitwisseling van stoffen tussen bloed en weefsel. Daarnaast komt het als eerste in contact met circulerende pathogenen. Endotheelactivatie en disfunctie speelt een belangrijke rol bij bloedstolling, inflammatie en verschillende ziektebeelden zoals sepsis. Het is aangetoond dat het Ang/Tie2-systeem een belangrijke rol speelt bij het behouden van de geïnactiveerde ruststaat van het endotheel. Van de vier beschreven angiopoietines is de werking van angiopoietine-1 (Ang1) en angiopoietine-2 (Ang2) het beste gekarakteriseerd. Ang1 en Ang2 binden beide aan Tie2 op een competitieve manier en met vergelijkbare affiniteit. Ang1 wordt continue aangemaakt door pericyten en gladde spiercellen en binding aan Tie2 induceert phosphorylatie wat leidt tot anti-inflammatoire signalen. Daarnaast voorkomt Ang1 op die manier celdood van het endotheel. De competitie door Ang2 voorkomt Ang1 binding aan Tie2 waardoor de inflammatoire respons vergroot wordt en er plasma lekkage ontstaat.

In gezonde individuen is er minimale expressie van Tie2 door endotheelcellen. Weibel Palade bodies, opslagplaatsen in het endotheel, slaan Ang2 op en geven het snel af indien zich een inflammatoire stimulus voordoet. De functies van Ang2 zijn complexer en minder duidelijk dan die van Ang1 en lijken meer afhankelijk te zijn van de context. Eerder klinisch en experimenteel onderzoek heeft aangetoond dat Ang2-geïnduceerde endotheelactivatie een belangrijke rol speelt bij inflammatie, atherosclerose en ernstige ziekte zoals sepsis.

Aangezien endotheelactivatie een belangrijke rol speelt binnen nierfunctievervangende therapie, hebben we in dit proefschrift het Ang/Tie2-systeem onderzocht in dialyse, donatie en transplantatie.

In **hoofdstuk 2** hebben we Ang1 en Ang2 levels onderzocht in 100 hemodialysepatiënten. In het eerste uur van dialyseren zagen we een forse toename van Ang2. Daarnaast was Ang2 geassocieerd met markers van inflammatie en hartschade. Prospectieve analyse liet zien dat Ang2 levels geassocieerd zijn met mortaliteit en cardiovasculaire events. Ang1 bleek niet geassocieerd te zijn met klinische parameters of uitkomst na dialyse. Dit sluit aan op eerder onderzoek naar Ang2 in dialyse dat aantoonde dat Ang2 levels correleren met de mate en ernst van coronaire hartziekten en perifere arterieel vaatlijden. Endotheelactivatie en disfunctie is een kenmerk van patiënten met chronisch nierfalen en patiënten die hemodialyseren. Aangezien endotheeldisfunctie zelf een oorzaak is van Ang2 afgifte door Weibel Palade bodies, speculeren we dat de verhoogde predialyse Ang2 levels een reflectie zijn van endotheelactivatie. Dat wordt onderbouwd door de sterke associatie tussen Ang2 en pro-endotheline levels die we in deze patiënten vonden. Het ophelderen van de verantwoordelijke mechanismes zou als basis kunnen dienen voor toekomstig interventieonderzoek naar het Ang/Tie2-systeem in hemodialyse.

Hoewel er onderzoek is gedaan naar circulerende angiopoietine levels in niertransplantatieontvangers en levende en postmortale donoren, is er nog weinig bekend over de angiopoietine respons tijdens een gehele niertransplantatiecascade, van donor tot ontvanger. Aangezien het is aangetoond dat Ang2 het snelst reageert in pathologische omstandigheden en daarnaast in verschillende ziektebeelden van voorspellende waarde is, hebben we zowel circulerend als arteriovenus Ang2 vanuit de nier onderzocht in niertransplantatie na levende donatie in **hoofdstuk 3**. In zowel de donoren als ontvangers veranderde plasma Ang2 gedurende de operatie vergeleken met de preoperatieve levels. Reperfusie had geen effect op de renale Ang2 afgifte. Dit is in tegenstelling tot een andere studie waar bij levende en DBD transplantatie de renale Ang2 afgifte toenam tijdens reperfusie. Gezien het gebruik van dezelfde assay is een technische verklaring voor dit verschil onwaarschijnlijk. Mogelijk zijn de levende donor populaties niet vergelijkbaar qua mate van endotheelactivatie voorafgaand en tijdens nefrectomie. Om de verschillen tussen transplantatiecentra wat betreft de selectie van levende donoren en

endotheelactivatie gedurende nefrectomie verder te verduidelijken is multicenter Ang2 analyse nodig. De prospectieve associatie tussen circulerend Ang1 en Ang2 met graft failure en mortaliteit in niertransplantatieontvangers is onderzocht in **hoofdstuk 4**. Dit is in lijn met eerder onderzoek waarin Ang2 geassocieerd is met inflammatoire processen en hartschade markers. Ook is het consistent met eerder gepubliceerd onderzoek in een ander cohort van niertransplantatieontvangers waarin Ang2 positief correleerde met CRP. Plasma Ang2 bleek hoger te zijn in niertransplantatieontvangers na postmortale donatie vergeleken met ontvangers van een levende donor. In de niertransplantatieontvangers na postmortale donatie was Ang2 geassocieerd met graft failure en mortaliteit. Dit wordt mogelijk verklaard door een pre-inflammatoire staat van de ontvangers wat bij een risico op orgaanfalen verergerd, weerspiegeld door Ang2-gestuurde endotheelactivatie. Bij niertransplantatie is het grootste aantal donornieren afkomstig van DBD donoren. **Hoofdstuk 5** zoomt in op de morfologische en histopathologische schade in niertransplantatiebiopten veroorzaakt door hersendood. Hoewel onze onderzoeksgroep en anderen de nadelige effecten van hersendood op orgaankwaliteit en graft survival hebben aangetoond is het nog steeds moeilijk om de orgaankwaliteit op moment van donatie vast te stellen. Verschillende pretransplantatie scorings- en predictiemodellen aan de hand van verschillende histopathologische parameters zijn onderzocht. De resultaten hiervan hebben niet tot een eenduidige benadering geleid. Naast de klassieke schademarkers waren wij met name geïnteresseerd in de lymfevatdensiteit (LVD). Hoewel het belang van LVD in de ontwikkeling en progressie van nierziekten en –transplantatie overtuigend is aangetoond, is het nog niet goed onderzocht in pretransplantatie biopten en hersendood. Zoals verwacht lieten pretransplantatie biopten van hersendode donoren een toename in LVD en profibrotische, vasculaire en inflammatoire schade zien in vergelijking met biopten verkregen van levende donoren. Binnen de DBD groep was LVD gecorreleerd met tekenen van vaatlijden zoals hyalinose en met markers van interstitiele schade zoals interstitiele fibrose. Of de toename in LVD de oorzaak of een gevolg is van de vasculaire schade is onbekend. Het zou kunnen dat pathologische verdikking van de vaatwand de normale vasculaire functie inclusief het vloeistoftransport belemmert en daarmee resulteert in een toename van de LVD. Validatie van LVD in het vaststellen van de pretransplantatie nierkwaliteit en de evaluatie of een apart scoringsstelsel voor DBD donoren nodig is zal moeten worden vastgesteld in prospectieve analyse. In **hoofdstuk 6** werd de endogene rol van Ang2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in de postmortale donor en ontvangers van niertransplantatie onderzocht. De associaties tussen Ang2 SNPs en de ontwikkeling van acute longschade en een toename van het risico op acute respiratory distress syndrome (ARDS) zijn naar aanleiding van eerder onderzoek gepubliceerd. Deze resultaten samen met de mogelijkheid van veranderde Ang2 eiwit expressie en effect onder verschillende Ang2 SNPs, en de mogelijke rol

van Ang2 in postmortale donatie en niertransplantatieontvangers, resulteerden in deze genetische Ang2 studie in een niertransplantatie cohort. Ang2 tagging SNPS waren geassocieerd met death censored graft survival bij analyse in zowel donor als ontvanger. Er werd geen associatie met mortaliteit aangetoond. Om de rol van genetisch Ang2 te bevestigen zal de functionaliteit van deze SNPs aangetoond moeten worden aan de hand van replicatieonderzoek. Een overzicht van de hersendoodpathofysiologie en de nadelige effecten op potentiële donornieren is beschreven in **hoofdstuk 7**. We beschrijven de huidige kennis rondom deze onfysiologische status, het effect daarvan op de nierkwaliteit, maar ook potentiële herstelmechanismen en de relevantie daarvan voor de transplantatie-uitkomst. Intracranieële bloeding of traumatische hersenschade zijn meestal de oorzaak van cerebrale compressie wat leidt tot irreversibele cerebrale schade. Uiteindelijk hernieert de hersenstam waardoor de herstenstamreflexen verloren gaan, er een Cushing reflex ontstaat door de catecholamineafgifte, gevolgd door hypotensie en uiteindelijk volledige circulatoir arrest. Door de complete disfunctie van de hypothalamus-hypofyse-as krijgen de meeste patiënten diabetes insipidus als gevolg van het niet meer vrijkomen van ADH (anti-diuretisch hormoon). Kort na het ontstaan van hersendood circuleren er hoge concentraties proinflammatoire cytokines zoals interleukine-6. Hersendood resulteert in endotheelactivatie en toegenomen influx van polymorphonuclear neutrophils (PMNs) en macrofagen in nier, lever en darm. De inflammatoire respons op orgaanniveau vraagt om interventiestrategieën om de graft kwaliteit en survival na DBD donatie te kunnen verbeteren. Het frequent voorkomen van endotoxemie in DBD donoren is aangetoond. Endotoxemie beïnvloedt het Ang/Tie2-systeem door een toename in de vasculaire permeabiliteit te veroorzaken.

Een verstoorde Ang1/Ang2 ratio ten gunste van Ang2 is geassocieerd met een toename in mortaliteit gedurende sepsis terwijl een ratio ten gunste van Ang1 de vasculaire integriteit behoudt en de inflammatoire response dempt. De endotoxemie samen met de overeenkomsten in pathofysiologie tussen hersendood en sepsis maken het Ang/Tie2-systeem een interessant interventiedoel om de nadelige consequenties van hersendood te verminderen. Experimentele studies met recombinant en Ang1 derivaten zoals recombinant humaan Ang1 (rhAng1) en Vasculotide hebben tot veelbelovende resultaten in sepsis in muizen en het beschermen van de volwassen vaten tegen plasmalekkage geleid. Daarom hebben we manipulatie van het Ang/Tie2-systeem onderzocht in drie proof of principle experimenten via twee Ang1 verhogende strategieën en met behulp van een Ang2 remmend antilichaam. In **hoofdstuk 8** onderzochten we de effecten van rhAng1, Vasculotide en de Ang2 remmer AMG 386 in een experimenteel hersendood rat model om op die manier de hersendode donor te simuleren. Hersendode ratten werden behandeld met rhAng1 of een placebo en vergeleken met sham-geopereerde ratten. In een tweede experiment werden hersendode ratten behandeld met Vasculotide of

een placebo. Noch rhAng1, noch Vasculotide behandeling beschermden tegen hersendoodgeïnduceerde inflammatie in rattennieren. Dit zou verklaard kunnen worden door een doserings- of timingprobleem. Mogelijk is Ang1 verhogende therapie voordeliger tijdens hersendood zelf, zodat er onmiddellijke competitie met toegenomen Ang2 plaats vindt. De gebruikte doseringen zijn gebaseerd op eerdere sepsis experimenten in muizen. Hoewel we het verschil in metabolisme en lichaamsgewicht in overweging hebben genomen zouden de gebruikte doseringen te laag kunnen zijn geweest. Daarom kunnen we een potentieel anti-inflammatoir effect bij een hogere dosering niet uitsluiten. Real-time PCR liet een opmerkelijke afname in Tie2 mRNA expressie zien in de hersendode ratten. Dit zou een andere mogelijke verklaring kunnen zijn waarom het Ang/Tie2-systeem niet gunstig werd beïnvloed door exogene toediening van deze Ang1 derivaten. Onze analyses laten geen afdoende resultaten zien of het Ang/Tie2-systeem daadwerkelijk werd beïnvloed ten gunste van Ang1 bij deze doseringen, al maken de mRNA expressie resultaten dit hoogst onwaarschijnlijk.

Hoewel de meerderheid van de preklinische studies over pathofysiologische condities die vergelijkbaar zijn met hersendood voornamelijk Ang1 verhogende interventiestrategieën hebben gebruikt, is de recente literatuur meer gefocust op Ang2 als de meest dynamische component van het Ang/Tie2-systeem in endotheelactivatie. Er zijn veelbelovende resultaten gepubliceerd over anti-Ang2 therapie in verschillende preklinische modellen waaronder een studie over hart allografts uit ratten. Daarom hebben we in een derde experiment onderzocht of Ang2-remming hersendoodgeïnduceerde inflammatie zou kunnen verminderen in het hersendood rat model. Deze studie was opgezet als een pilot met een enkele dosering van een anti-Ang2 antilichaam welke geen invloed had op systemisch Ang2. Daarnaast vonden we geen afname in systemisch of renale inflammatie in de hersendode ratten behandeld met dit antilichaam vergeleken met hersendode ratten die behandeld werden met een placebo. Door middel van een doseringstitratie studie met exogeen Ang1 of een Ang2-remmer zouden we kunnen achterhalen welke doseringen gebruikt zouden moeten worden in toekomstige experimenten. Hierna zou een experiment waarin Ang/Tie2-interventie in een hersendood tijdsreeks onderzocht wordt, ons in staat stellen definitievere conclusies omtrent een mogelijke rol van het Ang/Tie2-systeem in hersendood te trekken. Ofschoon de resultaten van onze pilots over Ang/Tie2-interventie in hersendood geen definitieve conclusies geven over Ang/Tie2-manipulatie in hersendood, zou Tie2 behoud een ander interessant doel kunnen zijn om hersendoodgeïnduceerde inflammatie te verminderen aangezien we een aanzienlijke afname in Tie2 mRNA expressie vonden in hersendode ratten en een trend in verminderde Tie2 eiwitexpressie in BD muizen. Voordat medicijnen die Tie2-afname voorkomen verder onderzocht worden dient de afname in renale Tie2 expressie bevestigd te worden in humane DBD donoren. Niet alleen systemische

behandeling van de donor maar ook Ang/Tie2-manipulatie gedurende de preservatieperiode zou voordelig kunnen zijn om de orgaankwaliteit te behouden en de functie in de ontvanger te verbeteren.

Alle resultaten van de hierboven beschreven studies zijn samengevat en worden bediscussieerd in **hoofdstuk 9**. Dit proefschrift laat zien dat het Ang/Tie2-systeem aan veranderingen onderhevig is voor, gedurende en na niertransplantatie, vooral in de hersendode donor. De endotheelactivatie in hemodialyse, nierdonor en -ontvanger zou weerspiegeld kunnen zijn door de veranderde angiopoietinelevels. De veranderde activatie van angiopoietinepathways zou echter een rol kunnen spelen in de verdere achteruitgang van endotheelfunctie in dialyse en transplantatie. Daarbij verandert de rol van dit systeem mogelijk van biomarker naar oorzakelijke factor in vasculaire schade. Onze studies laten zien dat verder therapeutisch interventieonderzoek naar het Ang/Tie2-systeem in (celkweek)experimenten nodig zijn. Deze zouden uiteindelijk de basis kunnen vormen voor de opzet van klinisch Ang/Tie2-therapie onderzoek in dialyse en niertransplantatieontvangers.

