

VU Research Portal

Restoring the balance of the pulmonary endothelium

Rol, N.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Rol, N. (2020). *Restoring the balance of the pulmonary endothelium: the silver lining in PAH?*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

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.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Chapter 11

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

De diagnose Pulmonale Arteriële Hypertensie (PAH) wordt gesteld als de gemiddelde druk in de pulmonale arterie (longslagader) hoger is dan 25 mmHg en andere oorzaken van een verhoogde druk in de pulmonale arterie zijn uitgesloten. De chronisch verhoogde druk zorgt ervoor dat het rechter ventrikel van het hart harder moet pompen. Dit kan uiteindelijk leiden tot dysfunctie van het rechter ventrikel, met hartfalen en overlijden tot gevolg. De WHO classificatie van PAH (hoofdstuk 1, tabel 1), die is gebaseerd op etiologische waarnemingen, laat zien dat een grote verscheidenheid aan oorzaken bijdraagt aan deze aandoening. Voorgaand onderzoek waarin PAH in dieren geïnduceerd wordt, laten zien dat er niet een alleenstaande oorzaak van PAH is, maar dat verschillende 'hits' nodig om de vaatafwijkingen die typisch zijn voor PAH te verkrijgen. Hetzelfde geldt waarschijnlijk voor patiënten met PAH, gezien zelfs de meest bekende en onderzochte mutatie van erfelijke PAH, in het gen Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 (BMPR2), maar in 20% van de gevallen leidt tot ziekte. Naast genetische mutaties is bekend dat veranderde bloedstroom, medicatie en toxinen, groeifactoren circulerend in het bloed, inflammatie, neurohormonale activatie, metabole veranderingen en vasoreactieve mediators een rol kunnen spelen in de pathogenese (hoofdstuk 10, figuur 1). Dit resulteert in de voor PAH karakteristieke vasculopathie in de longen gekenmerkt door 'plexiform lesions' (figuur 1D, hoofdstuk 5), muscularisatie van de perifere vaten, mediale hypertrofie en vorming van neointima (hoofdstuk 1, figuur 2). Huidig voorgeschreven medicatie voor PAH werkt allemaal (deels) op endotheliale dysfunctie die een sleutelrol speelt in de occlusieve remodelering en verhoogde tonus van de longvaten (hoofdstuk 2, figuur 2). De pathofysiologie van oorzaken en celdysfunctie is reeds uitgebreid bestudeerd, maar wordt nog niet geheel begrepen (hoofdstuk 10, figuur 1). Het onderzoek hiernaar wordt bemoeilijkt door factoren die zowel als initiërende als onderhoudende factor kunnen fungeren. Zo kan veranderde bloedstroom leiden tot remodelering van de vaten, maar deze remodelering zelf kan ook weer zorgen voor veranderde bloedstroom. De pathofysiologie van PAH zou omschreven kunnen worden als een vicieuze cirkel van remodelering en veranderde bloedstroom.

Effecten van veranderde bloedstroom op remodelering van de vaten

Endotheelcellen, die de binnenkant van bloedvaten bekleden en de intima vormen, worden continu blootgesteld aan wrijvingskrachten (shear stress) die het bloed uitoefent op de vaatwand. De invloed van veranderde bloedstroom op de pathofysiologie van PAH is bestudeerd aan de hand van modeltechnieken die deze krachten visualiseren en het nabootsen in celweef. In **hoofdstuk 3** hebben wij het effect van verhoogde bloedstroom na pneumonectomie in ratten bestudeerd. In

hoofdstuk 4 hebben we die bevindingen vergeleken met humaan longweefsel van patiënten die een pneumonectomie hebben moeten ondergaan wegens longkanker en enkele jaren met één long hebben geleefd. In beide studies was een pneumonectomie gerelateerd aan zeer minimale structurele veranderingen van de vaten. Een aantal patiënten lieten trombotische arteriopathie zien, een gebruikelijke bevinding in PAH. Hoewel er een verhoogde proliferatie van endotheelcellen werd gevonden na pneumonectomie, waren er geen structurele veranderingen in de intima van de longvaten van ratten als patiënten. Het ratmodel toont dat er naast pneumonectomie een tweede 'hit' met remming van groeifactoren nodig is om zowel proliferatieve als pro-apoptotische signalering te verkrijgen die leidt tot ernstige angio-obliteratieve pulmonale hypertensie (PH). Dit bevestigt dat een veranderde bloedstroom kan bijdragen, maar op zichzelf onvoldoende is om structurele veranderingen te veroorzaken in de longvaten.

Bijdragen van vaatremodelering aan pulmonale vaatweerstand

Hoewel vasodilerende medicatie een beperkt effect heeft op de progressie van PAH, wordt vasoconstrictie, het samenknijpen van de longvaten, gezien als de meest geaccepteerde oorzaak van de verhoogde pulmonale vaatweerstand (PVR) in PAH. Het PH ratmodel waarbij waarbij Sugen (een angiogenese remmer) gecombineerd wordt met pneumonectomie in plaats van de gebruikelijke combinatie van Sugen met hypoxie (SuHx), laat zien dat hypoxische vasoconstrictie geen verplichte hit is voor de ontwikkeling van pulmonale hypertensie. Er wordt verondersteld dat concentrische remodelering van de pulmonaalvaten minimaal bijdraagt aan de verhoogde PVR, omdat alleen de minderheid van de patiënten een substantiële drukdaling laten zien na blootstelling aan acute vasodilatoire middelen. De huidig beschikbare informatie omtrent remodelering van de longvasculatuur is vaak beperkt tot gemiddelde wanddikte van alle kleine longvaten. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 5** de remodelering van verschillende grootte longvaten gemeten om de invloed van deze verandering op de weerstand te berekenen. Hoewel wordt aangenomen dat verhoogde PVR in PAH wordt verklaard door structurele veranderingen in de meeste, zo niet alle, kleine pulmonaalvaten, lieten onze metingen een ander beeld zien. Allereerst observeerden wij dat de meerderheid van de vaten in longen van PAH patiënten (70%) geen afname van de binnendiameter hadden. Ten tweede varieerden de grootte van de vaten en de afname van de diameter sterk. Ten derde lieten onze berekeningen zien dat het maximale effect dat remodelering van 30% van de vaten een toename van 40% in PVR kunnen verklaren. Dit zou resulteren in een PVR van ongeveer $140 \text{ dynes}\cdot\text{cm}^{-5}$ wanneer men uitgaat van een normaalwaarde onder de $99 \text{ dynes}\cdot\text{cm}^{-5}$. Dit is bij lange na niet de $857 \text{ dynes}\cdot\text{cm}^{-5}$ die gemiddeld gemeten werd in onze patiëntengroep. Mogelijke zijn er andere factoren naast vasoconstrictie en remodelering van de vaten

die bijdragen aan een verhoogde PVR. Zo zou afname van vaten (rarefaction), waarvan aangetoond is dat dit bijdraagt aan rechterventrikeldysfunctie in PH, de PVR in de long kunnen beïnvloeden. Ook zou veneuze betrokkenheid een verklaring kunnen zijn. Als verschillende factoren van invloed zijn op de PVR, zou dit van betekenis kunnen zijn voor nieuwe therapeutische mogelijkheden.

Endotheel dysfunctie als doelwit van therapie in PAH

De toename van kennis over de pathofysiologie van PAH zou kunnen leiden tot nieuwe behandelstrategieën. Met het oog op relevante therapeutische mogelijkheden hebben wij ons voornamelijk gefocust op endotheliale dysfunctie. Een voorbeeld van gebrekkige sensitiviteit van endotheelcellen in PAH kan worden afgeleid uit cilia; zintuigelijke antennes die verantwoordelijk zijn voor signalering en het aanpassen van reacties in endotheelcellen. Voorgaande onderzoeken naar de rol van cilia in verschillende celtypen laten effecten zien in reactie op schade, regulatie van sensitiviteit en differentiatie van cellen. Ook zijn cilia de mechanosensoren van shear stress van het bloed op de vaatwanden. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat cilia in gezonde endotheelcellen van de long reageren op inflammatoire cytokinen door te verlengen. Dit kan geremd worden door de toevoeging van IL-10 en NF- κ B remmers. Endotheelcellen van PAH patiënten laten voor stimulatie al verlenging zien, die niet reageert op pro- of anti-inflammatoire behandeling. Dit kan verklaard worden door aanhoudende cytokine productie of een bijdragend mechanisme onafhankelijk van inflammatoire signalering, zoals metabole veranderingen. Shear stress, van belang in PAH zoals hierboven beschreven, zorgt in endotheelcellen van PAH patiënten zelfs voor verdere verlenging van de cilia, wijzend op een defect in de reactie op mechanische verandering. Voorgaande studies lieten zien dat expositie van cilia aan shear stress leidt tot activatie van Transforming Growth Factor (TGF)-beta signalering, mogelijk leidend tot endotheliale naar mesenchymale transitie (Endo-MT). Endo-MT is een proces waarvan recentelijk bekend is geworden dat het bijdraagt aan vaat remodelering in PAH. Toekomstig onderzoek moet uitwijzen wat de rol is van veranderde cilia lengte van pulmonale endotheelcellen en hun bijdrage aan endotheliale dysfunctie in de pathogenese van PAH.

Sinds de ontdekking in 2000 dat BMP2 mutaties erfelijke PAH veroorzaken, is er veel onderzoek gewijd aan het 'TGF-beta/BMP pathway'. In verschillende subtypen van PAH draagt verhoogde signalering van TGF-beta en verlaagde signalering van BMP bij aan endotheliale dysfunctie. De complexiteit van dit pathway, beschreven in **hoofdstuk 7**, wordt benadrukt door contrasterende onderzoeksresultaten. Zo kan enerzijds een BMP9 missense mutatie PAH veroorzaken, maar laat anderzijds een knockdown van BMP9 in diermodellen een beschermend effect tegen PAH zien. Niet alle hits zijn inwisselbaar met elkaar en sommige hits zijn sterker dan andere om PAH te

veroorzaken, dan wel te verergeren. In **hoofdstuk 8** hebben we het effect van BMP9 op het fenotype van verschillende soorten endotheelcellen (uit perifere bloed, pulmonale arterie en pulmonale microvasculatuur) getest en de potentiële therapeutische waarde bestudeerd. Microvasculaire endotheelcellen van PAH patiënten laten de sterkste reactie op BMP9 stimulatie zien, met aanhoudend verhoogde activatie van TGF-beta signalering door verlies van remming in endotheelcellen. Dit proces wordt ook gereguleerd door inflammatoire cytokines, bevestigd door de preventieve werking van interleukine-6 (IL-6) inhibitie. Voorzichtigheid is geboden bij het gebruik van BMP9 als medicatie in PAH vanwege het verlies van antagonistische effecten in de TGF-beta en BMP signalering en het zal mogelijk moeten worden gecombineerd met behandeling gericht op IL-6.

Verstoorde signalering in endotheelcellen van PAH patiënten is ook van belang voor behandelingen gericht op groeifactoren, zoals besproken in **hoofdstuk 9**. Hoewel proliferatie van gezonde endotheelcellen wordt geremd door nintedanib, een tyrosinekinase remmer gericht op VEGF, PDGF, FGF en TGF-beta signalering, wordt dit effect niet gezien in PAH endotheelcellen. Er werd ook geen effect van nintedanib geobserveerd op vaatremodelering in longweefsel van SuHx ratten. Wel vonden wij onverwacht een verbetering op rechterventrikel dilatatie, mogelijk door fibrose remming in het hart. Deze studie suggereert dat nintedanib, een medicament goedgekeurd voor patiënten met idiopathische pulmonale fibrose (IPF), veilig kan worden gebruikt in de context van pulmonale hypertensie geassocieerd met IPF.

Toekomstperspectieven

De resultaten van de gepubliceerde onderzoeken in deze thesis hebben geleid tot nieuwe inzichten die weer nieuwe vraagstukken aankaarten voor toekomstig onderzoek. De druk in de pulmonale arterie is verhoogd in een derde van de patiënten na een pneumonectomie. Zoals beschreven in hoofdstuk 3 en 4, vonden wij minimale veranderingen in de pulmonale vasculatuur in ons ratmodel en longweefsel van patiënten na een pneumonectomie. Welke rol de veranderde bloedstroom exact speelt in de pathogenese van pulmonale hypertensie, kan uitgezocht worden door in ratten een pneumonectomie te combineren met andere hits. Met name de invloed op Endo-MT en specifieke interacties tussen proliferatie en apoptose in endotheelcellen kunnen interessant zijn. Om verder te onderzoeken welke aanvullende hits van belang zijn in combinatie met shear stress, moet het longweefsel van patiënten na pneumonectomie die een verhoogde druk in de pulmonale arterie ontwikkelen verder onderzocht worden.

In hoofdstuk 5 komt de heterogeniteit van de vaatremodelering in PAH sterk naar voren. De hoge drukken in de pulmonale arterie bij PH patiënten kan niet alleen

verklaard worden door vasoconstrictie en concentrische remodelering in de pulmonale vasculatuur. Rarefaction is een vaak bediscussieerd fenomeen in het onderzoeksveld van PAH. Er is bewijs van afname van vaten in hartweefsel van PAH patiënten, maar het voorkomen hiervan in de longen blijft controversieel. Een belangrijke studie die in de toekomst zal moeten plaatsvinden is het visualiseren van de gehele aangedane pulmonale circulatie tot aan de capillairen. Deze benadering, tot op heden alleen geprobeerd middels micro-CT in ratweefsel, zal technische moeilijkheden met zich mee brengen gezien de weefseleigenschappen van de longen en limitaties in afbeeldingsresolutie. Aanvullend, is het van belang de mogelijkheid te bestuderen of veneuze pathologie bijdraagt aan de verhoogde PVR in PAH, gezien dit bijdraagt aan pulmonale hypertensie gerelateerd aan linkerhartfalen. Het is aangetoond dat capillaire drukken verhoogd zijn in PAH, wat een verhoogde veneuze druk suggereert. Veneuze weerstand is ook betrokken bij chronische trombo-embolische pulmonale hypertensie. Wij veronderstellen dat in aanvulling op andere vormen van pulmonale hypertensie veneuze weerstand ook een rol kan spelen in PAH.

De betekenis van een pro-inflammatoire omgeving van microvasculaire endotheelcellen in PAH is besproken in hoofdstuk 7 en 8. In de context van cilia gelokaliseerd op de endotheelcellen, lieten wij een afwezige response op inflammatoire cytokinen en remming met IL-10 en NFkB zien op permanent verlengde cilia in PAH. Ook wordt de reactie van het endotheel op nieuwe therapeutische middelen, zoals BMP9, in PAH negatief beïnvloed door inflammatie. Endotheelcellen van PAH patiënten gestimuleerd met BMP9 laten inductie van transcriptie factoren voor endo-MT zien, wat geremd kan worden met een antilichaam dat IL-6 wegvangt in de circulatie. IL-6, een pro-inflammatoire cytokine die is verhoogd in PAH en correleert met prognose, lijkt een veelbelovende therapeutische doelwit in PAH. Recent onderzoek toont aan dat ratten met een BMP2 mutatie die spontaan pulmonale hypertensie ontwikkelen, zich onderscheiden van degene die dat niet ontwikkelen door IL-6 overexpressie. Toekomstige studies zouden het precieze mechanisme waarmee IL-6 invloed uitoefent op het TGF-beta/BMP pathway en de effecten van modulatie hiervan op de long vasculatuur moeten uitwijzen.

Pulmonale arteriële hypertensie is een complexe groep aandoeningen die wordt veroorzaakt door een combinatie van hits wat uiteindelijk leidt tot een zogenaamd 'final common pathway' die niet gestabiliseerd of genezen kan worden door één alleenstaand medicijn. Toekomstige behandelstrategieën moeten gericht zijn op meerdere pathogene paden, waarmee een combinatie van verschillende medicatie onvermijdelijk lijkt.