

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33100> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Dane, Martijn

Title: Structure and function of the endothelial glycocalyx in the microcirculation

Issue Date: 2015-06-02

8

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift staat de endotheliale glycocalyx centraal. Hoofdstuk 1 is een algemene introductie, waarin de compositie en functie van de glycocalyx algemeen in zowel alle vaten, als meer specifiek in de glomerulus van de nier beschreven wordt. De glycocalyx is een vaat-beschermende gel-achtige laag tussen het stromende bloed en de vaatwand. Deze laag bevat eiwitten met vele suikerketens, vandaar de naam glycocalyx, (glykys = zoet, kalyx = schil). Deze suikerketens kunnen eiwitten binden en deze zo efficiënter bij de specifieke receptor op de doelcel brengen, of juist ver van deze receptor houden. Wanneer de endotheelcel geactiveerd raakt, bijvoorbeeld tijdens ontstekingen, veranderen deze bindingsplaatsen zo dat andere eiwitten uit het bloed (bijvoorbeeld eiwitten die ontsteking bevorderen) hier kunnen binden en hun effect kunnen uitoefenen op de cel. Aangezien de endotheelcel continu in direct contact staat met het bloed, is de glycocalyx betrokken bij bijna alle functies van het endotheel. In eerdere studies is aangetoond dat de glycocalyx beschermt tegen ontsteking, stolling en de ontwikkeling van eiwitlekage. Een beschadigde glycocalyx kan daarom leiden tot hart en vaatziekten, maar ook tot (indirecte) schade in andere organen, zoals in de nier. In dit proefschrift hebben we de compositie van de endotheliale glycocalyx in endotheelcellen bestudeerd. Vervolgens hebben we meer specifiek de rol van de glycocalyx in de filterfunctie van de nier onderzocht. Uiteindelijk hebben we gekeken naar glycocalyx schade bij patiënten met nierfalen.

In Hoofdstuk 2 hebben we de huidige technieken voor het detecteren van de glycocalyx beschreven. Dit zijn vooral visualisatietechnieken zoals elektronenmicroscopie en fluorescentiemicroscopie. In dit hoofdstuk beschrijven we ook SDF visualisatie van de microcirculatie en daaropvolgende schatting van veranderingen in de dikte van de glycocalyx. Dit gebeurt door het meten van de zijwaartse verplaatsing van rode bloedcellen, die gevisualiseerd worden doordat hemoglobine (in rode bloedcellen) het licht van de SDF camera absorberen. Wanneer de glycocalyx beschadigd is, kunnen rode bloedcellen dichter bij het endotheel komen en zich dus verder zijwaarts verplaatsen. Het grote voordeel van deze techniek is dat het mogelijk is om de glycocalyx non-invasief te meten zonder de laag uit de in vivo omgeving te halen. Dit maakt het een veelbelovende techniek voor studies naar de mogelijkheid tot het gebruiken van glycocalyx schade als vroege marker voor vasculaire schade in patiënten. Voor meer specifieke studies naar de compositie en functie van de glycocalyx zijn microscopie en specifieke kleuringen echter nog steeds de best mogelijke techniek. De glycocalyx is echter een instabiele en dynamische laag, waardoor het lastig is deze laag intact te houden buiten het lichaam. Ondanks deze uitdagingen hebben de specifieke kleuringen geleid tot inzichten in de compositie en functie van de verschillende componenten in de glycocalyx.

In hoofdstuk 3 hebben we deze compositie en functie van de glycocalyx *in vitro* bestudeerd. In eerdere studies is gebleken dat de glycocalyx dunner en minder functioneel is in cellen die *in vitro* (buiten het lichaam) gekweekt zijn. Deze cellen missen vele factoren vergeleken met de in vivo (in het lichaam) situatie, waarvan stromend bloed een van de meest cruciale

is. Eerder was al beschreven dat endotheel cellen die gekweekt worden in een omgeving waarbij medium over de cellen stroomt meer lijken op de cellen in bloedvaten. In dit hoofdstuk laten wij zien dat de glycocalyx in de cellen waarover medium stroomt dikker en dichter is dan in cellen waarbij dit niet is gebeurd. Verder laten we zien dat binnen de glycocalyx specifieke eiwitbindingsplaatsen in de heparan sulfaten veranderen. Deze veranderingen zorgen ervoor dat de endotheellaag minder inflammatoire cellen bindt na een inflammatoire stimulus. In dit hoofdstuk laten we dus zien dat stromend bloed ervoor zorgt dat zowel de cellen als de glycocalyx meer gezonde kenmerken krijgen. Als gevolg zou je kunnen speculeren dat vaten met een verstoorde bloedflow (bijvoorbeeld op plaatsen waar atherosclerose plaats vindt) niet alleen een ongezonde endotheelcel maar ook een beschadigde glycocalyx hebben.

In hoofdstuk 4 hebben we de rol van de glycocalyx in de filterfunctie van de nier bestudeerd. Meer specifiek hebben we gekeken naar de rol van een van de suikercomponenten van de glycocalyx: hyaluronan. Wij denken dat de glycocalyx een barrière vormt voor grote eiwitten, terwijl het water en kleinere moleculen doorlaat. Op deze manier zorgt de glycocalyx ervoor dat belangrijke eiwitten en cellen in het bloed behouden blijven. Hyaluronan heeft een belangrijke functie in deze barrière. Het is namelijk al langer bekend dat een gel-achtige laag van hyaluronan makkelijker kleine dan grote stoffen doorlaat. Om dit te onderzoeken hebben we muizen een maand lang een constant infuus van kleine hoeveelheden hyaluronidase, een enzym wat hyaluronan afbreekt, gegeven. Vervolgens hebben we gekeken naar het effect op de glycocalyx en het effect op de filtratie barrière in de nier. Ten eerste zagen we dat vooral de glycocalyx in de fenestrae (gaten in de endotheelcellen waardoor vloeistoffen de filtratie barrière kunnen passeren) verdwenen was na behandeling met hyaluronidase. Hoewel we geen verhoging van albumine terug konden vinden in de urine, zagen we wel degelijk dat albumine de filtratie barrière gepasseerd was. Dit geeft aan dat de verstoring van de glycocalyx door het afbreken van hyaluronan leidt tot een verslechtering van de filtratie barrière. Ook zagen we dat albumine voorbij de filtratie barrière gebonden was aan podocyten, wat samenging met een lichte verhoging van schademarkers aan deze podocyten. Dit wekt de suggestie dat podocyten beschadigd raken, mogelijk doordat relatief grote hoeveelheden albumine gebonden worden. Deze data impliceert dat beschadiging van glycocalyx het begin in de ontwikkelin van uiteindelijke nierschade kan zijn. Dit kan bijvoorbeeld zo zijn bij de ontwikkeling van nierfalen als gevolg van suikerziekte, een ziekte waarin enkele studies aangetoond hebben dat de glycocalyx beschadigd raakt.

Vervolgens hebben we naar glycocalyx-schade als marker voor (beginnende) vaatschade gekeken. In hoofdstuk 5 hebben we de glycocalyx-dikte gemeten met de eerder beschreven SDF camera in patiënten voor en na een niertransplantatie. Hier zagen we een vermindering van de dikte van de glycocalyx in patiënten met nierfalen vergeleken met gezonde controles. Na succesvolle niertransplantatie was de glycocalyx weer hersteld naar waardes zoals gemeten in gezonde controles. Na een minder succesvolle transplantatie was dit herstel niet te zien. De met de SDF gemeten glycocalyx-diktes



correleerden met circulerende glyocalyx afbraak-markers (syndecan, sTM), endotheel-activatiemarkers (Ang-2) en markers voor nierschade (GFR). Dit geeft duidelijk aan dat samen met endotheel activatie, de endotheliale glyocalyx ook beschadigd is in patiënten met nierfalen. Aangezien verwacht wordt dat schade aan de glyocalyx vooraf gaat aan vasculair en mogelijk ook renaal falen, is het meten van de endotheliale glyocalyx met een SDF camera een veelbelovende manier om op een non-invasieve manier de vasculaire (glyocalyx) status te monitoren. Hoewel meer studies nodig zijn, zou het een manier kunnen zijn om het risico op cardiovasculair- en mogelijk zelfs nierfalen te voorspellen.

Een studie met als uiteindelijke doel om uit te zoeken of dit inderdaad mogelijk is, is beschreven in hoofdstuk 6. De hier beschreven NEO studie, bestaat uit personen met een gemiddeld tot hoge BMI. Op basis hiervan hebben deze personen een hoger risico op cardiovasculair falen. Hoofdstuk 6 beschrijft de studie en de eerste basismetingen van de glyocalyx met SDF. Uiteindelijk worden deze patiënten vervolgd, zodat mogelijke complicaties op kunnen treden en gekeken kan worden naar de voorspellende waarde van de SDF metingen. Hoewel deze data nog niet beschikbaar is, vonden we wel een interessante correlatie tussen glyocalyx dikte en de perfusie van de gemeten vaten. Ondanks dat we nog geen vervolgmetingen hebben kunnen doen, zou de combinatie van dunnere glyocalyx en verslechterde perfusie al een hint kunnen zijn richting aangetaste microvaten. Toekomstige data moet uitwijzen of dit inderdaad zo is en of vervolgens de schattingen van de glyocalyx dikte aan de hand van metingen met de SDF camera gebruikt kunnen worden om cardiovasculair risico te voorspellen en zo preventief in te kunnen grijpen bij ogenschijnlijk gezonde personen.

Hoofdstuk 7 is een samenvatting en uitgebreide interpretatie van de data die in dit proefschrift beschreven is.



Curriculum Vitae

The author of this thesis was born on September 21, 1986, in Roosendaal, the Netherlands. After completing secondary education, VWO, in 2004, he started with the bachelor study Molecular Life Sciences in Maastricht. He continued with the master Clinical Molecular Sciences in Maastricht. During this master he completed two research projects. The first internship was at the department of tumor immunology, a project about haploidentical NK cells as a treatment for breast cancer. The second one was at the department of physiology, a project about the role for the endothelial glycocalyx in regulation of insulin sensitivity. In 2009, after he received his M.Sc. in Clinical Molecular Sciences, he started as PhD student in the department of Nephrology, Leiden University Medical Centre, under the supervision of dr. van den Berg and prof. A.J. Rabelink and the department of Physiology, Maastricht University, under the supervision of dr. H. Vink. This PhD project was funded by the Dutch kidney foundation and was titled: Role of the endothelial glycocalyx in renal glomerular and tubular function. The obtained data resulted in several publications in peer-reviewed international scientific journals and are shown in this thesis. In March 2014 he worked on a project to study the role of the glycocalyx in vascular drug adhesion. From December 2014 on he started the training to become a clinical chemist at LabWest in the Haga Ziekenhuis in the Hague, the Netherlands.

List of Publications

A Microscopic view on the Renal Endothelial Glycocalyx

Martijn J.C. Dane, Bernard M. van den Berg, Dae Hyun Lee, Margien G.S. Boels, Gesa Tiemeier, M. Cristina Avramut, Anton Jan van Zonneveld, Johan van der Vlag, Hans Vink, Ton J. Rabelink

American Journal of Physiology Renal Physiology, 2014

The Endothelial Glycocalyx: Scratching the Surface for Cardiovascular Disease in Kidney Failure.

Martijn J.C. Dane, Bernard M. van den Berg, Ton J. Rabelink

Commentary in Atherosclerosis, 2014

Deeper Penetration of Erythrocytes into the Endothelial Glycocalyx is Associated with Impaired Microvascular Perfusion.

Dae Hyun Lee, **Martijn J.C. Dane**, Bernard M. van den Berg, Margien G. S. Boels, Jurgen W. van Teeffelen, Renee de Mutsert, Martin den Heijer, Frits R. Rosendaal, Johan van der Vlag, Anton Jan van Zonneveld, Hans Vink, Ton J. Rabelink, for the NEO study group.

PlosOne, 2014

Association of Kidney Function with Changes in the Endothelial Surface Layer.

Martijn J.C. Dane, Meriem Khairoun, Dae Hyun Lee, Bernard M. van den Berg, Bart J.M. Eskens, Margien G.S. Boels, Jurgen W.G.E. van Teeffelen, Angelique L.W.M.M. Rops, Johan van der Vlag, Anton Jan van Zonneveld, Marlies E.J. Reinders, Hans Vink, Ton J. Rabelink

Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2013

The Endothelial Glycocalyx as a Potential Modifier of the Hemolytic Uremic Syndrome.

Boels MG, Lee DH, van den Berg BM, **Dane MJC**, van der Vlag J, Rabelink TJ.

European Journal of internal medicine, 2013

Glomerular Endothelial Surface Layer acts a Barrier against Albumin Filtration.

Martijn J.C. Dane, Bernard M. van den Berg, M. Cristina Avramut, Frank G.A. Faas, Johan van der Vlag, Angelique L.W.M.M. Rops, Raimond B.G. Ravelli, Bram J. Koster, Anton Jan van Zonneveld, Hans Vink, Ton J. Rabelink

American Journal of Pathology, 2013



Dankwoord

Er zijn vanzelfsprekend veel mensen die ik wil bedanken. Op verschillende manieren heeft iedereen binnen de afdelingen Nierziekten en het Eindhoven Laboratorium een bijdrage geleverd aan dit proefschrift. Daarnaast is de samenwerking met de Pathologie, MCB en de Nefrologie in Nijmegen erg fijn geweest. Zonder jullie was dit proefschrift op zijn minst veel dunner geweest.

Ton, allereerst wil ik jou bedanken voor alle hulp en begeleiding gedurende het glycolalyx-onderzoek in Leiden. Ik heb gedurende mijn tijd in het LUMC veel van je geleerd over onderzoeks-opzet, gestructureerd schrijven en organisatie. Bernard, jou wil ik natuurlijk bedanken voor de ‘bevrijding’ uit Maastricht. Ik heb geen seconde spijt gekregen van mijn keuze om mee naar Leiden te gaan. Bedankt voor de dagelijkse begeleiding, het doorzetten van onderzoek wanneer ik al vroegtijdig teleurgesteld afgehaakt was en het delen van jouw kennis over ongeveer alles.

Hans, de afgelopen 10-15 jaar zijn glycolalyx en Hans Vink bijna synoniemen geworden. De communicatie tussen Maastricht en Leiden was soms wat lastig, maar natuurlijk wil ik je heel erg bedanken voor alle uitleg en discussie. Anton-Jan, bedankt voor het feit dat Bernard en ik met ons onbekende onderwerp (‘glycolalyx, wat is dat?’) zo gastvrij opgenomen zijn in jouw onderzoeksgroep. Jurgen, door jouw enthousiasme ben ik begonnen met een onderzoeksstage naar de glycolalyx bij de afdeling fysiologie in Maastricht. Ik weet nog dat ik 10 minuutjes langs zou komen voor wat informatie en uiteindelijk na 30 minuten een MRI-scanner voor proefdieren aan de andere kant van het gebouw stond te bekijken. Jurgen, Bart, bedankt!

Het LUMC: ik kwam er voor mijn eerste werkdag zonder er ooit geweest te zijn. Hier kwam ik terecht in de glycolalyx-groep, toen bestaande uit.. Bernard. Later kwamen er enkele geweldige collega’s bij! Cristina, bedankt voor je hulp met alle EM plaatjes. Het zijn de mooiste figuren in mijn proefschrift. Wendy bedankt voor alle hulp in het laatste jaar. DaeHyun! I really enjoyed working with you! Thanks for the coffeebreaks: and discussing our latest progress (or fungus, SDF and cell culture). Margien bedankt voor alles: hulp, discussie en gezelligheid binnen en buiten het lab. Johan, Angelique, ondanks de afstand tot Nijmegen voelde het alsof jullie ook binnen de ‘glycolalyx-groep’ Leiden hoorden: bedankt!

In het LUMC begon ik in een afgelegen hok in het midden van het ziekenhuis, waar dag, nacht of frisse lucht niet leken te bestaan. Gelukkig werd er door de vele kamergenoten voor gezorgd dat het er altijd gezellig was. Er was altijd wel iemand om frustratie of vooruitgang mee te delen. Hierdoor voelde het altijd alsof ik naar het LUMC kwam voor de gezelligheid... en om te werken. De alhier opgedane kennis en kunde door Escape-the-Room en Sporcle zijn onmisbaar gebleken voor mijn verdere carrière. Coen: bedankt voor alle diepgaande discussies over cruciale randzaken. Ik zie je nog wel een keer in New York! Eric, als jij begint te praten, blijf je praten: altijd gezellig! Ik mis onze maandagochtend bespreking al. Roel, door jou heb ik geleerd dat er ook goede Rotterdammers zijn... Mooi om op C7 dagelijks jouw goede slechte humor mee te maken. Ruben, jij staat altijd

voor iedereen klaar. Altijd fijn om met jou de vorderingen in en om het onderzoek te bespreken. Ik zie je op de tennisbaan! Hetty, bedankt voor alle hulp in en om het lab! Ik zal de bloedplaatjes nooit meer vergeten... Meriem, Annemarie, Janine, Marina, Jac, Marko, Danielle, Ellen, Nicole, Taya, Carolien, ChunYu, Jonna, Jurrien, Carla; bedankt! Natuurlijk geldt dit ook voor de rest van de afdeling nierziekten en het Eindhoven lab: bedankt voor voor alle hulp en de gezelligheid de afgelopen jaren.

Paranimfen! Ties, ik ken je ondertussen al 'even'. Mede door jou ben ik bij dit onderwerp terecht gekomen en mede door jou mag ik dus ook dit proefschrift verdedigen. Een betere paranimf kan er voor mij dus niet zijn! Margien: Jij bent een echte versterking binnen onze groep gebleken! Fijn dat je naast mij wilt staan tijdens mijn verdediging!

Wouter, Marissa, Ingrid, Remco, opa's en oma's: Bedankt voor de interesse in mijn onderzoek en de steun gedurende de laatste 'ongeduldige' maanden van het schrijven van dit proefschrift! Pap, mam: hoewel voor jullie het grootste deel van dit proefschrift onbegrijpelijk al zijn wil ik jullie het meest bedanken. Dit is een opstapeling van jullie hulp, steun en alles wat jullie de afgelopen 28 jaar voor mij gedaan hebben. Dank daarvoor!

Liefste Manon: Jij hebt me het hele promotietraject gesteund en was er altijd voor me. Bedankt voor je begrip, geduld en liefde.



