



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unraveling mechanisms of vascular remodeling in arteriovenous fistulas for hemodialysis

Wong, C.Y.

Citation

Wong, C. Y. (2017, March 8). *Unraveling mechanisms of vascular remodeling in arteriovenous fistulas for hemodialysis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/46406>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/46406>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/46406> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wong, C.Y.

Title: Unraveling mechanisms of vascular remodeling in arteriovenous fistulas for hemodialysis

Issue Date: 2017-03-08

Nederlandse Samenvatting

Dankzij de ontwikkeling van de hemodialyse machine in 1943 door Kolff en vaattoegangs mogelijkheden door Scribner, was er eindelijk een behandeling voor patiënten met eind stadium nierfalen. In de loop van de jaren zijn de behandelopties uitgebreid en verbeterd, waarbij de transplantatie van een nier in de meerderheid van de gevallen de voorkeur geniet boven dialyse. Hoewel het aantal patiënten met een functionerende donornier toeneemt in Nederland, blijft het probleem bestaan dat het aanbod van donornieren kleiner is dan de vraag. De groep patiënten die geen niertransplantaat hebben en dus van dialyse afhankelijk zijn blijft groot (40%). Hemodialyse is de meest toegepaste vorm van dialyse, maar dit vereist wel dat er sprake moet zijn van een goede vaattoegang waarmee het bloedsomloop van de patiënt gekoppeld kan worden aan het dialyse apparaat. Helaas, zijn er veel problemen met deze vaattoegang welke leidt tot een hoge morbiditeit en ziektekosten.

In **hoofdstuk 2** wordt de pathofysiologie van arterioveneus fistel (AVF) falen bediscussieerd. Hoewel de exacte pathofysiologie hiervan grotendeels onbekend blijft, is er in de literatuur wel een consensus dat het gaat om multifactoriële factoren die hieraan ten grondslag liggen. Op het anatomisch niveau zijn er een tweetal processen die we kunnen identificeren, namelijk; intima hyperplasie (IH) en inadequate outward remodeling (OR). De vasculaire aanpassing die het bloedvat moet ondergaan wordt hoofdzakelijk gedreven door de veranderde hemodynamische factoren die ontstaan nadat bij de chirurgische procedure een vene waarin een lage druk heerst, wordt aangesloten op een arterie waar juist een hoge druk heerst. Dit resulteert in een directe toename in bloedflow van de zowel de arterie als de vene. Deze snelle stijging in bloedflow leidt tot zowel een passieve- als in een door stikstof oxide (NO) gedreven actieve vaatdistensie. Deze laatste wordt door de endotheelcellen geproduceerd en leidt tot relaxatie van de vaatwand via de gladde spiercellen (VSMCs). Vanuit een functioneel/mechanisch oogpunt van vaatremodelering, zal het lichaam proberen de veranderde hemodynamiek zoals een toename in “wall shear stress” en druk op de vaatwand te compenseren door respectievelijk toe te nemen in diameter en vaatwanddikte. De endotheelcel en gladde spiercel lijken hierin een hoofdrol te spelen, waarbij de endotheelcel hemodynamische stimuli omzetten in biochemische signalen zoals vasodilerende factoren, groeifactoren, cellulaire adhesie moleculen, cathepsines en matrix metalloproteinases (MMPs).

Intima hyperplasie is de pathologische laesie in AVFs die kan leiden tot stenose en uiteindelijk trombose. Op histologisch niveau wordt IH gekenmerkt door alpha-smooth muscle actin (α -SMA) positieve cellen, waarvan de meerderheid een myofibroblast of synthetische VSMC fenotype heeft. De pathofysiologie van IH is multifactorieel. Een van de factoren die hierin een

rol speelt zijn ongunstige hemodynamische profielen zoals een lage flow en een oscillerende flow patronen. Daarnaast zijn de pathologische processen die vaak gepaard gaan met eindstadium nierfalen zoals een chronisch verhoogde inflammatoire status, hyperuremie en verhoogde oxidatieve stress ook allen bijdragend aan IH vorming. Naast de hierbovengenoemde ongunstige factoren, blijkt er ook nog eens dat pre-existente IH laesies en vasculaire verkalking beiden een negatieve invloed hebben op AVF maturatie.

Het netto resultaat van het ongunstige IH vorming en het gunstige OR zal uiteindelijk het lumen kaliber, bloed flow en de lange termijns patency bepalen. Hoewel in de literatuur met name wordt gekeken naar mogelijkheden om IH te remmen, pleiten wij er juist voor om ook aandacht te besteden aan het stimuleren van OR.

Om de complexe processen te bestuderen die betrokken zijn in AVF falen, wilden wij een diermodel gebruiken die de klinische situatie het dichtst mogelijk benaderd. In de loop van de jaren zijn er meerdere diermodellen ontwikkeld die worden gebruikt om AVF falen te bestuderen. Dieren van een groot formaat zoals bavianen, varkens, geiten, schapen en honden hebben het voordeel dat de vasculaire dimensies dichtbij die van de mens zitten. Dit is met name van belang doordat de hemodynamiek een belangrijke rol speelt. Deze diermodellen zijn zeer geschikt voor experimentele opzetten die gericht zijn op chirurgische en interventionele technieken. Helaas zijn de faciliteiten hiervoor beperkt en zijn de kosten relatief hoog. Het gebruik van kleine proefdieren zoals muizen en ratten is daarentegen juist relatief goedkoop en de faciliteiten zijn beter beschikbaar. Een ander belangrijk voordeel van het gebruik van muizen is dat deze de mogelijkheid bieden tot genetische modificatie. Dit maakt een muismodel uitermate geschikt om mechanistische vraagstukken te onderzoeken. Het nadeel van een muismodel is dat de dimensies klein zijn, waardoor het chirurgisch technisch uitdagender wordt. In 2016 introduceerde Castier et al. een muismodel voor AVF falen, waarin voor het eerst gebruik werd gemaakt van alleen hechtingen om de anastomose te maken. Hiermee werd het gebruik van een kunststof katheter verlaten. De configuratie van de anastomose (arteriële end naar veneuze side) is echter niet gelijkend op de situatie zoals deze meestal in de klinische setting is (Veneuze end naar arteriële side). Dit laatste is van belang omdat met een andere configuratie er ook sprake is van een andere hemodynamiek.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we een nieuw muismodel die samen met de onderzoeksgroep van dr. Roy-Chaudhury werd ontwikkeld en waarin een arteriële side naar veneuze end anastomose gebruikt wordt, zoals deze ook in de klinische setting meestal wordt gebruikt. In dit model wordt de rechter carotis communis met de ipsilaterale tak van de vena jugularis externa verbonden met 10.0 hechtingen. De AVF werd op verschillende tijdstippen (Dag 0, 7, 14 en 28) histologisch geanalyseerd, en daaruit bleek dat de IH voornamelijk gelokaliseerd was

in het veneuze uitstroomgebied. Chronologisch gezien lijken deze IH laesies te beginnen als een wandtrombus dat naarmate de tijd vordert gepopulariseerd wordt door α -SMA positieve cellen. Zowel de locatie als de cellulaire compositie van de IH vertoont gelijkenis met die van gefaalde humane AVFs. De groei van de IH laesies verloopt op lineaire wijze. Als we kijken naar OR in ons model zien we dat deze alleen in de eerste 2 weken na de operatie aanwezig is. Door de lineaire groei van IH en het stoppen van OR na 2 weken neemt het luminale oppervlak vanaf week 2 geleidelijk af. In ongeveer de helft van de gevallen leidt dit proces tot een totale occlusie op week 4.

In de eerste week na de operatie is er een duidelijk verlies van endotheelcellen in de vaatwand. In de loop van de tijd wordt dit echter wel weer hersteld.

Na de creatie van de AVF lijkt het erop dat er een migratie van CD45 positieve cellen plaatsvindt beginnend vanuit de neovascularisatie in de adventitia. Toekomstige therapieën zouden dan zich dan hierop kunnen richten.

Het fysisch objectiveren van de functionaliteit van de AVF in de muis kan lastig zijn. Diagnostische hulpmiddelen zoals echografie en MRI zou hierin mogelijk kunnen helpen. Helaas was het gebruik van de hierbovengenoemde modaliteiten niet succesvol gebleken in onze handen. Als alternatief hiervoor hebben we met succes met Near Infrared Fluoroscopy (NIRF) de AVF functioneel kunnen visualiseren. Deze methode vereist een intraveneuze injectie met een contrastmiddel die dan wordt gevisualiseerd met behulp van een gespecialiseerde camera die de videobeelden in realtime kan genereren.

Om de complexe ingreep verder te verduidelijken hebben we in **hoofdstuk 4** de operatie-procedure gefilmd en de belangrijkste stappen gemonteerd in een video.

Na de succesvolle ontwikkeling van het diermodel, wordt de aandacht gericht op de mechanistische processen die in het bloedvat plaatsvinden na het aanleggen van de AVF. Een van de belangrijkste eiwitten die in een bloedvat zit is elastine. Dit eiwit geeft het bloedvat zijn elastische eigenschappen die nodig zijn voor een goede functie. In **hoofdstuk 5** bestuderen we het effect hiervan op OR en IH door muizen te opereren die haplo-deficiënt ($eIn^{+/-}$) zijn voor het tropo-elastine gen. Deze muizen hebben een 53% reductie in mRNA expressie van tropoelastine in de veneuze vaatwand leidend tot een afname van elastische vezels. De haplo-deficiënte muizen laten 21 dagen na het aanleggen van een AVF een 21 % toename van het omtrek zien. Onze hypothese is dat dit veroorzaakt wordt doordat elastine een belangrijke mechanisch component is die bijdraagt aan de sterkte van het bloedvat. Het wegnemen van een dergelijk component zal er dan toe leiden dat deze minder tegendruk kan geven aan de toegenomen bloeddruk, met als gevolg dat het bloedvat meer zal uitzetten.

Het reduceren van elastine in de bloedvaten leidt in ons diermodel niet tot een toename van IH. Wel wordt er een toename gezien in het aantal α -SMA positieve cellen in de $eln^{+/-}$ muizen. Dit laatste wordt mogelijk verklaard doordat VSMC proliferatie nodig is om OR te kunnen bewerkstelligen. Het reduceren van elastine in de AVF lijkt dus gunstig te zijn op de OR en derhalve zou een therapie die dit bewerkstelligt gunstig kunnen zijn.

In **hoofdstuk 6** wordt de rol van inflammatie in de AVF bekeken in ons muismodel. We hebben eerder in ons diermodel gezien dat er postoperatief sprake was van een duidelijke influx van CD-45 positieve ontstekingscellen. Om het effect van deze ontstekingsreactie op AVF maturatie te bestuderen hebben we de muizen postoperatief het anti-inflammatoire prednisolon toegediend. Om het prednisolon maximaal op lokaal niveau van de AVF te krijgen via een systemische intraveneuze toediening, werd deze verpakt in een liposoom. Een liposoom is een transporter dat ervoor zorgt dat de prednisolon die in de bloedsomloop circuleert niet actief kan worden, totdat deze uit het bloedsomloop treedt via lekkende vaten die aanwezig zijn in inflammatoir weefsel. We zien in ons diermodel dat deze liposomen inderdaad met name rondom de anastomose uittreden en worden gefagocyteerd door macrofagen. Het remmen van de inflammatie leidt tot een toename van OR en lumen oppervlak van respectievelijk 27% en 47%. Hoewel statistisch niet significant, leek de IH hoger in de dieren die met liposomaal prednisolon waren behandeld. We speculeren dat dit effect veroorzaakt wordt door een reductie in activiteit van MMPs. Het remmen van de inflammatoire respons na AVF chirurgie lijkt dus een positieve invloed te hebben op AVF maturatie. Op basis van deze studie werd in 2016 een dubbel geblindeerde, gerandomiseerde en placebo gecontroleerde klinische trial gestart waarbij hetzelfde liposomale prednisolon gebruikt wordt in patiënten met nierfalen.

In **hoofdstuk 7** gaan we verder in op de rol van inflammatie op AVF maturatie. We hebben specifiek gekeken naar de effecten, wanneer de inflammatie gestimuleerd zou worden via de Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway door het remmend RP105 complex uit te schakelen middels het gebruik van RP105 knock out muizen ($RP105^{-/-}$). Dit bleek echter een ander effect te hebben dan gedacht. Er was sprake van juist een anti-inflammatoir effect met hierbij een toename van het aantal anti-inflammatoire M2 macrofagen en afname van T-cellen. Hierbij werd ook een afname in MMP activiteit en VSMC proliferatie gezien in de $RP105^{-/-}$ muizen die leiden tot afwijkende OR.

Ten slotte geeft **hoofdstuk 8** een beschouwing en discussie van alle studies die in dit proefschrift zijn beschreven.

