

University of Groningen

## Molecular mechanisms of platelet-mediated liver regeneration after partial hepatectomy

Kirschbaum, Marc

**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:*

2017

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

*Citation for published version (APA):*

Kirschbaum, M. (2017). *Molecular mechanisms of platelet-mediated liver regeneration after partial hepatectomy*. Rijksuniversiteit Groningen.

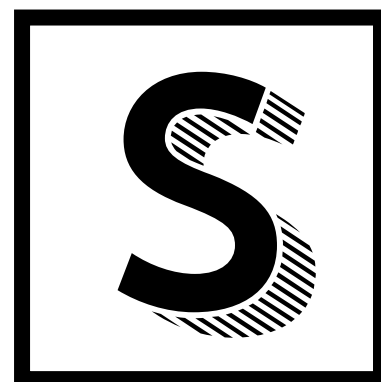
### Copyright

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).

### 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/  
DUTCH SUMMARY**

De lever heeft een enorm regeneratief vermogen. Rond 70% van de lever van een mens of proefdier kan veilig verwijderd worden door middel van een partiële leverresectie, waarna het resterende deel weer uitgroeit tot nagenoeg het oorspronkelijke volume.. Ook kan bij een levende donor levertransplantatie een deel van de lever gedoneerd worden waarna regeneratie in zowel donor als ontvanger plaatsvindt. In de mens groeit de lever weer tot nagenoeg het oorspronkelijke volume aan binnen enkele maanden. Leverregeneratie vindt niet alleen plaats nadat een deel van de lever verwijderd is maar kan ook plaats vinden nadat schade door toxines of virussen is ontstaan. Dit resulteert in veel gevallen in acute of chronische leverziektes. Terwijl de lever in sommige gevallen dankzij het regeneratief vermogen kan herstellen, zijn er patiënten die uiteindelijk aan leverinsufficiëntie gaan leiden. Voor patiënten met leverinsufficiëntie bestaan momenteel beperkte therapeutische opties en een levertransplantatie is uiteindelijk de enige behandeloptie. In de afgelopen jaren is door verschillende studies in proefdier en mens aangetoond dat bloedplaatjes betrokken zijn bij de stimulatie van leverregeneratie. Deze bloedplaatjes zouden een aangrijpingspunt kunnen zijn om nieuwe strategieën die leverschade kunnen voorkomen of het proces van leverregeneratie in patiënten met lever insufficiëntie kunnen versnellen. Helaas hebben wij nog te weinig inzicht in de moleculaire mechanismen die de stimulerende werking van bloedplaatjes op leverregeneratie verklaren. Als voorbeeld is de rol van groeifactoren opgeslagen in bloedplaatjes bij leverregeneratie te noemen. Hoewel wordt aangenomen dat deze groeifactoren een belangrijke rol spelen in bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie moet nog steeds aangetoond worden, dat dit mechanisme inderdaad betrokken is bij bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie. Andere mechanismen die het stimulerende effect van bloedplaatjes op leverregeneratie zouden kunnen verklaren, zoals de mogelijkheid dat bloedplaatjes hun RNA aan andere cellen overdragen, zijn nog niet in *in vivo* modellen onderzocht. In dit proefschrift zijn mogelijke mechanismen van bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie onderzocht in *in vitro* en *in vivo* modellen, en in een klinische studie onderzocht.

**Hoofdstuk 1** is een algemene inleiding van dit proefschrift waarin het doel van elk hoofdstuk wordt beschreven. Er wordt een kort overzicht gegeven over leverresectie, regeneratie en de rol van bloedplaatjes in kader van dit proefschrift. Het volgende **Hoofdstuk 2** is een brief in reactie op een review artikel gepubliceerd in Journal of Hepatology, die de huidige kennis samenvat op het gebied van de rol van bloedplaatjes in leverregeneratie. Aandachtspunt van deze brief is dat bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie meer intensief onderzocht moet worden en beschrijft de bestaande en nog onbekende kennis op dit onderzoeksgebied.

In **Hoofdstuk 3** wordt door middel van een aantal *in vitro* experimenten een potentieel nieuw mechanisme voor bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie aangetoond. In het model wordt er gebruik gemaakt van HepG2 cellen en vers geïsoleerde humane bloedplaatjes. Er

wordt aangetoond dat voor bloedplaatjes-gemedieerde stimulatie van HepG2 cel-proliferatie de opname (internalisatie) van bloedplaatjes door hepatocyten vereist is. Na internalisatie dragen bloedplaatjes hun RNA over aan de hepatocyt. Vervolgens vindt eiwitsynthese vanaf het mRNA afkomstig van bloedplaatjes door de hepatocyt plaats. Nog belangrijker is dat bloedplaatjes RNA substantieel bijdraagt aan bloedplaatjes-gemedieerde hepatocyten proliferatie. Deze bevindingen suggereren dat transport van bloedplaatjes RNA naar de HepG2 cel en vervolgens eiwitsynthese door de ontvangende cel belangrijk is voor HepG2 celproliferatie. Daarnaast is er *in vivo* aangetoond dat bloedplaatjes internalisatie door hepatocyten plaatsvindt na partiële hepatectomie in muizen. Het lijkt aannemelijk dat functionele bloedplaatjes RNA overdracht ook relevant is voor bloedplaatjes-gemedieerde stimulatie van leverregeneratie.

In **Hoofdstuk 4** is het mechanisme betrokken bij de aantrekking van bloedplaatjes door het leverparenchym na partiële leverresectie onderzocht. Onmiddellijk na partiële leverresectie werd er een tijdelijke bloedplaatjes infiltratie en bloedplaatjes aggregaatvorming in de leverrest gezien. Door het induceren van trombocytopenie 2 uur voor of 2 uur na partiële leverresectie, kon er aangetoond worden dat de aanwezigheid van bloedplaatjes in de eerste uren na partiële leverresectie essentieel is voor het stimuleren van leverregeneratie door de bloedplaatjes. Bij de muizen die trombocytopenie werden gemaakt 2 uur voorafgaand aan de partiële leverresectie, werd er een significant verminderde leverregeneratie aangetoond in vergelijking met muizen waarbij bloedplaatjes aanwezig waren tot 2 uur na partiële leverresectie.

Daarnaast werd er aangetoond dat de tijdelijke bloedplaatjes instroom in het leverparenchym afhankelijk is van Von Willebrand Factor (VWF). Belangrijker nog, een deficiëntie in VWF resulteerde in een verminderde leverregeneratie. Deze resultaten laten het belang van de instroom van bloedplaatjes in het leverparenchym binnen de eerste uren na een partiële leverresectie zien. Of het vrijkomen van VWF uit de sinusoidale lever endotheelcellen of de bloedplaatjes, of het plasma VWF belangrijk is voor de tijdelijke bloedplaatjes instroom na partiële leverresectie dient nog nader onderzocht te worden..

**Hoofdstuk 5** laat de resultaten van een prospectieve studie zien, waarin de plasmaspiegels van bloedplaatjes-gerelateerde groeifactoren onderzocht zijn bij patiënten die een partiële leverresectie ondergingen. Alhoewel bloedplaatjes afkomstige groeifactoren bestudeerd zijn in verschillende *in vitro* studies en in dierexperimenten, is het nooit bewezen dat deze groeifactoren in bloedplaatjes daadwerkelijk verantwoordelijk zijn voor bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie *in vivo*, bijvoorbeeld bij de patiënten die een partiële hepatectomie hebben ondergaan. Onze hypothese was dat bloedplaatjes-gerelateerde groeifactoren verbruikt worden tijdens en na partiële leverresectie. De plasmaconcentraties en spiegels in bloedplaatjes van verschillende bloedplaatjes-gerelateerde groeifactoren waarvan bekend is dat ze opgeslagen zijn in bloedplaatjes en die een rol spelen in

leverregeneratie (VEGF, HGF, FGF, PDGF, PF4, TSPI en endostatine) werden onderzocht bij patiënten die een partiële hepatectomie of pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (PPPD) ondergingen en werden vergeleken met de concentraties van gezonde vrijwilligers. Er waren geen substantiële verschillen tussen bloedplaatjes en plasmaconcentraties van bloedplaatjes afkomstige groeifactoren tussen patiënten die een partiële leverresectie of een PPPD ondergingen op verschillende tijdstippen na de ingreep. Deze resultaten suggereren dat groeifactoren opgeslagen in bloedplaatjes minder belangrijk zijn voor bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie bij mensen dan tot nu toe aangenomen werd.

In **Hoofdstuk 6** is er onderzocht of partiële leverresectie in muizen het proces van niet-alcoholische leververvetting (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) versnelt en of behandeling met vitamine E dit proces reduceert. De muizen kregen een “choline-deficient L-amino acid-defined” dieet om milde leversteatose te induceren. Daarna werd er een partiële leverresectie uitgevoerd. In deze studie had milde leversteatose geen nadelig effect op de leverregeneratie. Echter, partiële hepatectomie versnelde de progressie van NAFLD aanzienlijk. Bovendien is er bewijs geleverd dat oxidatieve stress na partiële leverresectie bijdraagt aan de progressie van NAFLD. Ook verminderde behandeling met de antioxidant vitamine E de progressie van NAFLD. Deze bevindingen kunnen klinische relevantie hebben omdat er steeds meer partiële hepatectomieën uitgevoerd worden bij patiënten met steatose.

**Hoofdstuk 7** is een intermezzo, hierin wordt het onderzoek beschreven van een nieuw mechanisme wat deels het profylactische effect zou kunnen verklaren van een dagelijkse injectie met recombinant stollingsfactor VIIa (rFVIIa) bij patiënten met hemofilie die remmende antistoffen tegen factor VIII hebben ontwikkeld. Ten eerste werd aangetoond dat rFVIIa dosisafhankelijk wordt opgenomen door de megakaryoblastische cellijn MEG-01. Ten tweede werd aangetoond dat de MEG-01 cellen rFVIIa selectief overbrengen naar plaatjes-achtige celfragmenten (platelet-like particles, PLPs) geproduceerd door deze cellen. Belangrijker nog, rFVIIa in PLPs is hemostatisch actief. Tenslotte is er gevonden dat rFVIIa opname door megakaryocyten afhankelijk is van de endotheliale proteïne C receptor.

Alle resultaten van hierboven beschreven studies zijn samengevat en worden bediscussieerd in **Hoofdstuk 8**. De in dit proefschrift beschreven studies hebben nieuwe inzichten gecreëerd in verschillende mechanismes van bloedplaatjes-gemedieerde leverregeneratie. Enkele concepten, die in dit proefschrift gepresenteerd worden, zoals de betrokkenheid van VWF in de vroege fase na partiële leverresectie, zouden directe klinische relevantie kunnen hebben en in nieuwe therapeutische opties kunnen resulteren om leverregeneratie te stimuleren. Andere concepten zijn op dit moment in een experimentele fase en vereisen nog uitgebreid vervolgonderzoek. Transfer van bloedplaatjes RNA zou in toekomstige studies zowel *in vitro* als ook in dierexperimenten verder onderzocht moeten worden om de daadwerkelijke relevantie van dit nieuwe mechanisme voor het proces van leverregeneratie vast te stellen.