



## Samenvatting proefschrift Johan Kuyvenhoven

*"Gelatinases in Chronic Liver Disease. The Clinical Relevance of MMP-2 and MMP-9 in Orthotopic Liver Transplantation"*

**Promotie: 31 mei 2005**  
**Leids Universitair Medisch Centrum**

**Promotor:**  
Prof. dr. C.B.H.W. Lamers

**Co-promotoren:**  
Dr. B. van Hoek  
Dr. ir. H.W. Verspaget

Het voornaamste aandachtspunt van de onderzoeken beschreven in dit proefschrift was de klinische relevantie van de matrix-metalloproteinasen (MMP)-2 en MMP-9 bij chronische leverziekten, met de nadruk op orthotopie levertransplantatie (OLT). Tevens werd de interactie tussen MMPs en het fibrinolytisch systeem tijdens OLT bestudeerd. Tot slot is de invloed van functionele gen polymorfismen van deze MMPs onderzocht. Een kort overzicht van de huidige kennis omtrent MMPs wordt gegeven in de inleiding van dit proefschrift (**hoofdstuk 1**). MMPs zijn de belangrijkste enzymen die betrokken zijn bij de afbraak van de extracellulaire matrix en basaal membranen. Bovendien spelen MMPs een rol bij tal van fysiologische en pathologische processen. Een subgroep uit de familie van de MMPs zijn de gelatinasen MMP-2 en MMP-9, waarvan wordt gedacht dat zij betrokken zijn bij de ombouw van matrix in de lever. Vele cellen in de lever vertonen expressie van MMP-2 doch de "stellate" cel is waarschijnlijk de belangrijkste bron. MMP-9 wordt in de lever geproduceerd door de Kupffer cel maar MMP-9 kan ook vrijkomen uit ontstekingscellen zoals de neutrofiële granulocyt. In het tweede deel van hoofdstuk 1 wordt de rol van MMP-2 en MMP-9 bij het ontstaan van leverfibrose, het hepatocellulair carcinoom (HCC), ischaemie/reperfusie (I/R) schade en rejectie na transplantatie beschreven. Gebaseerd op deze bevindingen zijn de doelstellingen geformuleerd van de studies beschreven in dit proefschrift. In het eerste onderzoek, beschreven in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift, werd de klinische relevantie van serum MMP-2 en MMP-9 bepaald bij 91 patiënten met diverse chronische leverziekten en bij een controle groep bestaande uit 60 personen. Serum spiegels van MMP-2 waren significant hoger bij patiënten met chronische leverziekten in vergelijking met de controle groep en namen toe met de progressie van de leveraandoening bij de patiënten met cirrose. Er was een sterke correlatie tussen MMP-2 en serologische kenmerken van leverinsufficiëntie (bilirubine, albumine en protrombine tijd). De serum MMP-9 concentratie vertoonde juist een inverse relatie met deze parameters en was verlaagd bij patiënten met een chronische leverziekte in vergelijking met de controle groep. De MMP-2 en MMP-9 waarden in een individuele patiënt

---

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatology.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:  
[www.hepatologie.org](http://www.hepatologie.org)



bleken echter niet geschikt als maat voor de functie van de lever omdat er niet voldoende onderscheid is tussen de patiënten in de verschillende Child-Pugh stadia. In patiënten met een HCC zijn de serum MMP-2 waarden hoger dan in de controle groep maar vergelijkbaar met de patiënten met chronische leverziekten zonder HCC. Er werden ook geen significante verschillen gevonden in MMP-9 spiegel tussen patiënten met en zonder een HCC. Omdat er een grote overeenkomst bestaat in serum MMP-2 en MMP-9 spiegels bij patiënten met en zonder HCC, kunnen deze parameters niet gebruikt worden als diagnosticum voor een HCC in de context van chronische leverziekten. Vervolgens werd bij 24 patiënten het verloop bepaald van plasma MMP-2 en MMP-9 en hun endogene remmers, de weefselremmers van MMPs TIMP-1 en TIMP-2, gedurende de levertransplantatie (**hoofdstuk 3**). Plasma TIMP-1, TIMP-2 en MMP-2 daalden geleidelijk tijdens transplantatie. Ongeveer tweederde van het totale MMP-2 leek in de activeerbare proMMP vorm voor te komen. Er waren geen aanwijzingen dat MMP-2 vrijkwam uit het transplantaat. 2 daarentegen nam de plasma MMP-9 concentratie sterk toe tijdens de OLT. Er werd een achtmaal hogere piekwaarde van MMP-9 gevonden 30 minuten na reperfusie in vergelijking met de uitgangswaarden. Het merendeel van de MMP-9 leek aanwezig in de actieve / remmergecomplexeerde vorm. Er werd een significante correlatie gevonden tussen plasma MMP-9 en weefsel-type plasminogeen activator (t-PA) spiegels, maar niet met de tumor necrose factor- $\alpha$  concentratie. Concluderend blijkt een OLT geassocieerd te zijn met een sterke toename van MMP-9 tijdens de anhepatische en post-reperfusie periode, welke gelijktijdig plaatsvindt met de veranderingen in t-PA waarden. Dit suggereert een gezamenlijk mechanisme van activatie. Het is aangetoond dat OLT gepaard gaat met verhoogde fibrinolytische activiteit door verhoogde plasmin productie, welke vervolgens sommige MMPs zou kunnen activeren. Derhalve werd het effect van serine-protease remming door aprotinine bestudeerd. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen patiënten die werden behandeld met aprotinine of placebo. Tevens werd de verhouding tussen de verschillende MMP iso-vormen niet beïnvloed door aprotinine. Dit suggereert dat een serine-protease / plasmin onafhankelijk mechanisme verantwoordelijk is voor de MMP activatie gedurende OLT. MMPs spelen mogelijk ook een belangrijke rol bij I/R schade tijdens een OLT. In de patiënten met ernstige I/R schade bleef de MMP-9 concentratie, met name de actieve / remmergecomplexeerde vorm, hoger na de reperfusie in vergelijking met de patiënten met geringe I/R schade. De daling van TIMP-1, TIMP-2 en MMP-2 was onafhankelijk van de ernst van de I/R schade. Derhalve lijkt alleen MMP-9 betrokken bij vroege I/R schade tijdens levertransplantatie en wellicht kan het beperken van de lokale MMP-9 productie en/of activatie de I/R schade verminderen. Een deel van de patiënten die beschreven werden in hoofdstuk 2 hebben een levertransplantatie ondergaan in het Leids Universitair Medisch Centrum vanwege leverinsufficiëntie en/of het ontwikkelen van een HCC. In deze groep van 33 patiënten werden de veranderingen van serum MMP-2 en MMP-9, evenals hun iso-vorm compositie, bepaald tijdens de late fase van I/R schade na OLT (**hoofdstuk 4**). De MMP-2 en MMP-9 concentratie als ook hun iso-vorm compositie, bepaald op de tweede dag na OLT, waren vergelijkbaar tussen de patiënten met ernstige en geringe I/R schade. Derhalve lijken serum MMP-2 en MMP-9 geen rol van betekenis te spelen in de late fase van I/R schade na OLT. In **hoofdstuk 5** wordt het beloop van serum MMP-2 en MMP-9 beschreven

---

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:  
[www.hepatologie.org](http://www.hepatologie.org)



gedurende 1 jaar na OLT, waarbij de nadruk werd gelegd op acute afstoting van het transplantaat. De extracellulaire matrix is wellicht een belangrijk doelwit bij rejectie. Wij vonden een significant hogere totaal en actief / remmer-gecomplexeerde MMP-9 concentratie bij patiënten met rejectie in vergelijking met patiënten zonder rejectie. Immunohistochemische kleuringen van leverbiopten, die 1 week na OLT werden genomen, toonden een verhoogd aantal MMP-9 positieve ontstekingscellen, voornamelijk neutrofielen en lymfocyten, in de portale driehoekjes van patiënten met rejectie. De serum MMP-2 waarden van patiënten die een OLT ondergingen waren hoger in vergelijking met de controle groep. De MMP-2 concentratie in stukjes lever van patiënten met levercirrose was eveneens hoger vergeleken met normale lever. Dit duidt op een belangrijke rol van MMP-2 bij de ontwikkeling van leverfibrose. Na transplantatie daalt de serum MMP-2 concentratie met de helft maar keert niet terug naar de normaal waarden van de controle groep. Dit zou kunnen passen bij persisterende matrix ombouw en wordt waarschijnlijk multifactorieel bepaald, bijvoorbeeld terugkeer van de oorspronkelijke aandoening (hepatitis C), laaggradige chronische rejectie of ontsteking. De relevantie van verschillende typen bloedmonsters voor het bepalen van MMPs werd bestudeerd door het bepalen van MMP-2 en MMP-9 in gelijktijdig afgenomen serum, heparine plasma en EDTA plasma bij 7 patiënten op 6 verschillende tijdstippen na OLT, zoals beschreven in **hoofdstuk 6**. EDTA plasma monsters bevatten een lagere concentratie aan MMP vergeleken met serum en heparine plasma. De correlatie van de MMP waarden tussen de verschillende monstertypen was echter sterk significant en bovendien was het patroon van de MMPs in de tijd hetzelfde voor de verschillende monsters. Concluderend blijkt het soort bloedmonster belangrijk voor de absolute MMP waarde, doch dit is minder relevant bij het bestuderen van de dynamische veranderingen van MMPs na levertransplantatie. **Hoofdstuk 7** beschrijft de invloed van de -1306 C/T MMP-2 en -1562 C/T MMP-9 genpromotor polymorfismen bij chronische leverziekten en transplantatie. De MMP-2 en MMP-9 eiwit expressie in het serum bleken in onze totale studie populatie onafhankelijk van het genotype. Echter in de patiënten met levercirrose werd een duidelijke relatie gevonden tussen de hogere serum MMP-2 waarden bij patiënten met een hoger stadium in de Child-Pugh classificatie en het frequenter voorkomen van het wildtype -1306 CC genotype van MMP-2. Vergelijkbaar werd in patiënten zonder cirrose, gekenmerkt door een hogere serum MMP-9 spiegel, frequenter het -1562 CT genotype van MMP-9 geconstateerd. De late fase van I/R schade en het ontwikkelen van rejectie na OLT was echter niet gerelateerd aan het MMP-2 en MMP-9 genotype van de donor, de ontvanger of hun respectievelijke genetische mismatch. **Concluderend:** de studies in dit proefschrift beschrijven de klinische relevantie van MMP-2 en MMP-9 bij chronische leverziekten en transplantatie. De "stellate" cel is waarschijnlijk de belangrijkste bron van MMP-2 en is actief betrokken bij de ombouw van extracellulaire matrix. De MMP-2 concentratie van een cirrotische lever is hoger in vergelijking met normale lever en de serum MMP-2 waarde correleert positief met parameters van leverinsufficiëntie. Deze bevindingen duiden, net als in andere recente publicaties, op een belangrijke rol van MMP-2 in de ontwikkeling en persisteren van leverfibrose. In een individuele patiënt kan het serum MMP-2 alléén echter niet gebruikt worden als parameter voor leverfunctie of als kenmerk van fibrose/cirrose. Recente studies suggereren dat een combinatie van meerdere serologische

---

Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de  
Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.

Voor proefschriftsamenvattingen zie:  
[www.hepatologie.org](http://www.hepatologie.org)



parameters, welke gerelateerd zijn aan extracellulaire matrix ombouw, zoals MMP-2, MMP-9 en TIMP-1, wél een onderscheid kunnen maken tussen patiënten zonder fibrose en patiënten met vergevorderde leverziekten. Het eindstadium van chronische leverziekten wordt vaak gecompliceerd door het ontstaan van een HCC. In tegenstelling tot een eerdere studie van Hayasaka e.a., waarin wordt gesuggereerd dat serum MMP-9 gebruikt kan worden als diagnostisch kenmerk voor een HCC, is in onze studie duidelijk aangetoond dat serum MMP-9 concentraties vergelijkbaar zijn in patiënten met chronische leverziekten met en zonder HCC. Serum MMP-9 kan derhalve de aanwezigheid van een HCC niet onderscheiden. Het zoeken naar andere kenmerken van een HCC in het serum blijft een voornaam doel van wetenschappelijk onderzoek. Dit wordt geïllustreerd door een zeer recente studie waarin wordt aangetoond dat een door MMP gekleefd fragment van vitronectine, een glycoproteïne dat een belangrijke rol speelt bij celadhesie en matrix ombouw, een HCC kan identificeren in patiënten met een chronische leverziekte. Verhoogde serum waarden van MMP-9, waarschijnlijk afkomstig van neutrofiele granulocyten en Kupffer cellen, werden aangetoond bij patiënten met acute afstoting na OLT. MMPs zijn ook betrokken bij koude preservatie-schade van de sinusoidale endotheelcel en wij hebben sterk verhoogde plasma MMP-9 waarden aangetoond in de post-reperfusie periode, met name bij patiënten met ernstige I/R schade. Derhalve lijkt MMP-9 een belangrijke rol te spelen bij de I/R schade na OLT. Het belang van MMP-9 is recent nog eens bevestigd in een studie naar koude preservatie schade waarin gebruik werd gemaakt van genetisch gedeleteerde MMP-9 (knockout) muizen, die aanzienlijk minder schade hadden dan de wildtype muizen. Hoewel preservatievloeistoffen reeds niet nader bekende MMP remmers bevatten, blijft het speculatief of verdere farmacologische MMP-inhibitie deze complicaties na OLT kan voorkomen vanwege de nadelige bijwerkingen bij langdurige toediening en omdat MMPs niet alleen betrokken zijn bij het ontstaan doch ook bij het herstel van schade aan de lever. Tot slot rechtvaardigt het feit dat MMP-2 en MMP-9 genotypen geassocieerd zijn met hun serum spiegels in relatie tot cirrose verder onderzoek bij grotere groepen patiënten met verschillende stadia van chronische leverziekten en wellicht ook van andere MMPs. ◀

---

*Aan de publicatie van dit proefschrift werd een financiële bijdrage geleverd door de Nederlandse Vereniging voor Hepatologie.*

Voor proefschriftsamenvattingen zie:  
[www.hepatologie.org](http://www.hepatologie.org)