

Vasculopathie bij sikkelcelziekte

Vasculopathy in sickle cell disease

E. Nur

Samenvatting

Op 12 mei 2011 promoveerde dhr. drs. E. Nur aan de Universiteit van Amsterdam op zijn proefschrift, getiteld 'Vasculopathie bij sikkelcelziekte', onder begeleiding van promotor dhr. prof. dr. M.H.J. van Oers en co-promotores dhr. dr. B.J. Biemond en dhr. dr. D.P.M. Brandjes. Hieronder zijn de belangrijkste bevindingen van het onderzoek weergegeven, geconcentreerd op het deel van het proefschrift over de pathofysiologie van vasculopathie bij sikkelcelziekte. (*Ned Tijdschr Hematol 2011;8:370-3*)

Summary

The 12th of May 2011, E. Nur defended his thesis entitled 'Vasculopathy in sickle cell disease' at the University of Amsterdam, under supervision of promoter M.H.J. van Oers, MD, PhD, professor of clinical hematology, and co-promoters B.J. Biemond, MD, PhD and D.P.M. Brandjes, MD, PhD. The most important findings, in particular the findings about pathophysiology of vasculopathy in sickle cell disease, of his investigation are summarized in this report.

Inleiding

Sikkelcelziekte (SCZ) is een erfelijke hemoglobinoopathie die wereldwijd bij miljoenen mensen voorkomt.^{1,2} SCZ ontstaat door een puntmutatie in het β -globine-gen, waardoor in plaats van het normale hemoglobine het afwijkende sikkelhemoglobine ontstaat.³ SCZ gaat gepaard met een chronische hemolytische anemie.⁴ Daarnaast wordt de ziekte gekenmerkt door obstructie van kleine bloedvaten (vaso-occlusie) die, indien ernstig genoeg, een pijnlijke crisis kan uitlokken.⁵ Vaso-occlusie bij SCZ is een complex proces waarin oxidatieve stress (verhoogde productie van reactieve zuurstofradicalen (oxidanten)), versterkte adhesie van sikkelcellen en leukocyten aan het endotheel, versterkte inflammatie en een verhoogde stollingactivatie een belangrijke rol spelen.⁵ Chronische activatie en beschadiging van het endotheel en recidiverende vaso-occlusies resulteren in gegeneraliseerde progressieve ischemische orgaanschade en verminderde levensverwachting.⁶ In dit onderzoek is gekeken naar de functie van cerebrale bloedvaten, circulerende endotheelcellen als ui-

ting van endotheelschade, en progenitor endotheelcellen en oxidatieve stress als pathofysiologische factoren betrokken bij vaatschade (vasculopathie) bij SCZ.

Vaatdisfunctie: verstoorde cerebrovasculaire CO₂-reactiviteit en dynamische cerebrovasculaire autoregulatie

Ischemisch cerebrovasculair accident (CVA) is 1 van de ernstigste complicaties van SCZ die bij 10% van de sikkelcelpatiënten in de eerste 2 levensdecades voorkomt.⁷ Deze complicatie is het gevolg van ernstige afwijkingen van de cerebrale vasculatuur met stenoses en collateraalvorming naast 'small vessel disease'. De pathofysiologie van dit fenomeen is niet geheel duidelijk, maar het proces lijkt primair te worden veroorzaakt door endotheelschade als gevolg van chronische intravasale hemolyse, oxidatieve stress en chronische ontsteking met toegenomen celadhesie en een chronisch tekort aan stikstofmonoxide (NO), dat een belangrijke rol speelt in dilatatie van bloed-

Auteur: dhr. dr. E. Nur, AIOS inwendige geneeskunde, afdeling Inwendige geneeskunde, Slotervaart Ziekenhuis, Postbus 90440, 1006 BK Amsterdam, tel.: 020 512 93 33, e-mailadres: e.nur@amc.uva.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: de studies van het proefschrift zijn mede mogelijk gemaakt door financiële ondersteuning van de Stichting Klinisch Wetenschappelijk Onderzoek Slotervaart Ziekenhuis (SKWOSZ).

Trefwoorden: advanced glycation end products, cerebrovasculaire CO₂-reactiviteit, circulerende endotheelcellen, dynamische cerebrovasculaire autoregulatie, endotheeldisfunctie, endotheliale progenitor cellen, oxidatieve stress, sikkelcelziekte, vasculopathie

Key words: advanced glycation end products, cerebrovascular CO₂ reactivity, circulating endothelial cells, dynamic cerebrovascular autoregulation, endothelial dysfunction, endothelial progenitor cells, oxidative stress, sickle cell disease, vasculopathy

vaten. Onder normale omstandigheden zorgen stijgingen en dalingen van arteriële CO₂-drukken voor respectievelijk vasodilatatie en vasoconstrictie van het cerebrovasculaire systeem om zo de perfusie van de hersenen ('cerebral blood flow' (CBF)) te kunnen regelen.⁹ Dit fenomeen wordt cerebrovasculaire CO₂-reactiviteit (chemoregulatie) genoemd en reflecteert de cerebrovasculaire reservecapaciteit.¹⁰ Chronische ziekten die worden gekenmerkt door een NO-gebrek hebben een verstoorde (verminderde) cerebrovasculaire CO₂-reactiviteit en zijn geassocieerd met een hogere incidentie van cerebrale infarcten. In dit onderzoek werd gekeken naar de cerebrovasculaire CO₂-reactiviteit bij 23 jongvolwassen homozygote sikkkelcelpatiënten zonder eerder CVA en 16 op ras en leeftijd gemaakte gezonde controles. Cerebrovasculaire CO₂-reactiviteit werd uitgedrukt als de verandering in gemiddelde cerebrale bloedstroomsnelheid ($\Delta\%V_{\text{mean}}$) per mmHg stijging in eindexpiratoire uitgedemde CO₂. De cerebrovasculaire CO₂-reactiviteit was normaal in de gezonde groep, maar significant verminderd bij sikkkelcelpatiënten (5,9 (4,6-6,7) versus 3,7 (3,1-4,7) $\Delta\%V_{\text{mean}}$ /mmHg).¹¹ Er werd in deze kleine studies geen relatie gevonden met de mate van hemolyse.

Dynamische cerebrovasculaire autoregulatie (mechanoregulatie) is het tweede belangrijke mechanisme in het reguleren van CBF. Dynamische cerebrovasculaire autoregulatie houdt de CBF min of meer constant, ondanks veranderingen in bloeddruk binnen een range van 60 en 150 mmHg gemiddelde arteriële druk. Systemische en cerebrovasculaire controles (bloeddruk, bloedstroomsnelheid, perifere en centrale vaatweerstand) werden gemeten bij 18 homozygote sikkkelcelpatiënten zonder eerder CVA en 10 gemaakte gezonde controles. Dynamische cerebrale autoregulatie werd geëvalueerd door transferfunctie-analyses, waarbij werd gekeken naar de relatie tussen gemiddelde cerebrale bloedstroomsnelheid (V_{mean}) en gemiddelde arteriële bloeddruk ('mean arterial pressure'; MAP). Verstoorde dynamische cerebrovasculaire autoregulatie bij sikkkelcelpatiënten werd bevestigd door een significant kleinere MAP-naar- V_{mean} transferfunctie fasevoorloop vergeleken met gezonde controles ($32 \pm 17^\circ$ versus $50 \pm 19^\circ$; $p < 0,05$).¹² Met andere woorden, CBF schommelt te veel mee met de schommelingen in de MAP en het vermogen om deze constant te houden ontbreekt bij sikkkelcelpatiënten. De resultaten van deze 2 studies wijzen erop dat bij sikkkelcelpatiënten, zonder symptomatisch CVA in

de voorgeschiedenis, de 2 belangrijkste mechanismen in het reguleren van de cerebrale bloedtoevoer, de chemoregulatie en de mechanoregulatie verstoord zijn, waardoor deze patiënten gevoelig zijn voor het oplopen van cerebrale ischemie. Dit zou vooral een belangrijke rol kunnen spelen bij het ontstaan van de zogenoemde stille cerebrale infarcten die bij een groot deel van de sikkkelcelpatiënten voorkomen.

Circulerende endotheelcellen

Het ontwikkelen van nieuwe objectieve laboratoriumtesten die de ontwikkeling en ernst van orgaanschade bij sikkkelcelpatiënten kunnen aangeven, is noodzakelijk.^{13,14} In eerder onderzoek zijn circulerende endotheelcellen (CEC's) een goede maat gebleken voor endotheelschade. In dit onderzoek is bekeken of CEC's in het plasma van asymptomatische sikkkelcelpatiënten kunnen worden gedetecteerd en of CEC-aantallen geassocieerd zijn met de mate van orgaanschade.¹⁵ Hiervoor werden 15 homozygote sikkkelcelpatiënten (HbSS) en 15 gemaakte gezonde controles geïncludeerd. Sikkkelcelgerelateerde orgaanschade bestond uit pulmonale hypertensie, microalbuminurie, galsteenlijden, chronische ulcera, retinopathie, osteonecrose en priapisme. CEC-aantallen waren significant hoger bij patiënten (mediaan 12 cellen/ml, 'interquartile range' 8-29) dan bij gezonde controles (4 cellen/ml, 3-10; $p = 0,007$). CEC-aantallen waren significant hoger bij patiënten met pulmonale hypertensie ($p = 0,015$) en waren significant gecorreleerd aan het aantal orgaancomplicaties (0-4 aangedane organen; $p = 0,002$). Pulmonale hypertensie wordt bij ongeveer 30% van de sikkkelcelpatiënten beschreven en moet worden gezien als een belangrijke maat voor vasculopathie en is geassocieerd met een hoge mortaliteit.¹⁶ Verhoogde CEC-aantallen geven continue endotheelschade aan en het meten ervan zou een belangrijk middel kunnen worden in het evalueren van orgaanschade bij sikkkelcelpatiënten. Wat de voorspellende waarde van CEC's is, zal nog moeten worden bepaald.

Endotheliale voorlopercellen

Endotheliale voorlopercellen ('endothelial progenitor cells'; EPC's) spelen een belangrijke rol in vaatnieuwvorming (angiogenese).¹⁷ EPC's zijn hematopoëtische voorlopercellen ('hematopoietic progenitor

cells'; HPC's) die de 'vascular endothelial growth factor receptor-2' (VEGFR-2) tot expressie brengen en in het perifere bloed kunnen worden gedetecteerd met behulp van flowcytometrie. EPC's worden gemobiliseerd door pro-angiogenese factoren, zoals VEGF en erythropoëetine, en zijn betrokken bij de verjonging van het endotheel en neovascularisatie na ischemische weefselschade. EPC's zijn verhoogd bij mensen met cardiovasculaire ischemie (bijvoorbeeld na myocardinfarct). In dit onderzoek werden EPC-concentraties in het plasma geanalyseerd van sikkelcelpatiënten in stabiele conditie en tijdens een vaso-occlusieve crisis. Bij sikkelcelpatiënten met vaso-occlusieve crisis werd een toegenomen aantal circulerende EPC's gevonden (asymptomatische fase: 0 cellen/ml, 0-0 versus crisis: 41,7 cellen/ml, 0-186; $p < 0,05$).¹⁷ De stijging in EPC-aantallen tijdens de pijnlijke crisis suggereert dat vaso-occlusieve crises gepaard gaan met een sterke angiogeneserespons die verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de neovascularisatie en re-endothelialisatie van het beschadigde endotheel na ischemie- en reperfusieschade tijdens de vaso-occlusieve crisisen.

Oxidatieve stress bij sikkelcelziekte

Oxidatieve stress is een belangrijk aspect van SCZ en speelt een significante rol in de pathofysiologie van hemolyse, vaso-occlusie, vasculopathie en het ontstaan van orgaanschade bij sikkelcelpatiënten.^{18,19} Reactieve zuurstofradicalen en de (eind)producten van hun reacties met eiwitten, suikers of vetzuren zouden kunnen dienen als markers van ziekte-ernst, maar ook als potentiële aangrijpingspunten voor anti-oxidatieve therapieën.²⁰

Eén van de eindproducten van oxidatieve stress zijn de zogenoemde 'advanced glycation end products' (AGE's). Plasmaconcentraties van AGE's zijn verhoogd onder oxidatieve omstandigheden en zijn gerelateerd met ziekte-ernst bij diabetes mellitus en inflammatoire ziektes. Door reacties van AGE's met intra- en extracellulaire structuren wordt de normale weefselarchitectuur verstoord. Dit is vooral van belang in het cardiovasculaire systeem waar deze interacties verdikking van het basale membraan en verminderde elasticiteit van bloedvaten kunnen veroorzaken. Door de verdikking van het basale membraan wordt het transport van stoffen door de vaatwand belemmerd en de verminderde elasticiteit van de bloedvaten

verstoort de vasodilaterende capaciteit van de bloedvaten (arteriolen), resulterend in weefselischemie. De vraagstelling in dit onderzoek was of plasma-AGE's verhoogd zijn bij sikkelcelpatiënten en of ze gerelateerd zijn met sikkelcelziektegerelateerde orgaancomplicaties.²¹ Plasmaconcentraties van de AGE's pentosidine, N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) en N^ε-(carboxyethyl)lysine (CEL) werden bepaald bij sikkelcelpatiënten met een ernstige vorm van sikkelcelziekte, HbSS/HbSβ⁰-thalassemie en bij patiënten met een mildere vorm van sikkelcelziekte, HbSC/HbSβ⁺-thalassemie en gematchte gezonde controles. Pentosidine en CML-concentraties waren significant hoger bij HbSS/HbSβ⁰-thalassemie ($n=60$; $p < 0,0001$) en HbSC/HbSβ⁺-thalassemie ($n=42$; $p=0,002$) sikkelcelpatiënten vergeleken met gezonde HbAA-controles ($n=30$), maar stegen niet verder tijdens pijnlijke crisisen (respectievelijk $n=27$ en $n=8$). CEL-concentraties waren vergelijkbaar in alle groepen. Concentraties van pentosidine en CML waren significant gecorreleerd met de parameters van hemolyse (hemoglobine, percentage reticulocyten en lactaatdehydrogenase) en het aantal hemolysegerelateerde orgaancomplicaties bij sikkelcelpatiënten. Deze gegevens laten zien dat AGE's mogelijk zijn betrokken bij de pathofysiologie van de hemolysegeassocieerde orgaancomplicaties en dat ze zouden kunnen dienen als een diagnostische test in het voorspellen van orgaancomplicaties bij sikkelcelziekte.

Conclusies

Uit dit proefschrift blijkt dat er bij sikkelcelpatiënten al op jonge leeftijd sprake is van vergevorderde vaat schade die is geassocieerd met ernstige orgaancomplicaties zoals CVA. De 2 belangrijkste mechanismen die zorgen voor het reguleren van de bloedtoevoer naar de hersenen zijn bij sikkelcelpatiënten verstoord, waardoor ze gevoelig zijn voor ischemische cerebrale schade (stille cerebrale infarcteringen) en zelfs CVA.

Het aantal CEC's, die in de circulatie terechtkomen als gevolg van endotheelschade, is verhoogd en gerelateerd met pulmonale hypertensie en het aantal orgaancomplicaties bij sikkelcelpatiënten. Meten van CEC's zou kunnen dienen als een objectieve parameter van ziekte-ernst bij sikkelcelpatiënten. Het aantal endotheliale voorlopercellen neemt tijdens een vaso-occlusieve pijnlijke crisis toe en duidt op ischemie-

Aanwijzingen voor de praktijk

- 1. Door endotheelschade is de regulering van cerebrale bloedtoevoer bij sikkelcelpatiënten al op jonge leeftijd verstoord, waardoor ze continu gevoelig zijn voor cerebrale ischemie.**
- 2. Circulerende endotheelcellen zijn verhoogd en geassocieerd met orgaanschade bij sikkelcelpatiënten. Het aantal endotheliale voorlopercellen neemt tijdens een vaso-occlusieve pijnlijke crisis toe en duidt op ischemiegeïnduceerde (neo)angiogenese bij sikkelcelziekte.**
- 3. 'Advanced glycation end products' zijn geassocieerd met orgaanschade bij sikkelcelziekte en zouden potentieel kunnen dienen als objectieve biomarkers van ziekte-ernst.**

geïnduceerde (neo)angiogenese bij sikkelcelziekte. AGE's als een maat van oxidatieve stress zijn verhoogd bij sikkelcelpatiënten en lijken een belangrijke pathofysiologische rol te spelen bij orgaancomplicaties. AGE's zouden potentieel kunnen dienen als diagnostische testen ter voorspelling van orgaancomplicaties bij sikkelcelziekte.

Referenties

1. Serjeant GR. Sickle-cell disease. *Lancet* 1997;350:725-30.
2. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151:839-45.
3. Serjeant GR. The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol* 2001;112:3-18.
4. Schnog JJ, Lard LR, Rojer RA, Van der Dijns FP, Muskiet FA, Duits AJ. New concepts in assessing sickle cell disease severity. *Am J Hematol* 1998;58:61-6.
5. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol* 2002;9:101-6.
6. Van Beers EJ, Van Tuijn CF, Mac Gillavry MR, Van der Giessen A, Schnog JJ, Biemond BJ. Sickle cell disease-related organ damage occurs irrespective of pain rate: implications for clinical practice. *Haematologica* 2008;93:757-60.
7. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998;91:288-94.
8. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO 3rd, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002;8:1383-9.
9. Lennox WG, Gibbs EL. The blood flow in the brain and the leg of man, and the changes induced by alteration of blood gases. *J Clin Invest* 1932;11:1155-77.
10. Aaslid R. Cerebral autoregulation and vasomotor reactivity. *Front Neurosci* 2006;21:216-28.
11. Nur E, Kim YS, Truijen J, Van Beers EJ, Davis SC, Brandjes DP, et al. Cerebrovascular reserve capacity is impaired in patients with sickle cell disease. *Blood* 2009;114:3473-8.
12. Kim YS, Nur E, Van Beers EJ, Truijen J, Davis SC, Biemond BJ, et al. Dynamic cerebral autoregulation in homozygous sickle cell disease. *Stroke* 2009;40:808-14.
13. Nur E, Mairuhu W, Biemond BJ, Van Zanten AP, Schnog JJ, Brandjes DP, et al. Urinary markers of bone resorption, pyridinoline and deoxypyridinoline, are increased in sickle cell patients with further increments during painful crisis. *Am J Hematol* 2010;85:902-4.
14. Nur E, Van Beers EJ, Martina S, Cuccovillo I, Otten HM, Schnog JJ, et al. Plasma levels of pentraxin-3, an acute phase protein, are increased during sickle cell painful crisis. *Blood Cells Mol Dis* 2011;46:189-94.
15. Strijbos MH, Landburg PP, Nur E, Teerlink T, Leebeek FW, Rijnveld AW, et al. Circulating endothelial cells: a potential parameter of organ damage in sickle cell anemia? *Blood Cells Mol Dis* 2009;43:63-7.
16. Van Beers EJ, Nur E, Schaefer-Prokop CM, Mac Gillavry MR, Van Esser JW, Brandjes DP, et al. Cardiopulmonary imaging, functional and laboratory studies in sickle cell disease associated pulmonary hypertension. *Am J Hematol* 2008;83:850-4.
17. Van Beem RT, Nur E, Zwaginga JJ, Landburg PP, Van Beers EJ, Duits AJ, et al. Elevated endothelial progenitor cells during painful sickle cell crisis. *Exp Hematol* 2009;37:1054-9.
18. Nur E, Biemond BJ, Otten HM, Brandjes DP, Schnog JJ. Oxidative stress in sickle cell disease: pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol* 2011;86:484-9.
19. Nur E, Verwijs M, De Waart DR, Schnog JJ, Otten HM, Brandjes DP, et al. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2011;doi:10.1016/j.bbadis.2011.04.011.
20. Nur E, Brandjes DP, Teerlink T, Otten HM, Oude Elferink RP, Muskiet R, et al. N-acetylcysteine reduces oxidative stress in sickle cell patients. *Ann Hematol*; in press.
21. Nur E, Brandjes DP, Schnog JJ, Otten HM, Fijnvandraat K, Schalkwijk CG, et al. Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. *Br J Haematol* 2010;151:62-9.

Ontvangen 18 augustus 2011, geaccepteerd 19 oktober 2011.