

Inhibition of ischemic organ damage with anti-coagulant agents : ASIS and APC in myocardial and renal ischemia/reperfusion

Citation for published version (APA):

Loubele, S. T. B. G. (2009). *Inhibition of ischemic organ damage with anti-coagulant agents : ASIS and APC in myocardial and renal ischemia/reperfusion*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20090618sl>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090618sl](https://doi.org/10.26481/dis.20090618sl)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary/Samenvatting

INHIBITION OF ISCHEMIC ORGAN DAMAGE WITH ANTI-COAGULANT AGENTS

Cardiovascular disease remains the most important cause of death within the western world. A major cause of cardiovascular disease is atherosclerosis, in which the formation of atherosclerotic plaques leads to occlusion of the affected vessel. This process can take place either via narrowing of the vessel lumen due to the plaque or via the activation of the coagulation cascade upon plaque rupture. Occlusion of a major artery, such as a coronary artery, leads to ischemia due to oxygen depletion of the affected tissue, resulting in cell death. To limit the injury caused by the ischemic process, reperfusion or opening of the occluded vessel is necessary to restore the blood flow within the affected organ. The process of reperfusion is, however, not without risk as it is associated with inflammation indicated by an infiltration of inflammatory cells and the up-regulation of a number of inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and -1β . This inflammatory process results in regulated cell death or apoptosis via a number of cellular signaling pathways. Ischemia/reperfusion injury has different consequences when distinct organs like the heart and the kidney are affected. After myocardial ischemia/reperfusion injury, the contractile function of the heart is reduced due to inflammatory and apoptotic processes resulting in a reduced heart function. Limitation of inflammation and apoptosis could result in an improved contractile function of the heart muscle after a myocardial injury. Within the kidney, limitation of ischemia/reperfusion injury is of great importance with organ transplants. Reduction of inflammation and apoptosis would limit the chance of acute renal failure and graft rejection upon kidney transplantation.

Coagulation and inflammation play an important role in the processes of ischemia and reperfusion and several studies revealed interacting mechanisms between the coagulation and inflammatory pathways via signaling through protease activated receptors or PARs. For this reason, anti-coagulants are, besides for their anti-coagulant function, also studied for their cytoprotective effects probably mediated via PARs. A number of *in vitro* and *in vivo* studies revealed cytoprotective effects for the two anti-coagulants investigated in this thesis namely active site inhibited FVIIa, or ASIS, and activated protein C or APC upon ischemia/reperfusion injury. ASIS is an inactive form of the coagulation factor VIIa and in complex with tissue factor (TF) it can no longer activate the coagulation cascade. Within a myocardial ischemia/reperfusion model, ASIS has shown to be protective but an exact working mechanism was not yet revealed.

A second anti-coagulant, APC, is activated upon thrombin generation and inhibits the coagulation factors Va and VIIIa. In a number of ischemia/reperfusion models including a renal ischemia/reperfusion and a stroke model, APC is shown to be protective but so far no study revealed a protective effect of APC on myocardial ischemia/reperfusion injury. **Chapter 2 and 3** of this thesis were used to determine the effect of ASIS in a myocardial ischemia/reperfusion injury model and to reveal the working mechanism. **Chapter 4** describes the use of APC within a myocardial ischemia/reperfusion model and looked further into the cell signaling mechanisms involved. **Chapter 5** describes the effects of both anti-coagulants ASIS and APC in a renal ischemia/reperfusion model where a comparison is made with the use of anti-coagulants in different renal ischemia/reperfusion models.

In **chapter 1** an overview is given of the pathophysiology of both renal and myocardial ischemia/reperfusion in which a focus is made on inflammation and apoptosis and this in relation to the cell signaling pathways involved. Furthermore, the specific functions related to coagulation and cytoprotection of APC and ASIS are described in relation to cell signaling.

Chapter 2 describes the effects of ASIS when administered during different time points of the ischemic and the reperfusion phase in a myocardial ischemia/reperfusion model. The effects of ASIS administration were determined in regard to myocardial infarct size, overall coagulation parameters, and cell signaling pathways. ASIS was administered during the ischemia phase, during the ischemia and reperfusion phase, or during reperfusion only. Analysis of the infarct size and TF activity levels revealed the most optimal effect of ASIS when administered during ischemia and during reperfusion. Furthermore, cell signaling effects related to NF- κ B signaling were also maximally influenced when ASIS was administered during both ischemia and reperfusion. From these results, the optimal time point of ASIS administration was set at during the ischemic and the reperfusion phase and this was used in all further experiments.

Chapter 3 revealed a positive effect of ASIS administration during ischemia and reperfusion on myocardial ischemia/reperfusion injury and this effect was sustained upon prolonged reperfusion times varying between 2 and 24 hrs. ASIS decreased the infarct size during a 2, 6 and 24 hrs reperfusion period compared to placebo administration. RNA analysis revealed a strong down-

regulation of a number of genes involved in NF- κ B signaling upon ASIS administration. Furthermore, protein analysis revealed reduced levels of nuclear activated NF- κ B and proteins regulated by NF- κ B including TF and IL-6, upon ASIS administration. The anti-inflammatory effect of ASIS was further proven by reduced leukocyte infiltration within the ischemic area of the heart. Analysis of the influence of ASIS on apoptosis did not reveal an anti-apoptotic effect of the anti-coagulant as shown by RNA analysis of a number of apoptotic genes and apoptosis staining. From this chapter we conclude that the diminished amount of myocardial ischemia/reperfusion injury after ASIS administration is primarily due to attenuated inflammation-related lethal ischemia/reperfusion injury, probably mediated through the NF- κ B mechanism.

In **chapter 4** APC was shown to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury during a 2, 6, and 24 hrs reperfusion period. APC administration during ischemia as well as reperfusion reduced myocardial infarct size, whereas administration of the non-specific anti-coagulant heparin did not reveal a protective effect. Analysis of the effect of APC on inflammation revealed reduced interleukin levels and decreased leukocyte infiltration upon APC administration. Furthermore a strong anti-apoptotic effect of APC was detectable as shown by a reduction of the RNA expression levels of a number of pro-apoptotic genes and a reduction in apoptotic cells within the infarcted area upon APC administration. RNA analysis of a number of genes involved in the NF- κ B pathway did not reveal an effect of APC. Blocking PAR-1, however, reversed the protective effects of APC on myocardial infarct size indicating that PAR-1 is necessary for APC to exert its protective effects. From these experiments we can conclude that APC exerts strong protective effects on early myocardial ischemia/reperfusion injury, primarily via inhibition of apoptosis and inflammation, regulated via PAR-1.

Since ASIS and APC showed strong cytoprotective effects in a myocardial ischemia/reperfusion model, both anti-coagulants were administered in a renal ischemia/reperfusion model. The results as described in **chapter 5** did, however, not reveal a protective effect of ASIS or APC on renal injury. On a systemic level, neither APC nor ASIS influenced blood urea nitrogen and creatinin levels, nor was histopathological scoring of the renal sections affected. On a cellular level, no overall effect of APC or ASIS was detectable on inflammation or apoptosis. An explanation for this can be in the variety of different renal ischemia/reperfusion models used in the literature. From this

study we can conclude that the anti-coagulants ASIS and APC do not have protective effects in renal ischemia/reperfusion injury regarding the processes of inflammation and apoptosis and this in contrast to the protective effects of these anti-coagulants in other models of ischemia/reperfusion injury.

In **chapter 6** all findings described in this thesis are being discussed in conjunction with the clinical implications of these studies. With these studies we gained a better insight into the working mechanisms of the anti-coagulants ASIS and APC regarding their anti-inflammatory and anti-apoptotic properties in 2 ischemia/reperfusion models, revealing different effects of both anti-coagulants in distinct organs.

HET BEPERKEN VAN ISCHEMISCHE ORGAANSCHADE MET ANTI-BLOEDSTOLLENDE MIDDELEN

Hart- en vaatziekten zijn de belangrijkste doodsoorzaak in de Westerse wereld en zijn vaak het gevolg van atherosclerose, een ziekte die door de vorming van atherosclerotische plaques leidt tot de occlusie van de aangedane bloedvaten. Deze occlusie vindt enerzijds plaats door de vernauwing van het lumen van het bloedvat door plaquevorming en anderzijds via een bloedstolsel dat gevormd wordt door de activering van de stollingscascade als gevolg van het scheuren van de plaque. Occlusie van de arterie kan aanleiding geven tot ischemie, ofwel zuurstoftekort in het aangedane weefsel, dat kan resulteren in celdood. Een voorbeeld hiervan is het hartinfarct. Om de schade, ontstaan door het ischemisch proces, te beperken moet het afgesloten bloedvat terug geopend worden, ook wel reperfusie genoemd. Het reperfusie proces is echter niet zonder risico aangezien het gepaard gaat met een ontstekingsreactie, gekenmerkt door infiltratie van ontstekingscellen en vrijgave van een aantal ontstekingsmediatoren zoals interleukine-6 en -1β . Dit ontstekingsproces kan vervolgens weer leiden tot gereguleerde celdood of apoptose en dit via regulatie van verschillende cel signaleringroutes. Ischemie/reperfusie schade heeft diverse gevolgen wanneer verschillende organen zoals het hart of de nieren aangedaan worden. Bij ischemie/reperfusie schade van het hart wordt de samentrekkende functie van de hartspier gereduceerd door de ontstekings- en celdoodprocessen wat uiteindelijk resulteert in hartfalen. Beperking van ontsteking en celdood kan resulteren in een verbeterde samentrekkende functie van de hartspier na een hartinfarct. In de nier is de beperking van de ischemie/reperfusie schade vooral van belang bij niertransplantaties. Afname van ontsteking en celdood beperkt de kansen op acuut nierfalen en afstoting van het getransplanteerde orgaan.

Bloedstolling en ontsteking spelen een belangrijke rol in het bepalen van ischemie/reperfusie schade en verschillende studies hebben reeds een belangrijke interactie tussen stolling en ontsteking laten zien en dit vooral via cel signalering door protease geactiveerde receptoren of PARs. Anti-stollingsmiddelen zijn, behalve om hun antistollende functie, om deze reden dan ook gekend vanwege een celbeschermende functie via regulatie door deze PARs. Een aantal *in vivo* en *in vitro* studies hebben aangetoond dat de twee anti-stollingsmiddelen die in dit proefschrift bestudeerd werden, namelijk ASIS en APC, ook celbeschermende effecten hebben bij ischemie/reperfusie schade.

De exacte werkingsmechanismen van deze middelen werden echter nog niet achterhaald. Het antistollend middel ASIS is een inactieve vorm van de stollingsfactor VIIa die een complex vormt met TF maar waarbij de overige factoren van de stollingscascade niet geactiveerd worden. ASIS werd reeds als interventie gebruikt in een hart ischemie/reperfusiemodel waar het een beschermend effect had, maar het exacte werkingsmechanisme werd nog niet achterhaald. Het tweede antistollingsmiddel APC wordt gevormd wanneer trombine gevormd wordt en leidt tot proteolytische inactivering van de stollingsfactoren Va en VIIIa. In een aantal ischemie/reperfusie modellen waaronder in de nier en in het brein werd reeds aangetoond dat APC een beschermende werking heeft, maar tot nu toe werd dit nog niet aangetoond in een hart ischemie/reperfusie model. In **hoofdstuk 2 en 3** van dit proefschrift werd het effect van ASIS bepaald op hart ischemie/reperfusie schade en werd het exacte werkingsmechanisme bepaald. In **hoofdstuk 4** werd APC gebruikt als interventie in een hart ischemie/reperfusie model en werd het effect op schade en het werkingsmechanisme achterhaald. In **hoofdstuk 5** tenslotte, werden de 2 antistollingsmiddelen ASIS en APC gebruikt in een nier ischemia/reperfusie model waarbij er een vergelijking werd gemaakt met eerdere studies waarbij antistolling als interventie gebruikt werd.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de pathofysiologie van zowel hart als nier ischemie/reperfusie. Hierbij ligt de focus op de rol van ontsteking en apoptose in deze processen en de relatie met de cel signaleringsroutes die hierin betrokken zijn. Verder worden ook de verschillende functies van zowel het ASIS als het APC met betrekking tot hun antistollende en celbeschermende eigenschappen besproken.

Hoofdstuk 2 beschrijft de effecten van het anti-stollingseiwit ASIS dat tijdens verschillende tijdstippen van zowel de ischemie als de reperfusie fase wordt toegediend in een hart ischemie/reperfusie model in de muis. De effecten van ASIS toediening tijdens enkel de ischemische fase, de ischemie en reperfusie fase of enkel tijdens de reperfusie fase werden bepaald en dit ten aanzien van de infarctgrootte, stollingsparameters en cel signaleringsroutes. Het effect van ASIS was maximaal op gebied van afname in infarctgrootte en afname in TF activiteit niveaus wanneer het tijdens de ischemie en de reperfusie fase toegediend werd. Ook uit analyse van cel signaleringsroutes betrokken bij NF- κ B signalering, bleek dat toediening van ASIS tijdens ischemie en reperfusie optimaal was. Uit deze resultaten werd besloten dat toediening van ASIS tijdens

ischemie en reperfusie het meest optimale moment was en dit toedieningsmoment werd dan ook gebruikt in de verdere experimenten.

In **hoofdstuk 3** worden de effecten van ASIS toediening tijdens ischemie en reperfusie in een hart ischemie/reperfusie model in de muis beschreven waarbij er gebruik gemaakt werd van verschillende reperfusietijden variërend tussen 2 en 24 uur. ASIS toediening verminderde de infarctgrootte voor zowel een 2, 6, als 24 uur durende reperfusietijd. RNA analyse van een aantal genen betrokken in NF- κ B signalering liet een belangrijke afname zien van genexpressie na ASIS toediening. Verder verminderde de toediening van ASIS ook de NF- κ B eiwitniveaus, alsook de eiwitniveaus van een aantal genen gereguleerd door NF- κ B waaronder TF en interleukine (IL)-6. De ontstekingsremmende effecten van ASIS werden aangetoond door een verminderde leukocyten infiltratie in het ischemische deel van het hart wanneer ASIS werd toegediend en dit in vergelijking met toediening van een placebo. De anti-apoptotische werking van ASIS werd onderzocht door middel van RNA analyse en kleuring van de apoptotische cellen met behulp van DNA laddering maar een apoptotisch effect van ASIS kon niet aangetoond worden. Uit dit hoofdstuk kunnen we concluderen dat ASIS een beschermende werking heeft na hart ischemie/reperfusie schade en dit via NF- κ B signaleringsroutes die een verminderde ontsteking maar geen afname in apoptose tot gevolg hebben.

Hoofdstuk 4 beschrijft de resultaten van APC toediening in een hart ischemie/reperfusie model in de muis. Interventie met APC resulteerde in een verminderde infarctgrootte en dit in tegenstelling tot interventie met een niet-specifiek anti-stollingsmiddel heparine waarbij de infarctgrootte niet beïnvloed werd. APC toediening resulteerde in een afname in interleukines in het hart en een afname in de infiltratie van leukocyten. Verder had APC een sterk anti-apoptotisch effect en dit was te zien in zowel een afname in apoptotische cellen in het ischemische deel van het hart als in de verminderde aanmaak van een aantal proapoptotische genen. Signalering via NF- κ B was niet beïnvloed door toediening van APC maar verdere experimenten lieten zien dat PAR-1 signalering nodig is voor de beschermende werking van APC. Uit dit hoofdstuk kunnen we besluiten dat APC een beschermend effect heeft op hart ischemie/reperfusieschade via een reducering van ontsteking en apoptose, gereguleerd door PAR-1 signalering.

Aangezien zowel ASIS als APC een beschermend effect hebben op hartschade na ischemie/reperfusie, werden beide middelen ook gebruikt in een nier ischemie/reperfusie model in de muis. De resultaten zoals beschreven in **hoofdstuk 5** laten echter geen beschermend effect van ASIS noch van APC zien op nier ischemie/reperfusie schade. Nierschade werd bepaald door middel van bloed ureum en creatinine levels en door middel van scoring van de niercoupes voor schade. De resultaten lieten echter geen verschil zien tussen ASIS of APC toediening en de toediening van een placebo. Op cellulair niveau was er geen verschil zichtbaar op zowel ontstekings- als celdoodmechanismen bij ASIS of APC toediening. Uit de data beschreven in dit hoofdstuk kunnen we concluderen dat ASIS en APC geen effect hebben in het door ons gebruikte nier ischemie/reperfusie model, dit in tegenstelling tot eerdere studies die wel een beschermend effect zien van het remmen van de bloedstolling op schade in de nier.

In **hoofdstuk 6** ten slotte worden alle bevindingen zoals beschreven in dit proefschrift bediscussieerd en worden de mogelijke klinische toepassingen geanalyseerd. Met de studies zoals beschreven in dit proefschrift, zijn we tot een beter inzicht gekomen in het werkingsmechanisme van zowel ASIS als APC met betrekking tot niet enkel hun antistollende eigenschappen maar ook met betrekking tot hun celbeschermende functies. In dit proefschrift werden twee verschillende modellen voor ischemie en reperfusie gebruikt waarbij er verschillende effecten zichtbaar waren voor het gebruik van gelijkaardige interventies. Dit impliceert dat er binnen diverse organen en celtypes verschillende routes werkzaam zijn bij het bepalen van schade door middel van ischemie/reperfusie.