

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22224> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Vries, Dorottya K. de

Title: Inflammation and innate immunity in renal ischemia/reperfusion injury

Issue Date: 2013-11-14

12

Summary

Samenvatting in het Nederlands

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord



Summary

Kidney transplantation represents one of the most striking medical achievements of the 20th century. Its clinical success, however is limited by ischemia/reperfusion (I/R) injury. Renal I/R injury can lead to fibrosis and both acute and chronic graft dysfunction. Because of the increasing shortage of donors, more kidney grafts from marginal donors are being considered for transplantation, with concomitantly more initial graft injury and limited organ and patient survival. This has led to an increased need for interventions aiming to minimize I/R injury in kidney transplantation.

In **chapter 1**, the pathophysiology of renal I/R injury is discussed. The exact sequence of events leading to graft injury is complex and incompletely understood. Mainly based on animal experiments, inflammation is considered an important event in the development of tissue injury and graft dysfunction in renal I/R injury. Many individual factors, such as cytokines, complement and platelets have been suggested to be involved in the inflammatory response. Although some intervention studies in animals have shown promising results, results of studies in humans have generally been disappointing. Although this contrast may reflect species-related pharmacokinetic differences or differences in timing of the intervention, the poor translatability could also imply fundamental differences between experimental animals and humans in the pathophysiologic processes involved in I/R injury.

The research presented in this thesis aimed to assess which processes and factors are involved in I/R injury in human clinical kidney transplantation, in order to obtain new insights for therapeutic modalities. To be able to study local processes during I/R of the kidney, paired arteriovenous blood samples were collected during early reperfusion. In **chapter 2**, the first results of measurements in these arteriovenous samples are described. Interleukin (IL)-6 was released in large amounts from the graft in human living donor kidney transplantation, suggesting its potential role in the pathophysiology of I/R injury. However, in the consecutive intervention study utilizing a model of bilateral renal ischemia and reperfusion in mice, anti-IL-6 treatment did not protect from renal I/R injury. Moreover, kidney damage even increased in the intervention group. Another cytokine of interest was IL-9, which is exclusively released during reperfusion from deceased donor kidneys. **Chapter 3** describes that, similar to IL-6, inhibition of IL-9 during renal I/R injury in mice did not result in improvement of renal function, but instead worsened renal injury. These studies indicate that renal I/R injury apparently is not easily modifiable by inhibiting a single factor only. The complex interplay between cytokines possibly includes the ability of other cytokines to replace the effects of the inhibited factor.

By measuring the release of multiple cytokines at once, we tried to gain insight in how the network of cytokines changes upon reperfusion in living, brain dead and cardiac dead donor kidney transplantation. In **chapter 4** it is shown that brain dead donor kidneys display a massive inflammatory cytokine release upon reperfusion, while kidneys from living and cardiac dead donors showed a more modest cytokine response with release of IL-6 and small amounts of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). These released cytokines may originate from infiltrated T lymphocytes and macrophages. Already before transplantation, these cells were far more prevalent in brain dead donor kidneys than in living and cardiac dead donor kidneys. These observations suggest that brain dead donor kidneys have a pro-inflammatory tendency, that induces the release of many cytokines upon reperfusion. Brain dead donor kidneys may therefore require a different approach in the prevention of I/R injury, aimed at inhibiting this inflammatory response.

While cytokines are signaling molecules, the complement system has both signaling and lytic functions within the innate immune system. Activation of either the classical, alternative, or mannan-binding lectin complement pathway ultimately leads to the formation of the membrane attack complex, C5b-9. Animal studies of renal I/R injury generally show that complement inhibition reduces post-reperfusion damage. In **chapter 5.1** we assessed whether the complement cascade is activated during clinical renal I/R injury. Arteriovenous measurements showed no release of sC5b-9 from living donor kidneys, but a transient venous release of sC5b-9 from the reperfused graft in brain dead and cardiac dead donor kidney transplantation. This activation of the terminal complement cascade was not reflected by renal tissue deposition of C5b-9 in biopsies taken 45 minutes after reperfusion. These results indicate there is instantaneous, intravascular terminal complement activation upon reperfusion, that might be induced by intravascular cellular debris and hypoxic or injured endothelium. Besides measurements in blood and biopsy tissue, urinary sC5b-9 would also be an attractive biomarker to study. However in **chapter 5.2** we show that urinary sC5b-9 can be formed extra-renally in case of procedure-related (microscopic) hematuria and proteinuria. Therefore, sC5b-9 in urine is not a reliable reflection of complement activation after kidney transplantation.

Platelets also have an important role in the innate immune response, and can serve as mediators of the innate immune system, apart from their primary function in haemostasis. Although in preclinical studies activated platelets have been implicated in the inflammatory response after reperfusion, their role in clinical human I/R injury is unknown. In **chapter 6** we used our method of arteriovenous measurements over the reperfused kidney to assess release of markers of platelet activation and degranulation. No evidence for platelet activation and degranulation in the reperfused kidney was found. Next, we focused on

measurement of more subtle changes in excitability of platelets. In the novel, bedside platelet excitability assay, platelets were stimulated and their response measured. Remarkably, platelets in renal venous blood were less easily and less intensely excitable than platelets in arterial blood. Since platelets were not trapped in the kidney, this may reflect true inhibition of platelet excitability upon passing the injured kidney, therefore suggesting platelets probably do not initiate the inflammatory response of I/R injury.

The most important step preceding platelet activation would be endothelial damage. Interactions between endothelial cells and pericytes, the main supportive cells of the endothelium, are important in maintenance of vascular integrity. Angiopoietins are the signaling molecules facilitating these interactions. Experimental data have shown that enhancement of Angiopoietin (Ang)-1 signaling may be beneficial in renal I/R injury. Little is known however, about the behavior of angiopoietins in human renal I/R injury. In **chapter 7**, endothelial cell activation and changes in angiopoietins were assessed in human living and deceased donor kidney transplantation. Local release of angiopoietins was measured by arteriovenous measurements over the reperfused kidney. Results showed acute endothelial cell activation by a vast Ang-2 release from both living and deceased donor grafts shortly after reperfusion. Its counterpart Ang-1 was not released. Histological analysis of kidney biopsies showed endothelial cell loss after reperfusion. Baseline Ang-1 protein and mRNA expression was significantly reduced in deceased compared to living donors and declined further after reperfusion. These results showed that human renal I/R injury induces endothelial cell activation after reperfusion reflected by Ang-2 release from the kidney. Interventions aimed at maintenance of vascular integrity by modulating angiopoietin signaling may be promising in human clinical kidney transplantation.

Another way by which endothelial cells may be involved in the pathophysiology of renal I/R injury is by changes in expression of the adenosine generating enzymes CD39 and CD73. Recent animal experiments suggest that extracellular adenosine may be a critical mediator in protection from renal I/R injury. Information on adenosine production in human kidney transplantation however, is lacking. In **chapter 8** changes in protein and mRNA expression of adenosine generating enzymes CD39 and CD73 in transplanted human kidneys were assessed. Results showed that CD39 protein is overrepresented in living compared to deceased donor kidneys before transplantation. However, CD39 mRNA expression was not different between groups and did not change upon reperfusion. CD73 mRNA expression was significantly downregulated after reperfusion, while its tissue protein expression did not change. Results showed that living donor kidneys may be protected by higher pre-transplantation CD39 expression, although this effect may be counteracted by the decrease in CD73 expression after reperfusion. Further studies will need to focus on the consequences of these enzyme

changes for renal adenosine generation and kidney graft injury. The results from **chapter 6, 7, and 8** together demonstrate that there is endothelial injury upon reperfusion, although this apparently does not lead to platelet activation.

Oxidative damage has been considered a key factor in the initiation of I/R injury for decades now. Although findings from preclinical studies show that quenching reactive oxygen and nitrogen species (RONS) alleviates I/R injury, results from clinical intervention studies in humans are largely inconclusive. In **chapter 9** we systematically evaluated release of established biomarkers of oxidative and nitrosative damage during reperfusion of the transplanted kidney. Interestingly, none of the measured biomarkers of oxidative and nitrosative damage (i.e. malondialdehyde, 15(S)-8-*iso*-prostaglandin F_{2α}, nitrite, nitrate and nitrotyrosine) were released upon reperfusion. Cumulative urinary measurements confirmed plasma findings. The *production* of RONS during I/R is explicitly not questioned by these findings. Indeed, we found increased urinary PGE₂ after reperfusion and activation of Nrf2, the master regulator of oxidative stress signaling. Together this illustrates that there is an increase in oxidative stress during early reperfusion. Yet, the generated RONS apparently do not induce tissue damage in human I/R. These observations suggest a very efficient antioxidant system, providing an explanation for the limited efficacy of antioxidant therapy in human I/R injury. Overall, results of this study challenge the prevailing paradigm of prominent involvement of oxidative damage in the initiation of human I/R injury.

Altogether, the studies presented in this thesis suggest that inflammation is the prevailing process in the early reperfusion period in human kidney transplantation. When assessing the mechanisms potentially underlying I/R injury however, it remained unclear what initiates I/R injury and what causes the differences in outcome between living and deceased donor kidneys. In contrast to the approach in the previous chapters, in **chapter 10** we examined the genome-wide expression patterns of donor kidneys prior to and 45 minutes after reperfusion. The comparison of gene expression between living and deceased donor kidneys showed an explicit difference in metabolism related genes. Living donor kidneys regained the expression of genes associated with metabolism shortly after reperfusion, while these genes all remained downregulated after reperfusion in deceased donor kidneys. These fundamental differences provide a totally new viewpoint, indicating that failure to restart metabolism after reperfusion may lead to enhanced I/R injury in deceased donor kidney grafts. This hypothesis is strengthened by the abundant release of lactate from deceased donors, which is released in many times higher concentrations from deceased than living donor kidneys. More extensive studies to assess the mechanism and implications of the failure to restart metabolism after transplantation are required.

Therapeutical modalities and current progress in prevention of I/R injury are discussed in **chapter 11**. The first intervention possibility is prior to transplantation. Before the actual transplantation, the graft is already exposed to various noxious events, including potential donor brain death and cold preservation. These non-immunological factors such as donor health and the duration of the ischemic period probably have substantial impact on short and long term graft function. Consequently, interventions in the donor, aimed at minimizing pre-transplantation graft injury, may potentially have large effects in preventing acute and long term graft dysfunction. In **chapter 11.1** the various therapeutical interventions that have been tested in donors are reviewed. As suggested by the results in **chapter 4**, anti-inflammatory interventions in the donor may prevent consequent I/R injury after transplantation. Donor pretreatment by various other strategies, including ischemic preconditioning, HO-1 induction, anti-complement interventions, erythropoietin and catecholamines has been successful in animal experiments. Although many of these promising results in animals have yet to be confirmed in human kidney transplantation, the first clinical studies have already shown encouraging results. Next, during transplantation, I/R injury may be limited by modulation of the inflammatory response. In this perspective, mesenchymal stromal cells (MSCs) are under extensive investigation, since MSCs are able to exert immune regulatory and reparative effects. These versatile cells have been shown to migrate to sites of injury and to enhance repair by paracrine mechanisms instead of by differentiating and replacing the injured cells. In **chapter 11.2** various preclinical studies are discussed that demonstrate the beneficial effects of MSCs in ameliorating renal injury and accelerating tissue repair. Moreover, the first phase I studies of MSCs in human renal I/R injury and kidney transplantation have been started, and results are awaited soon. Preliminary results from clinical studies and recent developments in stem cell research have given reason to believe that MSC-based treatments will become generally available in the near future.

In conclusion, the studies in this thesis describe the systematical search for factors involved in the pathophysiology of human renal I/R injury. Many of the processes assumed to be involved in renal I/R injury based on animal studies could not be confirmed in our clinical study in humans. However, we found new evidence of complement activation and endothelial cell activation in human renal I/R injury. Moreover, there were large differences between deceased and living donor kidneys; brain dead donor kidneys have a unique pro-inflammatory cytokine release after reperfusion. Finally it appears that both brain dead and cardiac dead donor kidneys are not able to upregulate their metabolism-related genes upon reperfusion as living donor kidneys do, indicating that failure to restart metabolism may be a factor expanding I/R injury. All of these findings contribute to the understanding of renal I/R injury in humans and instigate the further search for therapeutical modalities to limit renal I/R injury.

Samenvatting in het Nederlands

Niertransplantatie is een van de meest opvallende medische prestaties van de 20e eeuw. Helaas wordt het klinisch succes ervan nog altijd beperkt door ischemie/reperfusie (I/R) schade. I/R-schade veroorzaakt acute en chronische transplantaatdisfunctie en kan leiden tot fibrose en het falen van de getransplanteerde nier. Door het toenemende tekort aan donoren worden steeds vaker organen van marginale donoren gebruikt voor transplantatie, waarbij in de regel meer schade optreedt en de overleving van het transplantaat slechter is. Dit creëert een behoefte aan interventies gericht op het verminderen van I/R-schade in de getransplanteerde nier.

In **hoofdstuk 1** wordt de pathofysiologie van I/R-schade van de nier besproken. De exacte volgorde van processen die leiden tot schade aan de getransplanteerde nier is complex en niet volledig bekend. Inflammatie wordt als cruciaal beschouwd in de ontwikkeling van weefselbeschadiging en transplantaatdisfunctie door nier I/R-schade. Van vele individuele factoren, zoals cytokines, complement en bloedplaatjes wordt gesuggereerd dat zij betrokken zijn bij de inflammatoire reactie. Helaas zijn de resultaten van de uitgevoerde onderzoeken bij mensen over het algemeen teleurstellend, hoewel sommige interventiestudies bij dieren veelbelovende resultaten hebben laten zien. Hoewel verschillen in de farmacokinetiek of verschillen in timing van de interventie dit contrast tussen uitkomsten bij mens en proefdier zouden kunnen veroorzaken, impliceert de beperkte interspecies translatie tussen soorten dat er fundamentele verschillen zijn tussen proefdieren en mensen in de pathofysiologie van I/R-schade.

De studies beschreven in dit proefschrift zijn gericht op het ontrafelen van de processen en factoren die betrokken zijn bij I/R-schade bij klinische niertransplantaties, zodat er nieuwe inzichten kunnen ontstaan om doelgerichte therapieën te ontwikkelen. Om lokale processen te bestuderen tijdens reperfusie van de nier, werden arterio-veneus gepaarde bloedmonsters afgenomen tijdens de reperfusiefase. In **hoofdstuk 2** worden de eerste resultaten van de metingen in deze arterio-veneuze monsters beschreven. Bij levende donor niertransplantatie kwam interleukine (IL)-6 in grote hoeveelheden vrij uit het transplantaat. Dit suggereert dat het een rol speelt in de pathofysiologie van I/R-schade. Uit de daarop volgende interventiestudie van bilaterale renale ischemie en reperfusie in muizen, bleek echter dat de anti-IL-6 behandeling niet tegen nier I/R-schade beschermt. De schade aan de nier was zelfs toegenomen in de interventiegroep. Een ander cytokine van belang was IL-9, dat uitsluitend vrijkwam uit overleden donor nieren na reperfusie. **Hoofdstuk 3** beschrijft dat, net als bij IL-6, remming van IL-9 in nier I/R-schade bij muizen niet resulteerde in verbetering van nierfunctie, maar juist in een toename van de schade aan de nier. Deze

studies geven aan dat nier I/R-schade bij niertransplantatie blijkbaar niet gemakkelijk te beïnvloeden is door het remmen van een enkele factor alleen. De complexe wisselwerking tussen cytokines onderling maakt het waarschijnlijk mogelijk dat andere cytokines de effecten van de geremde factor overnemen.

De suggestie dat cytokines of andere inflammatoire mediators betrokken zijn, wordt bevestigd in een volgende studie waarbij de arterioveneuze afgifte van verschillende cytokines systematisch vergeleken is tussen levende, hersendode en harddode donorniertransplantaties. Door het vergelijken van de afgifte van meerdere cytokines, is getracht inzicht te krijgen in de manier waarop het cytokinenetwerk verandert na reperfusie in deze verschillende groepen. In **hoofdstuk 4** wordt aangetoond dat nieren van hersendode donoren een massale inflammatoire reactie doormaken, waarbij meerdere cytokines vrijkomen na reperfusie. Getransplanteerde nieren van levende en harddode donoren toonden een meer bescheiden cytokinerespons met afgifte van IL-6 en kleine hoeveelheden monocyte chemoattractant proteïn-1 (MCP-1). Deze vrijgekomen cytokines kunnen afkomstig zijn van de geïnfilteerde T-lymfocyten en macrofagen die al vóór de transplantatie in nieren van hersendode donoren in veel grotere aantallen aanwezig waren dan in nieren van levende en harddode donoren. De bevindingen in dit hoofdstuk suggereren dat nieren van hersendode donoren een pro-inflammatoire tendens hebben, geïnduceerd door het vrijkomen van de vele cytokines na reperfusie. Daarom vereisen hersendode donoren mogelijk een aparte aanpak bij de preventie van I/R-schade, specifiek gericht op het remmen van deze inflammatoire reactie.

Cytokines zijn signaleringsmoleculen, het complementsysteem heeft echter zowel signalerings- als lytische functies binnen het aangeboren immuunsysteem. Activering van de klassieke, alternatieve of mannan-bindende lectineroute leidt uiteindelijk tot de vorming van het functionele complex C5b-9. Dierexperimenten laten over het algemeen zien dat complementremming de post-reperfusie nierschade vermindert. Mogelijk zijn deze resultaten te transleren van de muis naar de mens. Derhalve hebben we in **hoofdstuk 5.1** eerst onderzocht of de complementcascade wordt geactiveerd tijdens klinische nier I/R-schade. In de arterioveneuze metingen kwam sC5b-9 niet vrij uit nieren van levende donoren, maar bij de hersendode en harddode donor niertransplantaties kwam sC5b-9 wel kortdurend vrij uit het gereperfundeerde orgaan. Deze activering van de terminale complementcascade leidde niet tot de afzetting van C5b-9 in nierbiopsieën 45 minuten na reperfusie. Deze resultaten wijzen op acute, intravasculaire terminale complementactivatie na reperfusie, die mogelijk geïnduceerd wordt door intravasculaire celresten, of contact met hypoxisch of beschadigd endotheel.

Naast de metingen in bloed en weefsel, zou sC5b-9 in urine ook een aantrekkelijke biomarker kunnen zijn. Helaas blijkt dit niet mogelijk, omdat sC5b-9 ook extrarenaal kan worden

gevormd in het geval van (operatie-gerelateerde) hematurie en proteïnurie. In **hoofdstuk 5.2** concluderen we dat de meting van sC5b-9 in urine niet betrouwbaar is als marker van complementactivatie na niertransplantatie.

Bloedplaatjes maken tevens onderdeel uit van het aangeboren afweersysteem. Naast hun primaire functie in hemostase, kunnen bloedplaatjes dienen als mediators van het aangeboren immuunsysteem. Hoewel in preklinische studies aangetoond is dat geactiveerde bloedplaatjes betrokken zijn bij de inflammatie na reperfusie, is hun rol bij humane klinische I/R-schade onbekend. In **hoofdstuk 6** hebben we opnieuw gebruik gemaakt van arterioveneuze metingen over de gereperfundeerde nier, nu om het vrijkomen van markers van bloedplaatjesactivatie en -degranulatie te bepalen. Resultaten toonden geen bloedplaatjesactivatie of -degranulatie in de nier na reperfusie. Daarom werd vervolgens onderzocht of er meer subtiele veranderingen zijn in de activeerbaarheid van bloedplaatjes. In de nieuwe bloedplaatjesactiveerbaarheidsassay werden bloedplaatjes gestimuleerd in toenemende mate en hun reactie daarop gemeten. Het is opmerkelijk dat bloedplaatjes in het veneuze bloed uit de nier minder makkelijk en minder intens geactiveerd raakten dan bloedplaatjes in het arteriële bloed. Omdat de bloedplaatjes niet achterbleven in de nier, lijkt dit te berusten op een remming van de activeerbaarheid van de bloedplaatjes bij het passeren van de gereperfundeerde nier. Al met al suggereren de bevindingen dat bloedplaatjes waarschijnlijk niet de initiator zijn van de inflammatoire reactie bij I/R-schade van de nier.

Endotheelschade wordt gezien als de belangrijkste stap voorafgaand aan activering van bloedplaatjes. Erg belangrijk bij het voorkomen van deze schade zijn de interacties tussen endotheelcellen en pericyten, de belangrijkste ondersteunende cellen van het endotheel. Deze interacties worden gefaciliteerd door signaalmoleculen, de angiopoietines. Uit dierexperimenten blijkt dat verhoging van angiopoietine (Ang)-1 signalering beschermend werkt bij nier I/R-schade. Er is echter weinig bekend over de rol van angiopoietines bij humane nier I/R-schade. In **hoofdstuk 7** werden endotheelactivatie en de veranderingen in angiopoietines onderzocht en vergeleken bij niertransplantaties met levende en overleden donor. Het lokaal vrijkomen van angiopoietines werd bepaald in arterioveneuze metingen over de gereperfundeerde nier. De resultaten toonden acute activatie van het endotheel, blijkend uit het fors vrijkomen van Ang-2 uit de nieren van zowel levende als overleden donoren. De tegenhanger van Ang-2, Ang-1, kwam niet vrij uit de nier. Histologische analyse van nierbiopten toonde verlies van endotheelcellen na reperfusie. De eiwit- en mRNA-expressie van Ang-1 was significant minder in biopten van nieren van overleden donoren vergeleken met levende donoren. De Ang-1 expressie daalde verder na reperfusie. Samen tonen deze resultaten aan dat bij nier I/R-schade in de mens endotheelcellen beschadigd

raken, volgend uit de Ang-2 afgifte uit de nier na reperfusie. Interventies gericht op behoud van vasculaire integriteit door het beïnvloeden van de angiotensinogen-signalering zijn veelbelovend voor humane klinische niertransplantatie.

Een andere manier waarop endotheelcellen betrokken kunnen zijn bij de pathofysiologie van nier I/R-schade, is door hun expressie van de adenosinegenererende enzymen CD39 en CD73. Recente dierexperimenten suggereren dat extracellulaire adenosine een belangrijke rol speelt in de bescherming tegen I/R-schade. Er is echter nog weinig bekend over de rol van extracellulair adenosine bij niertransplantaties in de mens. In **hoofdstuk 8** werd de eiwit- en mRNA-expressie van adenosinegenererende enzymen CD39 en CD73 bepaald in getransplanteerde menselijke nieren. De resultaten toonden aan dat vóór transplantatie het CD39-eiwit meer aanwezig was in nieren van levende dan overleden donoren. De mRNA-expressie van CD39 was niet verschillend tussen de groepen en veranderde ook niet na reperfusie. De mRNA-expressie van CD73 was significant minder na reperfusie, terwijl de eiwitexpressie niet veranderde. De resultaten suggereren dat nieren van levende donoren worden beschermd door hogere pre-transplantatie CD39-expressie, hoewel dit effect kan worden tegengegaan door de afname van CD73-expressie na reperfusie. Verdere studies zullen zich moeten richten op de gevolgen van deze enzymveranderingen op de adenosinegeneratie in de nier en het uiteindelijke letsel aan de nier. Samenvattend tonen de resultaten van **hoofdstuk 6, 7 en 8** aan dat er endotheelschade is na reperfusie van de nier, hoewel dit niet leidt tot bloedplaatjesactivatie.

Ten slotte wordt oxidatieve schade al tientallen jaren beschouwd als een belangrijke factor in de initiatie van I/R-schade. Hoewel de bevindingen uit preklinische studies aantonen dat het verminderen van reactieve zuurstof- en stikstofradicalen I/R-schade kan verminderen, zijn de resultaten van klinische interventiestudies niet eenduidig. In **hoofdstuk 9** hebben we het vrijkomen van biomarkers van oxidatieve en nitrosatieve schade tijdens reperfusie van de getransplanteerde nier systematisch onderzocht. Geen van de gemeten biomarkers van oxidatieve schade en nitrosatieve (bijvoorbeeld malondialdehyde, 15(S)-8-iso-prostaglandine F_{2α}, nitriet, nitraat en nitrotyrosine) kwamen vrij na reperfusie. Cumulatieve metingen in urine bevestigden de bevindingen van de metingen in het bloed. De vorming van vrij-radicalen tijdens I/R wordt nadrukkelijk niet in twijfel getrokken door deze bevindingen. Dit werd juist bevestigd door de verhoogde concentraties van PGE₂ in urine en activering van Nrf2, de hoofdregulator van de oxidatieve stress-signalering. Samen tonen deze een toename in oxidatieve stress aan kort na reperfusie. Desondanks leidt de oxidatieve stress blijkbaar niet tot oxidatieve weefselschade bij nier I/R in de mens. Deze belangrijke bevinding suggereert dat mensen een zeer efficiënt anti-oxidantsysteem hebben. Dat is direct ook de verklaring voor de beperkte effectiviteit van antioxidant therapie bij I/R-schade in de mens. Over het

geheel genomen gaan de resultaten van deze studie in tegen het heersende paradigma van prominente betrokkenheid van oxidatieve schade in de initiatie van I/R-schade in de mens.

Concluderend suggereren de studies in dit proefschrift dat inflammatie een belangrijk proces is in de reperfusieperiode van humane niertransplantatie. Echter, het blijft moeilijk in te schatten welke processen belangrijk zijn bij het veroorzaken van I/R-schade en wat de verschillen tussen nieren van levende en overleden donoren veroorzaakt. In tegenstelling tot de aanpak in de voorgaande hoofdstukken, is in **hoofdstuk 10** gepoogd nieuwe aanknopingspunten te vinden door de expressiepatronen van het totale genoom te bepalen in nierbiopten, genomen voor en 45 minuten na reperfusie. De vergelijking van genexpressiepatronen tussen nieren van levende en overleden donoren toonde een expliciet verschil in metabolisme-gerelateerde genen. Terwijl bij nieren van levende donoren de expressie van genen geassocieerd met metabolisme kort na reperfusie herstelde, bleven deze genen in nieren van overleden donoren alle ge-downreguleerd na reperfusie. Deze fundamentele verschillen impliceren een totaal nieuwe hypothese, namelijk dat het onvermogen om het metabolisme te herstarten na reperfusie kan leiden tot toegenomen I/R-schade bij niertransplantaties met nieren van overleden donoren. Deze hypothese wordt versterkt door de resultaten van lactaatmetingen, waarbij lactaat na reperfusie in vele malen hogere concentraties vrijkwam uit nieren van overleden donoren dan van levende donoren. Deze bevindingen zullen echter moeten worden bevestigd in uitgebreidere studies naar het mechanisme en de implicaties van het falen van het herstarten van het celmetabolisme.

Tenslotte worden de therapeutische mogelijkheden en de huidige vooruitgang in de preventie van I/R-schade besproken in **hoofdstuk 11**. Het eerste moment waarop een therapie kan aangrijpen is al voor de transplantatie. Voor de eigenlijke implantatie wordt het transplantaat al blootgesteld aan verschillende schadelijke gebeurtenissen, waaronder bijvoorbeeld hersendood van de donor en de koude preservatie van het transplantaat. Deze niet-HLA-afhankelijke factoren zoals de gezondheid van de donor en de duur van de ischemie hebben een aanzienlijk effect op de korte- en langetermijn transplantaatfunctie. Dientengevolge kunnen interventies in de donor, gericht op het minimaliseren van de transplantaatschade voor transplantatie, mogelijk al grote gevolgen hebben in het voorkomen van acute en lange termijn transplantaatdisfunctie. In **hoofdstuk 11.1** worden de verschillende therapeutische donorinterventies opgesomd en besproken. Zoals reeds geïmpliceerd door de resultaten in hoofdstuk 4, kan anti-inflammatoire behandeling van de donor de daaruit voortvloeiende I/R-schade na transplantatie mogelijk verminderen. Donorvoorbehandeling met verschillende andere methoden, waaronder ischemische preconditioning, HO-1-inductie, anti-complementinterventies, erythropoëetine en catecholamines is reeds succesvol gebleken

bij dierproeven. Alhoewel menig van deze veelbelovende resultaten bij dieren nog moeten worden bevestigd bij de mens, hebben de eerste klinische studies bij niertransplantatie al bemoedigende resultaten laten zien.

Ten tweede kan tijdens transplantatie de I/R-schade beperkt worden door modulatie van de inflammatoire reactie. Vanuit dit perspectief zijn mesenchymale stromale cellen (MSC's) uitgebreid onderzocht, omdat MSC's in staat zijn om het immuunsysteem te beïnvloeden en herstellende effecten uit te oefenen. Van deze veelzijdige cellen is aangetoond dat ze migreren naar plaatsen van schade en daar herstel stimuleren door hun paracrine effecten en niet door differentiatie en vervanging van de beschadigde cellen. In **hoofdstuk 11.2** worden verschillende preklinische studies besproken die de gunstige effecten van MSC's in het verminderen van schade aan de nieren en het versnellen van het weefselherstel tonen. Bovendien zijn de eerste fase 1-studies van MSC's ter vermindering van I/R-schade bij klinische niertransplantatie gestart. De definitieve resultaten worden binnenkort verwacht, echter de voorlopige resultaten van klinische studies en recente ontwikkelingen in het onderzoek naar stamcellen geven reden te geloven dat behandelingen met MSC's toegepast zullen gaan worden in de nabije toekomst.

De studies in dit proefschrift beschrijven de systematische zoektocht naar factoren die betrokken zijn bij de pathofysiologie van I/R-schade van de menselijke nier. Veel processen die op basis van dierstudies verondersteld waren betrokken te zijn bij deze I/R-schade konden niet worden bevestigd in onze klinische studies van niertransplantatie. We vonden echter nieuw bewijs voor de betrokkenheid van complement- en endotheelcelactivatie bij nier I/R-schade in de mens. Bovendien waren er grote verschillen tussen transplantaties met nieren van levende en overleden donoren. Hierbij bleek dat nieren van hersendode donoren een unieke combinatie van pro-inflammatoire cytokines afgeven na reperfusie. Een andere belangrijke bevinding is dat nieren van zowel hersendode als harddode donoren nieren niet in staat lijken te zijn de metabole motor opnieuw op te starten na reperfusie. Al deze bevindingen dragen bij aan een beter begrip van I/R-schade van de nier en stimuleren de verdere zoektocht naar therapeutische modaliteiten om de effecten van I/R-schade te beperken.

List of publications

de Vries DK, Khairoun M, Lindeman JH, Bajema IM, de Heer E, Roest M, van Zonneveld AJ, van Kooten C, Rabelink TJ, Schaapherder AF, Reinders ME. Renal ischemia-reperfusion induces release of angiopoietin-2 from human grafts of living and deceased donors. *Transplantation*. 2013;96(3):282-9

Khairoun M, van der Pol P, **de Vries DK**, Lievers E, Schlagwein N, de Boer HC, Bajema IM, Rotmans JI, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, van Kooten C, Reinders ME. Renal ischemia-reperfusion induces a dysbalance of angiopoietins, accompanied by proliferation of pericytes and fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(6):F901-10.

Reinders ME, Roemeling-van Rhijn M, Khairoun M, Lievers E, **de Vries DK**, Schaapherder AF, Wong SW, Zwaginga JJ, Duijs JM, van Zonneveld AJ, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, de Fijter JW, van Kooten C, Rabelink TJ, Roelofs H. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with end-stage renal disease are suitable for autologous therapy. *Cytotherapy*. 2013;15(6):663-72.

Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, Bajema IM, **de Vries DK**, Schaapherder AF, Claas FH, van Miert PP, Roelen DL, van Kooten C, Fibbe WE, Rabelink TJ. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(2):107-11.

de Vries DK, van der Pol P, van Anken GE, van Gijlswijk DJ, Damman J, Lindeman JH, Reinders ME, Schaapherder AF, van Kooten C. Acute but transient release of terminal complement complex after reperfusion in clinical kidney transplantation. *Transplantation*. 2013;95(6):816-20.

de Vries DK, Kortekaas KA, Tsikas D, Wijermars LG, van Noorden CJ, Suchy MT, Cobbaert CM, Klautz RJ, Schaapherder AF, Lindeman JH. Oxidative damage in clinical ischemia/reperfusion injury: a reappraisal. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(6):535-45

Kortekaas KA, **de Vries DK**, Reinders ME, Lievers E, Ringers J, Lindeman JH, Schaapherder AF. Interleukin-9 release from human kidney grafts and its potential protective role in renal ischemia/reperfusion injury. *Inflamm Res*. 2013;62(1):53-9.

de Vries DK, Schaapherder AF, Reinders ME. Mesenchymal stromal cells in renal ischemia/reperfusion injury. *Front Immunol.* 2012;3:162

van der Pol P, **de Vries DK**, van Gijlswijk DJ, van Anken GE, Schlagwein N, Daha MR, Aydin Z, de Fijter JW, Schaapherder AF, van Kooten C. Pitfalls in urinary complement measurements. *Transpl Immunol.* 2012;27(1):55-8.

de Vries DK, Lindeman JH, Ringers J, Reinders ME, Rabelink TJ, Schaapherder AF. Donor brain death predisposes human kidney grafts to a proinflammatory reaction after transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11(5):1064-70.

de Vries DK, Lindeman JH, Tsikas D, de Heer E, Roos A, de Fijter JW, Baranski AG, van Pelt J, Schaapherder AF. Early renal ischemia-reperfusion injury in humans is dominated by IL-6 release from the allograft. *Am J Transplant.* 2009;9(7):1574-84.

Becker T, Mevius I, **de Vries DK**, Schaapherder AF, zu Vilsendorf AM, Klempnauer J, Frölich JC, Tsikas D. The L-arginine/NO pathway in end-stage liver disease and during orthotopic liver and kidney transplantation: biological and analytical ramifications. *Nitric Oxide.* 2009;20(1):61-7.

Curriculum Vitae

The author of this thesis was born on January 23, 1982. She grew up in Zoetermeer and graduated *cum laude* from secondary school (Atheneum) in 2000. In the same year she started to study Biomedical Sciences at Leiden University. After two years, she decided to combine this study with the study of Medicine. In 2006 she completed Biomedical Sciences *cum laude* with a graduate research project at the department of Transplantation Surgery (Dr. A.F.M. Schaapherder). The research project on ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation made her enthusiastic to continue on the subject during her clinical rotations. In 2008 she obtained her medical degree *cum laude*. That same year she was selected for an AGIKO scholarship by ZonMw.

Appointed by this scholarship she continued and expanded the research on I/R injury from 2008-2010. She engaged in successful research collaborations with groups from the Nephrology department. During her research years and thereafter, she presented her findings on many international meetings and was awarded multiple grants and scholarships. Based on the results described in this thesis, additional studies on the role of metabolism in I/R injury have been started, in which she is still involved.

From January 2010 the author started surgical residency at the Leiden University Medical Center (LUMC) under supervision of prof dr J.F. Hamming, and since July 2012 she continued her training in the Haga teaching hospital, The Hague, under supervision of dr. J.W.S. Merkus and later dr. J.J. Wever. She lives with her husband Paul and their son Brem in Wassenaar.

Dankwoord

Het tot stand komen van dit proefschrift heeft natuurlijk meer dan alleen mijn voeten in aarde gehad. Met het besef hierin niet volledig te kunnen zijn, wil ik een aantal mensen speciaal bedanken.

Mijn promotor, professor J.H. van Bockel, wil ik van harte danken voor de kansen die mij zijn geboden binnen de afdeling Heelkunde van het LUMC. Tijdens de voortgang van het onderzoek was er altijd alle ruimte voor overleg, waarbij uw blik vaak zeer verhelderend werkte.

Mijn co-promotor, dr. J.H.N. Lindeman. Beste Jan, je was een geweldige rots in de branding in het onderzoek. Dank voor je vriendelijkheid en opbeurende woorden als het tegengat. Mijn co-promotor, dr. A.F.M. Schaapherder. Beste Sandro, jij was en bent een groot voorbeeld en inspiratiebron voor mij in de manier waarop je kliniek en onderzoek combineert. Ik heb veel geleerd van de overlegmomenten die we (met anderen) hadden, waarbij je bijdrage altijd concreet en constructief was.

Dr. Ringers wil ik bedanken voor zijn steun als hoofd van de transplantatiechirurgie. De overige transplantatiechirurgen van het LUMC, dr. Baranski, Braat en Dubbeld wil ik van harte danken voor hun betrokkenheid bij mijn onderzoek en hun inzet om bloed en biopten te verzamelen.

Collega's van de afdeling nefrologie van het LUMC, in het bijzonder prof. Rabelink, prof. Van Kooten, Marlies Reinders en Pieter van der Pol, dank voor de fijne samenwerking. Het aantal gezamenlijke publicaties de afgelopen jaren getuigt van de mooie samenwerking die we hebben opgebouwd: ik hoop dat we zo doorgaan.

Alle co-auteurs die hebben bijgedragen aan het uitvoeren en (her)schrijven van de hoofdstukken opgenomen in dit proefschrift wil ik van harte danken voor hun bijdrage en de prettige samenwerkingen.

D6-35 genoten Kirsten, Chantal, Vivianne, Mark, Alexander en vele anderen, het was alleen qua temperatuur dat we niet op één lijn zaten. Dank voor het groepsgevoel. Leonie, heel veel succes met de voortzetting van de prachtige I/R onderzoekslijn: je hebt nu al succes! Verder zijn zeker in het begin van mijn onderzoeksperiode de collega's van het CKCL steun en toeverlaat geweest. Dank aan Hans, Nico, Fred, Ria, Hinke, Harm, Ruben, Marja en Margo, Ali, Jolanda and of course Kathryn.

Lieve oud-studiegenootjes Ellen, Suzanne, Marjan en Femke. Geweldig dat we allen (letterlijk) een andere kant op zijn gegaan maar elkaar toch altijd weten te vinden. Lieve Bubbels vriendinnen Jolanda, Inge, Michelle, Rieneke, Annemieke, Ruth, Eveline en Lenny, jullie zijn mij zo dierbaar!

Lianne Koens en Margreet Poot, bedankt dat jullie mijn paranimfen willen zijn. Lieve Margreet, onze vriendschap is zo met mijn leven verweven, het voelt goed je vandaag naast me te hebben! Lieve Lianne, de combi van pret op reis en altijd een serieus luisterend oor maken je goud waard!

Lieve mama, door de stappen die jij terug hebt gedaan, was het voor ons mogelijk stappen vooruit te doen. Ik ben dankbaar dat je er altijd voor ons bent geweest, en ik verheug me op alle tijd samen die nog komen gaat! David en Bálint, jullie zijn topbroers! Dank voor jullie interesse. Lieve schoonouders, bedankt voor jullie steun en belangstelling in elke fase van mijn studies.

Lieve kleine Brem, mama is zo blij dat jij er bent! Hoe trots ik ook ben dat dit proefschrift af is, jij hebt het me in een heel ander perspectief doen zien! Lieve Paul, jij hebt me altijd gesteund en gestimuleerd uitdagingen aan te gaan. Heel veel dank daarvoor!

Dorottya de Vries
November 2013