



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Microvascular alterations in transplantation

Khairoun, M.

Citation

Khairoun, M. (2015, January 14). *Microvascular alterations in transplantation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/31432>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/31432>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/31432> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Khairoun, Meriem

Title: Microvascular alterations in transplantation

Issue Date: 2015-01-14

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

Acknowledgment

Curriculum vitae

Publication list

Nederlandse samenvatting

In de ontwikkeling van nierziekten en afstotingsreactie na niertransplantatie, spelen endotheel schade en herstel en de ontwikkeling van nierfibrose (bindweefselvorming) een belangrijke rol. Endotheel cellen (EC) vormen de binnenste laag van onze bloedvaten in de nieren. Het concept dat het begin van nierfibrose zou kunnen ontstaan door beschadiging aan EC, suggereert dat interventies om vasculaire integriteit in stand te houden essentieel zijn voor het behoud van nierfunctie. Door beter te begrijpen welke mechanismen betrokken zijn bij EC schade tijdens nierziekten en na niertransplantatie, is het wellicht mogelijk om hierop in te grijpen en therapeutische interventies te ontwikkelen. In dit proefschrift is onderzocht welke factoren van belang zijn in het proces van EC schade en herstel in chronische nierfalen (CKD), diabetes mellitus (DM) type 1, Ischemie/Reperfusie schade (I/R schade) en na transplantatie.

I/R schade van de nier ontstaat na transplantatie en is een belangrijke voorspeller voor nierfalen na een niertransplantatie. Tot dusver is niet geheel bekend welke mechanismen bijdragen aan I/R schade. Steeds meer studies wijzen in de richting van EC schade en een gestoord capillair herstel als vroege mechanismen die betrokken zijn bij I/R schade. De microvasculaire EC schade die optreedt is geassocieerd met profibrotische veranderingen van het nierweefsel. Het begin van deze microvasculaire schade zou kunnen ontstaan doordat EC niet meer op normale wijze signaleren naar pericyten (de steuncellen van de bloedvaten). Deze interactie tussen pericyten en EC wordt gereguleerd door verschillende angiogene factoren, waaronder angiopoietine-1 (beschermend/anti-inflammatoir) en angiopoietine-2 (pro-inflammatoir). In **hoofdstuk 2**, werd gebruik gemaakt van een rat model waar I/R schade van de nieren geïnduceerd werd en 9 weken daarna vervolgd is. In deze periode werd op verschillende tijdstippen het effect van nier I/R schade op veranderingen in angiopoietines expressie bestudeerd. Daarnaast werd de associatie met microvasculaire remodelling, pericyten expressie en ontwikkeling van nierfibrose bestudeerd. Uit deze studie bleek dat verlies van peritubulaire capillaire EC vroeg na I/R schade in de nier gepaard ging met een gestoorde Ang-2/Ang-1 balans, toename in pericyten en ontwikkeling van interstitiële fibrose. Negen weken na inductie van I/R schade trad er een verbetering op in de Ang-2/Ang-1 balans welk gepaard ging met herstel in aantal EC en pericyten. Deze data ondersteunen de hypothese dat angiopoietines en pericyten een belangrijke rol spelen in de microvasculaire EC schade en in het herstel van de nierschade.

Hoewel deze experimentele bevindingen een functionele rol suggereren van angiopoietines in EC schade in de nieren, is er weinig bekend of de rol van angiopoietines bij humane I/R schade in de nieren. Onze hypothese was dat de inflammatoire cascade in humane nier I/R schade geïnitieerd wordt door EC activatie en daaropvolgend angiopoietine-2 (Ang-2)

afgifte. In **hoofdstuk 3**, werd deze hypothese bestudeerd in klinische niertransplantatie (zowel levende als overleden donoren), door gebruik te maken van arterioveneuze metingen over de gereperfundeerde nier. Gepaarde arteriële en veneuze bloedsamples uit de nieren werden verzameld opeenvolgende tijdstippen gedurende de vroege fase van reperfusie. Deze studie liet zien dat nieren van zowel levende als overleden donoren Ang-2 afgeven. Dit ging gepaard met verlies van ECs in de nieren, wat bleek uit daling in CD34 en vWF expressie en verminderde angiopoietine-1 (Ang-1) eiwit en mRNA expressie. Onze bevindingen suggereren dat angiopoietines en pericyten een belangrijke rol spelen in microvasculaire remodeling tijdens I/R schade in de nier.

In **hoofdstuk 4**, werd onze studie naar lokale vasculaire EC schade voortgezet in vroege DM. Microvasculaire afwijkingen in de nieren zijn veel voorkomende histopathologische bevindingen bij diabetische nephropathie (DN). In humane DN worden morfologische veranderingen in capillairen gevonden, zoals elongatie en toename in aantal glomerulaire capillairen. Veranderingen in angiogene factoren zoals VEGF-A en angiopoietines zouden betrokken zijn bij de progressie van DN. Door gebruik te maken van een streptozotocine geïnduceerd diabetes model in varkens met een atherogeen dieet, is onderzocht of het vroege stadium van DM geassocieerd is met systemische microvasculaire schade. Daarnaast is onderzocht welke vroege factoren betrokken zijn bij de ontwikkeling van diabetische nefropathie. Hiervoor werd een varkensmodel gebruikt met een follow-up periode van 15 maanden na inductie van DM. Deze studie liet zien dat vroege atherogene DM leidt tot systemische microvasculaire afwijkingen, weerspiegeld door toegenomen capillaire kronkeligheid gemeten met de niet-invasieve sidestream darkfield techniek (SDF). Daarnaast werden er glomerulaire afwijkingen gevonden passend bij vroege DN en een dysbalans in angiopoietines in de nieren van diabetische atherogene varkens. Dit ging gepaard met een verhoogde urine albumine/creatinine ratio. De dysbalans in angiopoietines was geassocieerd met toegenomen capillaire kronkeligheid. Dit suggereert een relatie tussen toegenomen systemische microvasculaire kronkeligheid en veranderde expressie van angiopoietines in de nieren. Samenvattend wijzen deze bevindingen erop dat systemische microvasculaire schade en angiopoietine dysbalans de eerste gebeurtenissen zijn in het initiëren van nierschade in de vroege fase van DN.

In de vorige hoofdstukken lag de focus vooral op microvasculaire schade in de nieren na I/R schade en DM type 1. Om te onderzoeken of deze beschadigingen aan het endotheel zich ook systemisch manifesteren hebben wij de microcirculatie in beeld gebracht met SDF techniek in DN en CKD patiënten (niet-diabeten).

In **hoofdstuk 5**, werden de effecten van gecombineerde nier-pancreas transplantatie op microvasculaire schade in DM type 1 patiënten, met en zonder DN, bestudeerd in cross-sectionele en longitudinale studies. Daarnaast werd systemische capillaire kronkeligheid gecorreleerd met markers voor endotheelschade in het bloed, inclusief soluble thrombomoduline (sTM) en Ang-2/Ang-1. Vergelijkbaar met andere studies, liett deze studie toegenomen capillaire kronkeligheid zien in DM type 1 patiënten ten opzichte van gezonde controles. Dit ging gepaard met Ang-2/Ang-1 dysbalans en een toename in sTM. Een interessante bevinding van deze studie is dat er een verbetering werd gezien van capillaire kronkeligheid en normalisatie van Ang-2/Ang-1 balans na nier-pancreas transplantatie, maar niet na niertransplantatie alleen. Dit suggereert dat zowel β -cel functie als herstel van nierfunctie noodzakelijk zijn om systemische microvasculaire schade te verbeteren na transplantatie. Tevens werd er een correlatie gevonden tussen microvasculaire kronkeligheid en toegenomen Ang-2/Ang-1 ratio. In de longitudinale studie werden reversibiliteit van zowel microvasculaire schade als afname in sTM en Ang-2/Ang-1 dysbalans waargenomen binnen het eerste jaar na nier-pancreas transplantatie. Beoordeling van de mate van capillaire kronkeligheid, als marker voor microvasculaire schade, door gebruik te maken van de SDF techniek en angiopoetine waarden in het serum, zouden belangrijke hulpmiddelen kunnen zijn om de mate van microvasculaire verstoringen in DM patiënten in te schatten voor en na nier-pancreas transplantatie.

Naast onze bevindingen in nier-pancreas transplantatie patiënten, werden in **hoofdstuk 6** de resultaten van SDF metingen en endotheel dysfunctie marker bepalingen vergeleken in niet-diabetische CKD patiënten en gezonde controles. Daarnaast werd het effect van niertransplantatie bestudeerd. Onze eerste bevinding was dat niet diabetische CKD patiënten een gestoorde systemische microvasculatuur hebben met toegenomen kronkeligheid en verhoogde Ang-2 en sTM waarden in het serum in vergelijking met gezonde vrijwilligers. Dus naast toegenomen capillaire kronkeligheid in DN patiënten, zoals besproken in hoofdstuk 5, lieten niet-diabetische CKD patiënten ook systemische microvasculaire schade zien. De groep CKD patiënten werd vervolgens gedurende 12 maanden na niertransplantatie vervolgd om het effect van transplantatie op microvasculaire veranderen te onderzoeken. Interessant is dat niertransplantatie leidt tot verbetering van microvasculaire kronkeligheid en normalisatie in Ang-2 en sTM binnen 6 maanden na transplantatie. Dus, herstel van uremie in niet-diabetische CKD patiënten leidt in deze patiënten tot verbetering van de microvasculaire schade.

Tot slot werden in **hoofdstuk 7** microvasculaire veranderingen bestudeerd in niertransplantatie patiënten na acute rejectie (AR). Het is bekend dat herhaalde episodes van AR de EC beschadigen en tot destabilisatie van peritubulaire capillairen in de nieren. Echter, of AR na

niertransplantatie geassocieerd is met systemische microvasculaire schade is nog niet eerder onderzocht. Uit onze studie bleek dat AR tot gestoorde systemische microvasculaire schade leidt met toegenomen capillaire kronkeligheid, in vergelijking met stabiele niertransplantatie patiënten. De capillaire kronkeligheid bleef aanhouden tot 1 jaar na AR. Daarnaast was er een stijging in circulerende Ang-2/Ang-1 ratio, VEGF-A en sTM. Deze angiogene factoren, zouden een rol kunnen spelen in de pathogenese van microvasculaire schade tijdens inflammatoire processen en acute rejectie in de nieren. Sinds EC activatie/schade de kans op overleving van het transplantaat beïnvloedt, zouden therapeutische interventies gericht op behoud van microvasculaire integriteit een gunstig effect kunnen hebben op de lange termijn transplantaat overleving na AR. Monitoring van de microcirculatie middels SDF techniek zou een nieuwe niet-invasieve methode kunnen zijn om in een vroeg stadium microvasculaire schade te detecteren tijdens AR.

Concluderend lieten de resultaten van dit proefschrift zien dat EC schade en herstel een belangrijke rol spelen in nierziekten en na transplantatie. Zowel nier I/R schade als DM induceerden systemische microvasculaire schade wat blijkt uit in toegenomen capillaire kronkeligheid, gemeten met SDF techniek, en een dysbalans in angiopoietines. Tevens vertoonden patiënten met nierziekten en rejectie na niertransplantatie systemische microvasculaire afwijkingen. Transplantatie liet herstel zien van systemische microvasculaire verstoringen in diabetische en niet-diabetische CKD patiënten. De resultaten in dit proefschrift suggereren dat angiopoietines belangrijke factoren zijn in het reguleren van microvasculaire homeostase. Toekomstig onderzoek gericht op therapeutische interventies is noodzakelijk om een oorzakelijk verband aan te tonen tussen de rol van angiopoietines en pericyten in EC stabilisatie en herstel. Agentia om de Ang-2/Ang-1 balans te moduleren zouden een gunstig effect kunnen hebben als therapeutisch middel voor microvasculaire stabilisatie in nierziekten. Het gebruik van SDF techniek en markers voor endotheel dysfunctie zouden als diagnostisch middel gebruikt kunnen worden voor en na transplantatie.

Acknowledgement

The work presented in this thesis would not have been possible without the help and support of many people. First of all I would especially like to thank all the patients and volunteers that participated in our studies.

I would sincerely like to thank my promotor Professor Ton Rabelink for the opportunity to work on this project. Dear Ton, thank you for encouraging my research and for allowing me to grow as a research scientist. Your advice and help have been priceless. Despite your busy schedules, you have always made time to guide me during this PhD-project.

Also, I would gratefully like to thank my co-promotor Dr. Marlies Reinders for her guidance during this PhD project. Dear Marlies, thank you for your invaluable supervision, help and patience during this project. I learned a lot from you. I admire your passion for your work and the ambition to realize this project with me. Despite your busy schedules your door was always open to me when needed.

I also want to thank my second promoter Professor Anton-Jan van Zonneveld. Dear Anton-Jan, been a member of your vascular group was a pleasure for me. It was a unique experience working at your laboratory and learning all the basics of fundamental science. Thank you for your valuable discussions during the lab meetings. I admire your enthusiasm for science and the way you motivate people around you.

Also I would like to express my gratitude to Professor Cees van Kooten. Dear Cees, thank you for your valuable inputs and contributions to my projects.

Dear colleagues and students at the laboratory of department of Nephrology thank you for all the support during different steps of this thesis. Thank you for your warm welcome at the laboratory and for your help and conversations we had about non-work related topics. I would especially like to thank Ellen Lievers and Nicole Schlagwein for their valuable help with the experiments and laboratory work. This thesis would not have been possible without your help, patience teaching me the laboratory skills and your support. Also many thanks to all the other technicians for their help. I would also thank Kim Zuidwijk for her help during the start of my PhD-project.

I am also thankful to all the co-authors and collaborators in this thesis. It was a pleasant working with you and meeting you.

Next, I would further like to thank my roommates, Ethan, Rianne, Françoise, Karin, Maaïke and Pieter, thank you for the nice time, listening and advice when needed.

I would like to thank the nephrologists, fellow-nephrologist and nurse practitioners, especially Jeannet Bisschop, for their help with inclusion of patients. Also thanks to the secretaries Marianne Lobbezoo and Arnelle Kallan-van Loenen for their administrative and supportive help when needed during this PhD-project.

I am also thankful to my current supervisors at the Diakonessenhuis in Utrecht, Dr. A.F. Muller and Dr. T.J.M. Tobe. Dear Alex and Tom, thank you for providing me the time and space to complete this thesis in the last period. Also many thanks to my co-residents at the department of Internal medicine for their support.

Next, I would like to thank my family and friends. I would deeply like to thank my parents, Rahma Bekkouri and Abdelmajid Khairoun, for their endless love, support and helping me through this period of my life. Thank you for the interest and opportunities you gave me and the sacrifice you made and for helping me taking care for our daughter Safiye. Without your support I would not be able to finish this thesis and stand here on this day. I owe my special thanks to my sisters Hajar, Hanae, Sarah and my brother Othman Khairoun for their support. Also many thanks to my grandmother, uncles and aunts, especially my aunt Fatima Bekkouri.

A special gratitude to my parents in law, dear baba Mustafa Ocak and anne Gönül Bakan, I would like to thank you for being there for me when I needed you and for your unconditional support. I appreciate your help with taking care of our daughter Safiye, while I was working on this thesis. Dear Nursena and Fatih Ocak thank you for your support and encouragement.

Finally, I would like to sincerely thank my beloved husband, friend and colleague Gürbey Ocak. Thank you for going with me during this journey, for your support and belief in me. I am grateful to have you by my side. Dear Safiye, my dearest daughter, thank you for being there for me and making me laugh every day.

Curriculum vitae

De auteur van dit proefschrift werd geboren in 1982 te Tanger in Marokko. In 1989 emigreerde zij naar Nederland en volgde ze haar basisschool en middelbare school in Zoetermeer. In 2001 behaalde zij haar VWO diploma aan het Meander College en is zij aan de opleiding geneeskunde begonnen aan de universiteit van Leiden. Tijdens haar studie was zij al vroeg betrokken bij meerdere onderzoeksprojecten binnen verschillende afdelingen als student-assistent, waarvan een onderzoek naar urologische complicaties bij ontvangers van non-heart beating type III nieren onder leiding van Dr. A. Baranski (transplantatie heekunde) en Dr. P.J. Marang- vd Mheen (medische besliskunde) in het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) wat resulteerde in een publicatie. In 2007 heeft zij haar semi-arts stage gedaan op de afdeling nierziekten/niertransplantatie (LUMC) waar haar interesse voor onderzoek binnen de transplantatie geneeskunde is ontstaan. In 2008 behaalde zij haar arts-examen en is zij aan dit promotieonderzoek begonnen onder supervisie van Prof. Dr. T.J Rabelink en Dr. M.E.J Reinders. Data uit proefschrift zijn op verschillende nationale en internationale congressen gepresenteerd. Vanaf mei 2013 is zij in opleiding tot internist onder leiding van Dr. A.F Muller in het Diaconessenziekenhuis in Utrecht.

Curriculum vitae (English)

The author of this thesis was born on 1982 in Tanger, Morocco. In 1989 she immigrated to the Netherlands and continued her primary and secondary education in Zoetermeer. In 2001 she completed her VWO (secondary) education and started to study medicine at the university of Leiden. During her study she participated at different research projects at different department of the LUMC, of which one study under supervision of Dr. A. Baranski (transplant surgery) and Dr. P.J.Marang-vd Mheen (medical decision making) at the Leiden University Medical Center (LUMC) about urological complications and their impact on survival after kidney transplantation from deceased cardiac death donors, which resulted in a publication. In 2007 she performed her final clinical elective training at the department of nephrology/kidney transplantation (LUMC) where her clinical and research interest began for transplantation field. In 2008 she graduated from medical school and started the current PhD project under supervision of Prof. T.J. Rabelink and Dr. M.E.J. Reinders. Data from this thesis are presented at different national and international conferences. From May 2013 she started her specialist training for internal medicine at the Diaconessenhospital in Utrecht, under supervision of Dr. A.F. Muller.

Publicationlist

Marang-van de Mheen PJ, Nijhof HW, **Khairoun M**, Haasnoot A, van der Boog PJ, Baranski AG. Pancreas-kidney transplantations with primary bladder drainage followed by enteric conversion: graft survival and outcomes. *Transplantation*. 2008 Feb 27;85(4):517-23.

Khairoun M, Baranski AG, van der Boog PJ, Haasnoot A, Mallat MJ, Marang-van de Mheen PJ. Urological complications and their impact on survival after kidney transplantation from deceased cardiac death donors. *Transpl Int*. 2009 Feb;22(2):192-7.

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 Jun;15(6):663-72.

Khairoun M, de Koning EJ, van den Berg BM, Lievers E, de Boer HC, Schaapherder AF, Mallat MJ, Rotmans JI, van der Boog PJ, van Zonneveld AJ, de Fijter JW, Rabelink TJ, Reinders ME. Microvascular damage in type 1 diabetic patients is reversed in the first year after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2013 May;13(5):1272-81.

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 angiotensins, accompanied by proliferation of pericytes and fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Sep 15;305(6):F901-10

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 angiotensin-2 from human grafts of living and deceased donors. *Transplantation*. 2013 Aug 15;96(3):282-9.

Dane MJ, **Khairoun M**, Lee DH, van den Berg BM, Eskens BJ, Boels MG, van Teeffelen JW, Rops AL, van der Vlag J, van Zonneveld AJ, Reinders ME, Vink H, Rabelink TJ. Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Apr;9(4):698-704.

Bijkerk R, van Solingen C, de Boer HC, van der Pol P, **Khairoun M**, de Bruin RG, van Oeveren-Rietdijk AM, Lievers E, Schlagwein N, van Gijlswijk DJ, Roeten MK, Neshati Z, de Vries AA, Rodijk M, Pike-Overzet K, van den Berg YW, van der Veer EP, Versteeg HH, Reinders ME, Staal FJ, van Kooten C, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Hematopoietic microRNA-126 protects against renal ischemia/reperfusion injury by promoting vascular integrity. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Aug;25(8):1710-22

Roemeling-van Rhijn M, **Khairoun M**, Korevaar SS, Lievers E, Leuning DG, Ijzermans JN, Betjes MG, Genever PG, van Kooten C, de Fijter HJ, Rabelink TJ, Baan CC, Weimar W, Roelofs H, Hoogduijn MJ, Reinders ME. Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal Cells are Immunosuppressive In vitro and in a Humanized Allograft Rejection Model. *J Stem Cell Res Ther*. 2013 Nov 25;Suppl 6(1):20780.