



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Ischemia/reperfusion injury : a metabolic meltdown

Wijermars, L.G.M.

Citation

Wijermars, L. G. M. (2018, March 21). *Ischemia/reperfusion injury : a metabolic meltdown*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/61202>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/61202>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/61202> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wijermars, L.G.M.

Title: Ischemia/reperfusion injury : a metabolic meltdown

Issue Date: 2018-03-21



NEDERLANDSE
SAMENVATTING

Ischemie/reperfusie(I/R) schade is de paradoxale toename van weefselschade wanneer ischemisch weefsel opnieuw doorbloed wordt. Deze vorm van schade speelt een cruciale rol in onder andere myocard infarcten, cerebrovasculaire accidenten en orgaantransplantaties.

Al meer dan 50 jaar wordt er veel onderzoek verricht naar I/R schade. Uit evaluatie van deze onderzoeken blijkt dat veelbelovende resultaten uit diermodellen moeilijk transleerbaar zijn naar de kliniek. Dit benadrukt het belang om een stap terug te nemen en te focussen op de mechanismen van I/R schade in de mens. In de studies beschreven in dit proefschrift dienen niertransplantaties als humaan model om de mechanismen van I/R schade te onderzoeken. Omdat zowel ischemie als reperfusie tijdens orgaantransplantaties gepland zijn (in tegenstelling tot bijvoorbeeld infarcten) en er directe toegang is tot het gereperfundeerde orgaan, biedt de situatie van niertransplantaties de uitgelezen mogelijkheid om I/R schade in de mens te onderzoeken.

Door het persisterende donortekort worden steeds vaker organen van marginale donoren gebruikt voor transplantatie. Transplantatie van deze organen leidt in toenemende mate tot orgaanschade en heeft daardoor, zowel op de korte als lange termijn, verminderende transplantaat functie en overleving tot gevolg. Interventies die I/R schade kunnen voorkomen of verminderen zijn dan ook van cruciaal belang.

Op basis van de uitkomsten van niertransplantaties is er een graduele verdeling te maken in de mate van I/R schade. Levende donor niertransplantaties leiden vrijwel nooit tot “delayed graft function” (DGF – het vertraagd op gang komen van de nier na transplantatie en de uitkomstparameter van I/R schade), terwijl meer dan de helft van de overleden donor niertransplantaties DGF tot gevolg heeft. Levende donor niertransplantaties worden om deze reden als referentiegroep gebruikt in de beschreven studies.

Voorgaande studies, waarin niertransplantatie gebruikt werd als model voor humane I/R, konden geen bewijs vinden voor de rol van veronderstelde mechanismen van I/R schade zoals trombocyt, endotheel, neutrofiel en complement activatie. (*Thesis D.K. de Vries*) Ook konden er geen biomarkers van vrije radicaal schade worden aangetoond in de acute fase na reperfusie van het transplantaat. Dit terwijl vrije zuurstof radicalen altijd in één adem genoemd worden met I/R schade. Bronnen van vrije zuurstof radicalen zijn de gereactiveerde mitochondriale elektrontransportketen, NADPH oxidase in neutrofielen en xanthine oxidase (XO) in endotheel cellen. De rol van mitochondriale dysfunctie in I/R schade wordt beschreven in hoofdstuk 2, 4 en 5 van dit proefschrift. Neutrofiel



activatie als veroorzaker van I/R schade werd eerder al uitgesloten door de Vries et al. (*Thesis D.K. de Vries*) Hoofdstuk 2 belicht de hypoxanthine-XO-as en laat zien dat XO als bron van vrije radicalen geen oorzaak is van I/R schade in de mens. Middels in situ enzymologie werd er een lage XO activiteit gemeten, zowel aan het einde van de ischemische periode als in de acute fase van reperfusie. Deze lage XO activiteit werd geconfirmeerd door de afwezigheid van door XO geproduceerd urinezuur en oxypurinol in de gereperfundeerde nier. Bovenal werd er geen allantoïne uitgescheiden door de gereperfundeerde transplantaten, zelfs niet door nieren met klinische I/R schade (DGF). Allantoïne is het stabiele eindproduct van de antioxidant activiteit van urinezuur in de mens. Aangezien er geen allantoïne wordt gevormd ondermijnt dit direct de veronderstelde aanwezigheid en rol van vrije zuurstof radicalen in humane I/R schade. Opvallend was dat de in situ enzymologie wel een hoge XO activiteit toonde in ischemische ratten nieren; een uiting van interspeciële verschillen in het XO systeem.

Hoofdstuk 3 neemt deze interspeciële verschillen verder onder de loep. Zoals uitgebreid besproken in de inleiding van dit proefschrift (Hoofdstuk 1), bestaat er een enorme translationele kloof tussen experimentele modellen en de klinische realiteit. Dit blijkt uit de talloze veelbelovende resultaten uit preklinische studies die bij vertaling naar humane studies falen op klinische eindpunten. In een breed gedragen Nature artikel, gepubliceerd in 2014 (*Chouchani et al.*), werd een nieuw mechanisme van I/R schade geïndiceerd: accumulatie van succinaat tijdens ischemie leidt tot de terugstroom van elektronen naar complex I van de mitochondriale elektronentransportketen, waardoor er tijdens reperfusie vrije radicalen ontstaan die I/R schade veroorzaken. In de bestudeerde muismodellen werd dit mechanisme in verschillende organen gevalideerd. In hoofdstuk 3 laten wij zien dat er van dit mechanisme geen sprake is in de mens, aangezien er geen succinaat accumulatie plaats vindt tijdens ischemie. Sterker nog, in tegenstelling tot de muis, werden patiënten met I/R schade (+DGF) juist gekenmerkt door uitputting van hun succinaat reserves. Daarnaast werden duidelijke interspeciële verschillen gevonden met betrekking tot de mitochondriale vatbaarheid voor ischemie en reperfusie; waarbij humane mitochondria het meest kwetsbaar zijn en al na een relatief korte periode van ischemie verminderde capaciteit hebben om succinaat te oxideren. Resultaten in Hoofdstuk 3 laten zien dat succinaat gedreven I/R schade een muis-fenomeen is en legt opnieuw het knelpunt van translatie van experimentele modellen naar de mens bloot.

Kortom, van verschillende veronderstelde mechanismen van I/R schade kon de rol in humane I/R, in de klinische situatie van niertransplantaties, niet aangetoond worden.

In de zoektocht naar aanwijzingen voor alternatieve, onderliggende mechanismen



beschrijft Hoofdstuk 4 een objectieve benadering middels ‘transcriptomics’ en ‘metabolomics’. Tijdens de transplantatieprocedure werden de nier arterie en vene gecannuleerd, zodat over de tijd gepaarde samples over het orgaan afgenomen konden worden, vanaf het eerste moment van reperfusie. Arterioveneuze (AV) metingen laten zien dat DGF wordt gekenmerkt door de persisterende productie van lactaat, het eindproduct van aerobe glycolyse. Daarentegen zijn transplantaten die geen DGF ontwikkelen direct na reperfusie in staat om over te schakelen naar een aeroob metabolisme. Deze transplantaten scheiden geen lactaat uit en de nieren verzuren niet. De bevindingen in plasma werden gevalideerd middels de analyse van nierbiopten. Deze biopten werden gepaard afgenomen: aan het einde van de ischemische periode en 45 minuten na reperfusie. In biopten van nieren die adequaat herstelden werd direct na reperfusie een stijging van de glucose/lactaat ratio gemeten. In DGF transplantaten bleef deze ratio daarentegen laag, passend bij defecte oxidatieve phosphorylatie (OXPHOS) in de mitochondriën. Beeldvorming middels transmissie elektronen microscopie liet inderdaad herstel zien van mitochondriale morfologie in transplantaten die adequaat functioneerden en verslechtering van de mitochondriale morfologie in DGF nieren. Defecte mitochondriale OXPHOS leidt vervolgens tot totale metabole uitputting in DGF nieren. Dit wordt geïllustreerd door persisterende hypoxanthine excretie (het eindproduct van ATP katabolisme) en de afwezigheid van opregulatie van metabole genen.

Hoofdstuk 5 vormt een vervolg op de bevindingen van hoofdstuk 4 en verdiept zich in het energiek functioneren van het transplantaat na reperfusie. Met een metabooloom-brede benadering wordt middels arterioveneuze metingen en biopten voor en na reperfusie de status van DGF en daarmee renale I/R schade in de mens beschreven.

Het metabole profiel van DGF nieren is samen te vatten in 5 metabole clusters: (I) metabole ineenstorting/energetische crisis, (II) beta-oxidatie, (III) glycolyse/ glutamine oxidatie en autofagie, (IV) Krebs cyclus intrede defecten en (V) phospholipolyse/cel schade.

De post-reperfusie status van DGF transplantaten wordt gekenmerkt door het verlies van phosphocreatine en voortdurende productie van xanthine en hypoxanthine, de eindproducten van ATP/GTP katabolisme. Dit duidt op het plaatsvinden van een totale energetische crisis. DGF nieren laten zien dat alles in het gereperfundeerde orgaan in staat wordt gesteld om de mitochondriale Krebs cyclus draaiende te houden. Herstel van 3-hydroxybutyraat waarden in post-reperfusie biopten indiceert dat de beta-oxidatie intact is, evenals de pyruvaat synthese middels glycolyse en transaminase van glutamaat. Ondanks de vorming



van deze Krebs cyclus substraten vindt er excretie plaats van acetyl-CoA en pyruvaat vanuit de gereperfundeerde DGF nier. Dit duidt erop dat deze substraten niet in staat zijn de Krebs cyclus binnen te treden, waarna ze worden uitgespoeld uit het transplantaat. Excretie van het Krebs cyclus intermediair α -ketoglutaaraat, in combinatie met de afwezigheid van herstel van succinaat concentraties, impliceert een defect in oxoglutaaraat dehydrogenase activiteit in DGF nieren. De defecten in mitochondriale oxidatieve phosphorylatie leiden tot ATP tekorten. Dit leidt tot het onvermogen om cel homeostase te behouden wat resulteert in een staat van voortdurende weefselschade na reperfusie. Dit wordt weerspiegeld door de continue excretie van phospholipiden en uracil, welke respectievelijk membraan en cel schade kenmerken.

Kortom, ondanks intact glycolyse, glutaminolyse en beta-oxidatie, produceren DGF nieren onvoldoende ATP door gebrekkige oxidatieve phosphorylatie die wordt veroorzaakt door defecten in de Krebs cyclus. Van de bovenstaande, functionele processen produceert aerobe glycolyse 2*ATP. Echter, glutaminolyse en peroxismale beta-oxidatie kunnen de ATP productie van aerobe glycolyse beperken. Glutaminolyse en beta-oxidatie produceren namelijk H^+ . Dit leidt tot verzuring van het transplantaat en zorgt ervoor dat het pH-gevoelige enzym lactaat dehydrogenase (LDH) ineffectief wordt. Op deze manier kunnen glutaminolyse en beta-oxidatie de ATP productie van LDH tijdens aerobe glycolyse, welke pyruvaat omzet naar lactaat, limiteren. Het wordt daarom verondersteld dat het remmen van glutaminolyse en beta-oxidatie in DGF transplantaten netto-netto meer ATP oplevert, omdat LDH en daarmee aerobe glycolyse optimaler kunnen functioneren.

Een andere mogelijke route die de ATP productie zou kunnen vergroten is middels de afbraak van inosine tot hypoxanthine (8*ATP). Middels deze metabole route produceren erythrocyten, levende cellen die ATP genereren in de afwezigheid van mitochondriën, effectief energie. Omdat de mitochondriën in DGF nieren dysfunctioneel zijn, zou de afbraak van inosine naar hypoxanthine hypothetisch ATP op kunnen leveren.

Concluderend is de status van DGF een gevolg van extreem energetisch falen veroorzaakt door disfunctie van de mitochondriale Krebs cyclus. Verder onderzoek zal uit moeten wijzen of het preserven/preconditioneren van het transplantaat met de beschreven energetische substraten zal leiden tot verbetering van de energie status en daarmee tot vermindering van I/R schade. Verwacht wordt dat preventie van mitochondriale schade, vooraf aan ischemie en reperfusie, effectiever zal zijn in het limiteren van I/R schade.

Al met al omvat Hoofdstuk 5 één van de belangrijkste conclusies van dit proefschrift: I/R schade (in humane niertransplantaties) wordt veroorzaakt door



mitochondriale dysfunctie, wat leidt tot energiek falen. Om uit te zoeken welke klinische factoren predisponeren voor dit metabool falen en invloed hebben op de korte en lange termijn uitkomsten van niertransplantaties, worden transplantaat functie en overleving geanalyseerd in Hoofdstuk 6. Analyse van data van de Nederlandse Orgaantransplantatieregistratie (NOTR) laat zien dat nieren gedoneerd na hartdood (DCD: Donation after Circulatory Death; n=2891) een 50% hogere incidentie hebben van primaire non-functie (PNF) en een bijna verdrievoudiging van incidentie van DGF, vergeleken met transplantaten gedoneerd na hersendood (DBD: Donation after Brain Death; n=4084). Deze hoge incidentie van DGF in DCD versus DBD nieren leidt tot terughoudendheid in het gebruik van DCD transplantaten. Echter, wanneer we alle nieren die PNF ontwikkelden na transplantatie excluseren (7,9% van alle DCD en 4,5% van alle DBD transplantaten), is de 10-jaar transplantaat overleving gelijk voor beide donortypen. Verdere analyse wijst uit dat wanneer de koud ischemische periode langer duurt dan 24 uur, dit leidt tot disproportionele verslechtering van DCD transplantaat overleving.

Ook wijst analyse uit dat wanneer DBD nieren DGF ontwikkelen na transplantatie, dit een negatieve invloed heeft op transplantaatoverleving, terwijl de ontwikkeling van DGF geen negatieve invloed heeft op de overleving van DCD transplantaten. Er werd gerealiseerd dat achter de discrepantie in impact van DGF op transplantaatoverleving mogelijk een biologisch verschil tussen de twee verschillende donortypen schuil gaat. Inderdaad, wanneer we het functionele transplantaat herstel vergelijken tussen de twee donortypen zien we een exponentiele inhaalslag van DCD transplantaten. Deze inhaalslag compenseert volledig voor het initiële transplantaatverlies en resulteert daardoor in vergelijkbare lange termijn transplantaat overleving van DBD en DCD transplantaten.

Waarom DGF in DBD nieren wel een negatieve invloed heeft en in DCD nieren niet en waarom DCD nieren een hoger herstel vermogen lijken te hebben, is niet evident. Enerzijds zou het zo kunnen zijn dat DCD nieren beter beschermd zijn tegen de nadelige effecten van DGF. Een mogelijkheid is dat de initiële warme ischemie die optreedt bij DCD donoren een extreme vorm is van ischemische preconditionering waardoor beschermende mechanismen geactiveerd worden. Anderzijds kan het ontbreken van het hersendood zijn van de donor in DCD donoren een positief effect hebben op de lange termijn overleving. Uitgebreide studies zullen moeten uitwijzen welke oorzaken onderliggend zijn aan het verschillende 'effect' van DGF in de twee donortypen. De belangrijkste klinische conclusie van dit proefschrift is dat de negatieve kijk op de transplantaat overleving van DCD nieren nodig aan revisie toe is. We kunnen concluderen dat de terughoudendheid om DCD nieren toe te laten tot nationale transplantatie-



programma's herzien moet worden, wanneer men rekening houdt met de duur van de koude ischemie. De verwachting is dat orgaantekorten hierdoor verminderen en wachtlijsten zullen slinken.

Vanuit de conclusies van Hoofdstuk 3,4 en 5, gaat Hoofdstuk 7 verder in op de rol van mitochondriën. Op dit moment bestaan er geen biomarkers die de mate van functioneel herstel van het transplantaat gedurende de periode van DGF kunnen voorspellen. Omdat dysfunctionele mitochondriën onderliggend zijn aan DGF, word er verondersteld dat herstel van de mitochondriale machinerie vooraf gaat aan functioneel herstel en dat markers van mitochondriale regeneratie mogelijk biomarkers voor functioneel herstel kunnen zijn. Hoofdstuk 7 beschrijft een retrospectieve studie waarin bipten van nier transplantaten, die zich op dat moment in de fase van DGF bevinden, door middel van immunohistologie zijn geanalyseerd. De studie laat zien dat herstel van de mitochondriale pool, wat zich kenmerkt door toename van Mitochondriaal SOD in het biopt, voorafgaat aan functioneel herstel. Daarnaast voorspelt activatie van de Hippo-pathway, een ver in evolutie teruggaande pathway die een rol speelt in organogenese, functioneel herstel via translocatie van eind effector YAP-1 naar de celkern. Markers voor fission and fusion, het samenvoegen en splisten van mitochondriën waarmee de mitochondriale pool wordt vernieuwd, kwalificeerden zich niet als marker voor functioneel herstel. De resultaten van deze studie kunnen, naast de diagnostische rol als marker voor functioneel herstel, ook bekeken worden in het licht van therapie. In het kader van een zo genoemde theranostic: een combinatie van therapie en diagnosticum. Mogelijk dient activatie van de Hippo-pathway of het versnellen van mitochondriaal herstel ook een therapeutisch doel, namelijk versneld functioneel herstel van het transplantaat. Toekomstige studies zullen dit moeten uitwijzen.

Doorgaand op het concept van mitochondriale bescherming als doelwit tegen I/R schade, wordt de rol van mitochondriale aldehyde dehydrogenase (ALDH) enzymen bediscussieerd in Hoofdstuk 8. Deze ALDH enzymen spelen een rol in het wegvangen van schadelijke aldehydes die ontstaan bij reperfusie van ischemisch weefsel. De resultaten in Hoofdstuk 8 laten zien dat wanneer we genexpressie profielen van controle nieren vergelijken met DGF nieren, in controle nieren 'pathways' waarin ALDH enzymen betrokken zijn verrijken, terwijl deze pathways niet verrijken in DGF nieren. Dit suggereert een beschermende rol van ALDH enzymen in I/R schade of een rol voor aldehyde dehydrogenase enzymen in een adequate reactie op I/R. Daarnaast komt de beschermende rol van ALDH₂ in I/R schade sterk naar voren in epidemiologische studies. De deactiverende puntmutatie in het ALDH₂ gen, die zeer prevalent is in het Aziatische ras, leidt tot



een toename van schade bij myocard infarcten. Hoofdstuk 8 beschrijft de validatie van de genexpressie profielen middels qPCR en WesternBlot. Daarnaast hebben DGF nieren in de acute fase van reperfusie een significant lagere ALDH activiteit vergeleken met controle nieren. Hieruit wordt verondersteld dat verminderde ALDH activiteit gebruikt kan worden als biomarker om DGF te voorspellen. Bovendien zijn mitochondriale ALDH enzymen een veelbelovend doelwit om potentieel de incidentie van DGF te verminderen.

Hoofdstuk 9 beschrijft een alternatieve interventie die mogelijk I/R schade kan verminderen. Het beschrijft de resultaten van de 'POSITIVE' studie: Pre-Operatieve STatine InterVEntion en cardiale bescherming in mitraalklep chirurgie. Patiënten die een mitraalklep-plastiek ondergingen, waarbij via cardiopulmonaire 'bypass' het myocard intermitterend ischemisch en gereperfundeerd was, werden willekeurig verdeeld in twee patiëntengroepen. Onderzocht werd of dagelijks 40 mg statine minimaal 2 weken voor de ingreep of twee maal 40 mg statine 24 uur voor de ingreep, myocardschade kon verminderen. Metingen middels Multiplex vonden geen effect op postoperatieve inflammatoire markers. Wel werd er een effect gevonden van pre-operatieve statines op circulerende schademarkers van het hart: CPK, en Troponine T waren significant lager in patiënten die 2 weken lang statines gedoseerd kregen. Verdere studies zullen moeten uitwijzen of donor voorbehandeling met simvastatine effectief is in het verminderen van renale I/R schade.

Hoofdstuk 10 beschrijft een ander moment van interventie: niet gedurende de ischemie of na de reperfusie, maar voor het intreden van ischemie in de donor. Dit hoofdstuk vat alle experimentele en klinische studies samen die gedaan zijn naar donor voorbehandeling. Verschillende strategieën laten veelbelovende resultaten zien in dierexperimentele studies (o.a. ischemische preconditionering, HO-1 inductie, anti-inflammatoire interventies, anti-complement interventies, erythropoëetine en catecholamines), echter ontbreken de resultaten van klinische studies veelal. Een belangrijke conclusie die volgt uit dit overzichtsartikel is dat medische onderzoeken naar donor voorbehandeling zich bevinden in complexe ethische spanningsvelden. Hoewel er zeker geanticipeerd moet worden op deze ethische kwesties realiseren wij ons ook dat de factoren van de nieuwe inzichten die deze studies geven en de positieve effecten die zij kunnen hebben op het vergroten van de donorpool, zwaar moeten wegen in de morele dilemma's.

De studies in dit proefschrift bieden inzicht in mechanismen van renale I/R schade (DGF), bestudeerd vanuit humane niertransplantaties. Een energieke crisis onderscheidt DGF nieren van adequaat functionerende controle transplantaten.



Ondanks intacte Krebs cyclus substraat productie door beta-oxidatie, aerobe glycolyse en glutaminolyse in DGF nieren, zijn deze substraten niet in staat om de Krebs cyclus in te stromen. Kortom, door dysfunctionele mitochondriën ontbreekt een efficiënte ATP productie, wat leidt tot de metabole incompetentie die onderliggend is aan DGF. Deze theorie doet een nieuw licht schijnen op I/R schade en kan verklaren waarom ATP-afhankelijke therapieën in het verleden ineffectief zijn gebleken.

Resultaten lieten zien dat de mitochondriale vatbaarheid voor schade van ischemie en reperfusie enorm verschilt tussen mensen en knaagdieren. Dit verschil in vatbaarheid zou mogelijk kunnen verklaren waarom sommige therapieën wel effectief zijn in de experimentele, maar niet in de klinische situatie.

Een grote cohort studie geeft inzicht in donor, ontvanger en transplantatie-procedure variabelen en verwerpt de terughoudendheid naar het gebruik van DCD donor nieren. Een superieur herstel vermogen werd gevonden in DCD vergeleken met DBD transplantaten en toekomstige studies moeten uitwijzen welke biologische verschillen hier onderliggend aan zijn. Resultaten in dit proefschrift kwalificeren MnSOD en Yap-1 als biomarkers voor functioneel herstel tijdens DGF en potentiële strategieën die I/R schade kunnen verminderen moeten focussen op preservatie van mitochondriën (hypothetisch met het peptide SS-31 of activatie van mitochondriale aldehyde dehydrogenase enzymen).

Het identificeren van pathways en doelwitten die effectief mitochondriale functie preserveren zal voor de toekomst een grote en belangrijke uitdaging zijn, om zo de energieke crisis onderliggend aan DGF te voorkomen. Grote translationele studies zullen klinische en celbiologische data moeten combineren om de link tussen I/R schade en lange termijn uitkomsten te begrijpen. Op deze manier kunnen de desastreuze effecten van I/R schade op lange termijn transplantaat functie en overleving overwonnen worden, waardoor het aantal succesvolle niertransplantaties zal toenemen.



