



## **Samenvatting proefschrift Mariëlle Verweij**

“Rationale and effect of reduction of immunosuppressive load in organ transplant recipients”

**Promotie: 2 december 2011  
Erasmus Universiteit Rotterdam**

**Promotor:**  
Prof. dr. J.N.M. IJzermans

**Co-promotores:**  
Dr. R.W.F. de Bruin

Solide orgaantransplantatie is de behandeling van keuze voor patiënten met eindstadium orgaanfalen.<sup>1</sup> Echter, met slechts een beperkt aantal organen beschikbaar van levende donoren,<sup>2</sup> is de vraag naar donororganen groter dan het aanbod. In pogingen om het aanbod te vergroten, heeft de transplantatie gemeenschap gezocht naar alternatieven, door bijvoorbeeld gebruik te maken van organen die gedoneerd worden na overlijden.<sup>3</sup> Hoewel hierdoor het aanbod van de donororganen wordt vergroot, worden deze organen beschouwd als suboptimaal. De toename in tijd tussen de beëindiging van de circulatie, het intreden van de dood, de uitname van het orgaan, tot aan de perfusie met koude preservatie vloeistoffen<sup>3, 4</sup> vermindert de kwaliteit van het transplantaat door de initiatie van onomkeerbare ischemie/reperfusie (I/R) schade. I/R schade is een complex fenomeen dat geïnitieerd wordt door onvoldoende aanvoer van zuurstofrijk bloed naar de organen (ischemie), gevolgd door het herstel in de aanvoer van het zuurstofrijke bloed (reperfusie). Tijdens de vroege reperfusie fase worden er vrije zuurstofradicalen gevormd die lokale macromoleculen zoals vetten, eiwitten<sup>5</sup> en DNA<sup>6</sup> beschadigen. Als gevolg van deze oxidatieve modificaties sterven cellen af en ontstaat er een ontstekingsreactie die de weefselschade verergert,<sup>7</sup> met als gevolg dat de adequate werking van het transplantaat ernstig wordt vermindert. I/R schade wordt beschouwd als een risicofactor voor de ontwikkeling van het primair of vertraagd niet-functioneren van het transplantaat.<sup>4, 8-10</sup> Het dysfunctioneren van het transplantaat zorgt daarnaast ook voor een verminderde overleving van het transplantaat en de patiënt, alsmede de kans dat het transplantaat wordt afgestoten wordt vergroot. <sup>8, 11, 12</sup>

Sinds de behandeling van I/R schade nog niet optimaal is, is het noodzakelijk dat er nieuwe behandelmethoden worden onderzocht die I/R schade tijdens orgaantransplantatie verminderen. In dit proefschrift onderzochten wij 2 nieuwe



behandelmethode om I/R schade te verminderen, namelijk genetisch en nutritionele preconditionering.

#### Genetische preconditionering

Oxidatieve schade aan DNA is tijdens de normale cellulaire stofwisseling is onvermijdelijk door de vorming van vrije zuurstofradicalen.<sup>13</sup> Het transcriptie-gekoppelde nucleotide excision repair (TC-NER) is een mechanisme dat onder andere verantwoordelijk is voor het herstel van oxidatieve laesies aan de getranscribeerde DNA streng. Wanneer het TC-NER mechanisme niet goed functioneert, neemt het aantal oxidatieve laesies toe. Dit kan het normale verouderingsproces versnellen en leiden tot een verscheidenheid van ziekten waarvan sommige worden gekenmerkt door symptomen van vroegtijdige veroudering, zoals het Cockayne syndroom.<sup>14-16</sup> Het Cockayne syndroom is een lichtgevoelige autosomaal recessieve aandoening met kenmerken van vroegtijdige veroudering zoals neurodegeneratie, gehoorverlies, dun haar, en dunne huid<sup>15, 16</sup> dat ontstaat door mutaties in de TC-NER specifieke genen *csa* en *csb*.

Verschillende studies hebben aangetoond dat kort-levende muizen met een defect in het TC-NER mechanisme een aantal fysiologisch kenmerken gemeen hebben met lang-levende muizen, zoals een lager lichaamsgewicht, een lagere lichaamstemperatuur, een lagere bloedglucose spiegel en een lagere concentratie van de insuline-achtige groeifactor-1 (IGF-1) in het serum.<sup>17-19</sup> Sinds deze kenmerken normaal gesproken worden geassocieerd met levensverlenging en een verhoogde weerstand tegen oxidatieve schade,<sup>20</sup> suggereert dit dat een defect in het TC-NER mechanisme muizen kan preconditioneren tegen andere vormen van oxidatieve schade, zoals de schade die ontstaat tijdens I/R.

Wij onderzochten of een defect in het TC-NER mechanisme resulteert in bescherming tegen I/R schade van de nier. Daarvoor gebruikten wij 2 muismodellen die een mutatie hadden in de TC-NER specifieke *csa* en *csb* genen. Wij vonden dat de nierfunctie en de overleving van deze muizen na het chirurgisch induceren van renale I/R schade significant verbeterd was ten opzichte van muizen die geen mutatie in de TC-NER specifieke *csa* en *csb* genen hadden. Daarnaast resulteerde een mutatie in het TC-NER specifieke *csb* gen in een verbeterde preoperative glucose tolerantie en insuline gevoeligheid, werd de ontstekingsreactie na het ischemische insult significant vermindert en nam de celdeling toe. Concluderend stelden wij dat terwijl mutaties in de TC-NER specifieke *csa* en *csb* genen het verouderingsproces versnellen, ze op het zelfde moment gunstige veranderingen tot stand brengen die de nieren beschermen tegen I/R schade. Verder onderzoek naar de onderliggende mechanismen van deze specifieke TC-NER mutaties kan mogelijk leiden tot een nieuwe behandelingsmethode tegen I/R schade.

#### Nutritionele preconditionering

Dieet restrictie (DR), de vermindering van de dagelijkse voedselinname met behoud van voldoende vitamines en mineralen, wordt beschouwd als de enige niet-invasieve interventie die de levensduur in een verscheidenheid van organismen verlengt.<sup>21</sup> De toename in levensduur is afhankelijk van de mate van voedsel beperking<sup>22</sup> en de duur



van de DR periode.<sup>23</sup> DR gedurende een lange periode verlengt de levensduur door vele leeftijdsgebonden en pathofysiologische veranderingen en ziekten te bestrijden: DR verlaagt het lichaamsgewicht en de lichaamstemperatuur, vermindert de mitochondriale radicaalproductie, verbetert de insuline gevoeligheid, verlaagt de insuline-achtige groeifactor-1 concentratie in het plasma, verhoogt de productie van antioxidanten en vertraagt de ontwikkeling van ziekten zoals cardiovasculaire aandoeningen, kanker en Alzheimer.<sup>23-29</sup> Daarnaast hebben studies aangetoond dat DR gedurende een langere periode de ischemische schade aan de hersenen<sup>30</sup> en de oxidatieve schade aan het myocardium<sup>31</sup> van ratten kan verminderen. Het is niet bekend of DR ook in staat is om een ischemisch insult van de nier te verminderen. Bovendien, de periode van DR om dergelijke gunstige effecten te induceren, alsmede de toepasbaarheid van een korte periode van DR voor klinisch relevante eindpunten blijven grotendeels onontdekt.

Wij onderzochten of een ook een korte periode van DR bescherming kan induceren tegen I/R schade van de nier. Daarvoor werd de dagelijkse voedselinname van muizen voor een periode van 2 en 4 weken met 30% gereduceerd (30% DR) voordat ze werden onderworpen aan 37 minuten unilaterale renale ischemie en contralaterale nefrectomie, gevolgd door 7 dagen reperfusie. Wij vonden dat deze muizen beschermt waren tegen het ischemische insult, terwijl 70% muizen die voor de operatie onbeperkt konden eten gestorven waren of moesten worden opgeofferd als gevolg van de acute nierschade. Daarnaast hebben wij onderzocht of een kortere, ernstigere periode van DR ook beschermt tegen I/R schade. Muizen die 1 tot 3 dagen alleen toegang hadden tot water voordat ze werden onderworpen aan renale I/R schade hadden, net als de DR muizen, een significant betere nierfunctie en overleving dan wanneer muizen preoperatief onbeperkt konden eten. De bescherming tegen I/R schade van de nier werd geïnduceerd door preoperatief vasten en niet door postoperatief eten en werd snel opgeheven zodra de gevaste muizen preoperatief weer onbeperkt konden eten. In een additioneel experiment hebben wij aangetoond dat 3 dagen vasten ook de lever beschermt tegen I/R schade.

Om de overdracht van onze resultaten naar de kliniek te vergemakkelijken, hebben wij vervolgens getracht een protocol te ontwerpen dat zo min mogelijk invasief is voor de transplantatiepatiënt. Wij vonden dat het drinken van een glucosedrankje tijdens de periode van preoperatief vasten geen invloed had op het beschermende effect van 3 dagen vasten. Bovendien, het drinken van een glucosedrankje verminderde preoperatief het verlies in lichaamsgewicht en verbeterde de insuline gevoeligheid. Daarnaast ontdekten wij dat de muizen die vrij toegang hadden tot het glucosedrankje tijdens de vastenperiode circa 75% van de dagelijkse calorieën binnenkregen van de muizen die preoperatief onbeperkt konden eten. Sinds deze bevinding suggereert dat de bescherming door nutritionele preconditionering gerelateerd is aan een vermindering van bepaalde nutriënten in het voer, hebben wij ook onderzocht wat de effecten waren van verschillende nutriënten in bescherming tegen I/R schade. Wij vonden dat wanneer muizen gedurende 3 preoperatieve dagen een eiwitvrij dieet kregen, of gedurende 14 preoperatieve dagen diëten kregen die vrij waren van de essentiële aminozuren leucine en tryptofaan, dat deze muizen ook beschermt waren tegen I/R schade van de nier. Concluderend stelden wij dat de identificatie van de



mechanismen die geïnduceerd worden door deze diëten sommige fundamentele aspecten van de bescherming tegen acute oxidatieve schade kunnen blootleggen, welke kunnen leiden tot de ontwikkeling van mimetica die gebruikt kunnen worden in de kliniek.

Een ander doel van onze studie was om het mechanisme van nutritionele preconditionering te onderzoeken. Door enkele moleculaire en biochemische parameters van 3 dagen gevaste muizen en muizen die preoperatief onbeperkt konden eten te vergelijken, vonden wij dat het nutritioneel preconditioneren van de muizen onder andere resulteerde in een verbeterde insuline gevoeligheid, een toename in glutathione reductase antioxidant expressie, een toename in het stress response gen heme oxygenase-1, een verlaging van de insuline-achtige groeifactor-1 gen expressie en een veranderde fysiologie van mitochondrieën. Na een ischemisch insult van de nier verminderde 3 dagen vasten ook de ontstekingsreactie. In een additionele studie hebben wij ook het mechanisme van vasten op I/R schade van de lever onderzocht. Drie dagen vasten verhoogde de expressie van de antioxidanten superoxide dismutase 2, glutathione peroxidase 1, en glutathione reductase, verhoogde de expressie van het stress response gen heme oxygenase-1 en verhoogde de expressie van de ontstekingsmarkers P-selectine en interleukine-6 ten opzichte van muizen die preoperatief onbeperkt konden eten. Na een ischemisch insult van de lever, nam de expressie van de antioxidanten en het stress response gen meer toe in de levers van de gevaste dieren ten opzichte van de gevoede dieren. De ontstekingsmarkers en oxidatieve schade markers die wij onderzochten, inclusief P-selectine, interleukine-6, neutrofielen influx, superoxide radicaal formatie en lipide peroxidatie waren significant verlaagd in de levers van de gevaste muizen.

Om het onderzoek naar het beschermende mechanisme van nutritionele preconditionering voort te zetten, hebben wij het nierweefsel van 3 dagen gevaste muizen en 4 weken 30% DR muizen met behulp van gen expressie analyse vergeleken met die van muizen die vrij toegang hadden tot voer. Hoewel er een aantal genen zijn ontdekt, zijn toekomstige experimenten vereist om te bepalen of deze genen een mogelijke rol spelen in het beschermende mechanisme van nutritionele preconditionering tegen I/R schade.

### Conclusie

In dit onderzoek hebben wij aangetoond dat genetische en nutritionele preconditionering beschermen tegen I/R schade. Hoewel we enkele van de onderliggende mechanismen hebben kunnen ontrafelen zijn additionele studies vereist om deze fenomenen volledig te begrijpen. Inzicht in deze beschermende mechanismen kan leiden tot de ontwikkeling van farmacologische mimetica die profijt kunnen bieden aan transplantatiepatiënten. ◀