



Samenvatting proefschrift Jacqueline van de Wetering

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

**Promotie: 24 november 2011
Erasmus Universiteit Rotterdam**

Promotor:
Prof. dr. W. Weimar

Co-promotores:
Prof. dr. A.J. Hoitsma
Dr. C.C. Baan
Prof. dr. R. Zietse

In het eerste gedeelte van dit proefschrift beschrijven we de incidentie van twee belangrijke lange termijn complicaties na orgaantransplantatie, namelijk calcineurine geïnduceerde nefrotoxiciteit en maligniteiten, in respectievelijk een Nederlandse hart- en een niertransplantatie populatie en de invloed hiervan op patient- en graft survival. Aangezien het gebruik van immuunsuppressieve medicatie deze complicaties in de hand werkt, hebben we in het tweede gedeelte van dit proefschrift de mogelijkheden van afbouw van deze medicatie bestudeerd in een HLA gemismatchte en een HLA identieke niertransplantatie populatie. Daarbij hebben we de invloed van het afbouwen van immuunsuppressie bestudeerd op klinische en immunologische parameters.

Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding over de achtergrond en het doel van dit proefschrift. Drie bekende en belangrijke lange termijn complicaties na orgaantransplantatie worden hierin beschreven, namelijk hart- en vaat ziekten, maligniteiten en calcineurine (CNI) geïnduceerde nefrotoxiciteit. De incidentie en de mogelijke onderliggende mechanismen van deze complicaties na orgaantransplantatie vormen de onderliggende reden om de mogelijkheden tot het verminderen van immuunsuppressie bij een vooraf geselecteerde groep transplantatie patiënten te onderzoeken.

In hoofdstuk 2, beschrijven we het voorkomen van eind stadium nierfalen (ESRF) na hart transplantatie en bestuderen we de invloed van nierfalen op de patiënt overleving. Aangezien een verhoogde expressie van de profibrotische transforming growth factor- β (TGF- β) als een belangrijke etiologische factor voor CNI geïnduceerde nefrotoxiciteit wordt beschouwd, bestudeerden we daarnaast de impact van gen-polymorfismen in codon 10 en 25 van de promotor regio van TGF- β op het risico van het ontwikkelen van ESRF in deze harttransplantatie ontvangers. De prevalentie van ESRF na harttransplantatie was in



bovengenoemde observatieperiode hoog. Bijna een vijfde van de harttransplantatie ontvangers had ESRF ontwikkeld. Het ontwikkelen van ESRF na harttransplantatie resulteert in zeer hoge mortaliteitscijfers. We vonden een sterk verband tussen TGF- β polymorfismen en CNI geïnduceerde ESRF na harttransplantatie. In de univariate Cox proportional hazards analyse vonden we een sterk significante relatie tussen Pro dragers van een codon 10 of 25 en het ontwikkelen van ESRF. In de multivariate analyse bleef alleen de relatie tussen

TGF- β genpolymorfisme van codon 10 en het risico op ESRF na harttransplantatie sterk significant aanwezig. De implicaties van onze bevindingen zijn dat de lange termijn immunosuppressieve regimes van harttransplantaat ontvangers met een TGF- β codon 10 en waarschijnlijk ook 25 geen calcineurine remmers moeten bevatten, vooral omdat ESRF na harttransplantatie resulteert in een zeer hoog sterftecijfer.

Naast chronische CNI geïnduceerde nefrotoxiciteit, hebben we ook een andere lange termijn complicatie na een orgaantransplantatie onderzocht, namelijk de ontwikkeling van kanker. In alle rapportages vanuit verschillende transplantatie centra in de wereld, wordt er een verhoogde incidentie van bijna alle soorten kanker beschreven na orgaan transplantatie. Dit geldt zowel voor huid- als solide tumoren.

In hoofdstuk 3 beschrijven we de incidentie van kanker in de Nederlandse niertransplantatie populatie, getransplanteerd tussen maart 1966 en mei 2008, en hebben we een analyse uitgevoerd van de patiënt- en transplantaat overleving. Deze survival analyse is zowel uitgevoerd vanaf de dag van transplantatie als vanaf het moment dat bij een transplantatie patiënt de diagnose maligniteit gesteld is. Een gematchte populatie patiënten uit dezelfde transplantatie periode zonder maligniteit vormde de controle groep. Na 42 jaar niertransplantatie in Nederland is duidelijk dat een aanzienlijk deel van de patiënten kanker ontwikkelt. Deze gevreesde complicatie van orgaantransplantatie ontstaat op een aanzienlijk later tijdstip dan de andere bekende complicaties zoals infecties en hart-en vaatziekten. Bijna alle patiënten die kanker hebben ontwikkeld na transplantatie overlijden ten gevolge van deze complicatie, met een zeer korte mediane overleving na de diagnose. Onze studie toont aan dat het ontwikkelen van een maligniteit na niertransplantatie de levensverwachting van deze patienten significant beïnvloedt. Deze bevinding kwam uit de vergelijking met een controle groep bestaande uit niertransplantatie patienten zonder maligniteit gematcht voor geslacht, leeftijd, tijd na de transplantatie, en het jaar van transplantatie.

Gezien de relatie tussen het gebruik van immuunsuppressie en het ontwikkelen van deze lange termijn complicaties, lijkt afbouwen van immuunsuppressieve medicatie na transplantatie geïndiceerd. In het jaar 2000 hebben van Besouw et al reeds aangetoond dat, in stabiele niertransplantatie ontvangers uit onze transplantatie populatie, de calcineurine remmers veilig konden worden veranderd in mycofenolaat mofetil (MMF) of azathioprine (AZA) indien de T-cel gemedieerde donor reactiviteit, gemeten m.b.v. de donor-specifieke cytotoxische T-lymfocyt voorloper frequentie (CTLpf), laag was. In vervolg op deze resultaten vroegen we ons af of een lage donor specifieke CTLpf ook een positief voorspellende waarde had voor een verdere verlaging van de



immunosuppressieve belasting in stabiele, HLA-gemismatchte niertransplantatie patiënten die werden behandeld met dubbel therapie immunosuppressie, bestaande uit prednisolon in combinatie met MMF of AZA. In hoofdstuk 4 beschrijven we dat een geleidelijke afbouw van de dosis MMF of AZA tot 50% van de oorspronkelijke dosis bij inclusie veilig is bij deze geselecteerde patiënten groep zonder dat acute afstoting van het transplantaat of een verslechtering van nierfunctie optrad in de observatietijd. In hoofdstuk 5 wordt de T-cel reactiviteit bij deze patiënten na afbouwen van AZA of MMF beschreven. Geleidelijke vermindering van de AZA of MMF dosis resulteerde in een daling van donor specifieke CTLpf bij alle patiënten met detecteerbare donor specifieke CTLpf vóór de reductie van hun immunosuppressie, terwijl er geen effect op volledig HLA-gemismatchte derde partij reactieve CTLpf werd gevonden. De T-cel reactiviteit tegen cellen van de donor en de derde partij, zoals getest in de gemengde lymfocyt cultuur (MLR) en IFN- γ Elispot, werd niet beïnvloed door de geleidelijke vermindering van immunosuppressie. Concluderend resulteerde de vermindering van immunosuppressie in een specifieke daling van de donor-gerichte cytotoxische capaciteit van immunocompetente cellen, terwijl hun proliferatie en cytokine productiecapaciteit ongewijzigd bleef. Deze resultaten suggereren dat immunosuppressie de ontwikkeling van cytotoxische non-responsiviteit belemmert.

Hoofdstuk 6 beschrijft een studie van CNI onttrekking in stabiele niertransplantatiepatiënten, met een lage donor-specifieke, cytotoxische respons, die oorspronkelijk werden behandeld met een drievoudige immunosuppressieve therapie, bestaande uit CNI's (cyclosporine of tacrolimus), AZA of MMF in combinatie met prednison. Vier maanden na CNI onttrekking, bleek de mRNA expressie van Granzym B (GRB) en Perforine als markers voor cytotoxiciteit, Fas en FasL als markers voor apoptose, T-bet en GATA3 als Th1 en Th2 transcriptiefactoren, en CD25 significant lager dan tijdens CNI behandeling. Na CNI onttrekking was de donor-specifieke CTLpf afgenomen, terwijl de Foxp3 mRNA expressie discrimineerde tussen detecteerbaar en niet-detecteerbare donor-specifieke cytolytische reactiviteit. De Foxp3 mRNA transcriptie was het hoogst in afwezigheid van donor-specifieke cytotoxiciteit. In de discussie wordt besproken dat CNI behandeling bij patiënten met een niertransplantatie inderdaad interfereert in de cascades die leiden tot donor-specifieke hyporesponsiviteit. In afwezigheid van CNI was cytotoxische hyporesponsiviteit geassocieerd met een hoge Foxp3 mRNA expressie, wat suggereert dat donor-specifieke reactiviteit het resultaat is van een verminderde suppressie door Foxp3 + regulatoire T-cellen. Na het onttrekken van CNI's zie je deze regulatoire mechanismen weer ontstaan. Tevens werden, voor en 4 maanden na het onttrekken van CNI's, de nierfunctie, bloeddruk en serum cholesterol waarden van deze patiënten vervolgd. Deze klinische parameters werden nog verder vervolgd in de CNI vrije patient na verdere dosisreductie van de AZA of MMF (tweemaal 25% dosisreductie) op tijdstip 24 maanden. Er hebben zich geen significante veranderingen voorgedaan in nierfunctie, bloeddruk of serum cholesterol waarden na CNI onttrekking of verdere dosisreductie van AZA of MMF. Deze bevindingen suggereren dat langdurige behandeling met CNI definitieve schade veroorzaakt en dat als gevolg daarvan geen gunstig effect van CNI onttrekking op deze klinische parameters werd gevonden.



Hoewel een immuunreactie tegen een donornier voornamelijk bepaald wordt door HLA verschillen tussen de donor en de ontvanger, worden ontvangers van een HLA-identiek, living-related transplantaat meestal behandeld volgens dezelfde immunosuppressieve protocollen als voor niet-identieke koppels. Ons afvragende of dit correct is, hebben we een studie uitgevoerd met stabiele HLA-identieke, living-related niertransplantatiepatiënten, waarbij de immunosuppressieve medicatie drastisch werd verminderd. De resultaten van deze studie zijn beschreven in hoofdstuk 7. In onze HLA-identieke studiegroep werd het drastisch afbouwen van de immunosuppressie tot een lage dosis prednisolon monotherapie van 5 mg per dag goed wordt verdragen zonder dat er acute afstoting optrad gedurende een follow-up van 2 jaar. De rol van het afbouwen van immunosuppressie en het risico op terugkeer van de oorspronkelijke ziekte in het transplantaat wordt besproken. Na het bestuderen van onze HLA-identieke, living-related niertransplantatiepatiënten onder volledige dosis immunosuppressie en screening van de literatuur, concluderen we dat de prevalentie van terugkeer van oorspronkelijke ziekte in het niertransplantaat na afbouw van de immunosuppressieve medicatie in onze studie groep, vergelijkbaar is met die eerder beschreven in living-related, HLA-identieke niertransplantatie ontvangers behandeld met full-dose immunosuppressie en vergelijkbaar is met eerdere publicaties in de literatuur. Ook hebben we onderzocht of het staken van AZA of MMF in deze HLA-identieke patiënten de T-cel reactiviteit, gemeten middels een Elispot assay, beïnvloed. Deze Elispot assay bepaald de frequentie van het pro-inflammatoire cytokine interferon-gamma (IFN- γ) en het anti-inflammatoire cytokine IL-10 die, respectievelijk, geassocieerd zijn met rejectie van het transplantaat of onderdrukking van de immuunrespons. Granzym B (GrB) werd gebruikt als een marker van de activiteit van cytotoxische T-lymfocyten. Daarnaast vroegen we ons af of het stoppen van AZA of MMF in deze patiënten het aantal circulerende dendritische cel (DC) subsets en hun maturatie status, bepaald middels flowcytometrie, beïnvloedt, wetende dat dendritische cellen een belangrijke rol kunnen spelen bij het bepalen van het evenwicht tussen transplantatie tolerantie en immuniteit. De resultaten van deze studie zijn beschreven in hoofdstuk 8. Hierin hebben we aangetoond dat het aantal donor-, derde-partij-, en tetanus (TET)-reactieve IFN- γ producerende cellen of GrB producerende cellen niet toenam na stopzetting van AZA of MMF. Er werd echter wel een significante toename van het aantal derde partij- en TET-reactieve, IL-10 producerende cellen en een trend in meer donor-reactieve, IL-10 producerende cellen gevonden. Dit suggereert dat de onderdrukkende werking van IL-10 werd gehinderd door AZA en MMF. Onttrekking van AZA of MMF had geen effect op de absolute aantallen van de totale DC, myeloïde- en plasmacytoïde DC's of hun verhouding. Niettemin, DC subsets verschoven in de richting van meer mature DC fenotype na het stoppen van AZA of MMF, wat suggereert dat AZA of MMF de fenotypische maturatie status van DC belemmert. ◀