



Samenvatting proefschrift

H. Boom

'Delayed Graft Function in Renal Transplantation'

Promotie 19 januari 2005

Rijksuniversiteit Leiden

Samenvattend is onze hypothese dat delayed graft function (DGF) in de niertransplantatie een syndroom is dat voor het grootste deel bepaald wordt door de kwaliteit van het getransplanteerde orgaan. Omdat het aantal nefronen, of te wel de functionele renale massa, die initieel getransplanteerd wordt al bepaald is ten tijde van de transplantatie, zijn de grenzen waarbinnen de nierfunctie zich kan ontwikkelen al ten tijde van de ingreep en in de vroege periode hierna bepaald. De functionele renale massa is geassocieerd met determinanten zoals de leeftijd en geslacht van de donor. Daarom zijn deze risicofactoren niet alleen gerelateerd aan DGF maar ook aan het uiteindelijke lot van het transplantaat op de lange termijn.

Het optreden van DGF wordt bepaald door de balans tussen aan de ene kant ischemie- en reperfusieschade en de beschermende factoren aan de andere kant. De aanwezigheid van de beschermende factoren, die van nature aanwezig zijn of opgereguleerd worden zoals de superoxide dismutasen (SOD) kan worden samengevat als de kwaliteit van het orgaan en zou in de toekomst als leidraad kunnen fungeren bij de verdeling en toewijzing (allocatie) van organen. Zo kunnen de schaarse organen zo goed mogelijk worden gealloceerd, waardoor zo veel mogelijk mensen zo efficiënt mogelijk geholpen kunnen worden met een goed en langdurig werkend niertransplantaat.

Het vertraagd op gang komen van een nier die net getransplanteerd is, of te wel delayed graft function (DGF), wordt in de literatuur met een frequentie tot 50% van de getransplanteerde nieren beschreven. De klinische implicatie van dit fenomeen is dat patiënten na de transplantatie vaak alsnog gedialyseerd moeten worden en dat er weefselmonsters (biopten) uit de getransplanteerde nier moeten worden genomen om bijvoorbeeld acute afstoting (rejectie) of de bijwerking van geneesmiddelen uit te sluiten. Hierdoor verblijven patiënten met een vertraagd op gang komende nier gemiddeld langer in het ziekenhuis dan patiënten van wie de nier wel direct na de transplantatie goed functioneert. De nieren met DGF komen uiteindelijk altijd op gang en uiteindelijk hoeft de getransplanteerde patiënt niet meer gedialyseerd te worden.



Als onderliggend mechanisme voor DGF wordt zgn. ischemie- en reperfusie (I/R)schade verondersteld. Deze treedt tijdens de transplantatieprocedure m.n. op als de bloedvoorziening van de transplantaatnier wordt hersteld wanneer de donornier bij de ontvanger wordt geïmplant. Donornieren worden over het gehele Eurotransplant gebied verspreid, waardoor het transport van een orgaan door Europa soms tot 40 uur kan oplopen. Hierdoor ontstaat een periode van bloed- en zuurstofloosheid, die ischemie- en reperfusieschade veroorzaakt. Als gevolg van de I/R schade worden de verzamelbuizen van de nier (tubuli) beschadigd. Dit wordt acute tubulus necrose (ATN) genoemd, waarna de functie van de nier uiteindelijk weg valt. De kennis over de ontwikkelingsfasen bij ATN is met name gebaseerd op gegevens uit dierexperimenteel onderzoek en op een vergelijkbaar ziektebeeld bij niet-getransplanteerde patiënten, die op een Intensive Care afdeling worden opgenomen en van wie de nieren niet meer werken ten gevolge van ATN.

In deze modellen worden 3 fasen onderscheiden bij de ontwikkeling van acute tubulus necrose. Deze fasen kunnen gelijktijdig naast elkaar voorkomen. Als eerste is er de de ischemische fase, een fase waarin als gevolg van het tekort aan zuurstof celdood optreedt. Bij het optreden van deze celdood zijn enzymen betrokken zoals de calpainen en caspases die voor hun activiteit afhankelijk zijn van de aanwezigheid van calcium. De tweede fase is de fase waarbij een evenwicht bestaat tussen de bovengenoemde beschadigende factoren en de in de nier aanwezige beschermende factoren. Als uiteindelijk het herstel de overhand krijgt boven de beschadigende factoren, blijkt de nier een opmerkelijke mogelijkheid te hebben tot regeneratie. Deze derde fase van herstel wordt op weefselniveau gekenmerkt door snel delende cellen (mitoses) die kapotte dode cellen vervangen. Deze sneldelende cellen zijn waarschijnlijk stamcellen uit het nierweefsel of wellicht zelfs uit het beenmerg. Ze vertonen in deze korte tijd kenmerken van de gehele embryonale ontwikkeling van de nier, alvorens als volgroeide niercel te kunnen functioneren.

Over DGF bij de mens is in de transplantatieliteratuur slechts weinig bekend. De bovengenoemde dierexperimentele kennis is niet zonder meer naar de humane situatie te vertalen, omdat er bij de transplantatiegeneeskunde veel oorzaken zijn waardoor een nier na de transplantatie niet op gang komt. Zo kan een acute rejectie (afstoting) of bijwerkingen van de immunosuppressiva (calcineurine remmer toxiciteit) een bijkomende oorzaak zijn voor het vertraagd op gang komen van de nier. Het is van belang om onderscheid te maken tussen de eerder genoemde I/R schade en deze twee laatste omstandigheden (acute afstoting en bijwerkingen van immunosuppressiva), omdat aan de laatste specifieke therapeutische consequenties verbonden zijn: Zo moet een acute afstoting behandeld worden en moet in het geval van calcineurine remmer toxiciteit de dosering van het geneesmiddel worden aangepast. Daarom worden er in de vroege periode na transplantatie met enige regelmaat biopten uit de net getransplanteerde nier genomen.



De betekenis van het optreden van DGF voor het functioneren van de getransplanteerde nier op de middellange en lange termijn is niet duidelijk. Zo zijn er onderzoekers die concluderen dat DGF geen effect heeft op duur dat de getransplanteerde nier functioneert (transplantaatoverleving). Anderen concluderen daarentegen dat DGF alleen van invloed op de transplantaatoverleving is als het in het beloop gevolgd wordt door het optreden van een acute afstoting reactie (rejectie). Weer anderen vinden dat als een nier na de transplantatie meer dan 1 week niet functioneert, de nier aanmerkelijk minder lang werkt dan als hij direct of binnen een week op gang komt (primaire functie (PF)).

De reden dat er zo veel uiteenlopende meningen over de betekenis van DGF voor de lange termijn transplantaat overleving bestaan, is tweërlei. In de eerste plaats bestaat er in de literatuur geen duidelijke en eenduidige definitie voor het syndroom DGF. Veel onderzoekers houden als criterium aan, of een patiënt na de transplantatie al dan niet gedialyseerd moet worden. Het nadeel van deze definitie is dat een getransplanteerde patiënt om een heel aantal andere redenen dan het niet op gang komen van de nier, gedialyseerd kan moeten worden. Zo komt het nogal eens voor dat een patiënt na de transplantatie dialyse behandeling behoeft vanwege een teveel aan vocht dat is toegediend tijdens de operatie of een te hoog kalium of fosfaat gehalte van het bloed. Zoals eerder gezegd kan het ook zo zijn dat een nier niet direct op gang komt vanwege het optreden van een acute afstoting of een te hoge dosering van de immunosuppressieve medicatie. Omdat dit allemaal aandoeningen zijn met verschillende oorzaken en toch allemaal worden aangeduid als DGF, is het niet verbazingwekkend dat de uitkomsten van verschillende onderzoeken niet eenduidig zijn.

In de tweede plaats was de interesse voor het klinische probleem van DGF nooit erg groot omdat het een aandoening is die in het algemeen vanzelf weer over gaat. Research naar de oorzaak van DGF werd om die reden dan ook zelden gedaan. Nierbiopten werden slechts genomen om acute afstoting of calcineurine remmer toxiciteit aan te tonen en niet om het onderliggende mechanisme voor het ontstaan van DGF te bestuderen. Hierdoor is er maar weinig menselijk weefsel voor onderzoek naar DGF beschikbaar.

De interesse voor DGF is de laatste jaren echter toegenomen. Dit komt omdat de wachtlijst voor een niertransplantatie aanzienlijk is verlengd, als gevolg van een dramatische afname van het aantal postmortale donoren de afgelopen 8 jaar. Daarom wordt er momenteel gezocht naar mogelijkheden om dit donortekort aan te vullen. Naast een **toename van het aantal levende donaties**, waarbij een familielid, vriend of kennis een nier aan een dialysepatiënt afstaat, wordt een deel van het probleem opgelost door de **criteria voor het selecteren van een potentiële postmortale nierdonor aan te passen**.



Oudere donoren (dwz. donoren ouder dan 70 jaar) of donoren die een hoge bloeddruk of suikerziekte hebben, komen nu ook, onder bepaalde strikte voorwaarden, in aanmerking voor donatie.

Daarnaast wordt er uitgebreid onderzocht of potentiële donoren die niet alleen hersendood maar ook een hartstilstand hebben gehad (non heart beating donation), in aanmerking komen voor donatie. Bij deze laatste twee groepen van donoren is het opvallend dat het aantal malen dat DGF optreedt aanzienlijk hoger is dan in de groep van bijvoorbeeld de bij leven gedoneerde nieren of de nieren die bij het constateren van de hersendood van de donor worden getransplanteerd (heart beating donation). We worden dus meer met DGF geconfronteerd en daarom is het opportuun om DGF en ATN in de humane situatie te onderzoeken.

Bovenstaande inleiding over delayed graft function bij niertransplantatie is een samenvatting van **hoofdstuk 1** van dit proefschrift. Het doel van het vervolg van dit proefschrift is om met een duidelijke definitie van DGF, waarbij de I/R schade centraal staat en waarbij acute rejectie en calcineurine remmer toxiciteit zoveel mogelijk als oorzaak voor DGF zijn uitgesloten, de **risicofactoren voor en de gevolgen van DGF voor het functioneren van de nier op de korte en lange termijn te definiëren**. Op die manier kunnen we uiteindelijk tot een hypothese komen over het mechanisme van DGF en hoe uiteindelijk de invloed van DGF is op de korte en lange termijn transplantaat functie.

In **hoofdstuk 2** wordt een onderzoek beschreven waarbij in een cohort van 734 patiënten die tussen 1983 en 1997 werd getransplanteerd de risicofactoren voor het optreden van DGF werden vastgesteld. Het blijkt dat klassieke risicofactoren zoals een donorleeftijd boven de 50 jaar, een lage bloeddruk van de acceptor ten tijde van de transplantatie en een koude ischemie duur (KIT) van meer dan 28 uur, met name bepalen of een nier reageert met DGF. Een belangrijke bevinding is verder dat de duur dat een nier op de lange termijn functioneert, met name afhankelijk is van de functie die na 1 jaar na de transplantatie is verkregen. Deze 1 jaars transplantaat functie blijkt m.n. afhankelijk te zijn van de leeftijd van de donor, het optreden van DGF en het aantal acute rejectie episodes die in dit eerste jaar zijn opgetreden. Dus de verdere ontwikkeling van de transplantaat functie na het eerste jaar blijkt verder niet afhankelijk te zijn van het optreden van DGF of het optreden een acute afstoting, maar alleen van de functie die na een jaar na transplantatie is bereikt.

Met deze gegevens is de **hypothese opgesteld dat de nierfunctie bepaald wordt door de hoeveelheid functionerend nierweefsel (functionele renale massa)**. DGF en de nierfunctie op de lange termijn zij beide een uiting van nier functie en dus indirect ook een resultante van de functionele renale massa.



Omdat uit de literatuur bekend is dat de renale massa wordt beïnvloed door factoren als leeftijd en geslacht zou het begrip 'functionele renale massa' de relatie tussen DGF en lange termijn transplantaat functie kunnen verklaren.

Om deze hypothese te toetsen wordt in **hoofdstuk 3** een studie beschreven waarin de hoeveelheid functionerend nierweefsel wordt onderzocht in relatie tot het optreden van DGF en de lange termijn uitkomst. De hoeveelheid functionerend nierweefsel wordt middels een techniek uit de nucleaire geneeskunde (^{99m}technetium mercaptoacetyltriglycine (^{99m}MAG-3) scintigrafie) vast gelegd. In een groep van 42 getransplanteerde nieren blijken de 14 nieren die met DGF reageren, direct na de transplantatie een kleinere hoeveelheid functionerend nierweefsel te hebben dan de 28 nieren die direct op gang komen (primaire functie). Dit verschil blijft gedurende een follow-up periode van drie jaar bestaan.

Wanneer de creatinineklaring wordt berekend, als maat voor de transplantaatfunctie, blijft dit verschil ook gedurende deze follow-up periode van drie jaar, maar de significantie is net niet te bereiken. Daarom werd de analyse in de grotere groep die in hoofdstuk 1 is bestudeerd, opnieuw uitgevoerd. In deze groep bleek het verschil in creatinineklaring tussen de DGF en de PF groep, gedurende de gehele drie jaar follow-up, wél significant te zijn.

Een ander opvallende bevinding is dat de functionele renale massa direct na de transplantatie in beide groepen (DGF én PF) verlaagd is en dat in beide groepen een identiek herstel patroon te zien is die na 3 tot 4 weken zijn volledige beslag heeft gekregen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de I/R schade voor alle getransplanteerde nieren hetzelfde is en er dus een zelfde periode van 3 a 4 weken nodig is om hier volledig van te herstellen.

Een verhoogd serum calcium (hypercalcaemie) leidt bij niet getransplanteerde nieren tot nierfunctiestoornissen. Het precieze mechanisme hier achter is niet geheel duidelijk. Calcium is een ion dat in het lichaam in grote hoeveelheid aanwezig is. De grootste hoeveelheid bevindt zich in het bloed, deels gebonden aan eiwitten en deels als vrij calcium en in de botten. De functie van calcium is gelegen in de bot op- en ombouw en daarnaast heeft het een belangrijke bijdrage in het op peil houden van de zuurgraad van het lichaam. Verder is calcium werkzaam als een zogenaamde co-factor bij de activatie van tal van enzymen in het lichaam. Een groep van enzymen waar calcium een belangrijke co-factor voor is, zijn de enzymen die betrokken zijn bij het ontstaan van celdood (necrose) en geprogrammeerde celdood (apoptose), zoals calpain en de caspases.

In dierexperimenteel onderzoek worden drie vormen van door calcium veroorzaakte nierfunctiestoornissen beschreven:



- *macroscopische nefrocalcinose*, gekenmerkt door calciumzout neerslagen in het nierweefsel die middels echografie geïdentificeerd kunnen worden
- microscopische nefrocalcinose, gekenmerkt door de aanwezigheid van calciumzouten op microscopische niveau
- chemische nefrocalcinose, wanneer in het geheel geen calcium- zout neerslagen in het nierweefsel worden waargenomen. Deze laatste vorm van calcium gerelateerde nierfunctie stoornis wordt mogelijk veroorzaakt doordat calcium enzymatische processen onderhoudt, die uiteindelijk acute tubulus necrose veroorzaken.

Hypercalcaemie (te hoge calcium gehalte in het bloed) komt frequent voor bij patiënten die worden gedialyseerd. Dit heeft te maken met het frequente gebruik van calciumhoudende medicijnen (fosfaatbinders) en vitamine D. Deze medicijnen worden gebruikt om de nadelige gevolgen van te hard werkende bijnieren (hyperparathyreoidie), op botten en bloedvaten te verminderen. Deze hyperparathyreoidie treedt op als de nieren minder of niet meer werken. Echter, studies naar het verband tussen hypercalcaemie en het optreden van DGF na niertransplantatie zijn nooit gepubliceerd.

In **hoofdstuk 4** beschrijven wij de voor het eerst in de literatuur gevonden relatie tussen het bestaan van hypercalcaemie en het ontstaan van DGF. Een andere opvallende bevinding is dat het gebruik van medicijnen die de calcium opname in cellen remt (calcium channel blockers (CCB's)), bescherming biedt tegen het optreden van DGF. Deze CCB's zijn in het verleden onderzocht met het idee dat zij door het verbeteren van de doorbloeding van de nier de nadelige werking van cyclosporine, een calcineurine remmer, konden tegengaan. De resultaten van deze studies zijn echter niet eenduidig. In de door ons onderzochte groep, waarin per definitie calcineurine remmer toxiciteit was uitgesloten, hebben deze CCB's wel een betekenis. Wellicht komt dit doordat CCB's voorkomen dat er hoge calciumconcentraties in de cel ontstaan waardoor chemische nefrocalcinose, en in aansluiting DGF, wordt voorkomen.



Daarnaast beschrijven wij in hoofdstuk 4 ons onderzoek naar een anatomisch substraat voor DGF en deze serum calciumwaarden in nierbiopten. Daartoe onderzochten wij 71 biopten die in de eerste week na transplantatie waren genomen en waarin geen acute rejectie of calcineurine remmer toxiciteit aanwezig was, op de aanwezigheid van calciumfosfaat kristallen. Deze bevindingen correleerden we met de serum calciumwaarden en tekenen van ATN. Wij vonden geen correlatie tussen de aanwezigheid van calciumneerslagen in het nierweefsel en de hoogte van de serum calciumwaarden. Dit ondersteunt de hypothese dat het calcium een andere rol heeft bij het ontstaan van DGF dan door de vorming van calcium zout neerslagen die meestal vermoed worden.

Om de balans tussen necrose en apoptose inducerende mechanismen aan de ene kant en de aanwezigheid van beschermende factoren aan de andere kant te bestuderen, hebben wij in **hoofdstuk 5** nierbiopten, die in de eerste week na transplantatie werden genomen, van patiënten met en zonder DGF, bestudeerd. De aanwezigheid van apoptose werd met behulp van de markers TUNEL en caspase-3, gevisualiseerd. Daarnaast keken we of de aanwezigheid van beschermende factoren, zoals mangaan superoxide dismutase (Mn-SOD) geassocieerd is met het minder optreden van DGF of het vinden van ATN in deze biopten. Tenslotte keken wij of de aanwezigheid van vimentine en Ki 67, beide markers voor de regeneratie en het herstel van de nier, geassocieerd was met het optreden van DGF of de aanwezigheid van ATN. Wij vonden dat de expressie van actief caspase-3 verhoogd was als meer ATN in de biopten gevonden werd. Biopten uit transplantaten van patiënten die geen DGF hadden, vertoonden een hogere expressie van Mn-SOD dan die van patiënten met DGF. De aanwezigheid van vimentine en Ki 67 was wel geassocieerd met het herstel van ATN, maar de relatie was niet sterk genoeg om statistische significantie te bereiken. Deze bevindingen steunen onze hypothese dat een balans tussen beschadigende en beschermende factoren bepalen of een getransplanteerde nier direct functioneert of niet. Het zou zo kunnen zijn dat de mate van aanwezigheid van Mn SOD een uiting is van de kwaliteit van het getransplanteerde orgaan en dat het niet alleen geassocieerd is met het minder optreden van DGF maar ook met een betere transplantaat overleving.

Hoofdstuk 6 is een review over DGF bij niertransplantatie, waarbij de huidige inzichten over pathofysiologie en klinische betekenis zijn weergegeven.