



Samenvatting proefschrift Pieter van der Pol

“Pathogenic role of complement in renal ischemia/reperfusion injury”

**Promotie: 12 november 2013
Universiteit Leiden**

Promotor:
Prof. dr. C. van Kooten

Tussen de uitname en transplantatie van een donornier is er geen doorbloeding van het orgaan. Hierdoor ontstaat een tekort aan zuurstof, glucose en andere voedingsstoffen en een opstapeling van afvalstoffen zoals koolstofdioxide in de nier. Deze toestand van bloedtekort in het orgaan wordt ischemie genoemd. Door het tekort aan zuurstof tijdens deze ischemie kan de nier geen energie produceren en ontstaat er weefschade die te vergelijken is met bijvoorbeeld een hersen- of hartinfarct. We noemen deze schade ischemieschade. Het herstellen van de bloedtoevoer na de transplantatie wordt reperfusie genoemd. Bij de reperfusie van een ischemisch orgaan worden schadelijke afvalstoffen afgevoerd en zuurstof, glucose en andere belangrijke stoffen aangevoerd die nodig zijn om het weefsel te herstellen. Het lijkt tegenstrijdig, maar het is bekend dat de reperfusie van een ischemisch orgaan echter tot nog veel meer weefschade leidt. De schade na de reperfusie noemen we daarom ischemie/reperfusie schade (I/R schade). Het is aangetoond dat I/R schade kort na de transplantatie een erg ongunstige invloed heeft op de functie van de nier op de lange termijn.

De pathologische oorzaak van I/R schade is nog onvoldoende duidelijk en er is daarom nog geen gerichte behandeling ontwikkeld. Bij het ontstaan van de I/R schade na een niertransplantatie speelt het aangeboren afweersysteem een rol. Het complementsysteem is een onderdeel daarvan. Dit systeem doodt indringende bacteriën via een serie activerende factoren in het bloed. Er zijn drie manieren om het complementsysteem in werking te stellen. De eerste vindt plaats door de bloedfactor C1q, dit wordt ook wel de klassieke route van activatie genoemd. De tweede manier vindt plaats door de bloedfactor MBL (Mannan-binding lectin) en wordt ook wel de lectine route van activatie genoemd. De derde manier wordt de alternatieve route genoemd.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het bestuderen van de rol van het complementsysteem in I/R schade in de nier. Tot nu toe is onduidelijk wel



route van complementactivatie betrokken is bij nier I/R schade in de mens. Uit studies in muizen blijkt vooral de alternatieve route betrokken te zijn. Om een therapie te ontwikkelen waarbij het complementsysteem geremd kan worden, is het van belang om te weten welke specifieke route van het complementsysteem geactiveerd wordt na I/R in de humane nier.

We hebben daarom allereerst onderzocht welke route van het complementsysteem in werking wordt gezet wordt door muis en humane niercellen na I/R. Vooral de tubulus epitheelcellen in de nier raken beschadigd na I/R. We hebben daarom deze cellen geïsoleerd uit muizen en humane nieren en deze gekweekt in aan- of afwezigheid van zuurstof. Op deze manier simuleerden we het proces van ischemie tijdens een niertransplantatie. Na een aantal uur werden de ischemische niercellen weer van zuurstof voorzien en blootgesteld aan muis of humaan bloed (reperfusie). Dit bloed bevat de complementfactoren die vervolgens geactiveerd konden worden. Wat we vervolgens waarnamen was dat de gekweekte muis epitheelcellen na I/R de alternatieve route van het complementsysteem activeerden. Dit was ook al bekend uit eerder uitgevoerde onderzoeken in muizen en bevestigde onze resultaten. Verrassend was het echter dat de humane epitheelcellen deze alternatieve complementroute helemaal niet activeerden, maar wel herkend werden door een andere complementfactor (C1q) en daardoor de klassieke route van complement activeerden. Deze studie laat dus duidelijk zien dat er verschillen zijn tussen muis en humane tubulus epitheelcellen en het complementsysteem. Bij het ontwikkelen van een therapie gericht tegen een bepaalde route van het complementsysteem dient hier zeker rekening mee gehouden te worden.

In een andere studie onderzochten we in welke mate complementactivatie voorkomt na een niertransplantatie in de mens. In deze studie werd gebruikt gemaakt van een geheel nieuwe methode waarbij via een catheter in de lies bloed afgenomen wordt dat direct afkomstig is uit de getransplanteerde nier. Hierdoor waren we in staat om daadwerkelijk te meten hoeveel complementactivatie er in de getransplanteerde nier plaatsvindt. Ook werd kort na de transplantatie een nierbiopt genomen zodat ook in het weefsel onderzocht kon worden in welke mate er activatie van complement plaatsvindt op de epitheelcellen. Deze studie vond plaats in drie groepen patiënten. De eerste groep patiënten ontving een nier van een levende donor, de tweede groep van een hersendode donor en de derde groep van een overleden donor. Vooral de donornieren uit de derde groep zijn in relatief slechte staat vanwege de bloedcirculatie die al gedurende langere tijd stilstaat. In het weefsel en in het bloed werd vervolgens de complementactivatie bepaald door het aankleuren en meten van C5b-9, het terminale complex van het complementsysteem dat de cellen dood. Verrassend genoeg was er op het weefsel totaal geen complementactivatie aantoonbaar na de niertransplantatie in alle drie de groepen. Alleen in de patiënten die een nier ontvingen van een overleden donor, was enkele seconden na de reperfusie C5b-9 aantoonbaar in het bloed, dit was echter zeer tijdelijk. Concluderend laat deze studie zien dat in de mens vroeg na transplantatie nauwelijks complement activatie plaatsvindt in circulatie, terwijl deze zelfs volledig afwezig is op het nierweefsel. Dit suggereert dat activatie van het complementsysteem in de mens een secundair proces is en niet ten grondslag ligt aan de vroege ischemie/reperfusieschade die optreedt na niertransplantatie.



Uit eerdere klinische studies in niertransplantatie patiënten is gebleken dat patiënten met hoge MBL waarden in het bloed meer afstoting en een slechtere niertransplantaatoverleving hebben op langere termijn. Daarom onderzochten we ook de rol van MBL in I/R schade in de nier. Ook bestudeerden we de complementfactoren C3 en C5 die door MBL geactiveerd worden. We gebruikten hiervoor een I/R model in de rat waarbij we voor 45 minuten de bloedvaten naar de nier afklemde. Op deze manier wordt de I/R schade gesimuleerd die ontstaat wanneer een nier wordt uitgenomen voor transplantatie. Als therapie werd voor het afklemmen van de nier een antilichaam ingespoten dat aan MBL bindt en hierdoor de werking van dit eiwit blokkeert. In twee andere behandelgroepen werden voor het afklemmen de complementfactoren C3 en C5 in de rat therapeutisch geremd. Vervolgens werd gedurende enkele dagen bloed afgenomen om de nierfunctie te bepalen. Hieruit bleek dat ratten die geen werkend MBL meer hadden in hun bloed, volledig beschermd waren tegen I/R schade. Dit betekent dus inderdaad dat MBL, dat normaal gesproken belangrijk is voor de afweer tegen ziekteverwekkers, een zeer nadelige rol heeft in niertransplantatie. Verrassend genoeg waren de ratten waarin C3 of C5 geremd was, totaal niet beschermd. Omdat MBL bekend staat als een complementeiwit dat leidt tot C3 en C5 activatie, was deze vinding bijzonder. Dit betekent namelijk dat de nadelige werking van MBL in I/R schade in de nier onafhankelijk is van complementactivatie, iets dat totaal onbekend was. We konden vervolgens laten zien dat kort na reperfusie, MBL uit de bloedvatjes lekt en bindt aan de tubulus epitheelcellen in de nier. Vervolgens gaan deze epitheelcellen dood, waarna dan pas het complementsysteem geactiveerd wordt. Complement-activatie vindt dus uiteindelijk wel plaats, maar de eerste schade ontstaat door MBL. Wanneer we gekweekte humane niercellen blootstelden aan MBL, trad binnen 24 uur celdood op. Hierdoor konden we laten zien dat niet alleen in de rat, maar ook bij mensen blootstelling van niercellen aan MBL schadelijk is. Via welke mechanisme MBL de niercellen dood is echter nog onbekend. In conclusie hebben we laten zien dat complementactivatie na I/R meer een secundair proces is en niet ten grondslag ligt aan de eerste I/R schade in de nier. Complementactivatie op beschadigde en dode niercellen treedt uiteindelijk wel op, maar op een relatief laat moment na reperfusie. De belangrijkste vinding van dit promotieonderzoek is dat echter vroeg na reperfusie MBL uit het bloed in de nier terecht komt en wordt blootgesteld aan de tubulus epitheelcellen. MBL heeft vervolgens een cytotoxische (celdodende) werking op deze cellen. Deze cytotoxische werking van MBL is echter volledig onafhankelijk van complementactivatie. Het remmen van C3 of C5 beschermde daarom ook niet tegen I/R schade, terwijl het wegvangen van MBL bijna volledige bescherming bood. Ook konden we laten zien dat de blootstelling van MBL en het dood gaan van de tubulus epitheelcellen voorafging aan de activatie van het complementsysteem. MBL is daarom een zeer interessant therapeutisch doelwit en het tijdelijk remmen of wegvangen van MBL tijdens een klinische niertransplantatie zou daarom een veelbelovende behandeling kunnen zijn om I/R schade na niertransplantatie te voorkomen.