



Samenvatting proefschrift C.M.A. van Alem

“Targeting macrophages in renal transplantation”

**Promotie: 13 april 2023
Universiteit Leiden**

Promotores:
Prof. dr. J.I. Rotmans
Prof. dr. C. van Kooten

Targeting macrophages in renal transplantation

Carla M.A. van Alem

De menselijke nier is een cruciaal orgaan voor het filteren van bloed, het aanmaken van hormonen, en het regelen van de bloeddruk en de zuurgraad. Wanneer een nierziekte leidt tot nierfalen worden deze functies verstoord, waardoor patiënten onder andere last krijgen van hoge bloeddruk, vermoeidheid, pijn, jeuk, en het vasthouden van vocht. Voor deze patiënten is een niertransplantatie de beste behandelmethode. Na transplantatie van een donornier moet het immuunsysteem van de ontvangende patiënt worden onderdrukt met medicatie om afstoting van het donororgaan te voorkomen. Helaas komt afstoting nog steeds voor bij ongeveer 10% van de getransplanteerde patiënten. Er zijn verschillende vormen van afstoting, die onderverdeeld worden in cellulaire (directe) en humorale (indirecte) afstoting. In beide vormen van afstoting spelen macrofagen, een van de subtypes antigeen presenterende cellen, een belangrijke rol in de afstotingsreactie. Macrofagen bestaan in veel verschillende vormen, en vormen een spectrum van cellen die een ontstekingsreactie aandrijven of afremmen.

Bij sommige niertransplantatie patiënten komt de nierfunctie niet direct op gang na transplantatie, een proces dat vertraagde nierfunctie heet, of delayed graft function. Deze patiënten krijgen gemiddeld genomen vaker te maken met afstoting van hun getransplanteerde nier. Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van macrofagen in dit proces is in hoofdstuk 2 onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van anti-inflammatoire macrofagen in nier-biopten van niertransplantatie patiënten. In deze studie gebruiken we biopten die 10 dagen na niertransplantatie zijn afgenomen bij patiënten met een vertraagde transplantaatnierfunctie. Door middel van celkleuringen hebben we de hoeveelheid anti-inflammatoire macrofagen in deze biopten kunnen bepalen. Uit statistische analyse van de resultaten bleek dat patiënten met een hoog percentage anti-inflammatoire macrofagen, minder vaak acute cellulaire resectie ontwikkelden in de eerste 6 maanden na niertransplantatie, dan patiënten met een lager aantal van deze macrofagen in hun nier. Dit hoofdstuk laat daarmee zien dat



anti-inflammatoire macrofagen een beschermend effect kunnen hebben tegen het ontstaan van afstoting.

Vanwege de rol die macrofagen hebben in het afstotingsproces en hun capaciteit om zowel pro- als anti-inflammatoir te functioneren, is deze cel een interessant doelwit voor ontstekingsremmende medicatie. Een veelbelovende manier om medicatie aan macrofagen aan te bieden, is het verpakken in zogenaamde liposomen. Dit zijn kleine bolletjes gemaakt van losse fosfolipiden die aan de ene kant water afstoten, en aan de andere kant water aantrekken, waar ze automatisch tot een watergevulde bol vormen. In de waterige binnenkant van deze liposomen kunnen medicijnen en andere middelen opgelost worden. In hoofdstuk 3 is een overzicht gemaakt van de verschillende types liposomen, en de toepassingen waar ze tot nu toe als ontstekingsremmer voor gebruikt worden. Tot nu toe wordt het meeste onderzoek naar het gebruik van liposomale ontstekingsremmers gedaan voor de behandeling van psoriasis, vaatontsteking, reumatoïde artritis en transplantatie. De liposomen worden gevuld met verschillende ontstekingsremmende medicatie zoals prednison, dexamethason of methotrexaat, maar ook met andere onderdrukkers van het immuunsysteem zoals tacrolimus.

Na transplantatie gebruiken patiënten vaak de ontstekingsremmer prednison als onderdeel van hun dagelijkse medicatie om het immuunsysteem te onderdrukken. Prednison wordt daarnaast ook in hoge dosis gebruikt om acute afstoting te behandelen, waarbij ernstige bijwerkingen zoals osteoporose en type 2 diabetes mellitus vaak voorkomen. Om deze bijwerkingen te voorkomen wordt prednison idealiter selectief toegediend aan het ontstekingsproces in de nier, zonder de rest van het lichaam te belasten met de bijwerkingen van prednison. In hoofdstuk 4 wordt onderzocht of liposomaal-prednison opgenomen wordt door macrofagen en tot een lokale opeenhoping van prednison in de nier kan leiden. Door macrofagen in een celweek bloot te stellen aan liposomaal prednison waar een fluorescente kleurstof in opgenomen was, kon worden aangetoond dat macrofagen het liposomale prednison binnen 8 uur beginnen op te nemen. In dit onderzoek hebben we ook de glucocorticoïd receptor een fluorescente kleur gegeven waardoor we konden aantonen dat het werkingsmechanisme van de vrije vorm van prednison, namelijk het verplaatsen van deze receptor naar de celkern en het onderdrukken van de productie van pro-inflammatoire stoffen, ook geactiveerd werd door liposomaal prednison. In een ander experiment zijn ratten eerst blootgesteld aan ischemie reperfusie schade aan nier waardoor deze ontstoken raakte, en vervolgens geïnjecteerd met fluorescent gelabelde liposomen en met liposomaal prednison. Uit dit experiment bleek dan de liposomen sterker werden opgenomen in de ontstoken nier dan de onbeschadigde nier, en dat er in de beschadigde nieren een afname was van mRNA van het pro-inflammatoire MCP-1. Met deze experimenten hebben we bevestigd dat liposomaal prednison kan ophopen in een ontstoken nier, en daar via het normale werkingsmechanisme van prednison een anti-inflammatoir effect kan hebben.

In hoofdstuk 5 hebben we de werking van liposomaal prednison getest in muizen die een niertransplantatie hebben ondergaan en daarna acute cellulaire afstoting hebben ontwikkeld. Deze muizen zijn op de dag van transplantatie en op dag 3 en 6 na transplantatie behandeld met 10mg/kg liposomaal prednison. Op dag 6 is de



doorbloeding van de muizen nieren in de MRI scanner onderzocht en op dag 7 zijn alle interne organen verwijderd en zijn de nieren verwerkt voor verder onderzoek. Via FACS analyse is gekeken naar de aanwezigheid van individuele cellen in de nier. Uit deze analyse van de locatie van fluorescente liposomen bleek dat deze sterk werden opgenomen in macrofagen en dat meer dan 50% van de macrofagen in de nier liposomen bevatte. Uit HPLC analyse bleek ook dat de getransplanteerde nier meer prednison bevatte dan de gezonde nier. In de getransplanteerde nier was ook de glucocorticoïd receptor vaker geactiveerd, wat is gemeten door het mRNA van FKBP5 te bepalen. Via FACS analyse hebben we verder kunnen vaststellen dat zowel het totaal aantal witte bloedcellen, het aantal macrofagen en het aantal CFD3+ T-cellen die specifiek voor rejectie schade zorgen in de getransplanteerde nier, was afgenomen na behandeling met liposomaal prednison. Deze bevinding hebben we met de FACS methode vastgesteld waar individuele cellen in de nier geteld worden, maar ook via een immunohistochemische kleuring waar de cellen onder een microscoop geteld worden. Naast het bepalen van de hoeveelheid aan ontstekingscellen, is ook de Banff score van de nierbiopten bepaald. De Banff score is het internationale scoringssysteem voor het diagnosticeren van acute cellulaire rejectie. Uit deze test bleek dat de behandeling met liposomaal prednison even goed of beter werkte in het behandelen van de afstoting dan behandeling met conventioneel 'vrij' prednison. De MRI resultaten lieten daarnaast ook een beter doorbloeding zien van de nieren die behandeld waren met liposomaal prednison, dan onbehandelde nieren. Dit hoofdstuk laat hiermee voor de eerste keer zien dat liposomaal prednisolon in de getransplanteerde nier terecht komt, en dat het prednison in de liposomen daar effectief de acute cellulaire rejectie kan behandelen.

Met deze onderzoeken wordt duidelijk dat macrofaag polarisatie een rol speelt in het ontstaan van acute cellulaire rejectie van de getransplanteerde nier, en dat er gerichte behandelmethodes beschikbaar zijn. Uit de dierstudies blijkt dat liposomaal prednison op de juiste plek in de getransplanteerde nier terecht komt na intraveneuze injectie, en dat het bij herhaalde behandeling effectief is in het behandelen van de rejectie.

Dit onderzoek kan op verschillende manieren doorgezet worden. Om dit medicijn naar de patiënten te brengen moeten de optimale dosering en het startpunt voor de behandeling onderzocht worden, om daarna in een klinische studie de effectiviteit van het middel te onderzoeken. Daarnaast is er nog meer onderzoek mogelijk naar de rol van verschillende types macrofagen in het proces van afstoting, waarbij de samenstelling van ontstekingscellen op verschillende tijdstippen tijdens het ontstaan en behandelen van afstoting onderzocht kan worden. Met dergelijk onderzoek kunnen we meer te weten komen over het afstotingsproces, en eventueel aanknopingspunten voor nieuwe vormen van behandelingen ontdekken.