

University of Groningen

## The role of nitric oxide in renal transplant failure

Albrecht, Ester Willemina Johanna Annetje

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2003

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Albrecht, E. W. J. A. (2003). *The role of nitric oxide in renal transplant failure*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Inleiding

Jaarlijks worden er in Nederland iets meer dan 350 niertransplantaties uitgevoerd. Helaas zal een klein deel van deze patiënten al binnen een jaar hun transplantaat verliezen, meestal ten gevolge van acute afstoting. Door verbeterende immuunsuppressieve medicijnen en operatie technieken en de mogelijkheid om donor en ontvanger beter te matchen is het aantal transplantaten dat verloren gaat door acute afstoting de laatste jaren sterk gedaald naar zo'n 5%. Echter, 10 jaar na transplantatie heeft nog slechts 50% van alle nierpatiënten een voldoende functionerend transplantaat. Er zijn verschillende oorzaken voor het verlies van het transplantaat maanden of jaren na de operatie, maar het merendeel van de transplantaten gaat verloren ten gevolge van chronisch niertransplantaatfalen.

Het lage 10-jaars overlevingscijfer maakt onderzoek naar de oorzaken van acute afstoting en chronisch niertransplantaatfalen, alsmede onderzoek naar mogelijke therapieën om transplantaatverlies te voorkomen, noodzakelijk.

## Acute afstoting en chronisch niertransplantaatfalen

Acute afstoting is een proces dat geïnitieerd wordt door het geactiveerde immuunsysteem van de ontvanger. Het immuunsysteem van de ontvanger herkent de lichaamsvreemde HLA moleculen van de donor, die aanwezig zijn op alle cellen in het lichaam, en zal geactiveerd worden. Het geactiveerde immuunsysteem zal proberen de donornier op te ruimen, waardoor deze beschadigd wordt en zijn functie verliest. Een acute rejectie episode kan doorgaans goed worden behandeld met immuunsuppressieve medicijnen.

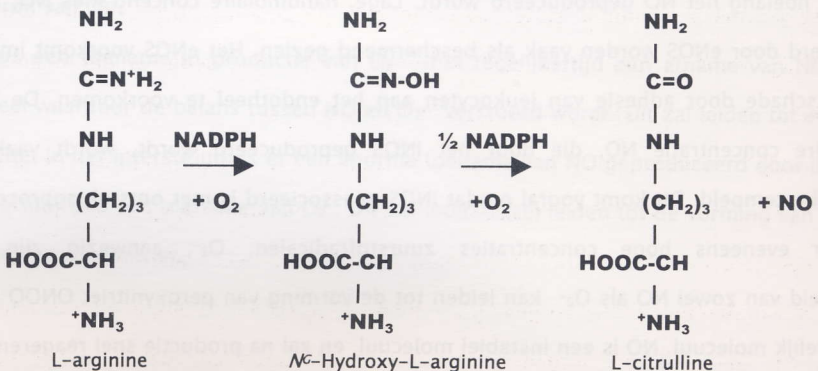
Chronisch niertransplantaatfalen wordt vaak omschreven als het progressieve verlies van nierfunctie, maanden of jaren na transplantatie, zonder dat hiervoor een specifieke oorzaak is, zoals bv. een infectie of een trauma. In tegenstelling tot acute afstoting is chronisch niertransplantaatfalen niet alleen het gevolg van immunologische factoren, maar ook van niet-immunologische factoren. Belangrijke immunologische factoren zijn de eerder genoemde verschillen in HLA moleculen, maar ook het doormaken van acute afstotingsepisoden, inadequate immuunsuppressieve behandeling en de aanwezigheid van donorspecifieke antilichamen. Niet immunologische factoren die een belangrijke rol spelen bij het ontstaan

van chronisch niertransplantaatfalen zijn o.a. leeftijd, sekse en ras van donor en ontvanger, ischemie- en reperfusieschade, terugkeer van de primaire ziekte en hypertensie. Tot op heden is er geen effectieve behandeling tegen chronisch niertransplantaatfalen.

Er is de laatste jaren veel onderzoek gedaan, om vast te stellen op welke manier deze verschillende factoren bijdragen aan het ontstaan van niertransplantaatfalen en of er mogelijkheden zijn om deze factoren zo te beïnvloeden dat niertransplantaatfalen voorkomen kan worden. Dit proefschrift heeft de rol van stikstof oxide (nitric oxide; NO) in niertransplantaat falen bestudeerd. Er is gekeken naar veranderingen in de expressie van de NO synthases in patiënten met niertransplantaatfalen, en tevens is onderzocht of het NO systeem zodanig beïnvloed kan worden dat acute afstoting of chronisch niertransplantaatfalen voorkomen kan worden.

### Stikstof oxide (NO)

NO is een radicaal dat gevormd wordt tijdens de omzetting van L-arginine naar L-citrulline. Deze omzetting van L-arginine naar L-citrulline wordt gekatalyseerd door de NO synthases (NOS). Er zijn drie verschillende NO synthases, eNOS, nNOS en iNOS. Het eNOS en het nNOS zijn constitutieve enzymen, wat betekent dat zij altijd werkzaam zijn. Ze produceren NO in een lage nanomolaire concentraties. Het iNOS daarentegen produceert NO in micromolaire hoeveelheden en is niet constitutief aanwezig, de expressie



Figuur 1 Tijdens de omzetting van L-arginine naar L-citrulline komt er een NO radicaal vrij.

van iNOS wordt geïnduceerd door o.a. cytokinen en LPS. Het eNOS (NOSIII) is voornamelijk aanwezig op het endotheel. In de nieren betekent dit dat eNOS aanwezig is op het endotheel van intrarenale vaten en glomerulaire capillairen. Door deze ligging wordt het eNOS gezien als de meest belangrijke NOS voor de regulatie van de bloeddruk. Het nNOS (NOSI) is het meest bekend door zijn lokalisatie in de neuronen in de hersenen, maar komt ook in de macula densa van de nieren tot expressie. Hier speelt het nNOS waarschijnlijk een belangrijke rol in het reguleren van de tubuloglomerulaire feedback. Het iNOS (NOSII) komt constitutief tot expressie in enkele weefsels, zoals longepitheel en de renale tubuli, waar het een rol speelt in water en zout transport. Het merendeel van het iNOS is aanwezig op de geactiveerde ontstekingscellen.

Het NO systeem speelt een belangrijke rol in verschillende (patho) fysiologische processen. Eén van de belangrijkste functies van NO is de regulatie van de bloeddruk. NO zorgt voor vaatverwijding, doordat het de gladde spiercellen van de vaatwand ontspant, wat leidt tot een verlaging van de bloeddruk, hiervoor is vooral het eerder genoemde eNOS verantwoordelijk. Daarnaast speelt NO een belangrijke rol in het voorkomen van adhesie van leukocyten aan het endotheel en het aggregeren van plaatjes, maar NO reguleert ook de aanmaak van nieuwe bloedvaten, aanmaak en afbraak van botten, zuurstof opname in de nier, en het doden van cellen en pathogenen.

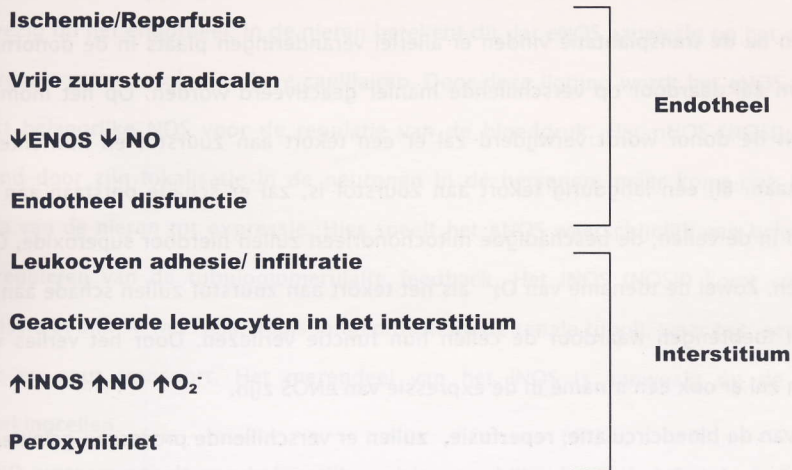
De werking van het NO hangt af van; 1) waar en door welke cellen, 2) in welke concentraties en 3) voor hoelang het NO geproduceerd wordt. Lage, nanomolaire concentraties NO, zoals geproduceerd door eNOS worden vaak als beschermend gezien. Het eNOS voorkomt immers endotheel schade door adhesie van leukocyten aan het endotheel te voorkomen. De hoge micromolaire concentratie NO, die door het iNOS geproduceerd wordt, wordt vaak als schadelijk bestempeld. Dit komt vooral omdat iNOS geassocieerd is met ontstekingsprocessen waarbij er eveneens hoge concentraties zuurstofradicalen,  $O_2^-$ , aanwezig zijn. De aanwezigheid van zowel NO als  $O_2^-$  kan leiden tot de vorming van peroxynitriet  $ONOO^-$ , een zeer schadelijk molecuul. NO is een instabiel molecuul, en zal na productie snel reageren met andere moleculen wat leidt tot de vorming van o.a nitriet ( $NO_2^-$ ) en nitraat ( $NO_3^-$ ) vaak samen afgekort tot  $NO_x$ .

## NO in transplantaat falen

Voor, tijdens en na de transplantatie vinden er allerlei veranderingen plaats in de donornier. Het NO systeem zal daardoor op verschillende manier geactiveerd worden. Op het moment dat een nier uit de donor wordt verwijderd zal er een tekort aan zuurstof en nutriënten, ischemie, ontstaan. Bij een langdurig tekort aan zuurstof is, zal er schade ontstaan aan de mitochondrieën in de cellen, de beschadigde mitochondrieën zullen hierdoor superoxide,  $O_2^-$ , gaan produceren. Zowel de toename van  $O_2^-$  als het tekort aan zuurstof zullen schade aan de endotheelcellen toebrengen waardoor de cellen hun functie verliezen. Door het verlies van endotheelcellen zal er ook een afname in de expressie van eNOS zijn.

Bij een herstel van de bloedcirculatie, reperfusie, zullen er verschillende processen geïnitieerd worden. Ten eerste zorgt de plotselinge reperfusie voor mechanische stress op het endotheel, waardoor de endotheelcellen nog meer beschadigd worden. Ten tweede, zullen de door ischemie beschadigde mitochondrieën bij een herstel van de zuurstof toevoer, nog meer  $O_2^-$  produceren. Herstel van de circulatie betekent ook dat het immuunsysteem van de ontvanger geconfronteerd wordt met de donornier. Door het verlies van NO en een toename van adhesiemoleculen zullen geactiveerde leukocyten gemakkelijk aan het endotheel plakken, transmigreren door het endotheel en op die manier het transplantaat infiltreren. De geactiveerde leukocyten produceren een verscheidenheid aan cytokinen waardoor de expressie van iNOS geïnduceerd wordt, daarnaast zijn de geactiveerde leukocyten ook een grote bron van  $O_2^-$ .

Er is dus een toename in productie van  $O_2^-$  met tegelijkertijd een afname van NO op het endotheel waardoor de balans tussen NO en  $O_2^-$  verstoord wordt. Dit zal leiden tot endotheel dysfunctie. In het interstitium is er een enorme toename van NO geproduceerd door iNOS met tegelijkertijd ook een toename van  $O_2^-$ . Dit zal interstitieel leiden tot de vorming van het zeer schadelijke peroxynitriet.



Figuur 2 Schematisch overzicht van de gebeurtenissen rondom en na transplantatie. Door ischemie en reperfusie schade zal er toename zijn van zuurstof radicalen. Tevens is er een verlies van eNOS en dus NO. Dit zal leiden tot endothel dysfunctie. Door verlies van endotheliaal NO zal er een toename zijn in de adhesie en infiltratie van leukocyten naar het interstitium. Hier zullen de geactiveerde leukocyten iNOS tot expressie brengen wat zal leiden tot een toename in NO. De leukocyten zijn echter ook een belangrijke bron van O<sub>2</sub><sup>-</sup>, welke met het NO kan reageren tot peroxytnitriet.

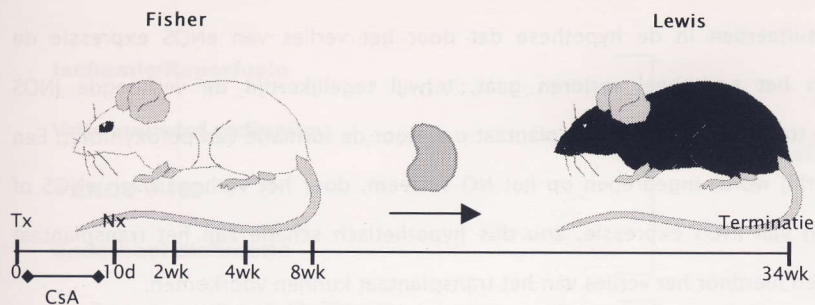
Wanneer er wordt gekeken naar de expressie van NO synthases tijdens acute afstoting is er een sterke toename in de expressie van interstitieel en glomerulair iNOS waarneembaar, tegelijkertijd is er een afname van glomerulaire eNOS expressie. De toename van iNOS kan worden toegeschreven aan de toename van ontstekingscellen in het transplantaat. Afname van eNOS expressie wordt deels veroorzaakt doordat het endothel beschadigd is door de geactiveerde ontstekingscellen en deels doordat er een directe downregulatie van het eNOS. In het serum van patiënten met een acute afstoting zien we een toename van NO<sub>x</sub> voorafgaand aan de diagnose van acute afstoting, terwijl in de urine juist een afname in de concentratie van urine NO<sub>x</sub> is waar te nemen (Hoofdstuk 3). In patiënten met chronisch niertransplantaatfalen is net als in patiënten met een acute afstoting ook het interstitieel en glomerulaire iNOS opgeregeerd terwijl het glomerulaire eNOS is downgeregeerd. Daarnaast zien we in deze patiënten ook een toename van O<sub>2</sub><sup>-</sup> producerende cellen en een toename van het schadelijke peroxytnitriet (Hoofdstuk 4).

Deze studies resulteerden in de hypothese dat door het verlies van eNOS expressie de bescherming van het endotheel verloren gaat, terwijl tegelijkertijd de verhoogde iNOS expressie schade toebrengt aan het transplantaat o.a. door de formatie van peroxy-nitriet. Een behandeling waarbij wordt ingegrepen op het NO systeem, door het verhogen van eNOS of door het remmen van iNOS expressie, zou dus hypothetisch schade aan het transplantaat kunnen remmen en hierdoor het verlies van het transplantaat kunnen voorkomen.

### **NO modulatie in een experimenteel model**

Er zijn verschillende manieren om het NO systeem te beïnvloeden, zoals bijvoorbeeld het toedienen van het substraat, L-arginine, of een co-factor zoals tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) of NADPH. Door het aanbod van het substraat te verhogen, kan er meer NO geproduceerd worden door de NO synthases tijdens bv. ischemie of ontsteking. Een andere manier om endotheliale NO productie te verhogen is het toedienen van directe NO donoren. Deze stoffen zorgen voor het vrijkomen van NO zonder dat hiervoor NO synthases nodig zijn. Er zijn verschillende NO donoren, sommige hebben een lange halfwaardetijd van enkele uren, anderen werken slechts enkele minuten. Daarnaast is het ook mogelijk om de expressie/activiteit van NO synthases specifiek te remmen. Hiervoor kunnen bijvoorbeeld specifieke iNOS remmers zoals aminoguanidine gebruikt worden.

Het is niet mogelijk om het effect van NO modulatie op het ontstaan van chronisch niertransplantaatfalen in nierpatiënten te onderzoeken, daarom is er gebruik gemaakt van een experimenteel transplantatie model, waarin een nier getransplanteerd wordt van Fisher 344 rat naar een Lewis SsnHsd rat. Deze twee ratten stammen hebben kleine HLA verschillen, waardoor er een afstoting zal plaatsvinden. Door toediening van immunosuppressieve medicijnen zullen deze ratten in enkele maanden chronische niertransplantaatfalen ontwikkelen. In deze ratten kan het NO systeem nu worden beïnvloed door toediening van NO substraat, NO donoren of specifieke NOS remmers.



**Figuur 3** Experimenteel model voor het ontstaan van chronisch niertransplantaatfalen. Fisher ratten worden gebruikt als donorratten. Na het vrijprepareren van de nier, wordt de nier doorgespoeld en op ijs bewaard. De linkernier van een Lewis rat wordt verwijderd, waarna de Fisher nier in de Lewis rat wordt geplaatst. Cyclosporine A; CsA) wordt gedurende 10 dagen, subcutaan toegediend. Na 10 dagen wordt de overgebleven eigen nier verwijderd (Nx). De ratten worden nu 34 weken lang gevolgd, waarbij iedere 4 weken, bloed wordt afgenomen, urine wordt verzameld en bloeddruk wordt gemeten. Op week 34 worden de ratten getermineerd en de nier verwijderd voor histologisch onderzoek.

Toediening van L-arginine in een experimenteel ratten model voor chronisch niertransplantaatfalen zorgde voor een toename in serum en urine NO<sub>x</sub> concentraties. Dit betekent dat een verhoogd substraat aanbod ook inderdaad zorgt voor meer NO productie door de NO synthases. Daarnaast was er ook een afname van de proteïnurie, en de focale glomerulosclerose (FGS). L-arginine heeft dus het transplantaat beschermd tegen schade ontstaan tijdens de operatie, tegen ischemie reperfusie schade, maar deels ook door het endotheel te beschermen tegen de constante afweerreactie van de ontvanger tegen de donor. Hoewel L-arginine ook het substraat is voor het "schadelijke" iNOS, was er geen toename in nitrotyrosine positieve cellen (Hoofdstuk 5).

L-arginine mag dan wel effectief zijn in het uitstellen van chronisch niertransplantaatfalen, men kan zich voorstellen dat het effect van toediening een direct NO donor sterker is dan het effect van een substraat, immers dit is onafhankelijk van de expressie van NO synthase. Het toedienen van molsidomine, een directe NO donor, in het experimentele model voor chronisch niertransplantaatfalen had echter niet zo'n sterk effect als verwacht. Er was een afname in de proteïnurie en FGS doch niet significant. Mogelijke oorzaken voor het feit dat molsidomine niet het verwachte effect had zijn een te lage dosering of adaptatie van het lichaam (Hoofdstuk 6).



De toediening van L-arginine en molsidomine is er op gericht om het endotheliale NO aanbod te verhogen. Het verhogen van het endotheliale NO beschermt immers het endotheel en op die manier zou infiltratie en schade aan het transplantaat minder moeten worden. Hoofdstuk 3 en 4 laten echter zien dat naast een verlies van eNOS er tijdens acute afstoting en chronisch niertransplantaatfalen ook een sterke toename is in de expressie van glomerulair en interstitieel iNOS. Daarnaast is er ook een toename in peroxynitriet in patiënten met chronisch niertransplantaatfalen, wat suggereert dat er het NO gevormd door het iNOS gereageerd heeft met  $O_2^-$ . Remming van de expressie van iNOS zou dus kunnen leiden tot een verminderde infiltratie en een afgenomen schade aan het transplantaat.

Er zijn verschillende specifieke iNOS remmers verkrijgbaar, zoals aminoguanidine en L-NIL. Recentelijk is er een nieuwe specifieke iNOS remmer aan toegevoegd, BSB-2. BSB-2 remt de dimerisatie van het iNOS enzym, waardoor het niet langer in staat is om NO te produceren. In een experimenteel model voor acute afstoting is BSB-2 succesvol in het remmen van tubulaire schade, terwijl er geen effect is op nierhistologie of nierfunctie (Hoofdstuk 7).

De verschillende onderzoeken in dit proefschrift hebben laten zien dat modulatie van het NO systeem in sommige gevallen schade aan het transplantaat deels kan remmen of voorkomen. In geen enkel geval is het echter mogelijk om transplantaat falen geheel te voorkomen. Dit suggereert dat NO modulatie misschien in combinatie met andere medicijnen toegepast zou moeten worden. Enkele mogelijke voorbeelden hiervan zijn combinaties met anti-oxidanten, statines of ACE remmers. De combinatie van NO donor en antioxidanten zorgt bijvoorbeeld enerzijds voor een toename in NO anderzijds voor een afname van  $O_2^-$ . Een combinatie met een statine en een iNOS remmer zal tegelijkertijd het endotheel beschermen en iNOS schade voorkomen.

Kortom, dit proefschrift heeft meer duidelijkheid gegeven over de rol van NO in niertransplantaatfalen, maar heeft daarnaast ook, zoals elk onderzoek, een heleboel nieuwe vragen opgeroepen. Vervolg studies moeten duidelijk maken of combinatie therapieën of nieuw ontwikkelde NO donoren dan wel NOS remmers effectiever zijn in het voorkomen van AR of CRTF.