

University of Groningen

## Early effects of brain death on kidney injury and outcome after transplantation

Nijboer, Wijmtje Nikeline

**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:*  
2010

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

*Citation for published version (APA):*

Nijboer, W. N. (2010). *Early effects of brain death on kidney injury and outcome after transplantation*. 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.*

CHAPTER



SAMENVATTING & TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

## - SAMENVATTING -

In de laatste decennia is niertransplantatie de behandeling van eerste keuze geworden bij eindstadium nierfalen. Van oudsher is de grootste 'bron' van nierdonoren de groep hersendode patiënten met intacte circulatie (donatie na 'brain death', DBD). Vanwege het chronische tekort aan donororganen worden echter in toenemende mate ook nieren gebruikt van levende donoren (al dan niet familie) en non-heart-beating donoren (NHB). Het was bekend dat transplantatie bij goed gemaachte combinaties van levende donoren en ontvangers succesvoller was dan transplantatie met nieren van DBD- of NHB-donoren. Tijdens de laatste vijftien jaar werd het echter duidelijk dat ook nieren van levende donoren die volstrekt niet gemaacht waren met de ontvanger een betere overleving vertoonden dan nieren van DBD-donoren met een goede HLA-antigenenmatch met de ontvanger. Dit verschil in uitkomst kan niet volledig verklaard worden door de langere koude ischemietijden in nieren afkomstig uit DBD-donoren, aangezien er geen significante verschillen in niertransplantatie-uitkomsten werden gezien zolang de koude ischemietijd onder de 24 uur bleef. Daarom moeten er andere risicofactoren zijn die dit verschil in transplantatie-succes tussen nieren afkomstig van levende en overleden donoren kunnen verklaren.

In de afgelopen jaren heeft onze groep zich gericht op de onfysiologische status van hersendood als een belangrijke factor en mogelijke oorzaak voor verminderde transplantatoeverleving. Het is al vele jaren bekend dat hersendood invloed heeft op de circulatoire en hormonale status van de donor. Het is echter tot nu toe niet gelukt deze negatieve effecten tegen te gaan door de bloeddruk te controleren en door hormonen toe te dienen. In dit proefschrift hebben we ons gericht op de progressieve pro-inflammatoire respons op hersendood in de nier en op de ontdekking van deze effecten voorafgaand aan transplantatie. We hebben de karakteristieken van deze inflammatoire respons bestudeerd, hypothesen opgesteld over de origine ervan en mogelijke reparatiemechanismen onderzocht. Reparatiemechanismen tijdens de hersendoodperiode zouden kunnen leiden tot een betere uitkomst na transplantatie. Daarom hebben we het effect van de duur van hersendood op transplantatie-uitkomsten onderzocht. Verder is de vroege detectie van nierschade door hersenschade onderzocht. We hebben hierbij ook een aantal nieuwe specifieke biomarkers voor nierschade getest. Tenslotte hebben we een interventiestudie verricht waarbij we een gemodificeerde vorm van erythropoietine hebben toegediend om nierkwaliteit tijdens hersendood te kunnen verbeteren.

In de **Inleiding** van dit proefschrift wordt de huidige stand van zaken beschreven wat betreft de kennis en concepten van hersendood en zijn effecten op orgaankwaliteit. Onomkeerbare hersenschade die leidt tot hersendood is over het algemeen het gevolg van een intracranieële bloeding of van traumatisch hersenletsel. Beiden leiden tot massawerking in het brein met compressie van hersenweefsel, waardoor uiteindelijk de hersenstam inklemt. Hierbij verdwijnen de hersenstamreflexen inclusief de ademhalingsprikkel. Tijdens de toename van de intracranieële druk is een Cushingreflex waarneembaar als gevolg van een catecholaminestijging.

Hierna raakt de patient hypotensief vanwege een progressieve sympathische deactivatie. Bij de meeste patienten is sprake van een complete dysfunctie van hypofyse-achterkwab, zoals blijkt uit het ontstaan van diabetes insipidus, en een dysfunctie van de hypothalamo-hypofyse-schildklieras. Het is nog steeds niet duidelijk of hormoonsubstitutie met triiodothyronine, cortisol of insuline een gunstig effect heeft op de toestand van de donor. Verder zijn kort na hersendood in het perifere bloed van de donor hoge spiegels aanwezig van proinflammatoire cytokines, zoals interleukine-1 $\beta$  and interleukine-6, oplosbare cytokine-receptoren zoals sIL-2 receptor and sTNF receptor II, en vasoactieve stoffen zoals endotheline-1. Zowel de afgifte van deze stoffen door het beschadigde brein als ischemie of shear stress van de vaatwand door hemodynamische instabiliteit zou verantwoordelijk kunnen zijn voor de effecten op perifere organen. In het hart zorgt zowel de systemische als een lokale afgifte van catecholaminen voor necrose van myocyten, en endotheelcelschade is het startpunt voor allograft vasculopathie. In de long zorgt hersenschade voor neurogeen longoedeem, dat nog wordt verergerd door de effecten van beademing. Hierbij raakt IL-8 opgereguleerd en worden PMNs naar het longweefsel gerecrueteerd. Wat betreft de lever: hier wordt tijdens hersendood een stijging van transaminases gezien. Verder wordt ook in de lever endotheelactivatie en een influx van PMNs en macrofagen gezien. In een diersmodel werd een significant lagere transplantatooverleving gebruikt wanneer een lever werd gebruikt van een hersendode donor, zelfs zonder hieropvolgende koude ischemie.

In de nier wordt een progressieve inflammatoire respons met endotheelactivatie gezien, en een vermindering van de nierfunctie. Aan de andere kant zijn HO-1 en Hsp70 wel significant opgereguleerd in hersendode donoren. HO-1 en Hsp70 coderen voor eiwitten met een aantal cytoprotectieve eigenschappen tegen ischemie, hitte en toxines. DNA microarrays hebben aangetoond dat er diverse genen zijn opgereguleerd in hersendood. Deze genen kunnen worden verdeeld in drie categorieën: genen betrokken bij ontsteking en stolling, in celdeling en fibrose, en in beschermende en reparatieprocessen. Deze bevindingen in hersendood van een inflammatoire respons op orgaaniveau, in combinatie met een eerste poging van het orgaan om zichzelf te beschermen, bieden nieuwe mogelijkheden voor donorbehandeling en orgaanbehandeling tijdens preservatie. Door ons te richten op specifieke blokkades of stimulatie van deze processen, zouden we transplantatooverleving van nieren van hersendode donoren kunnen verbeteren. Deze Inleiding wordt gevolgd door een algemene **Rationale** waar de verdere hoofdstukken van dit proefschrift op een rij worden gezet.

In **Hoofdstuk 3** hebben we ons gericht op de effecten van hersendood op de inflammatoire respons en op stress-gerelateerde heat shock eiwitten in de nier. Er werden nierbiopten genomen en serummonsters verzameld van hersendode donoren en van een controlegroep van levende donoren tijdens de donatieprocedure. De biopten werden gebruikt voor immuunhistochemie en semikwantitatieve polymerase-kettingreacties. De uitkomsten hiervan en de klinische en laboratoriumgegevens van de donoren werden gerelateerd aan

niertransplantatie-uitkomsten van de bijbehorende ontvangers. Immunochemie toonde een toename van E-selectine-aankleuring en interstitiële leucocyteninvasie in DBD donoren vergeleken met de controles. RT-PCR toonde een drievoudige stijging van haemoxygenase-1 en Hsp70 genexpressie na hersendood. De waarden van monocyte chemotactic protein-1 en transforming growth factor- $\beta$  waren twee keer zo hoog na hersendood, maar dit resultaat was niet statistisch significant. De transplantatie-uitkomsten werden door verschillende factoren beïnvloed: in positieve zin door donorbehandeling met desmopressine, in negatieve zin door hoge serum ureumwaarden tijdens hersendood en door hoge expressie in de nier van intercellular adhesion molecule en vascular cell adhesion molecule. Een hogere expressie van haemoxygenase-1 werkte protectief, maar alleen in de controlegroep. De aanwezigheid van interstitiële leucocyten en het vroege adhesiemolecuul E-selectine in nieren van DBD donoren wijst op een vroege fase van een ontstekingsreactie tijdens de donatieprocedure. De verhoogde expressie van monocyte chemotactic protein-1 en transforming growth factor- $\beta$  doen vermoeden dat monocytten/macrophage in deze fase een rol spelen. Dit leidt tot onze conclusie dat BD een stressrespons veroorzaakt, waartegen het toekomstige transplantaat protectieve heat shock eiwitten aanmaakt. Deze stressrespons in de DBD donor is misschien te ernstig om volledig teniet gedaan te worden door verhoogde heat shock eiwitten. Opregulatie van heat shock eiwitten zou echter wel een interessant aangrijpingspunt kunnen zijn voor interventies in de donor.

De opregulatie van cytokines en adhesiemoleculen in de nier zou verergerd kunnen worden door verstoringen van het milieu intérieur van de donor door andere organen. Het is bekend dat veel DBD donoren een hogere endotoxinespiegel hebben en meer bacteriële translocatie vanuit de darm, vergeleken met levende donoren. Endotoxinaemie zou een vermindering kunnen veroorzaken van de vasculaire integriteit, die weer zou kunnen leiden tot een vergrote vaatpermeabiliteit in de darm of de long door middel van beïnvloeding van het Angiopoietine-Tie ligand-receptor systeem. Een verlaagde Angiopoietine-1/Angiopoietine-2 ratio wordt geassocieerd met verhoogde morbiditeit and mortaliteit tijdens sepsis, terwijl een verhoogde ratio de vasculaire integriteit kan behouden en de inflammatoire respons kan dempen. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 4** Ang-1 en Ang-2 gemeten in donor serum, evenals de hoeveelheid Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) als maat voor endotoxinaemie. Daarnaast hebben we VEGF gemeten, omdat Ang-2 het endotheel stimuleert om te reageren op VEGF. DBD donoren hadden hogere LBP, Ang-2 en VEGF-waarden dan levende nierdonoren, waardoor ze een verlaagde Ang-1/Ang-2 ratio hadden, die wijst op pro-inflammatoire activatie. In een univariate regressie-analyse was een hoge Ang-2 waarde in de donor voorspellend voor de kans op rejectie in het eerste jaar na niertransplantatie. Dit wijst erop dat Ang-2 een mogelijke marker is voor de beoordeling van orgaankwaliteit in de donor.

Het mogelijke vrijkomen van schadelijke stoffen uit het brein in de circulatie van hersendode donoren en de toename van cytokine- en chemokine-expressie in de organen zelf tijdens de

hersendoodperiode suggereert dat een zo vroeg mogelijke donatieprocedure in hersendode donoren het beste zou zijn. Aan de andere kant zou je de expressie van beschermende heat shock eiwitten kunnen zien als een mechanisme waarmee het lichaam probeert de ontstane schade te herstellen. Er is maar weinig literatuur beschikbaar hierover, maar in twee publicaties wordt gesuggereerd dat een langere periode van hersendood beter zou zijn voor orgaan-kwaliteit. In **Hoofdstuk 5** van dit proefschrift staan de resultaten van een grote retrospectieve analyse waarbij we gegevens van de OPTN database hebben gebruikt om het effect van hersendoodduur (BDdur) op de uitkomst na niertransplantatie te bestuderen. Data van 20.773 nierdonor- en -ontvangerparen werden gebruikt. Als BDdur werd de periode genomen tussen het tijdstip van vaststellen van hersendood en het tijdstip van het zetten van de klem op de aorta. Het effect van BDdur op delayed graft function (DGF), acute reëctie and één- en driejaars transplantaatoverleving werd berekend met behulp van binaire logistische regressie en Cox regressiemodellen. De mediane BDdur was 23,8 uur. BDdur had een klein positief effect op de kans op direct functioneren van het transplantaat (odds voor DGF 0.995) en op de één- en driejaars transplantaatoverleving (hazard ratios 0.995 and 0.996), maar niet op de kans op acute reëctie. Deze effecten waren in een multivariate analyse niet onafhankelijk: donorleeftijd en acute reëctie waren confounding factoren. Wel bleek BDdur een onafhankelijke voorspeller van direct transplantaatfunctioneren te zijn in een multivariaat model bij een subgroepanalyse van donoren  $\leq 55$  jaar. Elk extra uur BDdur zorgde voor een vermindering van de kans op DGF met 0,4%. Deze analyse laat zien dat een langere BDdur iets gunstiger lijkt voor nieren van hersendode donoren  $\leq 55$  jaar door de reductie van de kans op DGF in de ontvanger. We trokken de conclusie dat een lange BDdur niet schadelijk is voor de kwaliteit van een transplantatienier, mits er een goede behandeling van de donor plaatsvindt gericht op het ondersteunen van de circulatie van de donor. Deze conclusie zou een grote invloed kunnen krijgen op de logistiek rond orgaandonatieprocedures in West-Europa, omdat hieruit blijkt dat deze procedures in principe in alle rust kunnen worden uitgevoerd.

Hoewel een langere hersendoodduur geen schadelijk effect heeft op orgaankwaliteit na transplantatie, is het nog steeds moeilijk om orgaankwaliteit te voorspellen tijdens de evaluatie van de donor en het donormanagement. Een vroege voorspelling van de kans op succes na transplantatie door middel van specifieke markers zou niet alleen een succesvollere en eerlijker orgaanallocatie mogelijk maken (bijvoorbeeld door specifieke programma's zoals het 'old-for-old' programma), maar zou ook kunnen leiden tot een betere evaluatie van interventiestrategieën in de donor of tijdens de orgaanpreservatie, gericht op verbetering van orgaankwaliteit. In **Hoofdstuk 6** hebben we een aantal interessante nieuwe urinebiomarkers getest, specifiek gericht op nierschade. We hebben gekeken naar urinespiegels van lactaat dehydrogenase (LDH), kidney injury molecule-1 (KIM-1), heart-type fatty acid binding protein (H-FABP), alanine aminopeptidase (AAP), malondialdehyde (MDA), N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) en interleukine-18 (IL-18). Deze markers hebben we vergeleken met klassieke parameters voor nierfunctie en -schade, namelijk urinespiegels van creatinine

en totaal eiwit. We hebben urinemonsters van twee verschillende populaties onderzocht: ten eerste van 40 nierdonoren rond de donatieprocedure, en ten tweede van 29 niertransplantatiepatiënten gedurende de eerste 10 dagen na niertransplantatie. De biomarkerspiegels werden door middel van regressie-analyses gerelateerd aan het vóórkomen van delayed graft function, acute resectie en nierfunctie tot één jaar na transplantatie. In de donorurinemonsters bleken de meeste biomarkers in vergelijking met levende nierdonoren verhoogd te zijn bij de hersendode donoren. Bij deze monsters voorspelde de AAP-waarde nierfunctie op de korte termijn, en H-FABP en KIM-1 voorspelden onafhankelijk de transplantaatfunctie na drie maanden. Delayed graft function (DGF), gedefinieerd als de noodzaak tot dialyse gedurende de eerste week na niertransplantatie, werd voorspeld door LDH in de donorurine. In de urinemonsters die waren verzameld bij de transplantatiepatiënten gedurende de eerste dagen na transplantatie bleken creatinine, LDH en NAG in de urine nierfunctie na drie maanden en één jaar te voorspellen. Hierbij konden echter niet op alle tijdstippen monsters worden verzameld als gevolg van een gebrek aan urineproductie bij een aantal patiënten met DGF. Onze analyse suggereert dat de bepaling van urinebiomarkers rond de donorprocedure en de transplantatie zinvol kan zijn voor een vroege evaluatie van het niertransplantaat.

In **Hoofdstuk 7** hebben we Kidney Injury Molecule-1 meer in detail bestudeerd. We waren in het bijzonder in KIM-1 als urinebiomarker geïnteresseerd vanwege de kennelijk hoge sensitiviteit voor nierschade en vanwege de vroege opregulatie tijdens nierschade. Bovendien was uit onze microarray resultaten al gebleken dat KIM-1 was opgereguleerd tijdens hersendood. Daarom onderzochten we Kim-1 expressie in een gestandaardiseerd hersendoodmodel in de rat, waarbij hersendood wordt geïnduceerd door het opblazen van een intracranieel geplaatste ballon. Sham geopereerde ratten werden vergeleken met ratten die hersendood waren geweest gedurende een half uur, 1, 2 of 4 uur. In de nier vonden we met real-time PCR een 46-voudige opregulatie van genexpressie na 4 uur hersendood. In situ hybridisatie liet Kim-1 expressie zien in de proximale tubuli, en dit kon bevestigd worden met immunohistochemie. Daarnaast vonden we met een Luminex assay een 6,6-voudige stijging van Kim-1 eiwit in de urine na 4 uur hersendood. We konden deze data bevestigen in humane hersendode donoren, waarbij we een 2,5-voudige opregulatie van KIM-1 genexpressie vonden in nierbipten, en een verdubbeling van KIM-1 urinespiegels, vergeleken met levende nierdonoren. Multiplexe regressie-analyse liet zien dat KIM-1 in urine, afgenomen rond het vaststellen van de hersendood, een positief voorspellende factor was voor creatininespiegels in het serum van niertransplantatiepatiënten 14 dagen en één jaar na transplantatie. Dit suggereert dat KIM-1 een veelbelovende non-invasieve marker is voor vroege nierschade geïnduceerd door hersendood.

De vorige hoofdstukken van dit proefschrift zijn vooral beschrijvend van aard, waarbij de effecten van hersendood worden gekarakteriseerd. Het is natuurlijk duidelijk dat het uiteindelijke doel is om te interveniëren tijdens hersendood en daarbij te mikken op een gunstiger balans tussen schade en herstel, in de hoop een betere transplantaatoverleving te bereiken.

In **Hoofdstuk 8** hebben we de toediening bestudeerd van (gecarbamyleerd) erythropietine tijdens hersendood in een rattenmodel. In dit experiment hebben we weer ons gestandaardiseerde diermodel voor hersendood gebruikt, waarbij we na uitname van de nieren de nierfunctie hebben geëvalueerd met het Isolated Perfused Kidney (IPK) model. De dieren werden behandeld met EPO, gecarbamyleerd EPO (cEPO, een gemodificeerd EPO-molecuul zonder de erythropoietische eigenschappen van EPO) of een placebo, en de uitkomsten werden vergeleken met die van sham geopereerde dieren. Beide stoffen, maar met name cEPO, verlaagden de expressie van een aantal pro-inflammatoire genen en reduceerden de infiltratie van PMN's in de nier. We vonden geen effect op parameters voor tubulusschade. Bij de evaluatie van de nierfunctie in het IPK-model bleek de nierfunctie met bijna 50% af te zijn genomen als gevolg van hersendood, maar de nierfunctie was volledig hersteld in de groepen die waren behandeld met cEPO of EPO. Deze resultaten zijn veelbelovend, maar er is nog verder onderzoek nodig om vast te stellen of deze remming van de inflammatoire respons en herstel van nierfunctie zal leiden tot betere resultaten in de klinische niertransplantatiepraktijk.



## - TOEKOMSTPERSPECTIEVEN -

De onderzoeksvragen die beschreven zijn in dit proefschrift zijn uitgevoerd op een grensvlak tussen basaal laboratoriumonderzoek en de klinische praktijk. Zoals het motto van de Groningse Junior Scientific Masterclass zegt: van 'bed' naar 'bench' en 'back'. In de toekomst zal dit uitgangspunt alleen nog maar belangrijker worden, omdat het doel is om de uitkomsten van klinische transplantatie te verbeteren.

### *Verbetering van vroege orgaanevaluatie en de monitoring van interventies*

Dit proefschrift beschrijft de evaluatie van biomarkers in urine ten behoeve van een vroege detectie van nierschade in organen van hersendode donoren. De studies die hier beschreven staan zijn pilotstudies, en zullen nog uitgebreid moeten worden. Verder hebben diverse studies recentelijk gesuggereerd dat er misschien meer dan één marker nodig is om voldoende sensitiviteit en specificiteit te verkrijgen voor de vroege detectie van acute nierschade. Dit zou kunnen leiden tot de ontwikkeling van 'biomarker panels' voor een accuratere evaluatie. Orgaanspecifieke schademarkers zijn waarschijnlijk niet alleen waardevol voor een betere evaluatie van donororgaan kwaliteit. Ze zouden ook kunnen dienen als een manier om het therapeutisch effect van interventies te meten. In dat opzicht zou de ontwikkeling van eenvoudig te gebruiken bedside-testen, zoals de nieuwe KIM-1 dipstick die recent is beschreven, erg behulpzaam kunnen zijn bij het monitoren van het effect van behandeling van de donor. In tegenstelling tot serummarkers zouden urinemarkers bovendien niet alleen gebruikt kunnen worden in de donor tijdens hersendood, maar ook tijdens perfusaat-'productie' in nieren die machinaal gepreserveerd worden.

### *Verbetering in interventie en studie van therapeutische effecten*

In dit proefschrift is één interventiestudie beschreven. De resultaten zijn veelbelovend, maar we moeten weten of cEPO-toediening daadwerkelijk effect heeft op de uitkomsten na transplantatie. Onze diermodellen zijn uitdagend en technisch complex, maar we zullen onze vaardigheden daarin moeten verbeteren, om onze interventies in donoren daarna te kunnen testen in de (allogene) ontvanger.

Wanneer je nadenkt over interventiemogelijkheden in hersendood, heb je verschillende mogelijkheden. Naar aanleiding van de positieve resultaten die worden gemeld ten aanzien van corticosteroidtoediening aan donoren, zou een meer specifieke stimulatie of remming van het immuunsysteem misschien effectief kunnen zijn, bijvoorbeeld de toediening van tacrolimus, complementremmers of liganden voor interleukines. Een andere aanpak zou kunnen zijn om te focussen op (hoog vet) enterale voeding, om hiermee de vasculaire integriteit te vergroten, en intestinale permeabiliteit en endotoxinaemie te verlagen. De eigen mogelijkheid van nieren in hersendode donoren om zichzelf te beschermen door heat shock eiwitten te produceren, zou ook een aangrijpingspunt voor therapie kunnen zijn, bijvoorbeeld de toediening van geranylgeranylaceton.

Een ander mechanisme dat zou kunnen bijdragen aan de inflammatoire respons tijdens hersendood is als de cholinerge anti-inflammatoire pathway recent beschreven in het proefschrift van Simone Hoeger. Normaalgesproken kunnen afferente signalen via de nervus vagus een efferente respons activeren die cytokinerelease blokkeert. Volgens de hypothese van Hoeger wordt deze zogenoemde inflammatoire reflex verstoord door de hersenschade van de hersendode donor, waardoor cytokineproductie kan plaatsvinden zonder centrale inhibitie. Vagusstimulatie in de donor door middel van nicotine-toediening zou een manier kunnen zijn om dit probleem aan te pakken.