

University of Groningen

Ischemia targeted therapies during critical periods of organ preservation

Maassen, Hanno

DOI:
[10.33612/diss.658835672](https://doi.org/10.33612/diss.658835672)

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:
2023

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

Citation for published version (APA):
Maassen, H. (2023). *Ischemia targeted therapies during critical periods of organ preservation*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.658835672>

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 10

Appendices

Nederlandse samenvatting

List of abbreviations

List of contributing authors

List of publications

About the author

Dankwoord / acknowledgements

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden (Dutch summary)

Inleiding

De Nederlandse samenvatting is bedoeld als een laagdrempelige, leesbare samenvatting van het werk wat wordt gepresenteerd in de rest van dit proefschrift.

Promotieonderzoek betekent dat je wordt opgeleid tot onderzoeker, waarbij het maken en verdedigen van je proefschrift uiteindelijk bepaalt of je dit traject succesvol afrondt. Tijdens het promotieonderzoek voer je wetenschappelijk onderzoek uit. Het betreft mogelijk onderzoek wat verricht is in een experimentele setting, een database die geanalyseerd wordt of een klinische studie met patiënten. Wanneer dit onderzoek uitgevoerd is, kunnen de resultaten gedeeld worden met de rest van de wereld middels een publicatie in een wetenschappelijk tijdschrift. Alvorens deze gepubliceerd worden, wordt het artikel gelezen en beoordeeld door onafhankelijke wetenschappers zodat de kwaliteit en integriteit gewaarborgd kan worden. In dit proefschrift betreffen de hoofdstukken 2 tot en met 8 wetenschappelijke artikelen die al dan wel of nog niet gepubliceerd zijn. Om het proefschrift compleet te maken worden er aanvullend nog een algehele introductie en discussie toegevoegd. Als het proefschrift is goedgekeurd door de beoordelingscommissie en met succes wordt verdedigd, verkrijgt men de academische graad doctor.

Dit proefschrift is onderdeel geweest van een MD/PhD traject, waarbij MD voor Medical Doctor staat en PhD voor het uitvoeren van promotieonderzoek. Dit houdt in dat het doen van het onderzoek gecombineerd werd met behalen van de master van de studie geneeskunde.

Niertransplantatie

Een belangrijke functie van de nieren is het filteren van het bloed waardoor deze wordt gezuiverd van afvalstoffen. Nierfalen is een veelvoorkomende ziekte waarbij de nieren deze functie niet meer goed kunnen uitvoeren en dit kan levensbedreigend zijn. Als dit nierfalen optreedt zijn er in grote lijnen twee behandel opties: dialyse of niertransplantatie. Bij dialyse wordt het bloed van de patiënt meerdere keren per week gezuiverd middels dialyse met een kunstnier. Dit is een intensieve behandeling met vele mogelijke complicaties. Een niertransplantatie is vaak de behandeling van voorkeur onder andere vanwege levenskwaliteit en overleving. Daarbij wordt gebruik gemaakt van een donornier welke de nierfunctie overneemt. Dit proefschrift richt zich op de niertransplantatie als behandeling van nierfalen.

Helaas is er een enorm tekort aan geschikte nieren voor transplantatie. Momenteel staan er in Nederland ongeveer 800 patiënten op de wachtlijst voor een donornier. De gemiddelde wachttijd is op dit moment 2,7 jaar, wat ertoe leidde dat in het jaar 2020 80 patiënten op de wachtlijst zijn overleden. Tevens werden 170 patiënten van de wachtlijst gehaald omdat hun gezondheidsstatus dusdanig achteruit was gegaan dat transplantatie geen geschikte optie meer was. Het tekort aan nieren heeft geleid tot de zoektocht naar alternatieven om het aanbod van geschikte organen te vergroten.

Nieren kunnen van verschillende type donoren komen: levende en overleden donoren. Waarbij in het algemeen geldt dat de kwaliteit van een nier van een levende donor een hogere kwaliteit heeft. Doordat er geen schade is ontstaan door het overlijden van de donor en de doorbloeding tot het moment van uitnemen gegarandeerd is. De overleden donoren kunnen worden onderverdeeld in “donation after brain death (DBD)” en “donation after circulatory death (DCD)”, welke respectievelijk hersen- en hartdood zijn. Nieren van deze donoren lopen al schade op tijdens het overlijdensproces. Bij DBD donoren door ontstekingsreacties ten gevolge van hersendood en bij DCD donoren door het gebrek aan doorbloeding door een stilstaand hart, ischemie. De schade als gevolg van ischemie vermindert de kwaliteit van de nieren en heeft een grote invloed op de uitkomst van de transplantatie. Het schrijnend tekort aan nieren voor transplantatie heeft ervoor gezorgd dat criteria voor geschiktheid voor transplantatie zijn/worden opgerekt zonder hierbij de overleving van de nier en zijn respectievelijke ontvanger in het gevaar te brengen. In dit proefschrift is de focus voornamelijk op de impact van ischemie tijdens verschillende perioden in het transplantatieproces. Waarbij we hebben gekeken naar mogelijke nieuwe therapieën welke ischemische schade kunnen beperken. We focussen ons hierbij op de categorie overleden donoren aangezien in deze categorie de meeste winst te behalen is.

Extractietijden

Wanneer een potentiële donor geschikt lijkt om te doneren is snelheid belangrijk om de kwaliteit van de organen te waarborgen. Alle uitnameprocedures vinden plaats op de operatiekamer waarbij het verschil tussen DBD en DCD donoren de aanwezigheid van een kloppend hart is. Het gebrek hiervan bij DCD donoren zorgt ervoor dat er meer druk ligt op het zo snel mogelijk verwijderen van de organen om zo ischemische schade te beperken. Bij beide type donoren worden de organen gekoeld met het idee om daarmee de stofwisseling (metabolisme) te vertragen zodat het orgaan langer bewaard kan worden. Dit gebeurt tijdens de operatie door ijs in de buikholte te leggen en door koude vloeistof door de aorta (grote lichaamsslagader) te spoelen. Het spoelen via de bloedvaten wordt flush-out genoemd en spoelt het bloed uit de organen en

koelt de organen van binnenuit. Het starten van deze flush-out is ook de start van de extractietijd en deze duurt tot het orgaan is uitgenomen en verder bewaard kan worden. In **hoofdstuk 2** wordt de invloed van de duur van extractietijden onderzocht op transplantatie uitkomsten in zowel DBD als DCD donoren. Hiervoor hebben wij zowel een Nederlandse database (NOTR) als Amerikaanse database (UNOS) gebruikt. De analyse toonde in de Nederlandse data dat een langere extractietijd is geassocieerd met een hoger percentage aan verlies van functionerende organen. De Amerikaanse data liet niet dezelfde associatie zien, mogelijk omdat er veel data miste waardoor de analyse minder betrouwbaar werd. Tevens lieten beide database zien dat een lange extractietijd in verband werd gebracht met een verhoogde kans op het ontwikkelen van vertraagde nierfunctie (DGF). DGF betekent dat het orgaan niet direct goed functioneert in het begin na de transplantatie en dat de patient nog een periode afhankelijk is van dialyse. Wanneer een patient DGF ontwikkeld na transplantatie dan is de kans op afstoting en verlies van nierfunctie groter.

De extractietijd blijkt belangrijk voor de kans op DGF. We denken dat temperatuur de beïnvloedende factor is omdat bij een langere extractietijd, de organen langzaam opwarmen waardoor de stofwisseling toeneemt terwijl er een gebrek is aan zuurstof en nutrienten. De invloed van temperatuur op de nier hebben wij in **hoofdstuk 3** onderzocht.

Temperatuur, metabolisme en ROS

Om het effect van temperatuur op niermetabolisme en schade te evalueren hebben wij nieren middels machine preservatie geperfundeed met vloeistof tussen de 4 en 37 °C. Machine preservatie betekent dat de nier doorstroomd wordt met perfusievloeistof. Dit kan zowel koud gebeuren, hypotherme machine perfusie (HMP) of warm, normotherme machine perfusie (NMP). HMP wordt in de kliniek in Nederland al gebruikt als manier om de nier zo goed mogelijk te bewaren tijdens het transport. NMP wordt momenteel voornamelijk experimenteel gebruikt om de kwaliteit van de nieren te testen. In hoofdstuk 3 hebben wij de zuurstof consumptie gemeten om een indruk te krijgen van hoe metabool actief de nieren waren tijdens de temperatuur wisseling. Vergelijkbaar onderzoek hebben wij ook op cellen uitgevoerd en op geïsoleerde mitochondriën. Mitochondriën zijn de energiecentrales van de cel. Ze produceren adenosinetrifosfaat (ATP) wat door cellen wordt gebruikt als brandstof. Naast ATP produceren de mitochondriën zuurstofradicalen (ROS). Normaal zijn ROS in lage concentraties aanwezig in het lichaam en doen daarmee geen schade. Echter, wanneer de hoeveelheid ROS fors toeneemt kan dit schade veroorzaken. In **hoofdstuk 3** zagen wij dat de zuurstof consumptie geen lineair verband toonde met een toename van

temperatuur, maar dat na 15-17 graden het metabolisme fors toeneemt. Tevens lieten de mitochondriën zien dat ze relatief veel ROS produceerden in de kou. De productie nam wel af ten opzichte van 37 °C, echter minder dan het metabolisme af nam. Hieruit concludeerden wij dat deze discrepantie tussen metabolisme en ROS productie wel eens verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de beperkte tijd dat organen bewaard kunnen worden in de kou zonder schade. Tevens werd bevestigd dat organen die zich in ischemische condities bevinden, zeker in warme omstandigheden, een veel te hoog metabolisme hebben om dat lang vol te houden. Hoogstwaarschijnlijk is dit ook de reden dat verlengde extractietijden een invloed hebben op transplantatie uitkomsten: de temperatuur neemt toe zonder dat het orgaan wordt voorzien van voldoende zuurstof en voedingsstoffen of beschermd wordt tegen de schade die optreedt.

Vervolgens zijn wij op zoek gegaan naar mogelijkheden om deze schade te verminderen. Hierbij hebben wij 2 methoden onderzocht.

1. Het verlagen van de energiebehoefte van de nier in hogere temperaturen.
2. Het voorzien van voedingsstoffen tijdens de uitname procedure.

H₂S en hypometabolisme

In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken naar eventuele stoffen die gebruikt kunnen worden om de schade te beperken. In een review, waarin onderzoeken van bestaande literatuur wordt gebundeld, hebben wij verschillende gasotransmitters vergeleken en gekeken naar wat hun functie is op de mitochondriën. Deze gasotransmitters zijn kleine moleculen die in ons lichaam aanwezig zijn met een enorm verscheidenheid aan functies. Hieruit bleek dat een van deze gasotransmitters, waterstofsulfide (H₂S), een mogelijk interessant molecuul zou kunnen zijn. H₂S staat bekend om zijn geur van rotte eieren en het feit dat het toxisch is. Echter, er zijn ook onderzoeksresultaten waarbij H₂S laat zien dat het in de juiste concentraties het metabolisme van kleine zoogdieren kan verlagen, zonder dat ze hier schade aan ondervinden. Er is ook data beschikbaar welke aantoont dat ischemische schade beperkt kan worden door toediening van H₂S. Het veronderstelde mechanisme hierachter is dat mitochondriële activiteit verminderd wordt, hypometabolisme. Toediening van H₂S via ventilatie in grote zoogdieren is tot dus ver niet effectief gebleken. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 5** H₂S toegediend aan geïsoleerde varkens nieren met behulp van NMP. Hierbij omzeilden we het probleem dat het hele dier de therapie ontving en konden we gericht testen in het orgaan zelf. We hebben hiervoor gebruik gemaakt van een slachthuismodel, waarbij nieren gebruikt worden van varkens voor vleesconsumptie. Door gebruik van afvalmateriaal vanuit de

vleesindustrie verminderen we het proefdiergebruik. H_2S resulteerde in dit model in een forse zuurstofconsumptie vermindering. Daarnaast hebben we aangetoond dat de geïsoleerde mitochondriën uit deze nieren minder actief zijn wanneer ze blootgesteld worden aan H_2S . Aangezien de nierfunctie en schade vergelijkbaar was tussen de controle en de H_2S behandelde groep kunnen we concluderen dat we met behulp van H_2S en machine perfusie de nieren veilig in een hypometabole staat konden krijgen bij een temperatuur van 37 °C.

In **hoofdstuk 6** hebben we het gebruik van H_2S getest in een uitname procedure bij zowel hersendode als niet-hersendode laboratoriumvarkens.

Toediening van H_2S vond plaats direct nadat de nieren uit de donor werden gehaald en gedurende de daaropvolgende bewaarperiode. De volgende dag werden de nieren geperfundeerd met NMP om hun functie en de schade te beoordelen. Hieruit werd duidelijk dat toediening van H_2S ervoor zorgde dat er minder cytokinen, stoffen die een rol spelen bij de immuun afweer, vrijkwamen tijdens de perfusie. H_2S had echter geen effect op het beperken van de schade of het beter behouden van de nierfunctie.

Zuurstof en glucose

Naast zuurstof hebben mitochondriën voedingsstoffen nodig om te functioneren. Daarom hebben we in **hoofdstuk 7** getest of mitochondriën minder schade oplopen wanneer ze tijdens de flush-out van zowel zuurstof als glucose worden voorzien. Deze studie werd wederom uitgevoerd op varkensnieren uit het slachthuis. We zagen dat er meer ATP beschikbaar was na de flush-out, wat mogelijk komt doordat de mitochondriën beter voorzien worden in hun behoeften. Wat echter contra-intuïtief was, is dat de mitochondriën niet actiever waren in de testen die we daarvoor uitvoerden. Het kan dus ook mogelijk zijn dat zuurstofarme afbraak van glucose genaamd anaerobe glycolyse heeft geleid tot een hoger ATP-level. Achter het exacte mechanisme zijn we niet gekomen. Na de flush-out zijn de nieren naar het laboratorium getransporteerd terwijl ze aan de HMP zaten, waarna warme reperfusie op het laboratorium plaatsvond. Er werden geen verschillen gezien in nierfunctie of schade tussen de groepen met en zonder glucose en zuurstof in de flush-out vloeistof.

Laser speckle contrast imaging

Ten slotte hebben wij in **hoofdstuk 8** een nieuwe methode getest om de doorbloeding van een nier te visualiseren; laser speckle contrast imaging (LSCI). Bij deze experimenten hebben wij wederom gebruikt gemaakt van varkensnieren die warm geperfundeerd werden op de pomp. Met deze opstelling konden wij de mate van

doorbloeding bepalen door de pomp harder of zachter te zetten. Tijdens deze reperfusie hebben wij LSCI gebruikt en vergeleken met sidestream dark-field (SDF) imaging. SDF-imaging kan individuele bloedcellen visualiseren, waardoor wij dit konden gebruiken als referentie of de waarde die de LSCI-apparatuur gaf klopte. Wij hebben aangetoond dat LSCI daadwerkelijk goed de doorbloeding van de nier meet. Het voordeel hiervan is dat de doorbloeding direct gevisualiseerd kan worden en een beter beeld geeft over de doorbloeding van de nier dan alleen de hoeveelheid bloed die door het orgaan gaat gemeten met een standaard flow-meter. Als een orgaan getransplanteerd wordt, zou LSCI goed de doorbloeding kunnen visualiseren en mogelijk de chirurg ondersteunen in beslissingen die genomen moeten worden. Ook zou LSCI mogelijk in de toekomst gebruikt kunnen worden om organen te beoordelen op functie. Dit hebben wij geprobeerd in **hoofdstuk 7**, hier zagen wij echter geen grote verschillen in mate van doorbloeding. Dit kan mogelijk komen omdat de nieren allemaal van vergelijkbare kwaliteit waren of doordat de groepen in dit experiment klein waren.

Conclusie

Toediening van H_2S aan geïsoleerde nieren heeft aangetoond een hypometabole staat te kunnen induceren. Echter lijkt H_2S minder geschikt in het beperken van schade op de korte termijn. Meer onderzoek is nodig om te bepalen of de toediening van zuurstof en voedingsstoffen tijdens de uitnameprocedure en transport protectief is voor de nier. LSCI zou mogelijk een rol kunnen gaan spelen in het beoordelen van de kwaliteit van het orgaan en de transplantatiechirurg ondersteunen tijdens de transplantatie.

List of abbreviations

3MST	3-mercaptopyruvate sulfur-transferase
AB	Assay buffer
ADP	Adenosine diphosphate
AP39	10-oxo-10-[4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5-yl)phenoxy]decyl]triphenyl-
phosphonium	
ARE	Antioxidant response element
ASAT	Aspartate aminotransferase
ATP	Adenosine triphosphate
AUC	Area under the curve
BMI	Body mass index
CAT	Cysteine aminotransferase
CBS	Cystathionine β -synthase
CCRP	Continuous cold regional perfusion
CO	Carbon monoxide
CORMs	CO-releasing molecules
COX	Cytochrome C oxidase
CSE	Cystathionine γ -lyase
Cyt c	Cytochrome c
DATS	Diallyl trisulfide
DBD	Donation after brain death
DCD	Donation after circulatory death
DGF	Delayed graft function
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	DL-Dithiothreitol
ECD	Extended criteria donors
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
EGTA	Egtazic acid
ER	Endoplasmic reticulum
ETC	Electron transport chain
FENa	Fractional sodium excretion
FOV	Field-of-view
GSH	Glutathione
GY4137	Phosphinodithioate
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
H ₂ S	Hydrogen sulphide
HCV	Hepatitis C virus

HEK293	Human epithelial kidney cells
HMP	Hypothermic machine perfusion
HO	Heme oxygenase
ICG	Indocyanine green
I/R	Ischemia/reperfusion
IRI	Ischemia/reperfusion injury
IRR	Intra renal resistance
KDRI	Kidney donor risk index
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	Lactate dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LSCI	Laser speckle contrast imaging
MAP	Mean arterial pressure
MDA	Malondialdehyde
MIB	Mitochondrial isolation buffer
MMP	Mitochondrial membrane potential
MnSOD	Manganese superoxide dismutase
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
MP	Machine perfusion
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MSB	Mitochondrial storage buffer
MSN	Mesoporous silica nanoparticles
NAG	N-acetyl- β -D glucosaminidase
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NMP	Normothermic machine perfusion
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthases
NOTR	Dutch Organ Transplant Registry
Nox	NADPH oxidase
NR	Neutral red
Nrf2	Nuclear-factor-E2-related factor-2
PAS	Periodic acid–Schiff
PDE5	Phosphodiesterase 5
RBC	Red blood cell
RBF	Renal blood flow
RCM	Renal cortical microperfusion

ROS	Reactive oxygen species
SCS	Static cold storage
SDF	Sidestream darkfield
SEM	Standard error of the mean
SNP	Sodium nitroprusside
STAT-1 α	Signal transducer and activator of transcription-1 α
STS	Sodium thiosulfate
TC	Temperature-controlled
TCC	Terminal complement complex
TNF- α	Tumor necrosis factor – alpha
UNOS	United Network for Organ Sharing
UMCG	University Medical Center Groningen
UW	University of Wisconsin
UW-SCS	University of Wisconsin – static cold storage solution

Author affiliations

B Bakker¹
EC Boerma²
IMA Brüggewirth³
J Calon⁴
AM Coester⁵
GM van Dam⁵
PR van Dijk⁶
M Eijken⁷
LA van Furth⁵
A Gerding⁹
H van Goor¹⁰
WT Heeman^{5,11,12}
KDW Hendriks^{5,13}
RH Henning¹³
JL Hillebrands¹⁰
HS Hofker⁵
TM Huijink⁵
B Jespersen⁷
AK Keller¹⁴
HGD Leuvenink⁵
C Moers⁵
SE Pischke^{15,16,17}
RA Pol⁵
RJ Porte³
JSF Sanders¹⁸
LH Venema⁵
MG Weiss^{7,14}

1 Department of Pediatrics, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands.

2 Department of Intensive Care, Medical Center Leeuwarden, Leeuwarden, The Netherlands.

3 Department of Surgery, Section of Hepatobiliary Surgery and Liver Transplantation, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

4 ZiuZ Visual Intelligence, Gorredijk, The Netherlands.

5 Department of Surgery, UMCG, University of Groningen, Groningen, the Netherlands.

6 Department of Internal Medicine, University of Groningen, University Medical Center, Groningen, The Netherlands.

7 Department of Renal Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark.

- 8 Department of Clinical Immunology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark.
- 9 Department of Laboratory Medicine, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands.
- 10 Department of Pathology and Medical Biology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands.
- 11 University of Groningen, Faculty Campus Fryslân, Leeuwarden, The Netherlands.
- 12 LIMIS Development BV, Leeuwarden, The Netherlands.
- 13 Department of Clinical Pharmacy and Pharmacology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Hanzeplein 1, 9713JZ, Groningen, The Netherlands.
- 14 Department of Urology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark.
- 15 Department of Immunology, Oslo University Hospital, University of Oslo, Oslo, Norway.
- 16 Institute for Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo Norway
- 17 Department of Anesthesiology, Oslo University Hospital-Rikshospitalet, University of Oslo, Oslo, Norway.
- 18 Department of Nephrology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, Netherlands.

List of publications

- Maassen H*, Hendriks KD*, van Dijk PR, Henning RH, van Goor H, Hillebrands JL. Gasotransmitters in health and disease: a mitochondria-centered view. *Curr Opin Pharmacol.* 2019 Apr;45:87-93.
- Hendriks KDW*, Brüggewirth IMA*, Maassen H, Gerding A, Bakker B, Porte RJ, Henning RH, Leuvenink HGD. Renal temperature reduction progressively favors mitochondrial ROS production over respiration in hypothermic kidney preservation. *J Transl Med.* 2019 Aug 13;17(1):265.
- Maassen H, Hendriks KDW, Venema LH, Henning RH, Hofker SH, van Goor H, Leuvenink HGD, Coester AM. Hydrogen sulphide-induced hypometabolism in human-sized porcine kidneys. *PLoS One.* 2019 Nov 19;14(11):e0225152.
- Maassen H*, Heeman W*, Calon J, van Goor H, Leuvenink H, van Dam GM, Boerma EC. Real-time visualization of renal microperfusion using laser speckle contrast imaging. *J Biomed Opt.* 2021 May;26(5):056004.
- Maassen H, Leuvenink HGD, van Goor H, Sanders JF, Pol RA, Moers C, Hofker HS. Prolonged Organ Extraction Time Negatively Impacts Kidney Transplantation Outcome. *Transpl Int.* 2022 Feb 9;35:10186.
- Maassen H*, Said MY*, Frenay AS, Koning A, Post A, Riphagen IJ, Heiner-Fokkema MR, Drabert K, Fernandez BO, Gans ROB, van den Berg E, Navis G, Tsikas D, Feelisch M, Bakker SJL, van Goor H. Nitric oxide and long-term outcomes after kidney transplantation: Results of the TransplantLines cohort study. *Nitric Oxide.* 2022 Aug 1;125-126:1-11.
- Heeman W, Maassen H, Dijkstra K, Calon J, van Goor H, Leuvenink H, van Dam GM, Boerma EC. Real-time, multi-spectral motion artefact correction and compensation for laser speckle contrast imaging. *Sci Rep.* 2022 Dec 15;12(1):21718.
- Maassen H, Venema LH, Weiss MG, Huijink TM, Hofker HS, Keller AK, Mollnes TE, Eijken M, Pischke SE, Jespersen B, van Goor H, Leuvenink HGD. H₂S-Enriched Flush out Does Not Increase Donor Organ Quality in a Porcine Kidney Perfusion Model. *Antioxidants.* 2023; 12(3):749.

* Both authors contributed equally

Over de auteur

Hanno Maassen werd geboren op 13 juni 1992 te Rotterdam. Hij is opgegroeid in Luttelgeest, een klein dorp in de Noordoostpolder. Na het behalen van zijn middelbare school diploma in 2010 is Hanno naar Groningen verhuisd om fysiotherapie te gaan studeren.

De studie fysiotherapie beviel goed maar het begon al vroeg te kriebelen of er meer uitdaging mogelijk zou zijn. Tijdens zijn studie is Hanno actief geweest op de G.S.R. Aegir als wedstrijdroeier, coach en actief lid en heeft hij actief deelgenomen aan de studievereniging Fysiek. Na het succesvol afronden van zijn laatste stages in 2014 is Hanno bij Impuls gaan werken als fysiotherapeut. Naast zijn werk heeft hij de post-HBO opleiding tot revalidatie en arbeid specialist afgerond en is hij gaan studeren om toegelaten te worden tot de zij-instroom van geneeskunde. Dit lukte in 2016 waarna hij begon aan de studie Geneeskunde in datzelfde jaar.

Na het behalen van het zij-instroom jaar begon Hanno met zijn stage wetenschap op het Chirurgisch onderzoekslab van het UMCG. Hier werd een nog niet eerdere interesse aangewakkerd in wetenschap en het doen van onderzoek. De combinatie van experimenteel werk, basaal wetenschappelijke vragen en een leuk team resulteerde in een MD-PhD aanvraag in 2018. Een MD-PhD betekent dat je de master van Geneeskunde combineert met het uitvoeren van promotieonderzoek. Na een succesvolle sollicitatie werd Hanno aangenomen en kon hij na zijn eerste jaar coschappen starten met het PhD deel van deze combinatie. Zijn promotieonderzoek bestaat voornamelijk uit experimenteel onderzoek naar het verminderen van ischemische schade. Naast het doen van onderzoek is sport een rode draad door het leven van Hanno. Zeer regelmatig is hij op de fiets terug te vinden en heeft jaren lang sportles gegeven. Tevens heeft hij lang gewerkt op de snijzaal als (hoofd) student-assistent.

In november 2022 behaalde Hanno zijn artsen examen na zijn laatste coschappen bij de Sportgeneeskunde en Orthopedie. Per maart 2023 is Hanno aan het werk als ANIOS bij de Orthopedie in Leeuwarden.

Dankwoord

Zo, daar is het dan... Het einde van iets waarvan ik nooit had verwacht dat ik er aan zou beginnen! Ondanks dat ik menig mens verraste met mijn plan om een PhD te gaan doen (inclusief mijzelf), heb ik het gigantisch goed naar mijn zin gehad. Ik ben ervan overtuigd dat dit komt door de vrijheid die ik kreeg, de fascinerende experimenten met perfusiemachines, maar vooral ook door de mensen met wie ik het samen heb mogen doen. Alle mensen om mij heen, die direct of indirect meegeholpen hebben aan de totstandkoming van dit proefschrift, wil ik dan ook van harte bedanken!

En dan beginnen we uiteraard met de begeleiding van beide heren professoren. Beste **Prof. Dr. H.G.D. Leuvenink** en **Prof. Dr. H. van Goor**, zo begon ik mijn eerste mail naar jullie eind 2017. Jullie reactie: doe maar Harry en Henri. Ik wil jullie beiden graag bedanken voor jullie fantastische begeleiding. Jullie laagdrempeligheid, toegankelijkheid en constante grappen tijdens onze meetings maakten mijn PhD tot een waar plezier. Efficiëntie was echter wel ver te zoeken tijdens de meetings, aangezien jullie in het dagelijks leven als vrienden door het leven gaan, is er denk ik maar 10% van de tijd gespendeerd aan het onderzoek. Niks mis mee.

Beste **Henri**, allereerst wil ik je graag bedanken voor de kans die je mij gegeven hebt. Laatst las ik de 1^e versie van mijn eerste artikel terug en ik kan het niet anders dan met je eens zijn met wat je op dat moment zei: slecht geschreven. Gelukkig mocht ik het nog een keer proberen. Taal is nog steeds niet mijn beste vriend en dus het controleren van mijn stukken jouw nachtmerrie, maar je hebt het overleefd. De laagdrempeligheid waarmee je als supervisor bereikbaar was en hoe je je rol als supervisor inkleed past perfect bij mij. Geen hiërarchie en ik kon net zo hard grappen over jou maken als jij dat over mij deed. Ik kan soms wat koppig zijn en als ik iets in mijn schedel heb zitten, ben ik wat lastig van koers te veranderen. Toch heb je dit op (on)subtiele wijze vaak voor elkaar gekregen. Bijgestuurd waar nodig en mij zo behoed voor het bijvoorbeeld stoïcijns uitvoeren van 36 perfusies. Concrete antwoorden gaf je helaas nooit. Dit frustreerde mij wel eens, maar goed, daar stond wel een enorme bak met vrijheid tegenover. Ik vermoed dat er in de toekomst nog wel wat fietsritjes of oppasmomentjes voor Waldo gepland gaan worden. Tevens hoop ik wel dat je niet teveel gaat fietsen zodat we bij de volgende HMC weer bij jullie terecht kunnen voor eenzelfde fantastische lunch. Bedankt voor de mooie tijd!

Beste **Harry**, omdat ik niet jou en Henri tegelijk kan bedanken kom je als tweede, maar dit betekent niet dat ik minder aan jou heb gehad tijdens mijn promotie. Sterker nog,

jij en Henri delen absoluut de eerste plek! Samen zijn jullie een briljant duo, waardoor ik met jullie vaker het idee had in de kroeg te zitten dan op kantoor. Daarnaast kreeg ik gelukkig bij jou wel concrete antwoorden. Tevens ben je altijd bereikbaar en hielp je in het weekend of in de avonden net zo hard mee om deadlines te halen van subsidie aanvragen of submissions. Zelden heeft het nakijken van stukken of een reactie op een mail langer dan enkele dagen geduurd! Met uitzondering van coupes bekijken, dat bleek altijd lastig.. Ook jij hebt een heerlijk laagdrempelig deurbeleid, even kloppen en je eerste zin was meestal: “what’s up?”. Dan gaan de pootjes omhoog, luister je aandachtig en tikken we de kwestie snel door. Iedere publicatie werd op eigenzinnige, echter traditionele wijze gevierd, waardoor ik nog wel eens twijfelde of ik om 10 uur op maandagochtend zulk heugelijke nieuws wel moest vertellen... Ook jij bedankt voor de mooie tijd Harry!

Beste **Dr. L.H. Venema**, Lieve Leo, wat heb ik ontzettend veel aan jou gehad tijdens mijn onderzoek en wat ben ik blij met jou als copromotor! Je liep overal een paar jaar op voor en hierdoor heb jij mij behoed voor het maken van vele fouten. Helaas had je veel hiervan zelf ondervonden... Je bent altijd bereid om mee te denken en ik kan altijd uitgaan van een eerlijk antwoord. Waar ik meestal wat summier ben in het opschrijven van wetenschap, ben jij de tegenpool hiervan en zeer uitgebreid. Hier heb ik veel van geleerd en zonder jou was dit proefschrift dan ook zeker een pagina of 30 korter geweest. De tripjes naar Aarhus zette alles in een stroomversnelling en zoals je zelf al zei: “hier heb ik je goed leren kennen”. Dank voor de briljante begeleiding en tot de volgende borrel!

Dear reading committee, I would like to thank you all for taking the time to review this thesis. Thanks you for your feedback, valuable information and inspiration **Prof. Dr. M.H. de Borst, Prof. Dr. D. Monbaliu and Prof. Dr. R. Wang.**

Beste **Drs. H.S. Hofker**, beste Sijbrand, als facultair begeleider van mijn stage wetenschap was deze thesis er überhaupt niet geweest zonder jou. Vanaf het eerste moment ben je betrokken geweest en gebleven bij mijn onderzoek. Jouw klinische blik is van ongekennde waarde en jouw enthousiasme is van ongekennde hoogte. Je stelde kritische vragen, liet mij niet snel even iets uitleggen, maar wou alles tot in de details weten. Je enthousiasme is aanstekelijk, na iedere meeting kwam ik weer met een bak energie je kamer uit. Uiteraard kan ik het alleen maar waarderen dat je ook nog een fantastisch sportman bent, met meerdere marathons op je naam en vaste deelnemer van de circuittraining. Sijbrand, bedankt voor alles!

Beste **Dr. C. Moers**, beste Cyril, ondanks dat je niet officieel behoort tot mijn begeleidingsteam heb ik je wel altijd als dusdanig beschouwd. Wat heb ik ongelofelijk veel aan jouw kennis en kunde gehad. Zowel bij de directe begeleiding bij het extractietijdenstuk, als alle indirecte begeleiding via bijvoorbeeld de ETM. Je bent een voorbeeld in hoe je klinische taken uitstekend kan combineren met het doen van onderzoek. En dit krijg je ook nog voor elkaar met de snelste reactietijd op mailtjes ooit! Volgens mij heeft het nooit langer dan 24 uur geduurd voordat ik antwoord had, inclusief weekenden. Ik heb de samenwerking als zeer prettig ervaren en wil je graag bedanken voor de afgelopen jaren!

Voor ik verder ga met het bedanken van personen die mij hebben geholpen deze mijlpaal te bereiken is het uitermate belangrijk om even stil te staan bij **Kroon Vlees**. Vier hoofdstukken in dit manuscript, vier publicaties en nog talloze pilot experimenten zouden niet mogelijk zijn geweest zonder het gebruik van de varkensnieren. Ontzettend bedankt **Henk Luinge** voor de samenwerking en het mogen gebruiken van de nieren. Zonder Kroon Vlees en al zijn medewerkers zou dit proefschrift niet bestaan, had ik geen fantastische tijd gehad en waren mijn speenvarkendiners minder smaakvol geweest. Iedere (oud) medewerker bedankt voor het meedenken en het meewerken aan dit onderzoek. **Gert** bedankt voor de organisatie in het begin en het meedenken voor alle barbecues. **Luitzen** bedankt voor al het gelul over fietsen tijdens het wachten. **Jan** bedankt voor het uitnemen van de organen en uiteraard alle andere werknemers van harte bedankt! Ik kom absoluut nog eens langs voor een bakkie koffie en grote stukken vlees en varkens voor het speenvarkendiner!

Beste **Dr. A.M. Coester**, Lieve Annemieke, tijdens mijn stagewetenschap was jij mijn dagelijks begeleider en wat heb jij het leuk gemaakt voor mij. Je dacht overal in mee, was laagdrempelig en hebt mij wegwijs gemaakt in het doen van onderzoek. Om een voorbeeld te geven voor de andere lezers over hoe jij studenten begeleid: als student mocht je toen der tijd nog niet in het busje rijden om de nieren op te halen, verzekeringstechnisch. Geen probleem als je een student bij jou bent, dan mag je gewoon jouw Volvo lenen! Reserve sleutel mee, om 05.30 uur bij je voordeur ophalen en 's avonds weer terugbrengen. Briljant. Door allerlei verhuizingen en opleidingen elders in het land ben je niet constant in Groningen aanwezig geweest, maar altijd betrokken en nieuwsgierig gebleven. Zo waren de denk-borrels samen met **Koen** altijd een genot.

Beste **Dr. K.D.W. Hendriks**, beste Koen, laten we dan maar gelijk bij jou verder gaan. Toen ik bezig was met mijn pilotexperimenten voor het H₂S stuk tijdens mijn stagewetenschap bleek dat wij geïnteresseerd waren in eenzelfde vraagstuk, maar

beide met een andere achtergrond. Dit bleek een gouden combinatie te zijn tussen hele nieren aan de pomp, aangevuld met kennis uit cellen en geïsoleerde mitochondriën. Tevens liep je 2 jaar op mij voor, waardoor ik enorm veel van je heb kunnen leren over hoe je onderzoek doet. Drie gezamenlijke publicaties en talloze borrels verder durf ik wel te stellen dat het een goede samenwerking is, en die nog niet is uitgespeeld. Vooral de vrijdagmiddagexperimenten, waar de echte wetenschap bedreven werd, heb ik als briljant ervaren. Geen varkensbloed meer? Dan tappen we zelf wel even wat af. Gooi daar nog een droogijsbommetje overheen en je vrijdag is geslaagd (uiteraard niet op het COL, **Jacco Zwaagstra**).

Beste **Jacco Zwaagstra**, ik denk dat ik in het begin van mijn onderzoekstijd vaker van jou op mijn donder heb gekregen dan ooit tevoren. Vaak wist ik niet dat ik iets fout deed, maar achteraf snap ik goed waarom er gecontroleerd wordt: een soepel draaiend onderzoekslab. Ik wil je dan ook van harte bedanken voor alle hulp, al het geregeld en het altijd meedenken als er iets moest gebeuren. Een andere onmisbare steun en toeverlaat op het COL is natuurlijk **Petra Ottens**. Zonder jou was dit proefschrift er absoluut niet geweest. Protocollen checken, analyses uitzoeken of uitvoeren wanneer ze lastig zijn, logistiek regelen, en zo kan ik nog wel even doorgaan. Ik heb Henri ooit horen zeggen: “zonder Petra kan ik het lab wel sluiten”. Daar sluit ik mij bij aan, zonder Petra was mijn boekje er in ieder geval niet geweest! **Janneke Wiersema-Buist**, ook jij bedankt voor alle hulp bij de analyses. Van het aanleren van ATP-metingen tot uitzoeken of complement te meten was in de varkenscouples, je hebt een behoorlijke bijdrage geleverd. **Susanne Veldhuis** ook jij bedankt voor de hulp. In het begin hebben we iets minder samengewerkt, maar zeker richting het einde heb je veel betekend in de logistiek van alle perfusies!

A significant part of my thesis was performed in Aarhus, Denmark, which was not possible without the hospitality of, and collaboration with **Prof. Dr. B. Jespersen**. Dear Bente, thank you for making me feel so welcome at your lab and in Aarhus. Your kindness, interest in the experiments and help in general made my stay in Denmark a lot of fun. The pig experiments were very nice to work on and I would like to thank you for the opportunity that you gave me. Of course, I had never operated a pig before, so an enormous thank you also goes to **Dr. A.K. Keller**. The first time we met was during a transplantation experiment. Thank you for your wisdom and time spend on me. From discussing future studies, to enjoying congresses together with the Denmark/Dutch crew. Denemarken is een populaire bestemming voor Nederlandse studenten. Tevens trof ik hier **Dr. M. Eijken**. Beste Marco, dank voor je fantastische gastvrijheid. Dat we gebruik mochten maken van je huis tijdens een deel van ons verblijf getuigt hiervan. Heerlijk

om af en toe weer even in het Nederlands te kunnen kletsen en het dan voornamelijk over fietsen/MTB'en te hebben. Ik sluit een rondje op de gravelbike of MTB niet uit in de toekomst! Dear **Drs. M.G. Weiss**, dear Marc, it was a pleasure working with you! I was very surprised to find out you were still a student when I met you as your surgery skills were already very impressive. The flush-out study we did together was so much fun, thank you for teaching me surgery in pigs and all the snacks during the long days. Also, your work ethic is beyond compare, which made the collaboration even more brilliant.

Dear **Dr. S.E. Pischke**, dear Søren, I highly appreciate our collaboration on the flush-out project of Aarhus. Your interest in the project, enthusiasm and expertise on complement activation made the cooperation very pleasant! Also a great thank you to Prof. **Dr. T.E. Mollnes** for all the help with the flush-out project.

Lieve COL collega's, zonder jullie had ik niet zo'n leuke tijd gehad als nu en ik wil jullie daar graag allemaal hartelijk voor bedanken! Ik ga ongetwijfeld mensen vergeten hier te benoemen, maar voel je niet gepasseerd, je wordt gewaardeerd.

Beste Drs. **T.M. Huijink**, beste Tobias, bedankt voor de afwas! Beste **L.A. van Furth**, lieve Annick, je begon op het COL als student die ik superviseerde, concreet kwam het erop neer dat je alles zelf deed en mij af en toe bij sprak over de voortgang. Dat je een schitterend proefschrift gaat maken was mij op dat moment al duidelijk. Dank voor de ontzettend leuke tijd en alle matige grappen van je waarmee je mij de kast op stuurde. Je bent een fantastische collega die altijd voor iemand klaar staat en helpt waar nodig. Nog een klein beetje meer trainen en dan kunnen we overwegen ook komende zomer weer wat fietstochtjes te plannen. Spelletjesavonden met **Veerle Lantinga** kan natuurlijk wel altijd. Lieve Veerle, ook jij bedankt voor de fantastische tijd! Als huisgenoot en vriendin van Annick was jij natuurlijk zeer regelmatig aanwezig bij de eerder genoemde spelletjesavonden, fietstochtjes en etentjes. Je bent altijd te porren om even mee te denken met experimenten, zo was een pilot experiment met retrograde druk in de MRI zo geregeld. Ondanks dat we geen echte experimenten samen hebben uitgevoerd, heb ik je wel altijd als directe collega beschouwd. Thanks dat je zo top bent! Beste **Dr. L.L. van Leeuwen**, lieve Leo, als "kleine generaal" van het COL beschik jij over kwaliteiten die gegarandeerd leiden tot succes: het organiseren van alles omtrent congressen. Van rooftop parties tot jacuzzi's in de Airbnb's, je maakt iedere activiteit tot een feestje. Tevens vond ik het heerlijk om je met mijn subtiel geplaatste, onsubtiele opmerkingen op de kast te jagen! Dank hiervoor, het was een genot. We hebben geen experimenten samen uitgevoerd maar je staat altijd klaar om bij te springen en mee te denken als het spaak loopt. Dat je een glansrijke carrière als academicus tegemoet gaat, twijfel ik niet over! Beste **Dr. M.B.F. Pool**, beste Merel, ik weet nog goed dat ik pas net begonnen was

met perfusie experimenten en enorm blij was dat ik de eerste keer naar het slachthuis zonder Annemieke niet helemaal alleen was. Vragen kon ik toen makkelijk bij je kwijt en eigenlijk is dat nooit veranderd. Dank voor de fijne samenwerking! Beste **T.L. Hamelink**, ook jij bedankt voor de mooie tijd. Van gezamenlijke experimenten met MRI en LSCI is het nog niet gekomen, maar wie weet wat de toekomst nog te brengen heeft.. Een beetje ouwehoeren tussen de experimenten door is natuurlijk ook al waardevol. Natuurlijk zijn er nog talloze andere mensen op het COL die hebben bijgedragen aan een top tijd. Dank **Baran Ogurlu, Silke Bodewes, Otto van Leeuwen, Anne Marye de Jong, Tamar van de Berg, Isabel Brüggewirth, Bianca Lascaris, Kalong Zhang, Elwin Blom, Ewout Bergsma, Carol Pamplona, Bas Keizers, Bente van der Boom, Nienke Grashuis, Nora Spraakman, Tina Jager, Ellen Driever, Daphni Efraimoglou, Ilse Kamminga, Michiel Hu, Mark Hendriks, Fien von Meijenfeldt, Shuqi Yang** en **Rianne Schutter**.

Het grootste deel van mijn onderzoekstijd heb ik gependeed op een kamer bij de pathologie. Beste **Dr. K. Boeve**, beste Koos, mijn PhD begon ik tegenover jou. Aangezien je ruim verder was in je promotietraject kon je mij handig wegwijs maken bij de pathologie en het PhD-traject. De gedeelde liefde voor de fiets resulteerde in een aantal mooie ritjes samen, al moet ik zeggen dat je verschijning op Strava wat zeldzaam wordt. Samen met **Dr. B. Koopman** hebben jullie mij welkom geheten en van het werk afgehouden met de Tour de France opzetten en Poulties opstarten. Dank voor de mooie tijd! Toen jullie besloten dat jullie professor te ver weg zat, werden jullie stoelen gevuld met een nieuwe garde PhD-ers van de pathologie. Beste **L. Feenstra**, lieve Lian, jij kwam de kamer weer gezelliger maken nadat ik er maanden alleen had gezeten. Ik heb genoten van je aanwezigheid en het was heerlijk ouwehoeren tussen het harde werken door. Het gezamenlijk opstarten met een goede bak filterkoffie heeft mij nog efficiënter gemaakt. Together with **Yang Luo** and later also **Gonzalo F. Rodriguez** you were excellent roommates, celebrating “Sinterklaas” and ordering Indian food.

Beste **Prof. J.L. Hillebrands**, beste Jan-Luuk, dank voor de prettige samenwerking met het gasotransmitter stuk. Niet slecht voor de tijd die we er voor hadden al zeg ik het zelf! Tevens dank voor de leuke en gezellige momenten tussen al het werken door. Geklets over fietsen en motorrijden mag altijd natuurlijk. Het proefritje op jouw V-strom 1000 heeft mij er van overtuigd dat mijn 650 misschien niet genoeg was en getuigd van goed vertrouwen. Dank! Beste **Marian Bulthuis**, ondanks dat ik niet veel tijd heb gependeed op het pathologielab heb je mij uitstekend geholpen met alle vragen die ik had en al het pathologiewerk wat verricht moest worden. Dank hiervoor!

Dan komen we aan bij de zelfbenoemde “laser-nerd” **Dr. W.T. Heeman**. Beste Wido,

wat een genot om met jou samen te werken. Ik weet nog goed toen ik je leerde kennen op Aegir ruim 10 jaar geleden, want je produceerde voornamelijk veel geluid op dat moment. Later kwam ik er pas achter dat dit niet zomaar zinloze trillingen van lucht waren, maar een enorme bak met energie en briljante ideeën. Ik vond het echt fantastisch om samen met jou de LSCI-nierperfusie-experimenten uit te voeren, naar mijn idee een hele mooie samenkomst van 2 expertisegebieden. Het feit dat je dan ook mijn droom nog laat uitkomen: werken op de fiets, maakte dit allemaal nog veel beter. Tevens ben ik je dankbaar dat je Scooter terug in mijn leven hebt gebracht. Op naar hopelijk nog veel toekomstige publicaties. Aansluitend wil ik graag **Hessel Bouma** bedanken voor het faciliteren van deze samenwerking en het meedenken in de mogelijkheden! Als laatste hebben we natuurlijk veel overleg gehad met **Prof. Dr. E.C. Boerma**. Beste Christiaan, wat heb ik genoten van de samenwerking. Meetings samen met Henri en Harry voelde als heerlijk ongedwongen sparren over de toekomst. Tevens beschik jij over een ongekende kwaliteit in het enthousiasmeren van mensen om je heen. Uiteraard heb ik het “eureka!” moment nog helder op mijn netvlies, wanneer na uren hannesen het eindelijk lukte om met de SDF-camera de doorbloeding goed in beeld te krijgen. Wat een genot! In het verlengde hiervan wil ik ook **Prof. G.M. van Dam** van harte bedanken voor het begeleiden van de LSCI-projecten.

Tevens wil ik graag alle co-auteurs die hebben geholpen de gepubliceerde artikelen tot de huidige kwaliteit te doen stijgen bedanken! Zonder jullie was dit proefschrift niet aan zijn huidige vorm gekomen: **J. Calon, Dr. P.R. van Dijk, A. Gerding, Prof. Dr. R.H. Henning, Dr. R.A. Pol, Prof. Dr. R.J. Porte, Dr. J.S.F. Sanders** en **Dr. M.Y. Said**.

Lieve **Pip**, heel erg bedankt voor de hulp met het ontwerpen en in elkaar zetten van dit proefschrift. Je hebt mij een boel werk bespaard en het 100x mooier gedaan dan ik ooit zou kunnen!

Lieve vrienden, uiteraard was dit proefschrift er niet geweest zonder jullie. Dank voor de leuke momenten, humor, matige grappen, kilometers aan fietsplezier en steun waar nodig. Jullie zijn de voedingsbodem voor levensgeluk. Voel je je aangesproken? Dan klopt dat. Golden lustrum boys, Licht '12, aanvullend Aegir gespuis licht '11 en zwaar '12, polderboys, TDF en alle speenvarken liefhebbers, dank!

Lieve schoonfamilie, **Karin, Ruud** en **Yulia**, dank voor jullie oprechte interesse en alle leuke momenten. Ik heb mij altijd thuis gevoeld bij jullie en waardeer jullie enorm!

Dit proefschrift en alle organisatie er omheen was niet gelukt zonder de trouwe steun van mijn paranimfen **Tobias Huijink** en **Hugo Maassen**. Uiteraard kwam je er niet vanaf met slechts 1 zinnetje **Tobias**, ondanks dat ik je afwas skills wel waardeer. Je bent een van de meest behulpzame en onzelfzuchtige mensen die ik ooit heb leren kennen. Met jouw lengte is GVR wel een gepaste bijnaam. Daarbij heb je enorm flauwe humor en zit je bomvol scherpe opmerkingen. Dit resulteerde in een uitermate prettige samenwerking waarbij zelfs opstarten op het lab voor slachthuisdagen om 05.45 uur geen enkel probleem was. Tevens was je wel bijzonder slecht in het raden van hematocriet waarden, vlug prepareren en steen-papier-schaar, maar dit resulteerde wel in veel koffie voor mij en veel plezier. Dank voor de samenwerking, bier brouwen, spelletjes avonden en dat je mijn paranimf wil zijn. En bedankt **Marjolein**, voor alle ondersteunende hulp!

Naast de GVR staat uiteraard broer en vriend **Hugo**. Vroeger was het misschien niet altijd duidelijk aangezien je als broers wel eens een meningsverschil hebt, maar voor mij ben je van jongs af aan al een voorbeeld. We doen al jaren van alles samen; zoals vakanties, sporten en kattenkwaad uithalen. Laten we daar een PhD verdediging aan toevoegen! Ik waardeer het enorm dat je er altijd voor me bent en precies begrijpt wat ik bedoel zonder dat ik iets zeg. Een betere grote broer kan ik mij niet wensen.

Lieve **Eileen**, wat ben ik blij met jou als schoonzus! Je oprechte interesse in alles wat ik doe, je gepaste gekheid en ontzettend aanstekelijke lach maken ieder moment met jou tot een waar plezier. Superfijn om te zien hoe jij en Hugo samen een gezinnetje hebben opgebouwd en om jullie gelukkig samen te zien. Je laat me altijd thuis voelen, zelfs als ik al jullie eten weer eens op eet. Lieve **Leon** en **Lucas**, jullie snappen uiteraard totaal nog niet waar ik mee bezig ben, of wie ik überhaupt ben. Toch wil ik jullie wel alvast bedanken. Leon voor de nu al fantastisch leuke momenten die ik met je heb gehad. Je zou denken dat 38 keer een schroef in de bank draaien verveelt, maar nee! Lucas, je bent nog geen maand oud als ik dit schrijf, welkom op de wereld en ik hoop dat we samen een fijne band op gaan bouwen.

Lieve ouders, uiteraard wil ik jullie bedanken voor alles. Ik vermoed dat niet alle ouders staan te springen als hun zoon zegt een tweede studie te willen uitvoeren, bij jullie is dat anders. Jullie stellen kritische vragen, sturen bij waar nodig, maar steunen mij vooral onvoorwaardelijk in de beslissingen die ik neem.

Lieve **ma**, je zorgzaamheid en onvoorwaardelijke liefde is wat je een top moeder maakt. Jij bezit een stuk creativiteit en kunstzinnigheid die bij mij ontbreken. Dank voor het maken van de fantastische voor- en achterkant van dit proefschrift. Ik kan altijd bij je terecht en een betere moeder kan ik mij niet wensen. Samen backpacken in Vietnam is denk ik het mooiste voorbeeld van wat voor bijzonder mens jij bent.

Lieve **pa**, de absolute stille kracht van ons gezin. Ik betrap mij er nog regelmatig op dat ik altijd jou bel als ik ergens tegenaan loop of advies nodig heb. Je bent een ondernemer in hart en nieren, stilzitten hoort daar niet bij. Deze mate van ondernemerschap en het luisterend oor dat je biedt, maken je tot een waar voorbeeld. Je woordspelingen blijven mij tot op de dag van vandaag verbazen, maar stiekem denk ik (als je geen ondernemer was) dat je een heel goed onderzoeker zou zijn geweest, gezien je creatieve gedachtegangen. Ik hoop dat Stef Bos gelijk heeft in zijn nummer en dat ik net zo mag worden als jij. Beiden bedankt voor jullie liefde en steun.

Lieve **Emmy**, vanaf het begin van dit traject ben je er bij geweest. Toen ik te horen had gekregen dat ik was aangenomen voor het MD/PhD traject stond jij dezelfde avond voor de deur, ballonnen in je hand en een feesttoeter in je mond. Op dat moment een nog vrij prille relatie, maar sindsdien hang je de slingers op in mijn leven. Je maakt me gelukkig. Je steunt me in alles wat ik doe en je vult me perfect aan. Waar ik een rationele levensaanpak heb, laat jij mij de andere kant zien. Ook moet ik je bedanken voor alle spellingschecks die je hebt uitgevoerd. Ik vermoed dan ook dat deze alinea bomvol spelfouten staat.. Dank dat je zo'n leuk mens bent en dat je onderdeel van mijn leven bent. Ik heb zin in de toekomst samen!