Maastricht University

Complement activation and apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury : from basic insights to clinical applications

Citation for published version (APA):

de Vries, B. (2005). *Complement activation and apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury : from basic insights to clinical applications*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. https://doi.org/10.26481/dis.20050128bv

Document status and date:
Published: 01/01/2005

DOI:
10.26481/dis.20050128bv

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 25 Apr. 2024

SUMMARY

In *Chapter 1* the relevance of ischemia-reperfusion (I/R) injury in renal transplantation is discussed. In particular in the setting of Non-Heart-Beating (NHB) organ donation I/R injury is a major concern since it may result in post-transplant organ failure. Therefore I/R injury limits the general acceptance and broad implementation of NHB organs as a source of organs for transplantation. It is of crucial importance to gain insight into the early events which ultimately result in I/R injury and post-transplant organ failure. Therefore the main goals of this thesis were:

* The development of diagnostic methods which can estimate ischemic injury prior to transplantation and thereby predict post-transplant organ function
* The development of effective therapeutic strategies to treat or prevent I/R injury thereby improving post-transplant organ function

In the second section the general pathophysiological principles of I/R injury are shortly addressed. Initial cellular injury induced by ischemia results in cell-death which can be necrotic or apoptotic. Cell-death subsequently induces an inflammatory response which is regarded to be crucially involved in the development of I/R injury and organ failure.

In the third section of the introduction the basic aspects of apoptotic cell-death in relation to I/R injury are discussed. Next, the role of inflammation, in particular the role of the complement-system in I/R injury is outlined. Renal I/R induces activation of the immune system which is, among others, characterized by complement-activation. The complement-system can be activated via three pathways: the classical pathway (activated by antigen-antibody interaction), the lectin pathway (activated by mannose recognized by mannose binding lectin (MBL)) and the alternative pathway (activated by microbial products). All three pathways ultimately activate complement factor C5 which results in the formation of C5a and C5b, the latter one being the first step in the formation of the membrane attack complex (MAC). Both the formation of the MAC and the generation of C5a are believed to be important in the pathophysiology of I/R injury.

In *Chapter 2* the initiation of apoptotic cell-death during warm ischemia was studied. A human model for warm ischemia was used applying kidneys nephrectomized because of small renal cell carcinoma. Ex vivo, kidneys were stored at 37°C and consecutive biopsies were taken to investigate apoptotic processes. During warm ischemia the renal levels of the pro-apoptotic protein Bax increased. In contrast the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and cFLIP were depleted in a time-dependent manner. Warm ischemia resulted in the activation of caspase-9, whereas caspase-8 and caspase-3 were not activated.

Thus, warm ischemia in the human kidney initiates the apoptotic cascade. Moreover, the duration of ischemia correlates with the degree of activation of the apoptic cascade. Therefore, we hypothesize that the determination of early apoptotic changes allows estimation of ischemic injury prior to transplantation, thereby predicting post-transplant function. Furthermore, this study provides opportunities to delineate targets in apoptotic pathways for pharmacological interventions to reduce clinical manifestations of reperfusion injury.

Since redox-active iron has been implicated in the induction of apoptotic cell-death and inflammation, in *Chapter 3* the role of circulating redox-active iron in the development of experimental renal I/R injury was investigated. Mice were subjected to unilateral renal ischemia for 45 minutes, followed by contralateral nephrectomy and reperfusion. To investigate the role of circulating iron, mice were treated with apotransferrin, an endogenous iron-binding protein, or iron-saturated transferrin (holotransferrin) as control treatment. Renal ischemia induced a significant increase in circulating redox-active iron levels during reperfusion, indicating that during experimental I/R the endogenous iron-binding capacity is overwhelmed. Exogenous apotransferrin, in contrast to holotransferrin, reduced the amount of circulating redox-active iron and abrogated renal oxidative stress as determined by superoxide generation. Apotransferrin treatment did not affect I/R-induced apoptotic cell-death, however holotransferrin aggravated renal apoptosis. Apotransferrin inhibited inflammation, characterized by the influx of neutrophils and activation of the complement-system. Most importantly, apotransferrin, by inhibition of oxidative stress and inflammation, inhibited post-ischemic organ failure. Therefore apotransferrin could potentially be used in the treatment of acute renal failure, as seen after transplantation of ischemically damaged organs.

Based on the experimental data described in *Chapter 3*, we investigated the involvement of redox-active iron in clinical transplantation in *Chapter 4*. We therefore measured redox-active iron levels in preservation fluid during machine-preservation of 218 NHB kidneys which were machine preserved at the University Hospital Maastricht between July 1998 and January 2003 and transplanted within the Eurotransplant region. During machine preservation of NHB donor kidneys, in contrast to heart-beating donor kidneys, redox-active iron was rapidly released into the preservation fluid in substantial amounts. The levels of redox-active iron in the preservation fluid correlated well with donor characteristics, such as warm ischemic injury. Moreover, redox-active iron levels during machine preservation adequately predicted post-transplant organ failure of NHB category 2 donor kidneys, kidneys which most evidently suffer from warm ischemia. These data suggest that redox-active iron is involved in clinical transplantation of ischemically injured organs. Since redox-active iron levels correlate well with post-transplant organ function, pre-transplant assessment of redox-active iron could potentially be used for

viability-testing of ischemically injured organs. The addition of iron-scavengers to preservation fluid could possibly improve functional outcome of machine-preserved ischemically injured grafts.

In *Chapter 5* we investigated the role of the endogenous survival factor lysophosphatidic acid (LPA) in the protection against experimental renal I/R injury. LPA is an endogenous phospholipid growth factor with anti-apoptotic properties. Since the inhibition of apoptosis is protective against I/R injury, we studied the effects of exogenous LPA in a murine model of renal I/R injury. LPA administered at time of reperfusion dose-dependently inhibited renal apoptosis. I/R-induced renal apoptosis was present in tubular epithelial cells with evident disruption of the brush-border. LPA treatment prevented tubular epithelial cell apoptosis and also reduced the I/R-induced loss of brush-border integrity. Besides, LPA showed strong anti-inflammatory effects, inhibiting the renal expression of TNF-α and abrogating the influx of neutrophils. Next, LPA dose-dependently inhibited activation of the complement-system which is induced by renal I/R. Finally, treatment with LPA almost completely abrogated the loss of renal function in the course of renal I/R. This study illustrates that ischemia-induced apoptosis, inflammation, and organ failure can be abrogated by application of endogenous anti-apoptotic compounds and thereby provides new means to treat clinical conditions associated with I/R injury, in the kidney and potentially also in other organs.

Based on the observation in *Chapter 5* that experimental renal I/R induces activation of the complement-system in *Chapter 6, 7, and 8* we more extensively studied the role of the complement-system in experimental as well as clinical acute renal failure.

First, in *Chapter 6*, we demonstrated that the mannose-binding lectin (MBL) pathway is involved in complement-activation in the course of renal I/R injury. In experimental renal I/R injury and in clinical post-transplant organ failure we assessed the activation and regulation of the MBL-pathway. Mice subjected to renal I/R displayed evident renal MBL-depositions in the early reperfusion phase indicating activation of the MBL-pathway. In the later reperfusion phase also renal deposition of C3, C6, and C9 was observed. Deposition of MBL-A and -C completely co-localized with the late complement-factor C6, showing that MBL is involved in complement-activation in the course of renal I/R injury. In serum of mice subjected to renal I/R, MBL-A levels increased in contrast to MBL-C levels which dropped evidently. Finally, in human post-transplant biopsies MBL was deposited early after reperfusion, in contrast to pre-transplant biopsies in which no MBL depositions could be detected. In particular in NHB-grafts displaying post-transplant organ failure extensive MBL depositions were observed in peritubular capillaries and tubular epithelial cells. Taken together, in experimental renal I/R injury and clini-

cal post-transplant ARF the MBL-pathway is activated, followed by activation of the complement system. These data indicate that the MBL-pathway is involved in ischemia-induced complement-activation.

Next, in *Chapter 7*, the pathophysiological role of complement-activation in renal I/R injury was addressed. To investigate the involvement of complement in I/R injury we examined the effect of complement-inhibition on post-ischemic organ failure. Therefore mice were subjected to 45 minutes of unilateral ischemia and subsequent contralateral nephrectomy and reperfusion for 2, 12 or 24 hours. Mice were control-treated or treated with BB5.1, a monoclonal antibody which prevents cleavage of the complement-factor C5, thereby preventing C5a generation and formation of the membrane attack complex (MAC). Renal I/R induced extensive deposition of C3 early after reperfusion, whereas C6 and C9-deposition (MAC-formation) occurred relatively late. I/R-induced complement deposition mainly localized to tubular epithelial cells. Treatment with BB5.1 totally prevented MAC-formation. Inhibition of C5 strongly inhibited late inflammation, as measured by neutrophil-influx and induction of the murine C-X-C chemokines macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), KC and LPS-induced C-X-C chemokine (LIX). Anti-C5 treatment furthermore abrogated late I/R-induced apoptosis whereas early apoptosis was not affected. Finally, BB5.1 treatment significantly protected against I/R-induced organ failure. These data show that complement-activation is crucially involved in the regulation of both apoptosis and inflammation in the course of renal I/R injury. Moreover, complement-inhibition is strongly protective against the development of post-ischemic acute renal failure.

In *Chapter 8* the specific role of complement-factor C5a and its interaction with the C5a-receptor (C5aR) in the development of post-ischemic acute renal failure was examined. We analysed the expression of the C5aR in kidneys of healthy mice. The C5aR was expressed on mesangial as well as tubular epithelial cells. After I/R injury, C5aR expression was upregulated in tubular epithelial cells. In addition, after renal I/R mRNA levels of C-X-C chemokines and TNF-α increased significantly and kidneys were heavily infiltrated by neutrophils. Blocking the C5aR pathway applying a specific C5a receptor antagonist (C5aRA) abrogated upregulation of C-X-C chemokines but not of TNF-α and significantly reduced neutrophil infiltration. Application of the C5aRA abrogated post-ischemic organ failure. The improvement of renal function was independent of the presence of neutrophils since neutrophil depletion (with the monoclonal antibody NIMP-R14) did not affect the protective effect of C5aRA treatment. Furthermore, blocking of the C5a receptor pathway had no influence on renal apoptosis. These data provide evidence that C5a is crucially involved in the pathogenesis of renal I/R injury by modulation of PMN dependent as well as PMN independent pathways, which include the regulation of C-X-C chemokines but not TNF-α or apoptotic pathways.

Thus, the complement-system is activated in the course of renal I/R injury. Post-ischemic activation of the complement-system is, at least partially, mediated by the MBL-pathway. The complement-system is crucially involved in ischemia-induced cell-death, inflammation and organ failure, in which MAC and C5a play different but significant roles.

In *Chapter 9* the protective effects of the acute phase protein α-1-acid glycoprotein (AGP) against experimental I/R injury were studied. AGP has been described to regulate apoptosis, complement-activation, neutrophil-influx and neutrophil-activation, all processes crucially involved in renal I/R injury. Therefore the effects of exogenous as well as endogenous AGP were studied in our mouse model for renal I/R injury. Mice were subjected to renal I/R and treated with human AGP, fucose-depleted human AGP (since fucose-groups expressed on the AGP protein potentially mediate the effects of AGP), or control-treated. Also transgenic mice overexpressing rat-AGP or wild type controls were subjected to renal I/R. Treatment with AGP as well as fucose-depleted AGP protected mice against I/R-induced acute renal failure. Surprisingly, AGP-overexpressing mice were not protected against I/R injury. Both natural and fucose-depleted AGP inhibited activation of the complement-system and influx of neutrophils. Tubular epithelial cell-structure (actin-cytoskeleton) and cell-cell interaction (tight-junction architecture) were completely preserved in AGP-treated mice. Epithelial caspase-activation and apoptotic DNA-cleavage were prevented by AGP treatment. Thus, both natural and fucose-depleted AGP protect against renal I/R injury by preservation of tubular epithelial structure, inhibition of apoptosis and subsequent inflammation. Therefore AGP can be regarded as a potential new therapeutic intervention in the treatment of acute renal failure, as seen after transplantation of ischemically injured kidneys.

Finally, in *Chapter 10*, the possible clinical application of the experimental studies described in the present thesis was discussed. These and other experimental studies will hopefully result in new therapeutic interventions in the treatment of patients suffering acute renal failure.

SAMENVATTING

In *Hoofdstuk 1* werd de relevantie van ischemie-reperfusie (I/R) schade met betrekking tot niertransplantaties besproken. Met name in het kader van Non-Heart-Beating (NHB) orgaandonatie speelt I/R schade een belangrijke rol omdat I/R vaak resulteert in orgaanfalen na transplantatie. I/R schade limiteert op deze manier de algemene acceptatie en brede implementatie van NHB orgaandonoren als een bron van organen voor transplantatie.
Het is van groot belang inzicht te verkrijgen in de vroege processen die leiden tot het ontstaan van I/R schade en orgaanfalen na transplantatie. Daarom waren de twee belangrijkste onderzoeksdoelen voor het voorliggende proefschrift :

* De ontwikkeling van diagnostische middelen die de mate van ischemische schade voor transplantatie kunnen vaststellen en op die manier het orgaan-functioneren na transplantatie kunnen voorspellen
* De ontwikkeling van effectieve therapeutische middelen om I/R schade te voorkomen of te reduceren om daarmee het functioneren van een getransplanteerd orgaan te verbeteren

In het tweede deel van *Hoofdstuk 1* werden de algemene pathofysiologische principes van I/R schade kort toegelicht. Initiële ischemie-geïnduceerde celschade resulteert in celdood, necrotisch danwel apoptotisch. Celdood leidt vervolgens tot een ontstekingsreactie die als essentieel beschouwd wordt in het ontstaan van I/R schade en orgaanfalen.

In het derde deel van de introductie werden de basale aspecten van apoptotische celdood in relatie met I/R schade besproken. Vervolgens werd de rol van ontsteking in het ontstaan van I/R schade verder toegelicht. Met name de rol van het complement-systeem, als onderdeel van de ontstekingsreactie, werd besproken. Het complement-systeem kan worden geactiveerd via één van de volgende drie routes: de klassieke route (geactiveerd door antigeen-antilichaam interactie), de lectin route (geactiveerd door mannose dat herkend wordt door 'mannose binding lectin' (MBL)) en de alternatieve route (geactiveerd door microbiële producten). Alle drie de routes leiden tot activatie van complement factor C5, resulterend in de vorming van C5a en C5b, waarbij C5b de eerste stap vormt in de vorming van het 'membrane attack complex' (MAC). Het MAC alsook C5a spelen mogelijk een belangrijke rol in de pathofysiologie van I/R schade.

In *Hoofdstuk 2* werd de inductie van apoptotische celdood ten gevolge van warme ischemie bestudeerd. Humane nieren, verwijderd vanwege een niercelcarcinoom, werden ex vivo bij 37°C bewaard en in de tijd werden biopten genomen om apoptotische processen te analyseren. Gedurende warme ischemie nam de hoeveelheid van het pro-apoptotische eiwit Bax in de nier sterk toe. Daarentegen nam de hoeveelheid van de anti-apoptotische eiwitten

Bcl-2 en cFLIP af gedurende ischemie. Warme ischemie leidde tot de activatie van caspase-9, terwijl caspase-8 en caspase-3 niet werden geactiveerd. Deze data laten zien dat warme ischemie in de humane nier leidt tot de activatie van apoptotische processen. Bovendien correleert de duur van de ischemie met de mate van activatie van deze apoptotische processen. Het bepalen van vroege apoptotische veranderingen kan potentieel gebruikt worden om vóór transplantatie ischemische schade vast te stellen en op die manier orgaan-functioneren na transplantatie te voorspellen. Bovendien, bieden de verworven inzichten de mogelijkheid om middels farmacologische interventies in te grijpen in deze apoptotische processen om daarmee het optreden van I/R schade te verminderen.

Aangezien redox-actief ijzer een rol speelt bij de inductie van apoptose en ontsteking werd in *Hoofdstuk 3* de rol van circulerend redox-actief ijzer bij het ontstaan van renale I/R schade onderzocht. Muizen werden blootgesteld aan 45 minuten ischemie van de linker nier, gevolgd door het verwijderen van de rechter nier en reperfusie. De rol van redox-actief ijzer werd onderzocht door muizen te behandelen met apotransferrine, een endogeen ijzer-bindend eiwit, of met ijzer verzadigd transferrine (holotransferrine) als controle-behandeling. Renale ischemie leidde ten tijde van reperfusie tot het vrijkomen van grote hoeveelheden redox-actief ijzer in de bloedsomloop. Dit wijst erop dat de endogene capaciteit om ijzer te binden ten tijde van renale I/R tekort schiet. Exogeen apotransferrine, in tegenstelling tot holotransferrine, bleek in staat de hoeveelheid vrij circulerend redox-actief ijzer na I/R sterk te verminderen. Behandeling met apotransferrine verminderde het optreden van oxidatieve schade, maar had geen effect op het optreden van apoptotische celdood. Apotransferrine reduceerde de infiltratie van neutrofiele ontstekingscellen en het optreden van complement-deposities in de post-ischemische nier. Bovenal beschermde apotransferrine, door het remmen oxidatieve schade en inflammatoire processen, tegen het optreden van post-ischemisch orgaanfalen. Apotransferrine biedt daarom nieuwe mogelijkheden om acuut renaal falen na transplantatie van ischemisch beschadigde organen te behandelen.

Naar aanleiding van de experimentele data beschreven in *Hoofdstuk 3*, hebben we in *Hoofdstuk 4* de betrokkenheid van redox-actief ijzer bij klinische transplantaties bestudeerd. Daartoe werd redox-actief ijzer gemeten in preservatie-vloeistof afgenomen gedurende machine-preservatie van 218 NHB nieren die in het Academisch Ziekenhuis Maastricht tussen juli 1998 en januari 2003 op de machine gepreserveerd werden en getransplanteerd werden binnen de Eurotransplant regio. Gedurende machine-preservatie van NHB donornieren werden, in vergelijking met heart-beating donornieren, hoge concentraties redox-actief ijzer in de preservatie-vloeistof gemeten. De concentraties redox-actief ijzer in de preservatie-vloeistof correleerden

uitstekend met donor karakteristieken, waaronder warme ischemie. Bovenal had de concentratie redox-actief ijzer gedurende machine-preservatie een goede voorspellende waarde voor het optreden van orgaanfalen na transplantatie van NHB categorie 2 donornieren; nieren die het meest uitgesproken worden blootgesteld aan warme ischemie. Deze gegevens, in combinatie met de gegevens in *Hoofdstuk 3*, suggereren dat redox-actief ijzer een rol speelt bij het optreden van orgaanschade na transplantatie van ischemisch beschadigde organen. Aangezien redox-actief ijzer concentraties goed correleren met orgaan-functie na transplantatie, kan het vóór transplantatie bepalen van redox-actief ijzer potentieel worden gebruikt als viability-test voor ischemisch beschadigde organen. Bovendien kan het toevoegen van ijzer-bindende stoffen aan preservatie-vloeistof mogelijk het orgaan-functioneren van machine-gepreserveerde, ischemisch beschadigde nieren na transplantatie verbeteren.

In *Hoofdstuk 5* werd het beschermende effect van de endogene groei-factor lysophosphatidic acid (LPA) tegen het optreden van experimentele renale I/R schade onderzocht. LPA is een endogene fosfolipide groei-factor met anti-apoptotische eigenschappen. Omdat inhibitie van apoptotische celdood beschermt tegen renale I/R schade, bestudeerden we de effecten van exogeen LPA in een muizen-model voor renale I/R schade. LPA, toegediend ten tijde van reperfusie voorkwam dosis-afhankelijk renale apoptose. I/R-geïnduceerde renale apoptose was aanwezig in tubulaire epitheelcellen met evidente beschadiging van de brush-border. Behandeling met LPA inhibeerde apoptose van tubulaire epitheelcellen en het I/R-geïnduceerde verlies van brush-border integriteit. Naast anti-apoptotische werking bleek LPA sterke anti-inflammatoire effecten te hebben; het inhibeerde de renale expressie van TNF-α en de infiltratie van neutrophiele ontstekingscellen. Bovendien remde LPA dosis-afhankelijk ischemie-geïnduceerde activatie van het complement-systeem. Tot slot voorkwam behandeling met LPA bijna volledig het optreden van nierfunctie-verlies ten gevolge van I/R. Dit illustreert dat met behulp van endogene anti-apoptotische middelen het optreden van ischemie-geïnduceerde apoptose, inflammatie en orgaanfalen kan worden voorkomen en voorziet daarmee in nieuwe middelen om klinische ischemie-gemedieerde aandoeningen in de nier, maar mogelijk ook in andere organen, te behandelen.

Naar aanleiding van de bevinding in *Hoofdstuk 5* dat experimentele renale I/R leidt tot activatie van het complement-systeem, werd in *Hoofdstuk 6, 7 en 8* de rol van het complement-systeem bij het ontstaan van experimenteel alsook van klinisch acuut nierfalen bestudeerd.

Allereerst toonden we in *Hoofdstuk 6* aan dat de 'mannose-binding lectin' (MBL) route betrokken is bij complement activatie ten gevolge van renale I/R schade. Gedurende experimentele renale I/R en klinisch orgaanfalen na trans-

plantatie werd de activatie en regulatie van de MBL-route van het complement-systeem bestudeerd. Muizen die blootgesteld werden aan I/R van de nier lieten kort na reperfusie uitgebreide renale MBL-deposities zien. In de latere reperfusiefase werd ook renale depositie van de complement-factoren C3, C6 en C9 waargenomen. De lokalisatie van MBL-A en -C bleek volledig overeen te komen met de plaats waar depositie van complement-factor C6 werd waargenomen. Dit impliceert dat MBL betrokken is bij complement-activatie na renale I/R. De MBL-A concentraties in het serum van aan I/R blootgestelde muizen stegen sterk in tegenstelling tot de MBL-C concentraties die sterk daalden. In humane nierbiopten, genomen na transplantatie, werden al vroeg MBL deposities gedetecteerd, terwijl in biopten genomen vóór transplantatie geen MBL deposities werden waargenomen. Met name in biopten van NHB nieren met orgaanfalen na transplantatie werden uitgebreide MBL deposities waargenomen in peritubulaire capillairen en tubulaire epitheelcellen. Deze studie toont aan dat gedurende experimentele renale I/R alsook klinisch nierfalen na transplantatie de MBL-route wordt geactiveerd, gevolgd door activatie van het complement systeem. Deze gegevens laten zien dat de MBL-route betrokken is bij I/R-geïnduceerde complement-activatie.

Vervolgens werd in *Hoofstuk 7* de pathofysiologische rol van complement-activatie bij het ontstaan van renale I/R schade geanalyseerd. Om de oorzakelijke rol van het complement-systeem te bestuderen werd het effect van complement-inhibitie op post-ischemisch orgaanfalen onderzocht. Daartoe werden muizen blootgesteld aan 45 minuten unilaterale nierischemie gevolgd door contralaterale nefrectomie en reperfusie gedurende 2, 12 danwel 24 uur. De muizen werden controle-behandeld of behandeld met BB5.1, een monoclonaal antilichaam dat de activatie van complement-factor C5 inhibeert, en daarmee de vorming van C5a en het membrane attack complex (MAC) voorkomt. Renale I/R leidde snel na reperfusie tot uitgebreide renale depositie van complement factor C3, terwijl C6 en C9-deposities (MAC-vorming) relatief laat optraden. I/R-geïnduceerde complement-deposities werden met name waargenomen op tubulaire epitheel-cellen. Behandeling met BB5.1 voorkwam MAC-vorming volledig. Inhibitie van C5 inhibeerde het optreden van een ontstekingsreactie, gemeten middels neutrofiel-influx en inductie van CXC-chemokines (MIP-2, KC en LIX). Daarnaast voorkwam behandeling met BB5.1 late I/R-geïnduceerde apoptose, dit in tegenstelling tot vroege apoptose die niet werd beïnvloed. Tot slot beschermde behandeling met BB5.1 tegen het optreden van ischemie geïnduceerd orgaanfalen. Deze studie toont aan dat complement-activatie in belangrijke mate betrokken is bij het optreden van apoptose en inflammatie ten gevolge van renale I/R. Bovendien werkt inhibitie van het complement systeem beschermend tegen het optreden van post-ischemisch nierfalen.

In *Hoofdstuk 8* werd de rol van complement-factor C5a en zijn interactie met de C5a-receptor (C5aR) bij het ontstaan van renale I/R schade onderzocht. De C5aR kwam in nieren van gezonde muizen tot expressie op mesangiale cellen en op tubulaire epitheelcellen. Renale I/R verhoogde de C5aR expressie in tubulaire epitheelcellen sterk. Daarnaast leidde I/R tot een sterke toename van renale mRNA levels voor C-X-C chemokines en TNF-α alsook een massale infiltratie van neutrofiele ontstekingscellen. Het blokkeren van C5a-C5aR interactie met behulp van een specifieke C5a receptor antagonist (C5aRA) voorkwam de verhoogde expressie van C-X-C chemokines, maar niet van TNF-α. C5a-C5aR blokkade leidde tot een significante daling van het aantal geïnfiltreerde neutrofielen. Bovenal beschermde de behandeling met C5aRA tegen het optreden van ischemie-geïnduceerd nierfunctie-verlies. De verbetering van nierfunctie bleek onafhankelijk te zijn van de influx van neutrofielen aangezien neutrofiel-depletie (middels het monoclonale antilichaam NIMP-R14) geen effect had op het beschermende effect van C5aRA behandeling. Tot slot bleek het blokkeren van de C5aR geen invloed te hebben op het optreden van apoptotische celdood. Deze studie toont aan dat C5a in belangrijke mate betrokken is bij het ontstaan van renale I/R schade. Hierbij spelen zowel neutrofiel-afhankelijke alsook neutrofiel-onafhankelijke mechanismen een rol waaronder de regulatie van C-X-C chemokines.

Het complement-systeem wordt geactiveerd ten gevolge van renale I/R. Deze ischemie-geïnduceerde activatie van het complement-systeem wordt ondermeer gemedieerd door de MBL-route. Complement-activatie is essentieel betrokken bij het ontstaan van ischemie-geïnduceerde celdood, ontsteking en orgaanfalen, waarbij zowel MAC als C5a een belangrijke rol spelen.

In *Hoofdstuk 9* werden de beschermende effecten van het acute fase eiwit α-1-acid glycoprotein (AGP) tegen het optreden van experimentele renale I/R schade bestudeerd. AGP wordt beschreven als remmer van apoptotische celdood, complement-activatie, neutrofiel-influx en neutrofiel-activatie; processen die betrokken zijn bij het ontstaan van renale I/R schade. Daarom hebben we in een muizenmodel voor renale I/R schade de effecten van exogeen alsook endogeen AGP bestudeerd. Muizen werden blootgesteld aan renale I/R en behandeld met humaan AGP, fucose-gedepleteerd humaan AGP (aangezien fucose-groepen op het AGP eiwit mogelijk een rol spelen bij de werking van AGP), ofwel controle-behandeld. Ook transgene muizen die in verhoogde mate rat-AGP produceren en wild type controles werden blootgesteld aan renale I/R. Behandeling met AGP alsook fucose-gedepleteerd AGP bood bescherming tegen I/R-geïnduceerd nierfalen. Transgene muizen met een verhoogde rat-AGP productie waren niet beschermd tegen I/R schade. Zowel natuurlijk als fucose-gedepleteerd AGP inhibeerden de activatie van het complement-systeem en de influx van neutrofiele ontstekingscellen. In tegenstelling tot muizen in de controle-groep waren er nauwelijks ischemische ver-

anderingen van de tubulaire epitheliale cel-structuur (actine-cytoskelet) en de cel-cel interactie (tight-junctions) in AGP-behandelde muizen. Epitheliale caspase-activatie en apoptotische DNA-laddering werden eveneens geremd door AGP behandeling.

Zowel natuurlijk als fucose-gedepleteerd AGP beschermen tegen renale I/R schade middels behoud van tubulaire epitheliale structuur, inhibitie van apoptotische celdood en de daarop volgende onstekingsreactie. AGP kan worden beschouwd als een nieuwe therapeutische interventie bij de behandeling van nierfalen na transplantatie van ischemisch beschadigde nieren.

Tot slot werden in *Hoofdstuk 10* de mogelijkheden voor klinische toepassing van de in dit proefschrift beschreven experimentele studies bediscussieerd. Deze en andere experimentele studies zullen hopelijk op korte termijn leiden tot nieuwe therapeutische interventies in de behandeling van patiënten met acuut nierfalen.