

Interview met Ünsal Yapici

Interview met Ünsal Yapici naar aanleiding van zijn publicatie in *Transplant International Interleukin-17 positive cells accumulate in renal allografts during acute rejection and are independent predictors of worse graft outcome*. Yapici Ü, Kers J, Bemelman FJ, Roelofs JJ, Groothoff JW, van der Loos CM, van Donselaar-van der Pant KA, Idu MM, Claessen N, Ten Berge IJ, Florquin S. 2011 Oct;24(10):1008-17.

Introductie

Ünsal Yapici is 32 jaar en heeft in de periode 1997-2004 Geneeskunde gestudeerd aan de Vrije Universiteit, te Amsterdam. Na zijn opleiding is hij eerst voor een periode van twee jaar werkzaam geweest als AGNIO Thoraxchirurgie in het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, te Amsterdam, waarna hij aan de opleiding Pathologie van het AMC begon. Hij koos voor dit specialisme wegens zijn interesse in basale wetenschap en de verschillende mogelijkheden, die door dit specialisme worden aangeboden. Tijdens de opleiding Pathologie ontwikkelde Ünsal een buitengewone interesse in de pathologie van nierziekten, in het bijzonder in de immunologische aspecten van niertransplantatie. Al tijdens de opleiding heeft Ünsal zijn klinische taken gecombineerd met onderzoek en heeft onderzoek verricht naar de rol van FOXP3 (marker voor regulatoire T-lymfocyten) en Interleukine-17 (cytokine dat voornamelijk wordt uitgescheiden door T-helper 17 cellen) tijdens acute afstoting van de nier. Tevens heeft hij de bruikbaarheid van FOXP3 en IL-17 als biomarker voor graft survival onderzocht. Dit heeft geleid tot twee publicaties in respectievelijk *Transplantation* en *Transplant International*. Sinds januari 2011 is Ünsal begonnen met full-time onderzoek voor een periode van twee jaar om zijn promotietraject te kunnen voltooien. Dit onderzoek is een door de Nierstichting gefinancierd multicenter project (Allovir), waarin het samenspel tussen virale infecties en de alloïmmuunrespons bij niertransplantatie wordt onderzocht. Na afloop van deze onderzoeksperiode zal hij het laatste jaar van zijn opleiding Pathologie voltooien en hoopt zich te specialiseren in de pathologie van nierziekten.

Kunt u het doel van uw studie kort beschrijven?

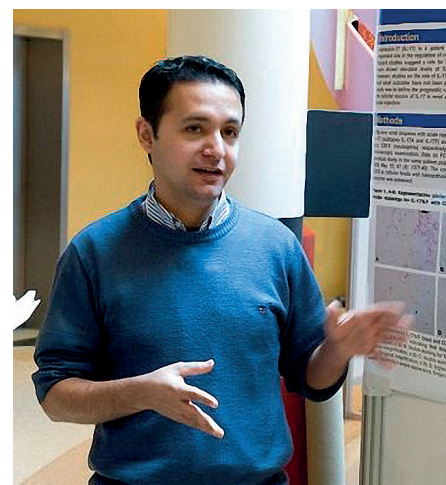
Door de opkomst van meer potente immunosuppressiva is er een aanzienlijke verbetering opgetreden in de korte termijn overleving van een niertransplantaat. Helaas wordt ditzelfde effect niet gezien voor de lange termijn overleving. Een van de belangrijke factoren hierbij is het optreden van acute resectie van het orgaan. De mechanis-

men, die ten grondslag liggen aan dit proces zijn complex en nog niet volledig bekend. Daarom is het van belang om dit proces beter in kaart te brengen en op zoek te gaan naar markers, die van voorspellende waarde kunnen zijn voor de lange termijn uitkomst na een niertransplantatie. Acute resectie werd initieel gezien als een consequentie van een Th1 respons. Na de ontdekking van andere typen T-helper lymfocyten, waaronder de Th17-lymfocyt, is er echter een explosieve toename ontstaan in onderzoeken naar de rol van deze celtypen in het proces van acute resectie. In onze studie hebben we met immunohistochemische kleuringen infiltraten in nierbiopten van patiënten met een acute resectie getypeerd voor interleukine-17 en onderzocht wat de rol van dit cytokine is als biomarker voor overleving van de getransplanteerde nier.

Kunt u de studieopzet van het artikel kort samenvatten?

Het doel van deze studie was om op eiwitniveau de expressie van IL-17 in acute resectie te onderzoeken en deze te vergelijken met de Banff criteria. De Banff classificatie, is een schema, waarin de criteria voor acute resectie en chronische allograft nefropathie zijn gedefinieerd en waarin een gradering is opgenomen van de histologische veranderingen. Tevens wilden we onderzoeken welke cellen IL-17 kunnen produceren en wat het lange termijn effect is van IL-17 op de overleving van de getransplan-

Ünsal Yapici



teerde nier. Daarom hebben wij immunohistochemische dubbelkleuringen verricht op twee afzonderlijke cohorten met circa 50 biopten met acute resectie en een controle cohort met normale biopten. Deze dubbelkleuringen waren CD3/IL-17 (IL-17 producerende T-lymfocyten), tryptase/IL-17 (IL-17 producerende mestcellen) en CD15/IL-17 (IL-17 producerende granulocyten). Het aantal IL-17⁺ cellen per High Power Field werd gecorreleerd aan de Banff criteria en aan de estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) ten tijde van de laatste follow-up.

Kunt u de resultaten in het artikel kort samenvatten?

Wij vonden dat IL-17 is gecorreleerd aan de Banff "i" score (interstitieel infiltraat) en "ti" score (totaal infiltraat). Correlatiewaarden hier waren respectievelijk 0,48 ($P < 0,001$) en 0,54 ($P < 0,001$). Een verrassende uitkomst van onze studie was dat de meeste IL-17⁺ cellen granulocyten (68%) of mestcellen (25%) bleken te zijn en dat IL-17⁺ T-lymfocyten nauwelijks aanwezig waren. In het univariate Cox model waren de volgende factoren geassocieerd met graft dysfunctie op de lange termijn: tijd tussen transplantatie en biopt, aantal IL-17⁺ cellen en C4D-positiviteit (marker voor antilichaam-gemedieerde resectie). Na inclusie van alle significante parameters in het multivariate Cox model, bleek alleen het aantal IL-17⁺ cellen onafhankelijk van andere factoren geassocieerd te zijn met graft dysfunctie op de lange termijn (HR: 1,72, $P = 0,0007$). Deze gegevens werden gevalideerd in een onafhankelijk cohort. In figuur 1 wordt de predictieve waarde van IL-17 voor graft dysfunctie op de lange termijn weergegeven met behulp van survival curves. De getrokken lijn weerspiegelt de groep met hoge IL-17 expressie en de gestippelde lijn de groep met lage IL-17 expressie. Uit de figuur is op te maken dat de groep met hoge IL-17 expressie een voorspellende waarde heeft voor zowel het bereiken van een eGFR < 30 mL/min/1,73 m², als het bereiken van eind stadium nierfalen, waarvoor dialyse noodzakelijk is. Samenvattend kunnen wij zeggen dat IL17 op zichzelf een voorspellende waarde is echter de meerwaarde van een dubbelkleuring van IL17 en mestcellen of granulocyten ten opzichte van een mestcel of granulocyte kleuring is niet onderzocht.

Hoe is deze studie tot stand gekomen?

Onze onderzoeksgroep op de afdeling Pathologie van het AMC wordt geleid door Prof. Dr. S. Florquin en doet op het gebied van de niertransplantatie onderzoek naar de karakterisering van ontstekingsinfiltraten in nierbiopten met als doel biomarkers te vinden, die de progressie naar 'chronische allograft nefropathie' kunnen voorspellen. Dit onder-

zoek is een vervolg op eerdere onderzoeken, waarbij de rol van B-lymfocyten en regulatoire T-lymfocyten in acute resectie van de nier zijn onderzocht. Na de ontdekking van de Th17-lymfocyten, werd beschreven dat het cytokine, dat door dit type T-lymfocyt wordt geproduceerd (IL-17) verhoogd tot expressie kwam tijdens acute resectie. Er waren echter geen duidelijke inzichten over de gevolgen van deze verhoogde expressie op de lange termijn. Daarom wilden we onderzoeken of er inderdaad een verhoogde expressie van IL-17 kon worden aangetoond in biopten tijdens acute resectie en aantonen wat de bron van dit cytokine was. Tevens wilden we uitvinden of IL-17 geassocieerd was met de verschillende Banff criteria en wat de gevolgen van een verhoogde IL-17-expressie waren voor de lange termijn overleving van de getransplanteerde nier.

De hoeveelste versie van het artikel is het gepubliceerde artikel?

De vierde of vijfde versie.

Waarom heeft u 'Transplant International' gekozen om in te publiceren?

Transplant International is het blad van de Europese Vereniging voor de Orgaantransplantatie en is een blad in opkomst. Het heeft een impactfactor die ongeveer gelijkwaardig is aan Transplantation. Dit artikel past goed bij de speerpunten van dit tijdschrift.

Wat zou u anders gedaan, of toegevoegd, hebben om het artikel nog sterker te maken?

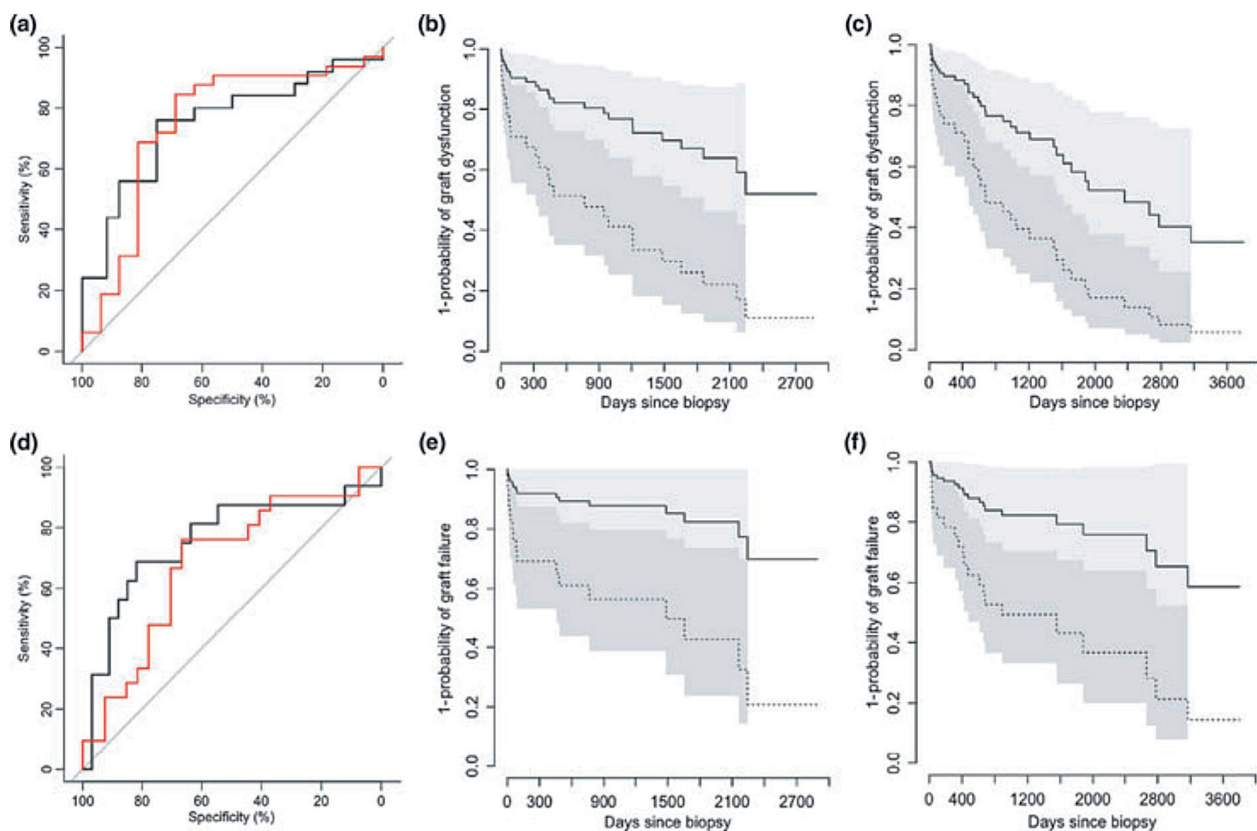
Het onderzoek is uitgevoerd op eiwitniveau (immunohistochemie). Aanvankelijk was het de bedoeling om ook met RT-PCR de IL-17-expressie op mRNA niveau te meten. Het bleek echter zeer lastig om significante IL-17 mRNA waarden te detecteren in onze cohorten. Als beide detectiemethoden gebruikt hadden kunnen worden, zou het stuk vermoedelijk een sterkere impact hebben.

Hoelang bent u in totaal bezig geweest met dit artikel (van het onderzoek tot en met het schrijven)?

Al met al heeft deze studie ongeveer een jaar geduurd.

Wat was uw grootste prestatie tijdens dit onderzoek?

Aangezien mijn gegevens deels in strijd waren met de huidige inzichten, heb ik ook veel literatuur onderzoek moeten doen en verschillende experimenten om mijn data te ondersteunen. Vooral de observatie, dat IL-17 voornamelijk door granulocyten en mestcellen wordt geproduceerd en in slechts minimale hoeveelheden door



Figuur 1. Analyse voor de voorspellende waarde van IL-17 immunohistochemie voor transplantaat dysfunctie

- A) Voorspellende waarde met behulp van ROC curve van totaal IL17⁺ cell infiltraat per HPF voor een eGFR < 30 mL/min/1,73m². De zwarte lijn is het test cohort, de rode lijn het validatie cohort.
- B) Kaplan-Meier curve voor een eGFR < 30 mL/min/1,73m² tijdens de laatste follow-up in het test cohort waarbij donor organen met IL17hoog (gestreepte lijn) met IL17laag (doorgetrokken lijn) worden vergeleken. Een cut-off van 4 cells/HPF wordt gehanteerd. Het grijze gebied vertegenwoordigt het 95% confidence interval van de Kaplan-Meier schattingen.
- C) Kaplan-Meier curve voor een eGFR < 30 mL/min/1,73m² tijdens de laatste follow-up in het validatie cohort waarbij donor organen met IL17hoog (gestreepte lijn) met IL17laag (doorgetrokken lijn) worden vergeleken. Een cut-off van 4 cells/HPF wordt gehanteerd. Het grijze gebied vertegenwoordigt het 95% confidence interval van de Kaplan-Meier schattingen.
- D) Voorspellende waarde met behulp van ROC curve van totaal IL17⁺ cell infiltraat per HPF voor terugkeer naar dialyse. De zwarte lijn is het test cohort, de rode lijn het validatie cohort

- E) Kaplan-Meier curve voor terugkeer naar dialyse in het test cohort waarbij IL17 hoog (gestreepte lijn) met IL17 laag (doorgetrokken lijn) donor organen worden vergeleken met een cut-off van 4 cellen/HPF. Het grijze gebied vertegenwoordigt het 95% confidence interval van de Kaplan-Meier schattingen.
- F) Kaplan-Meier curve voor terugkeer naar dialyse in het validatie cohort waarbij IL17 hoog (gestreepte lijn) met IL17 laag (doorgetrokken lijn) donor organen worden vergeleken met een cut-off van 4 cellen/HPF. Het grijze gebied vertegenwoordigt het 95% confidence interval van de Kaplan-Meier schattingen.

Th17-lymfocyten, heeft ertoe geleid dat ik onder andere gebruikte IL-17-antistoffen uit andere publicaties heb moeten testen. De resultaten hiervan heb ik besproken in een critical appraisal, die geaccepteerd is voor publicatie in the American Journal of Transplantation.

Wat was uw grootste obstakel tijdens dit onderzoek?

Mijn grootste obstakel was de beschikbaarheid van het biopsiemateriaal. Het betreft namelijk kleine naaldbiopsies, waarmee uiterst voorzichtig omgegaan moet worden. Er kunnen uiteindelijk een beperkt aantal paraffine coupes van worden gesneden, die gebruikt kunnen worden voor de immunohistochemische kleuringen.

Voordat u met uw promotietraject begon heeft u vast een idee gehad over hoe deze zal verlopen? Welke verwachtingen kloppen en welke absoluut niet?

Voordat ik aan mijn promotietraject begon, had ik een opzet gemaakt van alle experimenten, die ik zou willen verrichten en aangegeven op welk termijn dit zou moeten plaatsvinden. In de praktijk bleek echter dat dit niet haalbaar was en dat ik keuzes moest maken tussen experimenten. In het begin waren er opstartproblemen en bleken sommige experimenten niet te werken. Hierdoor heb ik mijn planning moeten aanpassen. Mijn verwachting dat ik meer expertise in de verschillende experimentele technieken zou krijgen, is gelukkig wel uitgekomen.