

신장이식에서 대사체 연구

경희대학교 의과대학 신장내과학교실¹, 강동경희대병원 신장내과²이유호¹ · 이상호²

Metabolomics Research in Kidney Transplantation

Yu Ho Lee, M.D.¹ and Sang Ho Lee, M.D.²Department of Nephrology, Kyung Hee University College of Medicine¹,
Department of Nephrology, Kyung Hee University Hospital at Gangdong², Seoul, Korea

Acute and chronic immune injury, drug toxicity, and cardiovascular complications remain a critical challenge following kidney transplantation. Success from these hurdles is closely associated with the ability to monitor patients and responsively adjust their medication. Metabolic and biochemical profiling (metabolomics) may enable detection of early changes in cell signal transduction regulation and biochemistry with high sensitivity and specificity. However, metabolomics have not been studied extensively in the field of kidney transplantation. This review describes the basic principles of metabolomics, summarizes recent studies, and suggests future perspectives.

Key Words: Kidney transplantation, Metabolomics, Biological markers

중심 단어: 신장이식, 대사체학, 생체표지자

서 론

대사체학(metabolomics)은 세포 과정(Cellular process) 중 발생하는 소분자 대사산물 전체(대사체; Metabolome)에 대하여 종합적인 연구를 하는 학문으로 정의한다. mRNA 발현을 연구하는 전사체학(transcriptomics), 단백질의 변화와 기능을 연구하는 단백질체학(proteomics)과 함께 생명체내 변화를 총체적으로 이해할 수 있는 학문으로 특히 전사체 또는 단백질이 제공하지 못하는 어떠한 특정 순간에 세포 내에서 일어나는 생리학적, 대사적, 화학적

현상에 대한 정보를 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다 (1). 인체의 세포, 조직, 체액에 존재하는 저분자 화합물 (분자량 100~1,000)들을 전체적으로 분석하기 위해서는 이들을 적절히 분리하고 탐지할 수 있는 분석기술과 다양한 통계적 방법을 사용하여 대사체를 확인하고 분석하는 생명정보학 기술이 요구된다. 현재 40,000종이 넘는 인간 대사체 정보 및 이중질량분석(Tandem mass) 스펙트럼 데이터가 축적되어 있으며 인체 검체를 활용한 연구 경험이 축적되면서 의약품의 독성연구, 질병진단을 위한 바이오마커 연구로 대사체학 연구가 다양하게 접목되고 있다.

바이오마커 개발 연구는 정상 상태 및 질병 상태의 대사체 양상(profile)을 비교해서 질병상태에서 변화되는 주요 대사체들을 검출 및 규명함으로써 질병의 조기진단 및 새로운 병태생리 및 치료 표적을 규명하고자 함이 주요 목적이며 현재 다양한 질병 모델과 인체 유래물 검체에 대사체학의 활용이 증가하고 있다. 이식분야에서 대사체 연구는 아직 초기 단계로 면역억제제 대사 이상 또는 급성 거부반

Received June 4, 2015

Revised June 8, 2015

Accepted June 8, 2015

Corresponding author: Sang Ho Lee

Department of Nephrology, Kyung Hee University Hospital at Gangdong, 892 Dongnam-ro, Gangdong-gu, Seoul 134-727, Korea
Tel: 82-2-440-6121, Fax: 82-2-440-6121
E-mail: lshkidney@khu.ac.kr

응의 진단분야에서 활용 가능성이 최근 제시되고 있다. 본 논문에서는 대사체학 연구의 기본 개념을 소개하고 신장 이식 분야에서의 연구 현황과 향후 활용방안 등을 소개하고자 한다.

대사체 분석 방법과 데이터 처리

1. 임상 검체에서 대사체 추출

인체 검체를 대상으로 대사체학 분석을 위해서는 우선 검체에 포함되어 있는 광범위한 특성의 대사체들을 효율적으로 추출해야 하며 이를 위해서는 추출방법의 최적화가 중요하다. 이 같은 추출 방법의 최적화는 시료의 종류와 분석 방법에 따라 차이를 보이게 된다. 이식분야에서 대사체 연구의 검체 시료는 혈액과 소변이 이용되고 있으며 신장이식의 경우에는 그 특성상 소변 대사체 분석에 대한 연구가 비교적 활발히 진행되었다. 하지만 소변의 경우 시간과 농축 정도에 따른 변화가 심하여 normalization 즉 정량화가 어렵고 다양한 인체 대사 물질들이 다량 배설되기 때문에 소량 존재하는 바이오마커 대사체 검출이 용이치 않으며 특히 여러 극성 대사체의 검출 한계 등으로 실제 분석과 해석이 용이치 않다. 최근 Bouatra 등은 다양한 검출기기를 통합 분석을 통해 새로운 소변 대사체 동정과 정량화를 시도하여 소변 대사체 지도를 작성하였다(2). 이 같은 노력과 정보의 공유(Human Urine Metabolome Database, www.urinemetabolome.ca)는 질병 진단을 위한 임상 검체의 처리 및 대사체 추출 방법의 개선에 향후 크게 기여할 것이다.

2. 대사체 분석 방법

대사체 분석기기의 선택과 분석 방법은 각 실험 대상과 특성에 맞도록 선택되어야 한다. 아미노산 계열, 지질체 등 특정 대사체 군의 변화만을 분석할 수도 있으나 바이오마커 발굴에는 특정 표적을 정하지 않는 전체 대사체 양상의 변화, 즉 비표적 분석을 주로 수행한다. 대사체 분석 방법은 개발 연구(discovery set)와 검증 연구(validation set)에 이용되는 시료와 질병 특성, 그리고 후보 대사체의 특성 등을 고려하여 결정하게 된다. 대사체 분석에서 한 종류의 분석 방법으로 전체 대사체를 모두 포함하는 것은 어려우므로 통상 전체적인 대사체 분석을 위해서는 2가지 이상의 분석기기를 이용하여 분석 결과를 통합하는 것이 이상적이다. 이는 질량분석기(mass spectrometry)와 핵자기 공명장치(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)의 개발에 힘입어 크게 발전하였고 대사체 분석을 위해서는

NMR (nuclear magnetic resonance spectrometry), GS-MS (gas chromatography-mass spectrometry), LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry), FT-ICR MS (fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry) 등이 사용된다.

질량분석법은 대사물질들을 탐지하고 정량할 수 있을 뿐만 아니라 분자구조까지 파악할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 질량분석법(chromatography) 과정에 많은 노력이 들어간다는 단점이 있음에도 NMR과 비교할 때 높은 민감도를 가지므로 대사체 분석에서 주로 활용되고 있다. 이는 대사체 분리를 위한 혼합물 분리 방식에 따라 기체크로마토그래피(GS-MS)와 액체크로마토그래피(LC-MS) 방식으로 나뉘며 GS-MS는 감도, 재현성, 경제성에서 우수하나 비휘발성 물질에 대해서 유도체화(derivatization)를 시켜야하는 과정이 필요하는 등 전반적으로 번거로운 처리 과정을 포함하고 있다. LC-MS는 이러한 과정이 필요하지 않고 여러 다른 컬럼 선택, 가능한 장점을 가지고 있으나 상대적으로 고가이며 낮은 재현성, 무엇보다 분석하고자 하는 대사체들 이온 형태 단점을 가지고 있다. 핵자기공명장치, 즉 NMR은 기본적으로 샘플준비 과정에 분리나 이온화 등이 필요하지 않아 수시간 이내에 검사결과를 얻을 수 있는 큰 장점을 가지고 있어 임상에 유용하다. 하지만 질량분석법에 비하여 감도가 낮고 분석할 수 있는 대사체의 수가 제한이 있다는 단점이 있다. 대사체 분석 연구에 있어서 NMR 분석은 주로 ^1H 와 ^{13}C NMR 분광(Spectroscopy)을 주로 이용하며, 최근에 극저온으로 냉동된 프로브, 마이크로 프로브 및 자장력 증가 같은 NMR spectroscopy의 민감도를 향상시키기 위한 기술 개발이 보고되고 있다(4).

3. 다변량 통계를 이용한 데이터 분석

질량분석기 또는 핵자기공명장치를 이용한 전체 대사체 분석은 많은 양의 복잡한 자료를 생산해내며 이 같은 자료들을 정량화 하기 위한 다양한 소프트웨어들의 적절한 활용이 요구된다. 또한 올바른 자료의 해석과 임상적으로 유용한 표지자를 발굴하기 위해서는 이에 특화된 데이터분석 방법이 필요하다.

질량분석기 또는 핵자기공명장치를 통해 생성된 방대한 양의 데이터 결과는 일반적으로 다변량 통계법을 통해 분석된다. 이는 대사체학을 비롯한 전사체, 단백질체 등과 같은 다양한 오믹스분야에서 사용되는 통계기법으로 데이터의 구조나 목적에 따라 다양한 알고리즘을 적용하여 사용하며 크게 unsupervised와 supervised 방법으로 나누어진다. Unsupervised 방법 중 PCA (주성분 분석법)은 많은

변수로 이루어진 데이터(고차원 데이터)로부터 최소변수로 집약된 형태의 데이터(저차원)로 환원시키는 기법으로써, 데이터의 손실을 최소화하면서 보다 쉽게 이해할 수 있게 된다. PCA 분석은 샘플에 대한 기지의 정보가 주어지지 않으며 이의 분석결과는 2차원 또는 3차원으로 집약된 변수공간에서 유사샘플(replicates) 또는 각각 다른 샘플간의 상대적 거리를 시각화(score scatterplot) 함으로써 데이터에 잠재된 다양한 형태의 클러스터링의 패턴인식을 통한, 기지 또는 미지의 사실에 대한 유용한 정보와 잠정가설(working hypothesis)을 설정하는 단계로 유용하게 사용할 수 있다(5).

이와 함께 계량화학(chemometrics) 알고리즘에서 생체 지표 발굴 및 모델구축에 가장 많이 사용되는 방법으로는 PLS (부부최소자승법) 및 파생된 다양한 supervised data mining method가 있다. 이는 상대적으로 적은 수의 관찰(e.g. 샘플수 << 관측 대사체수)에 잘 적용할 수 있는 선형 회귀 기반방법(linear regression-based method)으로서 데이터와 기지의 샘플간의 공분산(covariance)을 최대화함으로써, 샘플간 차이를 극대화할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 PCA의 loading plot과 유사한 기능을 가지고 있는 S-plot은 이러한 샘플간의 극대화된 차이를 야기하는 공변 변수에 정량적 점수를 부여함으로써 수많은 검출 미확정 변수에 중요성을 정량화하여 추후 정성분석 및 생체지표 인자 우선순위를 결정할 수 있는 역할을 한다(6).

이식 분야에서 대사체 연구의 활용

신장이식 분야에서 대사체 연구는 주로 소변 및 혈액 검체를 이용하여 이식 후 신손상 또는 거부반응의 발생에 따른 저분자량 대사체의 변화를 분석하거나 수술 중 사용되는 관류액의 대사체 변화 분석을 통해 초기 신기능 저하를 예측하고자 하는 아직 비교적 초기 단계의 연구가 현재까지 진행된 상태이다(Table 1).

1. 신장이식 후 임상 검체를 이용한 급성 거부반응 및 신장 손상의 예측 연구

신장이식 분야의 대사체 연구는 초기에는 이식 후 경과에 따라 혈청 대사체 변화 양상 또는 면역억제제 사용에 따른 대사체 변화 양상을 NMR로 분석하여 보고하며 시작되었고(7,8) 차츰 질량분석기의 발달에 힘입어 거부반응 등 주요 임상 양상에 따른 소변 및 혈액 대사체의 변화 분석을 통해 진단적 활용 가능성을 알아보고자 하는 연구들이 보고되고 있다. 이식분야에서 소변 대사체 연구는 주로 질량분석기의 발달과 소변 검체 처리의 연구경험이 축적되면서 진행되었다. Sui 등(9)과 Wang 등(10)은 신장이식 후 거부반응 및 신손상 환자의 혈청과 소변에서 저분자량 대사체를 MALDI-FTMS를 통해 분석하여 거부반응 및 세관괴사 등 임상 양상에 따라 차이를 보이는 대사체 양상을 확인하고자 하였다. 이들 연구들은 이식후 소변 검체에서 high throughput 대사체 분석이 가능하고 이들 대사체 변

Table 1. 신장이식 분야의 주요 대사체 연구

저자(참고문헌)	검체	환자 수 (n)	분석 방법	연구 특징 및 주요 결과
Kim 등(7)	혈청	CsA 군 (27) TAC 군 (30)	NMR	이식 전, 후 1, 3, 6 검체에서 cyclosporine 및 tacrolimus 사용 군에서 기간에 따른 대사체 변화 비교
Li 등(8)	혈청	정상 대조군 (28) 신장이식 (20)	NMR	이식 전, 후 1일 및 7일 검체에서 정상인과 대사체 차이를 비교
Sui 등(9)	소변	신장이식 (36) 건강대조군 (12)	MALDI-FTMS	급성 거부반응 대사체 18, 만성거부반응 대사체 6 종 제시, 대사체 동정은 되지 않음
Wang 등(10)	소변	급성 신손상 (5)	MALDI-FTMS	5명 이식환자에서 이식 후 신기능 회복에 따른 53개 검체 분석
Blydt-Hansen 등(11)	소변	신장이식환자 57명의 399개 검체	LC-MS	거부반응에서 특이적인 134개의 대사체를 발굴, 이중 10개를 이용한 거부반응 진단 지표 개발
Zhao 등(12)	혈청	거부반응군 (11) 비거부반응군 (16)	LC-MS	검체 처리를 위해 reversed-phase liquid chromatography (RPLC) 분리법과 hydrophilic interaction chromatography (HILIC) 분리법을 같이 이용
Diémé 등(16)	소변	CsA 군 (12) TAC 군 (23)	GC-MS	7일, 3, 12개월 소변 분석, 7일 소변의 대사체 변화가 이식신장 기능을 예측

Abbreviations: CsA, cyclosporine A; TAC, tacrolimus; NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy; MALDI-FTMS, matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform mass spectrometry; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; GC-MS, gas chromatograph-mass spectrometer.

화 양상이 임상양상에 따라 차이가 나타남을 증명하며 소변 대사체 분석을 통한 중계연구가 가능함을 제시하였다. 하지만 분석방법의 한계로 후보 대사체의 동정이 이루어지지 않았으며 적은 검체 수에서 한계를 보였고 특히 검증군을 통한 독립적 검증이 이루어지지 않는 못하였다.

2014년 Blydt-Hansen 등(11)은 57명의 소아 이식환자에서 277개의 비교적 많은 수의 소변 검체를 LC-MS로 분석한 결과 거부반응에서 특이적인 134개의 대사체를 발굴하였다. 거부반응 환자에서 변화를 보인 대사체 양상은 정상군뿐만 아니라 비정형적(borderline rejection) 환자의 구별에도 통계적 유의성을 보였다. 특히 가장 큰 변별력을 보인 10개의 대사체를 통해 거부반응 분류지표를 구하고 이를 다양한 임상 지표와 조직학적 소견을 같이 비교 분석함으로써 향후 임상 적용 가능성을 제시하였다. 주목할 만한 사실은 이들 대사체 분석의 거부반응에 대한 변별도가 이전에 수행되었던 microarray를 이용한 전사체 분석 바이오마커에 비해 뒤떨어지지 않아 향후 소변 대사체 분석을 통한 거부반응 진단이 활용 가능성이 높음을 주장하였다. 하지만 이들 연구 역시 독립적 검체를 통한 외부 검증(external validation)을 시행하지 않은 아직 제안 수준의 연구이며 향후 외부 검증 및 전향적 연구 검체에서 그 유용성이 증명되어야 할 것이다.

한편 Zhao 등(12)은 최근 혈청 검체를 LC-MS 질량분석기로 분석하여 거부반응 특이 혈청 대사체를 발굴하고 제시하였다. 특히 이들은 대사체 분리에 reverse-phase liquid chromatography (RPLC) 방법과 hydrophilic interaction chromatography (HILIC) 방법을 동시에 적용하여 비표적(non-targeted) 대사체 profiling의 효율을 높이고자 하였다. 이 같은 대사체 finger printing 방식의 접근은 최근 생명정보학의 발전과 동반하여 지속적인 발전을 이룰 것으로 기대되며 향후 거부반응 특이 후보 대사체 발굴에 보다 유용하게 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 관류액 대사체 분석을 통한 이식신장 기능 및 예후 예측 연구

신장이식에서 대기자 숫자에 비해 극히 제한된 제공자 발생에 따라 이식신장의 허혈 손상이 상대적으로 심하고 이에 따른 지연 기능 회복 또는 이식신장의 예후가 저하되는 심장사 또는 확장 기준 뇌사자 공여(expanded criteria donation, ECD)의 사용은 점차 증가하고 있다. 이 같은 중증 이식신장 허혈을 예방 및 교정하기 위해 적출 신장에 대한 기계관류가 시도되고 있으며 이 경우 적출 신장의 예후 예측을 위해 관류액 대사체 분석 연구가 역시 활발히

진행되고 있다(13). 관류액의 Glutathione S-transferase (GST), N-acetyl-A-D-glucosamidase 및 hearttype fatty acid binding protein (HFABP) 농도가 이식 후 신기능 호전과 밀접한 연관성을 보이면서 지연 이식신장 기능(Delayed Graft Function, DGF)의 유의한 예측인자로 활용될 수 있음이 제시되었다(13). 하지만 이 같은 관류액 대사체 표지자는 진단적 정확성이 아직 입증되지 않았고 특히 이식신장 생존에 대해서는 예측력이 떨어진다는 보고되고 있다(14). 한편, Bon 등(15)은 인간 신장과 크기가 유사한 돼지 신장 관류 모델에서 관류액 대사체를 검사시간이 비교적 짧은 NMR로 분석한 결과 비교적 정확한 예측력을 보여 이 같은 관류액 대사체 분석 연구가 임상에 실제로 활용될 수 있다고 제시하였지만 이 역시 향후 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

3. 면역억제제 사용에 따른 대사체 변화 모니터링 연구

이식 후 임상검체에서 대사체의 변화는 면역억제제 등 다양한 약제의 사용 여부, 용량 그리고 독성 여부 발생 등에 따라 크게 영향을 받게 된다. 따라서 면역억제제 사용 후 혈액 및 소변 대사체의 변화의 특성을 분석하고자 하는 연구들 역시 국내외에서 수행되었다(7,16). 하지만 아직은 서로 다른 면역억제제가 인체 검체의 대사체에 미치는 영향을 특징짓는 연구에 국한되어 수행되었으며 향후 면역억제제의 신장 독성 및 전신 부작용 등 다양한 임상 양상들의 변화와 연관된 표지자의 개발연구가 진행될 것으로 예측된다.

결론: 신장이식 분야에서 대사체학 연구의 활용전망

신장이식이 도입된 이후 반세기가 넘었지만 이식 후 이식신장의 평가는 아직도 혈청 크레아티닌, 소변량, 혈압 등 비특이적 검사법에 의존하고 있다. 침습적인 신조직 검사를 피하기 위한 다양한 바이오마커가 활발히 연구되고 있지만 아직까지 신조직 검사는 이식신장 손상 진단에 필수적이다. 이식신장의 기능의 평가와 손상에 대한 적절한 모니터링 방법의 개발은 결국 적절한 면역조절 수준을 유지함으로써 거부반응뿐만 아니라 감염 및 약제 독성을 예방할 수 있을 것이다.

최근 저분자 화합물에 대한 분리, 탐지 기술이 발달하고 생명정보학의 발전으로 대사체분석은 이식분야에서도 이식신장 기능 및 손상에 대한 표지자 발굴에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 전망되어 왔다. 실제로 동물 모델뿐만

아니라 인체유래물 검체를 이용한 바이오마커 연구에 저분자량 검체를 이용한 대사체 연구는 종양, 신경학적 질환, 신장 및 심혈관계 질환 등에서 활발히 연구되고 있다. 그럼에도 불구하고 이식분야에서 대사체 연구, 특히 혈액 및 소변 검체를 이용한 중계 연구는 아직 많은 연구결과가 보고되지 않고 있는 상태이다.

신장이식 분야에서 대사체학이 실제 진단적으로 활용되기 위해서는 충분한 검체 수, 엄격한 검증연구의 필요성 등 전사체, 단백질체 등의 다른 접근 방법에서도 극복해야 할 기본 장벽들 외에도 많은 제한점의 개선이 아직 요구된다. 이식 후 임상검체에서 대사체의 변화는 이미 알려진 조절 기전 외에도 면역억제제 등 다양한 약제의 사용, 이식 후 신기능의 변화, 고혈압, 당뇨, 고지혈증 등 다양한 동반 질환 여부에 의해 크게 영향을 받게 된다. 또한 이식 후 신기능 변화 또는 사용하는 검체에 따라 임상 검체의 대사체 양상은 달라지게 된다. 또한 이러한 대사체의 변화를 이용한 질병 표지자가 특정 임상변수와 발생 또는 진행에 실제로 인과관계를 가지고 있는가에 대한 증명이 어렵다는 점 역시 제한점으로 제시된다. 이 같은 제한점을 극복하기 위해서는 이식 후 약제의 사용 및 다양한 임상 양상에 따른 기본적인 대사체의 변화 양상에 대한 충분한 분석자료가 뒷받침되어야 할 것이다. 또한 적절한 검체 처리, 분석 과정을 통한 후보 표지자의 정량화 등의 기술적 요소들의 개선뿐만 아니라 향후 임상적 활용성을 고려한 적절한 연구 디자인의 개발이 필요할 것이다.

REFERENCES

- 1) Chung BC. Metabolomics in disease research. *Mol Cell Biol News* 2006;18:17-27. (정봉철. 질환연구분야에서의 대사체학. 분자세포생물학뉴스 2006;18:17-27.)
- 2) Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, et al. The human urine metabolome. *PLoS One* 2013;8:e73076.
- 3) Kim SH, Yang SO, Kim KH, Km YS, Liu KH, Yoon YR, et al. Research trends, applications, and domestic research promotion strategies of metabolomics. *KSBB Journal* 2009; 24:113-21. (김소현, 양승욱, 김경현, 김영석, 유광현, 윤영란, 등. 대사체학의 연구동향, 응용 및 국내 연구 활성화 방안. *KSBB Journal* 2009;24:113-21.)
- 4) Emwas AHM, Salek RM, Griffin JL, Merzaban J. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics* 2013;9: 1048-72.
- 5) Boccard J, Veuthey JL, Rudaz S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. *J Sep Sci.* 2010;33(3):290-304.
- 6) Sugimoto M, Kawakami M, Robert M, Soga T, Tomita M. Bioinformatics Tools for Mass Spectroscopy-Based Metabolomic Data Processing and Analysis. *Curr Bioinform* 2012; 7(1):96-108.
- 7) Kim CD, Kim EY, Yoo H, Lee JW, Ryu do H, Noh DW, et al. Metabonomic analysis of serum metabolites in kidney transplant recipients with cyclosporine A- or tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 2010;90: 748-56.
- 8) Li L, Sui W, Che W, Li W, Chen J, Li H, et al. 1H NMR-based metabolic profiling of human serum before and after renal transplantation. *ASAIO J* 2013;59:286-93.
- 9) Sui W, Huang L, Dai Y, Chen J, Yan Q, Huang H. Proteomic profiling of renal allograft rejection in serum using magnetic bead-based sample fractionation and MALDI-TOF MS. *Clin Exp Med* 2010;10:259-68.
- 10) Wang J, Zhou Y, Xu M, Rong R, Guo Y, Zhu T. Urinary metabolomics in monitoring acute tubular injury of renal allografts: a preliminary report. *Transplant Proc* 2011;43: 3738-42.
- 11) Blydt-Hansen TD, Sharma A, Gibson IW, Mandal R, Wishart DS. Urinary metabolomics for noninvasive detection of borderline and acute T cell-mediated rejection in children after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2014;14: 2339-49.
- 12) Zhao X, Chen J, Ye L, Xu G. Serum metabolomics study of the acute graft rejection in human renal transplantation based on liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res* 2014;13:2659-67.
- 13) Moers C, Varnav OC, van Heurn E, Jochmans I, Kirste GR, Rahmel A, et al. The value of machine perfusion perfusate biomarkers for predicting kidney transplant outcome. *Transplantation* 2010;90:966-73.
- 14) Hoogland ER, de Vries EE, Christiaans MH, Winkens B, Snoeijs MG, van Heurn LW. The value of machine perfusion biomarker concentration in DCD kidney transplantations. *Transplantation* 2013;95:603-10.
- 15) Bon D, Billault C, Thuillier R, Hebrard W, Boildieu N, Celhay O, et al. Analysis of perfusates during hypothermic machine perfusion by NMR spectroscopy: a potential tool for predicting kidney graft outcome. *Transplantation* 2014;97: 810-6.
- 16) Diémé B, Halimi JM, Emond P, Büchler M, Nadal-Desbarat L, Blasco H, et al. Assessing the metabolic effects of calcineurin inhibitors in renal transplant recipients by urine metabolic profiling. *Transplantation* 2014;98:195-201.