



Samenvatting proefschrift A.P.M. Matton

“Machine Perfusion of Human Donor Livers with a Focus on the Biliary Tree”

**Promotie: 11 december 2019
Rijksuniversiteit Groningen**

Promotor:
Prof. dr. R.J. Porte
Prof. dr. J.A. Lisman

De studies in dit proefschrift zijn gericht op het uitbreiden van het aantal bruikbare donorlevers door middel van machineperfusie van “extended criteria donor” (ECD) levers, met een bijzondere focus op de galwegen. Één van de meest effectieve manieren om het aantal beschikbare donorlevers voor transplantatie te vergroten, is door ECD levers te transplanteren. In vergelijking met donorlevers die aan de optimale standaardcriteria voldoen zijn ECD levers inherent van mindere kwaliteit en hebben ze meer schade opgelopen, waardoor transplantatie van deze organen een hoger risico op complicaties met zich meebrengt. De gouden standaard voor het conserveren van donorlevers, waarbij de organen worden gekoeld en op ijs worden getransporteerd (“static cold storage”, SCS), veroorzaakt teveel extra schade aan deze reeds risicovolle ECD organen. Daarom vereist de omgang met deze transplantaten een andere aanpak. Machineperfusie is een nieuwe techniek die zowel bescherming biedt tegen ischemische schade, alsook de mogelijkheid geeft om organen te verbeteren en zorgvuldig te selecteren. Afhankelijk van de indicatie voor machineperfusie kan het worden geïmplementeerd tijdens verschillende fasen van transplantatie (tijdens uitname, transport en bij aankomst in het transplantatiecentrum), bij verschillende temperaturen en met behulp van verschillende preservatievloeistoffen.

Geoxygeneerde normotherme machineperfusie (NMP), op 37 °C, zorgt ervoor dat het orgaan metabolisch actief wordt, hetgeen de mogelijkheid biedt om de kwaliteit van het orgaan te beoordelen. Om een fysiologische omgeving te creëren werd NMP toegepast met behulp van een perfusievloeistof op basis van rode bloedcellen (RBC), fresh frozen plasma (FFP) en een mix van voedingsstoffen, spoorelementen en antibiotica. In een online video werd uitgelegd hoe NMP wordt uitgevoerd met behulp van het Liver Assist (Organ Assist)-perfusieapparaat, hetgeen een druk-gestuurde continue stroom door de vena porta en een pulserende stroom door de arteria hepatica geeft.

Echter, omdat menselijke bloedproducten schaars zijn en het gebruik ervan logistiek complex is, hebben we een NMP-perfusievloeistof ontwikkeld die het gebruik van



menselijke bloedproducten omzeilt. RBC's werden eerst vervangen door een acellulair bovine hemoglobine (HBOC-201) en deze gemodificeerde perfusievloeistof werd getest in zes voor transplantatie afgekeurde donorlevers. Vervolgens werden FFP's vervangen door gelofusine en een mix van andere additieven, en de resulterende vloeistof werd getest in nog eens zes donorlevers. Beide groepen werden vergeleken met een historisch cohort van twaalf donorlevers waarin NMP werd uitgevoerd met een perfusievloeistof op basis van RBC's en FFP's. De levers in de HBOC-201 geperfundeerde groepen vertoonden een significant betere functie, waaronder een hogere cumulatieve galproductie, portale en arteriële flow en hepatisch adenosinetrifosfaat (ATP)-gehalte.

Een andere belangrijke eigenschap van HBOC-201 is dat het, in tegenstelling tot RBC's, bij lagere temperaturen als zuurstofdrager kan worden gebruikt. Dit maakt een perfusieprotocol mogelijk met een periode van duale hypotherme geoxygeneerde machineperfusie (dual hypothermic machine perfusion, DHOPE), gevolgd door gecontroleerde geoxygeneerde heropwarming (controlled oxygenated rewarming, COR) en uiteindelijk NMP. We hebben aangetoond dat sequentiële DHOPE-COR-NMP met behulp van een HBOC-gebaseerde perfusievloeistof een nieuwe methode biedt voor gecombineerde reanimatie en kwaliteitsbeoordeling van suboptimale levers voorafgaand aan transplantatie. In deze casusreeks werden zeven levers die aanvankelijk werden geweigerd voor transplantatie geperfundeed met behulp van DHOPE-COR-NMP, waarvan er vijf met succes werden getransplanteerd nadat ze tijdens NMP aan alle hepato-cholangiocellulaire kwaliteitscriteria voldeden. Het primaire eindpunt, transplantaatoverleving na 3 maanden, was 100%. Ook was de post-operatieve piek-ALT lager in onze ontvangers dan in studies waarin SCS alleen werd vergeleken met NMP, hetgeen mogelijk te wijten is aan de door DHOPE geïnduceerde vermindering van ischemie-reperfusieschade.

Vervolgens werd aangetoond dat bicarbonaat, pH, glucose in gal en de gal/perfusaat glucoseratio nauwkeurige voorspellers zijn van histologische galwegschade tijdens NMP. Histologische galwegschade werd beoordeeld met behulp van een klinisch relevant scoresysteem en levers werden verdeeld in een groep met hoge en lage schade. Biliaire biochemiemarkers werden geanalyseerd op hun voorspellende waarde met behulp van AUC-ROC-curves. Het vaststellen van biomarkers voor het beoordelen van galwegschade is belangrijk, omdat NMP-beoordeling van levers tot dan toe voornamelijk was gebaseerd op hepatocellulaire criteria ondanks het feit dat galwegschade voorafgaand aan transplantatie rechtstreeks is gecorreleerd aan de ontwikkeling van galwegstricturen.

In een andere studie werden lever en galweg afgeleide micro-RNA's (HDmiR-122 en CDmiR-222 respectievelijk) in perfusaat en gal getest. Vroege release van deze micro-RNA's blijken late functie en schade van hepatocyten en cholangiocyten tijdens NMP te kunnen voorspellen. Deze analyses werden uitgevoerd in een groep van twaalf donorlevers die werden afgekeurd voor transplantatie. Over het algemeen waren de niveaus van beide miR's in perfusaat en gal lager in levers met lage schade en goede functie. Niveaus van HDmiR-122 in perfusaat correleerden sterker met hepato-cholangiocellulaire parameters vergeleken met niveaus in gal, terwijl niveaus van CDmiR-222 in gal sterker correleerden met parameters vergeleken met niveaus in



perfusaat, wat hun celspecifieke oorsprong bevestigde. De HDmiR-122 / CDmiR-222 ratio was aanzienlijk hoger in perfusaat van levers van lage kwaliteit in vergelijking met de verhouding in levers van hoge kwaliteit. Deze miR's worden differentieel vrijgegeven in perfusaat en gal en kunnen in de toekomst mogelijk worden gebruikt als biomarkers voor de beoordeling van de kwaliteit van het transplantaat tijdens machineperfusie.

Verder werd het vermogen van verschillende preservatievloeistoffen om te beschermen tegen galwegbeschadiging onderzocht. Galwegsegmenten van afgekeurde donorlevers werden koud bewaard in vijf verschillende preservatievloeistoffen en vervolgens beoordeeld op histologische galwegschaade. Histidine-tryptofaan-ketoglutaraat (HTK) oplossing leidde tot hogere galwegschaade in vergelijking met University of Wisconsin (UW) oplossing. Dit heeft belangrijke klinische implicaties, aangezien de HTK oplossing op grote schaal wordt gebruikt en donorlevers met een hoog risico op galwegcomplicaties in toenemende mate worden getransplanteerd. Bovendien resulteerde de toevoeging van polyethyleenglycolen (PEG's) aan HTK en UW oplossing in een lichte maar niet-significante vermindering van galwegschaade. PEG's zijn door de FDA goedgekeurde niet-toxische wateroplosbare verbindingen die op grote schaal worden gebruikt, inclusief klinisch, met hoge flexibiliteit, hydrofiliciteit en eiwitafstotende eigenschappen. Uit eerder onderzoek is gebleken dat PEG's een belangrijke rol kunnen spelen bij het beschermen van lever en darm, die sterk lijkt op galwegen. De toevoeging van PEG's aan preservatievloeistoffen zou een gemakkelijk uitvoerbare en betaalbare methode kunnen zijn om de galwegen te beschermen, wat verder onderzoek rechtvaardigt.

In de laatste studie hebben we een nieuwe methode ontwikkeld met de naam precision-cut bile duct slices (PCBDS) om humane galwegen te bestuderen, waarbij het gebruik van proefdieren werd omzeild. Met behulp van dit ex vivo model werden humane extrahepatische galwegen van afgekeurde donorlevers in kleine plakjes gesneden en gedurende maximaal zes dagen geïncubeerd. Deze techniek handhaafde de intacte anatomische organisatie van celstructuren en maakte de studie van spatiotemporale differentiatie en migratie van peribiliary gland (PBG) cellen mogelijk. PBG zijn niches met progenitor en stamcellen ingebed in de galwegwand, die een cruciale rol spelen in de ontwikkeling van galwegstricturen na transplantatie. We toonden aan dat na ernstige galwegschaade, PBG cellen reageerden met proliferatie, migratie en differentiering om galwegepitheel te herstellen. Dit was de eerste studie die bewijs leverde dat PBG reageren op galwegschaade door herstel van galwegepitheel en bevestigt de beschermende rol van PBG bij de ontwikkeling van grote galweg cholangiopathieën.