



## Samenvatting proefschrift L.C. Burlage

“Oxygenated machine perfusion of donor livers and limbs: Studies on endothelial activation and function”

**Promotie: 6 mei 2019**  
**Rijksuniversiteit Groningen**

### Promotoren:

Prof. dr. Robert J. Porte  
Prof. dr. Ton Lisman

Het succes van orgaan transplantatie hangt nauw samen met kwaliteit van het te transplanterendonororgaan. Geoxygeneerde machine perfusie krijgt steeds meer aandacht als alternatieve methode voor orgaanpreservatie, omdat het gebruikt kan worden om de kwaliteit van zo genoemde ‘extended criteria donor’ (ECD) organen te verbeteren en te beoordelen voorafgaand aan transplantatie. Dit kan uiteindelijk leiden tot transplantatie van meer en betere kwaliteit organen. In dit proefschrift wilde ik de effecten van geoxygeneerde machine perfusie op zowel donorlevers als ledematen in meer detail bestuderen. Wij hebben de effecten van machine perfusie op endotheliale activatie en functie onderzocht en de effecten van nieuwe perfusieoplossingen op transplantaatfunctie uitgezocht, zowel *ex situ* als *in vivo*. In dit hoofdstuk worden de belangrijkste bevindingen van de studies die beschreven staan in dit proefschrift samengevat. Tot slot wordt dit hoofdstuk afgesloten met een sectie waarbij de toekomstperspectieven worden besproken. Een algemene inleiding van dit proefschrift staat beschreven in **hoofdstuk 1**.

### **DEEL A: Geoxygeneerde machine perfusie en transplantatie van humane levers**

In **hoofdstuk 2** wordt de mogelijke impact van machine perfusie als alternatieve methode voor orgaanpreservatie besproken, met name voor donor levers na ‘donatie na circulatoire dood’ (DCD). In een poging om het dringende tekort aan organen te overwinnen, worden DCD donoren steeds meer gebruikt als een nieuwe bron van donororganen. Het succes van DCD levertransplantatie hangt echter sterk af van de methode om de vitaliteit van het orgaan voorafgaand aan transplantatie te preserven. Wij concludeerden dat uiteindelijk een combinatie van verschillende methoden van machine perfusie kan worden gebruikt, gespecialiseerd voor de behoeften per orgaan. Interessant is dat recente onderzoeken ook het gebruik van machine perfusie onderzoeken om ischemievrije orgaantransplantatie (IFOT) beschrijven. In de komende decennia zou deze interessante techniek van IFOT de voorkeursmethode kunnen worden voor preservatie van ECD organen.



In **hoofdstuk 3** hebben wij het effect van eind-ischemische, geoxygeneerde hypotherme machine perfusie (HMP) op de endotheelcelfunctie van ECD levers onderzocht. In deze studie werden donor levers geïncubeerd die waren afgekeurd voor transplantatie. Na een periode van statische koude preservatie (SCS) tijdens transport naar ons centrum, werd de vitaliteit van alle levers getest middels normotherme machine perfusie (NMP); ofwel direct bij aankomst (controle groep) ofwel voorafgegaan door 2 uur HMP. Dit hoofdstuk concludeert dat een korte periode van geoxygeneerde HMP, na een periode van SCS en voorafgaand aan NMP, van ECD-levers de kwaliteit van de endotheelcellen bevordert.

In **hoofdstuk 4** hebben wij cellulaire shifts van natrium en kalium bestudeerd tijdens eindischemische geoxygeneerde machine perfusie en daaropvolgende reperfusie *ex situ* of *in vivo*. De reden om deze shifts in detail te bestuderen was de onverwachte observatie tijdens onze eerste klinische pilot studie van end-ischemische, geoxygeneerde HMP levertransplantaties, dat reperfusie van HMP-gepreserveerde levers leidde tot ernstige hypokaliëmie tijdens transplantatie bij drie van de tien patiënten. Deze studie toonde aan dat reperfusie van HMP-gepreserveerde levers kan leiden tot verlaagd kalium concentratie in het bloed (of zelfs hypokaliëmie) van de ontvanger. Bij toenemend klinisch gebruik van HMP als een alternatieve methode voor orgaanpreservatie, moeten anesthesiologen en chirurgische teams er op voorbereid zijn op kalium shifts tijdens transplantatie van een HMP-gepreserveerde levers tegengesteld zijn aan de (verwachte) kalium shifts van de transplantatie van SCS-gepreserveerde levers.

In **hoofdstuk 5** hebben wij geprobeerd een nieuwe NMP preservatievloeistof te ontwikkelen, die het gebruik van humane bloedproducten overbodig zou maken. Wij hebben achtereenvolgens de rode bloedcellen (RBC's) vervangen door HBOC-201, een acellulaire op hemoglobine gebaseerde zuurstofdrager, en bevroren plasma (FFP) is vervangen door de colloïde oplossing gelofusine. Levers die geperfundeerd werden met RBCs en FFP werden als controles gebruikt. Wij concludeerden dat levers die met HBOC-201 geperfundeerd waren, een significant hoger ATP-gehalte hadden vergeleken met controle levers. Tevens was de cumulatieve galproductie en bloed doorstroming (zowel portaal als arterieel) significant hoger in HBOC-201 levers vergeleken met controles. Ook was de concentratie van schademarker ALAT lager in HBOC-201 geperfundeerde levers vergeleken met controles. Levers die tijdens NMP geperfundeerd werden met HBOC-201 waren qua functie gelijk (en op sommige punten zelfs beter) dan levers die geperfundeerd werden met RBCs. NMP van menselijke levers kan dus effectief worden uitgevoerd met een perfusie vloeistof gebaseerd op HBOC-201 en gelofusine. Momenteel wordt in de eerste klinische studie uitgevoerd waarin een op HBOC-201-gebaseerde perfusievloeistof wordt gebruikt voor de perfusie van ECD levers voorafgaand aan transplantatie (3).

**Hoofdstuk 6** beschrijft een deelstudie van het vorige hoofdstuk. In hoofdstuk 6 hebben we het effect van HBOC-201 bestudeerd op de functie van endotheel cellen van donorlevers tijdens *ex situ* NMP. De reden om het effect van HBOC-201 op de functie van endotheel cellen te onderzoeken waren de ernstige hemodynamische complicaties die zijn gemeld bij patiënten die HBOCs kregen omhemorragische shock te behandelen in de setting van een klinische studie.



Er werd gedacht dat de acellulaire Hb-moleculen vasoconstrictie veroorzaakten vanwege 'nitric oxide (NO) scavenging'. De belangrijkste bevinding van deze studie was dat de cumulatieve NO-productie niet daalde tijdens *ex situ* NMP van een op HBOC-201 gebaseerde perfusieoplossing. Na 6 uur NMP waren de cumulatieve NO-waarden van HBOC-201-geperfundeerde levers vergelijkbaar met de waarden van RBCgeperfundeerde levers.

In **hoofdstuk 7** onderzochten wij de *in vitro* effecten van recombinant oplosbaar humaan trombomoduline (ART-123) op de coagulatie en fibrinolyse van patiënten met eindstadium leverfalen die een levertransplantatie ondergingen. ART-123 wordt klinisch gebruikt als een antistollingsmiddel en ontstekingsremmend middel in de behandeling van gedissemineerde intravasculaire stolling. Wij waren echter geïnteresseerd in ART-123 voor een andere reden. In preklinische studies werden veel belovende resultaten gemeld dat ART-123 de I/R-schade van donorlevers efficiënt kan verminderen. Voor deze studie werden plasma verzameld van 10 patiënten die een levertransplantatie ondergingen, tijdens transplantatie en in de dagen daarna. Deze studie suggereerde dat het onwaarschijnlijk is dat ART-123 bloedingen zal veroorzaken bij patiënten die een levertransplantatie ondergaan. Echter, er zijn meer klinische studies nodig om het veilige gebruik van ART-123 tijdens levertransplantatie te bevestigen.

## **DEEL B: Geoxygeneerde machine-perfusie en transplantatie van ledematen**

In **hoofdstuk 8** werd een overzicht gegeven van nieuwe strategieën die de langdurige preservatie 'vascularized composite allotransplantatie' (VCA) grafts mogelijk maken. Samengevat is de huidige

methode van statische koude preservatie ontoereikend voor de langdurige preservatie van VCA grafts. Nieuwe ontwikkeling op het gebied van VCA, onder andere met betrekking tot matching, desensibilisatie en potentiële tolerantie-inductie vereisen echter allemaal dat VCA grafts uren tot dagen vitaal blijven. De potentie van machine perfusie als nieuwe preservatiemethode wordt in dit hoofdstuk besproken. Ook worden voor- en nadelen van meer extreme preservatie methoden, zoals cryopreservatie, besproken. Een complicerende factor in de zoektocht naar de optimale VCA graft preservatie methode, is de heterogene aard van VCA-transplantaten, omdat alle weefseltypes hun eigen gevoeligheid voor (koude) ischemie en cryoprotectieve middelen hebben. Wij zijn van mening dat in de huidige reikwijdte van protocollen voor langdurige bewaring, 'high subzero' preservatie protocollen veelbelovend lijn voor de preservatie van VCA grafts. Langdurige preservatie middels deze nieuwe techniek kan de klinische toepassing van VCA als een reconstructieve optie voor patiënten over de hele wereld vergroten.

In **hoofdstuk 9** hebben we een protocol ontwikkeld voor 6 uur subnormotherme machine perfusie (SNMP). Als model voor een gevasculariseerd samengesteld allotransplantaat gebruikten wij de achterpoot van een rat. Wij vergeleken drie verschillende perfusieoplossingen; allemaal op basis van kweekmedium voor spiercellen, met de toevoeging van polyethyleenglycol en de acellulaire zuurstofdrager HBOC-201. Van alle groepen, was de piek zuurstofextractie was beter in HBOC-201



geperfundeerde ledematen. Bovendien was de cellulaire energielading vergeleken met conservatief gepreserveerde ledematen significant hoger in ledematen die gepreserveerd werden met HBOC-201. De levensvatbaarheid van de HBOC-201-geperfundeerde ledematen werd bevestigd met een heterotopie transplantatie en een succesvolle follow-up van een week. Samenvattend demonstreerde dit hoofdstuk dat 6 uur *ex situ* SNMP van achterpoten van de rat haalbaar is, en dat dit resulteert in superieure weefselpreservatie in vergelijking met conventionele koude preservatiemethoden. Huidige studies onderzoeken de verlenging van de preservatie tijd van VCA-transplantaten, door ons SNMPprotocol te implementeren in een preservatie protocol dat 24 uur per dag duurt. In het addendum **hoofdstuk 10** geven wij een gedetailleerde samenvatting van ons recent ontwikkelde 24-uurs 'subzero non-freezing' protocol voor langdurige bewaring van ledematen