



Samenvatting proefschrift Carlijn I. Buis

“Molecular and biochemical mechanisms of bile duct injury after liver transplantation.”

Promotiedatum: 8 december 2008
Rijksuniversiteit Groningen

Promotor:
Prof. dr. R.J. Porte

Co-promotor:
Prof. dr. H.J. Metselaar
Prof. dr. M.J.H. Slooff
Prof. dr. H.J. Verkade

Levertransplantatie is de aangewezen behandeling voor patiënten met eindstadium leverfalen. Het succespercentage van een transplantatie is groot, na 5 jaar is meer dan 75% van de patiënten nog in leven. Er kunnen echter complicaties optreden, onder meer van de galwegen. Complicaties van de galwegen betreffen lekkage, stricturen van de anastomose (AS) en stricturen en verwijdingen van de galwegen in de lever, de non-anastomotische stricturen (NAS).

In dit proefschrift zijn NAS nader onderzocht, we hebben gekeken naar moleculaire en biochemische mechanismen van deze complicatie.

Part I: **Non-anastomotische galwegstricturen na levertransplantatie**

In dit eerste gedeelte beschrijven we een tweetal studies met als doel a) de verschillende vormen van NAS en bijbehorende klinische risico factoren te beschrijven, b) te achterhalen welke patiënten met NAS een risico lopen op het ontwikkelen van ernstige problemen en de behandeling daarvan.

In **hoofdstuk 3** presenteren we een nieuwe classificatie van NAS. Met deze methode hebben we alle beeldvorming van de patiënten met NAS van de afgelopen jaren in het UMCG opnieuw beoordeeld. Verder hebben we gekeken naar risicofactoren voor het ontstaan van NAS, het moment na de transplantatie waarop NAS zich presenteren en de progressie van de ziekte in de loop van de jaren na de transplantatie.

In een groep van 487 volwassen transplantatie patiënten met een mediane follow-up van bijna 8 jaar waren er 81 (16.6%) patiënten die NAS ontwikkelden. We hebben aanwijzingen gevonden dat er 2 vormen van NAS bestaan. NAS welke zich vroeg, binnen 1 jaar na de transplantatie, presenteren en NAS welke zich na meer dan 1 jaar presenteren. Vroege NAS zijn geassocieerd met preservatie en ischemisch gerelateerde risicofactoren, zoals een



langere koude en warme ischemie tijd. Tevens presenteren de vroege NAS zich vaker centraal in de lever. Late NAS daarentegen zijn meer geassocieerd met immunologische risico factoren, zoals primair scleroserende cholangitis als indicatie voor de transplantatie. Deze late vorm van NAS werd vaker gezien in de periferie van de galwegen. We kunnen dus zeggen dat er verschillende pathogenetische processen een rol spelen bij het ontstaan van NAS.

Als we verder kijken naar de groep patiënten met diagnose NAS, in **hoofdstuk 4**, konden we de volgende risicofactoren identificeren voor radiologische progressie, wat bij bijna 70% van de patiënten optrad: vroege NAS en één of meerdere episodes van bacteriële cholangitis. Bij patiënten met NAS bleek een galwegreconstructie met een Roux-Y hepatico-jejunostomie een risicofactor voor het ontstaan van bacteriële cholangitis. Ernstige fibrose of cirrose ontstond in 23 gevallen, vooral in gevallen waarbij de NAS perifeer in de lever gelokaliseerd was. Transplantaatoverleving, maar niet patiëntenoverleving, werd beïnvloed door de aanwezigheid van NAS. Dertien patiënten (16%) ondergingen een re-transplantatie vanwege de NAS.

De conclusie van deze studie was dat vooral patiënten met een Roux-Y reconstructie, patiënten met vroege NAS en patiënten met NAS in de periferie van de lever risico lopen op voortschrijdende ziekte met ernstige uitkomsten.

Part II: Gal fysiologie na levertransplantatie

De specifieke doelen van dit tweede gedeelte waren te evalueren welke bijdrage de gal samenstelling heeft op het ontstaan van galwegschaade. Van galzouten is het bekend dat ze een detergente, vetoplossende werking hebben (zie de titelpagina verklaring). Galzouten, zonder beschermende fosfolipiden, hebben een schadelijke werking. Het is bekend dat ze een rol spelen in het ontstaan van galwegschaade en cholangiopathie bij vele andere ziektebeelden. Galformatie direct na de transplantatie kan verstoord zijn hetgeen resulteert in een dergelijke schadelijke samenstelling met een lage fosfolipiden – galzouten ratio. De rol van schadelijke galsamenstelling in de ontwikkeling van galwegstricturen na levertransplantatie is echter onduidelijk.

Na 'non-heart-beating' (NHB) levertransplantatie zijn NAS een vaak voorkomende complicatie. In **hoofdstuk 5** wordt in een varkensmodel van NHB levertransplantatie het effect van verschillende periodes van warme ischemie in de donor op galsamenstelling en daaropvolgende schade aan de galwegen na transplantatie bestudeerd. In drie groepen werd een olopemde vertraging voor uitname van de lever toegepast, waarna het orgaan wordt getransplanteerd na 4h koude bewaartijd. De galflow werd gemeten en galmonsters werden dagelijks verzameld om de fosfolipiden – galzout ratio te bepalen. De mate van schade aan de galwegen werd gescoord door middel van een histologische scoringsschaal. De resultaten toonden dat de fosfolipiden – galzouten ratio in de gal die vlak na de transplantatie werd geproduceerd significant lager is in groep met de langste warme ischemietijd in de donor. In deze groep was ook de grootste mate van galwegschaade te zien. Op basis van de resultaten van deze studie werd geconcludeerd dat langere warme ischemie in NHB donoren is geassocieerd met de vorming van schadelijke gal na transplantatie, deze bevindingen suggereren dat schade door galzouten bijdraagt aan het ontstaan van galwegschaade na NHB levertransplantatie.

In het voorgaande hoofdstuk en ook andere studies uit onze groep hebben aangetoond dat galformatie direct na de transplantatie verstoord kan zijn wat resulteert in een schadelijke samenstelling van de gal met een lage fosfolipiden - galzouten ratio. Het was onbekend of deze veranderde samenstelling ook en rol speelt bij de ontwikkeling van NAS, een aandoening



van de grotere galwegen. Indien veranderingen in de galsamenstelling een rol spelen bij het ontstaan van NAS na transplantatie dan is te verwachten dat de galsamenstelling na transplantatie anders is bij patiënten die NAS ontwikkelen ten opzichte van patiënten die geen NAS ontwikkelen. Deze hypothese werd getest in een prospectieve klinische studie welke beschreven is in **hoofdstuk 6**. In deze grote cohort studie bij volwassen levertransplantatiepatiënten werd galproductie en samenstelling in de eerste week na transplantatie gecorreleerd aan het ontstaan van NAS in het verdere beloop na transplantatie. In 111 levertransplantatiepatiënten werden dagelijks galmonsters verzameld om de samenstelling te analyseren. NAS werden gediagnosticeerd in 14 patiënten (13%) binnen 1 jaar na transplantatie. Patiënten die uiteindelijke NAS ontwikkelden bleken minder galzouten, fosfolipiden en cholesterol uit te scheiden in de gal. Tegelijkertijd was de biliare fosfolipiden - galzouten ratio lager in patiënten die NAS ontwikkelden, wat duidt op mogelijk meer schadelijke samenstelling van de gal. Deze bevindingen passen in het concept dat galzouten betrokken is bij het ontstaan van NAS.

In het voorgaande hoofdstuk hebben we laten zien dat schadelijke gal samenstelling met een verlaagde fosfolipiden - galzouten ratio geassocieerd is met NAS na levertransplantatie. Hepatobiliare transporteiwitten zijn verantwoordelijk voor de secretie van fosfolipiden en galzouten vanuit de hepatocyten naar de gal. Omdat de verschillen in de galsamenstelling niet te verklaren waren door klinische variaties bij de donor of ontvanger was het doel van **hoofdstuk 7** om te analyseren of variaties in de genen die coderen voor deze transporters in de donor geassocieerd zijn met het ontstaan van NAS in de ontvanger. Zonder transplantatie leiden deze variaties op zichzelf niet tot galweschade. Echter, direct na transplantatie, op het moment dat de lever nog herstellende is van de schade van de ischemie en reperfusie (I/R), kunnen deze variaties juist een belangrijke factor zijn in de serie van gebeurtenissen die leidt tot het ontstaan van galweschade. Een vergelijkbare situatie wordt gezien bij patiënten met intrahepatische cholestase tijdens de zwangerschap. Wanneer deze patiënten niet zwanger zijn hebben zij geen klachten, echter op het moment dat er iets bijzonders gebeurt, een zwangerschap vertonen ze ziekte verschijnselen. Bij 458 levertransplantatie procedures konden we de verschillende hepatobiliare transport eiwitten genotyperen. Zevenenzeventig patiënten (16%) ontwikkelden NAS na transplantatie. Patiënten die een donorlever ontvingen met een genetische variatie in de fosfolipidentransporter ontwikkelde bijna 2 keer zo vaak NAS (28%) als patiënten die een donorlever ontvingen zonder deze variatie (15%). Ook in een multivariate analyse was deze variatie een onafhankelijke risicofactor voor het ontstaan van NAS. Hoewel we dat in deze studie niet hebben onderzocht, zou het transport van fosfolipiden naar de gal in levers welke drager zijn van het risico haplotype veranderd kunnen zijn in de direct postoperatieve periode en op deze wijze een bijdrage kunnen leveren aan het ontstaan van NAS.

Part III: HO-1 en hepatobiliare schade na lever transplantatie

Het specifieke doel van het derde deel was om de rol van heme oxygenase-1 (HO-1) te bestuderen in relatie tot hepatobiliare schade en leverfunctie. Opregulatie van HO-1 wordt beschouwd als een belangrijk beschermingsmechanisme tegen I/R schade bij levertransplantatie. In **hoofdstuk 8** hebben we in 38 volwassen levertransplantatiepatiënten de rol van endogene HO-1 expressie, voor tijdens en na transplantatie, bestudeerd in relatie tot postoperatieve hepatobiliare schade en functie direct na transplantatie. Voorafgaand aan de operatie was de mediane HO-1 expressie reeds 3,4-keer verhoogd (spreiding 0,7 tot 9,3-keer verhoogd). Deze spreiding was niet te verklaren door de klinische condities of behandelingen



van de donoren. We vonden dat in de groep van levers die het vermogen hadden om het HO-1 tijdens de transplantatie verder op te reguleren, de schade aan de lever minder was dan bij de patiënten waarbij de HO-1 expressie in de lever niet toenam. Dit suggereert dat levers die tijdens reperfusie het HO-1 kunnen induceren beter beschermd zijn tegen I/R-schade dan donorlevers die dit niet kunnen. Verder onderzoek zal nodig zijn om te achterhalen wat belangrijker is: een lage HO-1 expressie voor aanvang van de transplantatie, of het vermogen om HO-1 tijdens de reperfusie te induceren.

In het voorgaande hoofdstuk is de endogene regulatie van HO-1 tijdens levertransplantatie onderzocht. Omdat de variatie die werd gevonden in de initiële HO-1 expressie in de donor levers kon niet worden verklaard door klinische variabelen, werd de hypothese opgevat dat genetische verschillen verantwoordelijke zouden kunnen zijn voor de variatie in HO-1. De expressie van HO-1 wordt in belangrijke mate bepaald door 2 variaties in het gen, zogenaamde polymorfismen. Eén daarvan is het 'single nucleotide polymorfisme' (SNP) A(-413)T. Aangezien ieder mens 2 allelen heeft kunnen de volgende variaties ontstaan: AA, AT en TT. De A-variant is geassocieerd met een verhoogde HO-1 activiteit. In **hoofdstuk 9** beschrijven we een studie waarin de genetische variatie van de donor werd geanalyseerd en gecorreleerd aan uitkomsten na transplantatie in een groep van 308 volwassen patiënten die een levertransplantatie ondergingen. In een subgroep werd de HO-1 genexpressie in de lever gecorreleerd aan de genotypen. Overleving van het transplantaat na 1 jaar was beter voor A-varianten in vergelijking met de TT-genotypes. Verlies van het transplantaat als gevolg van primaire disfunctie werd vaker waargenomen bij levers met het TT-genotype. Er werd geen verschil gezien in de incidentie van NAS in beide groepen. Ontvangers van een TT-genotype lever hadden meer schade aan de lever direct na transplantatie. HO-1 genexpressie in de lever was lager in de levers met het TT-genotype, in vergelijking met levers met een A-allel. De belangrijkste conclusie van deze studie was dat het A(-413)T polymorfisme in de HO-1 promotor geassocieerd is met uitkomsten na levertransplantatie.

Tot besluit kunnen we stellen dat onderzoek naar de moleculaire en biochemische mechanismen van het ontstaan van galwegschaade belangrijke nieuwe gezichtspunten hebben opgeleverd. We hebben een nieuw classificatie systeem voor NAS voorgesteld, wat is gebaseerd op de lokalisatie en ernst van de galwegafwijkingen. Dit classificatiesysteem bleek waardevol in het identificeren van verschillende ontstaansmechanismen van NAS, tevens was het mogelijk patiënten te identificeren die een groter risico liepen op complicaties en progressie van de ziekte. Schadelijke samenstelling van de gal, gekarakteriseerd door een lage fosfolipiden - galzouten ratio, werd geïdentificeerd als een belangrijk bijdragende factor aan het ontstaan van galwegschaade en NAS na levertransplantatie. Verder interventie onderzoeken gericht op het voorkómen van NAS gebaseerd op de bevindingen van deze veranderde gal samenstelling zijn nu het aangewezen vervolg. Tot slot hebben we een beschermende rol aangetoond voor HO-1 in levertransplantatie, dit opent nieuwe wegen voor het ontwikkelen van preventieve strategieën en therapieën. ◀