



## **Samenvatting proefschrift Joost van der Hoeven**

***'Effects of brain death on donor organ viability in transplantation'***

**Promotie 22 juni 2005  
Universiteit Groningen**

De mogelijkheid om patiënten met terminaal orgaanfalen te behandelen met behulp van orgaan transplantatie heeft zich ontwikkeld van een experimentele procedure in de jaren vijftig tot de therapie van keuze op dit moment. De eerste vorm van orgaan transplantatie die de experimentele setting ontgroeide en voor therapeutische doeleinden gebruikt kon worden was de niertransplantatie. In de eerste succesvolle transplantatieseries in Parijs en Boston werden nieren van gezonde familieleden getransplanteerd bij hun zieke verwanten (familietransplantatie). Aangemoedigd door het succes van deze transplantaties opteerden een toenemend aantal patiënten met terminaal nierfalen voor deze therapie waarop de vraag sterk toenam echter zonder toename van het aanbod van donornieren. Aldus ontstond in een snel tempo een discrepantie tussen vraag en aanbod, waarop aanvullende bronnen werden gezocht van kwalitatief goede donornieren. Deze bleven beperkt tot levende donoren en in sommige gevallen na acute hartstilstand, totdat post-mortale orgaan donatie mogelijk werd door het definiëren van hersendood. In die tijd maakten technische ontwikkelingen het mogelijk door middel van mechanische ventilatie een adequate zuurstofconcentratie in de perifere weefsels van de mens te handhaven. Bij patiënten met een ernstig hersenletsel, waarbij het ademhalingscentrum onherstelbaar was beschadigd, ontstond hierdoor de mogelijkheid van tijdelijke stabilisatie. Deze voorheen niet bestaande gestabiliseerde fase vormde een nieuwe medische entiteit, tegenwoordig hersendood genoemd. Na grondige discussie waarbij de nodige barrières van morele, wettelijke en religieuze aard overwonnen moesten worden, werd deze fase, bij een patiënt met een kloppend hart, als terminaal eindpunt erkend (1). Vanaf het moment van het vaststellen van de definitie van hersendood werden deze personen de voornaamste bron van donororganen voor orgaan transplantatie. In de zeventiger en tachtiger jaren zijn hormonale en hemodynamische veranderingen tijdens hersendood onderwerp van onderzoek geweest. Deze onderzoeken beperkten zich met name tot het verbeteren van klinisch inzicht in stabilisatie van deze personen (2-6).

Mogelijke negatieve effecten van hersendood op de kwaliteit van donororganen en de effecten op de functie na transplantatie zijn echter tot op heden geen onderwerp van enig onderzoek geweest.



Dit is opvallend, aangezien er een consistent significant verschil in transplantatieresultaten wordt geconstateerd tussen enerzijds transplantaten afkomstig van levende donoren ( familie transplantaties en niet-bloedverwante transplantaties bij leven) en anderzijds transplantaten afkomstig van postmortale donoren (7-9). Dit zelfs ondanks het feit dat de donor-ontvanger HLA combinatie veel beter is in de postmortale transplantatie combinatie dan in de donatie-bij-leven transplantatie combinatie. De kortere koude ischamietijd bij de geplande familietransplantaties kan een beperkte rol spelen, maar is zeker niet de gehele verklaring voor het verschil in transplantatieresultaten.

Dit consistent waar te nemen verschil in transplantatieresultaten ondersteunt onze hypothese dat de niet-fysiologische en vaak turbulente fase van hersendood in de postmortale donor aanleiding is tot een afgenomen transplantaat overleving.

Dit effect zou het gevolg kunnen zijn van een immunologische respons in de orgaandonor, geactiveerd door de centrale catastrofe, de hersendood. De gedachte van inductie van schade en immunologische activatie van de donororganen is gebaseerd op een gewijzigd inzicht in de immunologie. In de laatste paar jaar hebben verscheidene auteurs beschreven dat het drijvende mechanisme achter een immuunreactie de noodzaak is om gevaar te herkennen (10-12). Dit in tegenstelling tot de historische aanname, dat een immuunreactie gedreven wordt door lichaamseigen versus lichaamsvreemd. Hersendood zou goed als fase van "significant gevaar" door het lichaam geïnterpreteerd kunnen worden en derhalve een adequate immunologische reactie kunnen activeren. Immuungeactiveerde donororganen worden dan getransplanteerd in niet HLA-identieke ontvangers, hetgeen aanleiding geeft tot een versnelde allorespons in de ontvanger tegen het donororgaan leidend tot een toename van de mate van acute en chronische afstoting.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had tot doel na te gaan, of de niet-fysiologische fase van hersendood in de postmortale donor immunologische activatie van de potentiële donororganen induceert met als gevolg het hierboven beschreven verschil in transplantatieresultaten.

Om deze hypothese te toetsen werd allereerst een hersendood model in een klein proefdier (rat) ontwikkeld. Na validatie van het model konden de eerste series experimenten worden verricht.

In het eerste onderzoek, beschreven in **Hoofdstuk III**, werden de effecten van hersendood in combinatie met hypotensie op de potentiële donorlever en -nier bestudeerd. Acute hersendood gaat altijd met hypotensie gepaard, tenzij de bloeddruk effectief wordt behandeld. De combinatie van hersendood en persisterende hypotensie is in de humane situatie bekend en gevangen onder de noemer marginale donoren. De resultaten van transplantatie van organen van dergelijke donoren zijn significant slechter dan die van niet-hypotensieve donoren. Dit zou kunnen duiden op toegenomen schade in hypotensieve donoren.



Aan de hand van standaard serum parameters en immunologische parameters werden de effecten van korte (1 uur) en een langdurige (6 uur) expositie aan de fase van hersendood op de potentiële donorlever en –nier bestudeerd. De gegevens werden vergeleken met die van een niet-hersendode normotensieve controle groep. Om mogelijke effecten van hypotensie op zich uit te sluiten werd tevens een controle groep bestaande uit hypotensieve niet-hersendode controle ratten bestudeerd. Orgaandisfunctie werd geconstateerd na hersendood inductie aan de hand van verhoogde concentraties van de leverfunctieparameter aspartaat transaminase (113 vs. 253 vs. 272 in controle ratten, 1 uur en 6 uur hersendode ratten respectievelijk) en nierfunctieparameter creatinine (43 vs. 87 vs.178). Daarnaast was een duidelijke immunologische activatie aantoonbaar waarbij er sprake was van een toegenomen expressie van celadhesiemoleculen en een influx van leukocyten in het nier- en leverweefsel. Deze effecten werden niet veroorzaakt door de hypotensie als zodanig, aangezien er geen aantoonbaar verschil was tussen de normotensieve en hypotensieve niet-hersendode controle groepen.

Om de effecten van hersendood zonder de beïnvloeding van hypotensie vast te stellen werd bij volgende experimenten gebruik gemaakt van een normotensief hersendood model. In **Hoofdstuk IV** en **V** worden de effecten van hersendood op lever- en nierweefsel afzonderlijk bestudeerd. In de in deze hoofdstukken beschreven serie experimenten werden ratten vrijgesteld aan korte en langere periodes van hersendood in aan- en afwezigheid van hemodynamische instabiliteit. Ratten werden willekeurig in een van de zes groepen geplaatst: óf in een van de twee sham geopereerde niet-hersendode controlegroepen (gedood één of zes uur na de shamoperatie) óf in één van de vier hersendood groepen. Deze ratten werden gedood één of zes uur na het begin van de aanvang van hersendood. Twee van deze groepen, de één en zes -uur optimale donoren, kregen tijdens de hersendoodfase haemodynamische ondersteuning om normotensief te blijven. In de twee andere hersendoodgroepen, de marginale donoren, werd hypotensie niet bestreden. Opnieuw werden standaard serum parameters bestudeerd. Immunactivatie van de organen werd in meer detail onderzocht.

In **Hoofdstuk IV** worden de effecten van hersendood op leverweefsel weergegeven. In dit hoofdstuk wordt aan de hand van leverspecifieke  $\alpha$ -GST aangetoond dat leverdisfunctie progressief met de duur van hersendood optreedt. In marginale donoren is de leverdisfunctie meer uitgesproken. Onafhankelijk van de haemodynamische status vond er een immunologische activatie plaats progressief met de duur van hersendood. Een toegenomen expressie van celadhesie moleculen werd geconstateerd, waarbij tevens een instroom van leukocyten werd geconstateerd. De leukocyten in het weefsel bleken met name uit polymorfonucleaire granulocyten (PMN's) te bestaan, waardoor de immuun reactie het meest lijkt op een niet-specifieke immuunrespons.



In **Hoofdstuk V** worden vergelijkbare resultaten bij nierweefsel beschreven. Afgenomen functie kon aan de hand van toename van het serum creatinine worden vastgesteld. Zowel de activatie van cel adhesie moleculen als de instroom van leukocyten in het nierweefsel werden waargenomen, zoals geconstateerd in het leverparenchym. Uit deze onderzoeken kon worden geconcludeerd, dat de fase van hersendood progressief lever- en nierfalen induceert die wordt bevorderd door de aanwezigheid van haemodynamische instabiliteit in de donor. Tevens induceert hersendood een niet-specifieke immuunrespons onafhankelijk van de hemodynamische stabiliteit. Eén en dezelfde respons werd in beide bestudeerde organen gezien wat wijst op een algemene respons en niet op een orgaanspecifieke reactie.

Als onderdeel van een ontstekingsproces, zoals beschreven in het lever- en nierweefsel in **Hoofdstuk IV** en V, zijn inflammatoire mediators en acute fase proteïnen in verhoogde concentraties aanwezig. Naast hun effect op ontstekingsreacties kunnen deze substanties ook vitale processen zoals apoptose beïnvloeden en eventueel veranderingen in de metabole capaciteit van de lever teweegbrengen. De mogelijke nadelige inductie van apoptose, geprogrammeerde celdood, kan vooral door TNF- $\alpha$ , één van de centrale ontstekingsmediators, worden geactiveerd. Anderzijds kan TNF- $\alpha$  juist een beschermend effect hebben door apoptose tegen te gaan ten gevolge van activatie van de NF $\kappa$ B gereguleerde overlevingsroute. In **Hoofdstuk VI** wordt het onderzoek beschreven naar de vraag, of de inflammatoire respons in de lever in hersendode donoren vergezeld gaat van de inductie van apoptose met het vrijkomen van apoptose gereguleerde proteïnen. Tevens werd onderzocht, welke van de hoofdroutes leidend tot eventuele apoptose werd geactiveerd: de cell surface mediated pathway of de mitochondrial pathway. Een duidelijke toename van de apoptotische activiteit werd geconstateerd aan de hand van verhoogde caspase 3 enzym activiteit, een down stream effector caspase. TUNEL kleuring liet zien dat de apoptotische cellen voornamelijk hepatocyten zijn. mRNA waarden van alle cytokine geïnduceerde activatoren (Fas, Bid) en remmers (A1, BCL-x, cIAP) van beide tot apoptose leidende hoofdroutes waren in het leverweefsel van hersendode donoren significant hoger dan in het leverweefsel van niet-hersendode controle ratten. Op grond van deze resultaten hebben wij geconcludeerd, dat activatie van de anti-apoptotische pathway minder krachtig is dan de activatie tot inductie van apoptose, netto leidend tot apoptose. Inductie van apoptose vond plaats via beide hoofdroutes. Een dergelijke aanzet tot apoptose is al eerder beschreven voor hepatocyten, echter onder andere omstandigheden. De toegenomen apoptose kan bijdragen tot een verminderde levensvatbaarheid van het transplantaat. Derhalve kan in de toekomst het voorkomen van het ontstaan van apoptose de levensvatbaarheid van donororganen verbeteren.

Cytokinen, welke bij het proces van apoptose betrokken zijn, kunnen de metabole capaciteit van de lever beïnvloeden. Een afgenomen metabole capaciteit van de lever zou direct gevolgen hebben voor de functie van het transplantaat na transplantatie.



Op basis hiervan werd in **Hoofdstuk VII** de metabole capaciteit bestudeerd waarbij gebruik werd gemaakt van levers van zes uur hersendode normotensieve ratten. De levers van deze dieren werden bij uitname geperfundeed met koude University of Wisconsin oplossing (UW). Van elke lever werden meerdere dunne plakjes gesneden (liver slice model) wat de mogelijkheid bood meerdere experimenten per lever uit te voeren. De leverarchitectuur blijft in dit model intact met mogelijk eventuele gevolgen voor cel-cel interacties. De testen werden uitgevoerd na uitspoelen van de UW oplossing en reoxygenatie in een incubatiemedium. De integriteit van de levercel werd bestudeerd door het meten van het ATP gehalte en van de door ATP gedreven ureumsynthese. Cytokine productie in de niet-parenchymale cellen van de lever (Kupffer- en endotheelcellen) werd gecontroleerd aan de hand van de productie van interleukinen (IL-10 en IL-1B) en opregulatie van inducible Nitric Oxide Synthesis (iNOS) met meting van eindproduct NOx. Effecten op de metabole capaciteit werden bestudeerd door analyse van fase 1 en 2 metabolisme van standaard oplossingen. Hersendood gevolgd door preservatie en reoxygenatie bleek geen effect te hebben op de celintegriteit. Tijdelijke immunologische activatie van Kupffercellen trad op. Activatie van endotheelcellen bleek duurzaam. In de levers van hersendode donoren werd een opregulatie van iNOS en een verhoogde productie van NOx geconstateerd. Ondanks het feit dat deze parameters op cytokine release wijzen, konden geen significante verschillen in metabole capaciteit van de lever worden waargenomen.

Alle voorgaande beschreven onderzoeken wijzen er op dat de hersendoodfase immunologisch geactiveerde en minder inerte donororganen oplevert met als mogelijk gevolg een toegenomen immuunrespons in de ontvanger met uiteindelijke mogelijk nadelige consequenties voor de transplantatoverleving. Om deze laatste stap te onderzoeken werd een transplantatie-experiment uitgevoerd, beschreven in **Hoofdstuk VIII**. Donorlevers werden uitgenomen uit zes uur normotensieve hersendode ratten en niet-hersendode controle ratten. Na explantatie werden de levers óf gespoeld met UW oplossing en direct getransplanteerd óf gespoeld en gepreserveerd in UW oplossing gedurende 20 uur alvorens in syngene ontvangers te worden getransplanteerd. Orgaanfunctie in de ontvanger en overleving werd gedurende 14 dagen bepaald. De overleving van ontvangers van een lever van een niet-hersendode controle donor was 100%, ongeacht of de levers gedurende 20 uur gepreserveerd dan wel direct getransplanteerd waren. De overleving van ontvangers van een lever van een hersendode donor zonder preservatie nam af tot 75% (6/8). Van de groep, waarbij de lever afkomstig was van een hersendode donor en aansluitend 20 uur was gepreserveerd voor transplantatie, overleefde slechts 20 %. Biopsies van deze levers toonden pericentrale necrose en vacuolisatie van de hepatocyten. Dergelijke histologische bevindingen passen bij het beeld van primaire disfunctie. Dit onderzoek toont aan dat de hersendood geïnduceerde veranderingen in de donorlever de lever meer gevoelig maken voor preservatie- en reperfusieschade. Na transplantatie resulteert dit in een toegenomen allorespons en een afgenomen transplantatoverleving.



Gelijktijdig met onze inspanningen om de effecten van hersendood op de donororgaan-kwaliteit te bestuderen voerde de groep van Tilney van de Harvard Medical School een niertransplantatie onderzoek uit gebruik makend van 6 uur hersendode ratten als donor (13). De donor-ontvanger combinatie in dit transplantatie experiment werd zodanig gekozen dat er standaard sprake is van een vertraagd acuut afstotingsproces. Zij waren in staat een versnelde afstoting na transplantatie aan te tonen indien donorlevers waren verkregen uit hersendode donoren in plaats van uit niet-hersendode controle dieren. Deze resultaten bevestigden de hypothese van hersendood inducerende schade in een nier transplantatie model in overeenstemming met onze resultaten in het levertransplantatie model.

Als vervolg op onze experimentele resultaten, waarin het bewijs werd geleverd voor een door hersendood geïnduceerde immunologische activatie van potentiële donororganen, werd door onze groep een onderzoek gestart naar de effecten van hersendood in humane donoren. Het routinematig verrichten van een bioptie uit de nier van de donor voor preservatie, na preservatie en na reperfusie werd geïnitieerd. Immunohistochemisch analyse en semiquantitatieve reverse transcriptase polymerase chain reaction (rt-PCR) werden verricht op biopten van 27 postmortale en 34 familietransplantatie donoren. De resultaten van dit onderzoek bevestigden de inductie van endotheel cel activatie aan de hand van significant verhoogde expressie van E-selectine. Een verschil in intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) en vascular cel adhesion molecule-1 (VCAM-1) werd echter niet geconstateerd tussen beide groepen. De influx van leukocyten was, net zoals in de biopten van de ratten nieren, wel verhoogd in hersendode donoren. Daarnaast werd een significante toename van beschermende eiwitten heme oxygenase(HO)-1 en heat shock proteïn 70 geconstateerd. De transplantatie resultaten bevestigde de toegenomen kans op het ontstaan van delayed graft function en de afgenomen overleving van organen afkomstig van hersendode donoren ten opzichte van levende donoren. De mate van ICAM-1 en VCAM-1 expressie en een toegenomen influx van leukocyten in het biopt waren geassocieerd met verhoogde creatinine concentraties en afgenomen creatinine klaring na transplantatie, met name in de postmortale transplantatie combinatie. Een beschermend effect van de overexpressie van HO-1 op patiënt en orgaan overleving kan alleen geconstateerd worden in de nieren van levende donoren, waarschijnlijk door de overmaat aan schade welke optreed tijdens de hersendoodfase (14).

Koo van de groep van Fuggle in Oxford toonde ook endotheelactivatie bij humane nierbiopten van postmortale donoren aan (15). In hun onderzoek werd een immunohistochemische vergelijking gemaakt tussen enerzijds post-reperfusie biopten van postmortale donoren en anderzijds die afkomstig van levende donoren (familietransplantaties). Zij constateerden een toegenomen expressie van E-selectine op het endotheel in biopten van postmortale donoren naast het vrijkomen van HLA-DR antigenen. In tegenstelling tot onze klinische resultaten toonden zij een toegenomen expressie van celadhesie moleculen ( ICAM en VCAM) in de proximale tubuli aan.





Tevens zagen zij, dat er een causaal verband bestaat tussen de expressie van tubulaire antigenen in de pretransplantatie biopten en een vroege acute afstoting van het donororgaan. Zowel het werk uit Oxford als onze klinische resultaten laten zien dat de fase van hersendood bij mensen en dieren vergelijkbare processen in gang worden gezet, met negatieve effecten op de orgaanfunctie na transplantatie. Hoewel het optreden van vroege acute afstoting meestal succesvol behandeld kan worden hebben deze organen een grotere kans op een afgenomen transplantaatfunctie met een aantoonbare lagere transplantatoeverleving (16,17).

Gebaseerd op voorgaande onderzoeksresultaten kan verbetering van de donororganen bereikt worden door het voorkómen van activatie van ontstekingsmediatoren tijdens de hersendood fase. Pratschke et al. van de groep van Tilney voerden als eerste een interventieonderzoek uit met de intentie de immunologische activatie te onderdrukken met een veelbelovend resultaat (18). In een niertransplantatie experiment werden vier groepen F344 ratten als orgaandonor en Lewis ratten als ontvangers gebruikt. In deze donor-ontvanger combinatie treedt het acute afstotingsproces vertraagd op, waardoor donorgelateerde veranderingen sterker tot uiting komen. In drie van de vier donorgroepen werd hersendood geïnduceerd. Eén groep functioneerde als niet-hersendode controle groep. Na hersendood werden de donoren óf niet behandeld óf geïnjecteerd met glucocorticosteroïden óf geïnjecteerd met oplosbare liganten van P-selectine (sPSGL). De steroïden werden toegediend ter vermindering van het vrijkomen van inflammatoire cytokine, sPSGL ter voorkoming van leukocyt adhesie op de geactiveerde endotheelwand van het transplantaat met als oogmerk de influx van leukocyten te voorkomen. In pretransplantatie biopten van de nieren van de controle groep en de behandelde hersendode groepen werd een relatief beperkte influx van cellen geconstateerd ten opzichte van de niet behandelde hersendode donoren groep. In biopten van niertransplantaten van ontvangers van niet behandelde hersendode donoren waren significant sneller aanwijzingen voor acute afstoting te constateren en stierven de ontvangers duidelijk eerder aan nierfalen dan de controlegroep. De ontvangers van behandelde nieren lieten een overleving zien vergelijkbaar met de niet-hersendode controlegroep en significant beter dan de onbehandelde transplantaten. Dit onderzoek toont aan, dat de negatieve effecten van hersendood kunnen worden tegengegaan in het ratten model. Een optimale behandeling voor- en het moment van aanvang van behandelen zullen onderwerp van toekomstige onderzoeken moeten zijn. Om therapeutische opties te verbeteren is het noodzakelijk een goed inzicht te krijgen in de oorzaak die leidt tot de beschreven immuunactivatie. Daarom zijn wij nu gestart met een reeks onderzoeken, waarbij met behulp van de DNA micro arrays techniek in meer detail veranderingen tijdens hersendood worden vastgelegd (19). Zowel ratten als menselijk weefselbiopten worden getest op de expressie van meerdere genen. In het eerste experiment waarbij nierweefsel van zes uur hersendode ratten werd bestudeerd werden mogelijk interessante en te onderzoeken genen gecategoriseerd in verschillende functionele groepen: metabolisme/transport, ontsteking/stolling, cel splitsing/ fibrose en afweer/herstel.



Daarnaast werden genen die coderen voor transcriptie factoren en eiwitten betrokken bij signaalverwerking geanalyseerd. In dit onderzoek konden wij aantonen dat hersendood via activatie van transcriptie factoren en signaalverwerkende cascades leidt tot activatie van verschillende “effector”genen. Naast activatie van genen die betrokken bij ontsteking en fibrosering kon ook de activatie van genen die beschermen en voor herstel belangrijk zijn worden geconstateerd. Een vergelijkbaar onderzoek nu gebruikmakend van humaan donor en ontvanger weefsel wordt nu uitgevoerd. De resultaten van dit experiment zullen ons in staat stellen om de mogelijkheden tot gerichte cytoprotectieve interventies beter te onderzoeken om zodoende de donor orgaan kwaliteit te verbeteren vóór preservatie en transplantatie. De resultaten van dit proefschrift laten zien dat de fase van hersendood niet langer moet worden gezien als een statisch gegeven, maar als een dynamisch proces dat de kwaliteit van potentiële donororganen significant negatief kan beïnvloeden. Nadelige effecten van hersendood kunnen beperkt worden door de duur van de hersendoodfase zo kort mogelijk te houden en hemodynamische instabiliteit in de hersendode donor te voorkomen. De eerste experimenten waarbij de hersendode donor met behulp van weinig selectieve therapie wordt behandeld laten een afname van de immuunrespons zien na transplantatie en een betere overleving in diermodellen.

De tot op heden verkregen gegevens over de effecten van hersendood en onfysiologische stress op orgaanfunctie zijn een begin. Alhoewel inmiddels een tip van de sluier wordt opgelicht over de mechanismen die hierbij een cruciale rol spelen is de bijdrage van dit proefschrift slechts een tipje van de ijsberg. In de komende jaren zal gericht moeten worden gezocht naar cytoprotectieve behandeling die de kwaliteit van het donororgaan verbeterd en de functie en overleving doet toenemen danwel op niveau houden tegen de achtergrond van de toename van oudere en slechtere donoren.

Een ander interessant aspect is dat dit onderzoek, nu zo logisch gefocussed op transplantatie, ook van belang kan zijn bij het verkrijgen van nieuwe inzichten ten aanzien van invasieve (chirurgische) behandelingen in het algemeen, met andere woorden de balans tussen stress, injury en repair.