



## **Samenvatting proefschrift L.H. Venema**

“Strategies to improve donation after circulatory death kidneys for transplantation.”

**Promotie: 25 augustus 2021  
Rijksuniversiteit Groningen**

### **Promotores:**

Prof. Dr. H.G.D. Leuvenink  
Prof. Dr. R.J. Ploeg

### **Beoordelingscommissie:**

Prof. Dr. Bente Jespersen  
Prof. Dr. Ina Jochmans  
Prof. Dr. Jan-Luuk Hillebrands

De wereldwijde behoefte aan geschikte organen voor transplantatie is vele malen hoger dan het aantal beschikbare organen. In 2018 stonden er in de Eurotransplant regio meer dan 10.000 patiënten geregistreerd op de wachtlijst voor een nier en meer dan 100.000 patiënten in de Verenigde Staten. Deze enorme aantallen laten zien hoe ernstig de tekorten zijn. Slechts een kleine minderheid van de patiënten komt überhaupt op een wachtlijst terecht vanwege de strenge eisen die gesteld worden. Hierdoor zijn wachtlijsten alleen niet representatief en is het probleem dus nog groter dan deze wachtlijst aantallen weergeven. Samenvattend, er is een schrijnend tekort aan organen voor transplantatie.

De schaarste in organen heeft al geleid tot meer gebruik van oudere orgaandonoren, donoren met co-morbiditeit en donoren die zijn overleden na een circulatie stop (DCD-donoren). Organen verkregen van deze donoren zijn over het algemeen van mindere kwaliteit vergeleken met de historische standaard criteria donoren. Echter, deze maatregelen alleen zijn onvoldoende om het probleem op te lossen en extra opties moeten worden bekeken om het huidige aanbod verder te vergroten.

Orgaan preservatie is een fundamenteel gedeelte van een donatie- en transplantatieprocedure en betreft de periode tussen uitname van het orgaan bij een donor tot plaatsing in de ontvangende patiënt. Statische koude preservatie (Static cold storage, SCS) was tot voor kort nog de gouden standaard. Echter, het toenemende gebruik van organen van mindere kwaliteit heeft geresulteerd in de noodzaak om meer dynamische preservatie strategieën toe te passen. Ook wel machine preservatie (MP) genoemd. De gemene deler in de zoektocht naar meer geschikte organen voor transplantatie is het gebruik van MP. MP biedt namelijk de mogelijkheid om organen



(cellen) te voorzien van zuurstof en voedingsmiddelen tijdens de preservatie fase en hierdoor de stofwisseling te ondersteunen.

Organen welke zijn uitgenomen voor transplantatie ondergaan een periode zonder bloedtoevoer (ischemie) wat resulteert in een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen en uiteindelijk in cel schade of zelfs celdood. Echter, het daadwerkelijke proces van schade wordt ondervonden na transplantatie wanneer er weer bloedtoevoer is. Dit wordt ischemie reperfusie schade (IRI) genoemd. IRI is een multifactorieel pathofysiologische conditie welke resulteert in nier dysfunctie, acute afstoting en verminderde nier transplantaat overleving. Het verbeteren van orgaankwaliteit focust zich op het verminderen van IRI door tijdens de preservatie, stofwisseling van organen te ondersteunen door het toedienen van zuurstof en nutriënten.

Dit proefschrift richt zich op verschillende tactieken om de aantallen en kwaliteit van nieren verkregen van DCD-donoren te verbeteren. In het eerste gedeelte exploreren we het mogelijke gebruik van “unexpected donation after circulatory death donors (uDCD)”. Dit is een potentiële DCD-donor welke overlijdt op de spoedeisende hulp (SEH) als gevolg van een hartstilstand en welke mogelijk tot veel extra nieren (en longen) voor donatie kan leiden. Daarnaast, focussen we op het gebruik van verschillende MP-strategieën voor nieren.

In **hoofdstuk 2**, bespreken we de implementatie van een uDCD protocol in drie Nederlandse transplantatiecentra. Tijdens dit project bekeken we de mogelijkheid van orgaandonatie vanaf de SEH. Elke patiënt die binnenkwam na een hartstilstand binnen de gestelde leeftijdscriteria (<50 jaar voor nieren, <65 jaar voor longen) werd gescreend op een mogelijke donatie. De gestelde inclusiecriteria waren een doodsverklaring op de SEH, dat er iemand getuige was van de hartstilstand, start reanimatie binnen 10 min en dat de ambulance de reanimatie over nam binnen 20 minuten. Tijdens de 19 maanden dat dit project liep werden er in totaal 553 patiënten gezien op de een van de SEH met een hartstilstand waarvan 248 (44,8%) het voorval overleefden. In totaal werden er 87 en 42 potentiële long en nierdonoren geïdentificeerd op basis van de gestelde inclusiecriteria. Ondanks dat deze aantallen erg bemoedigend lijken, resulteerde geen enkele potentiële donor tot een daadwerkelijke donor vanwege vele redenen.

Aangezien de uDCD pilot uit **hoofdstuk 2** niet resulteerde in donatie en transplantatie maar er meerdere landen succesvol zijn in uDCD donatie waren we benieuwd naar de demografie van de gebieden waar men succes heeft met deze vorm van donatie. In **hoofdstuk 3** hebben we Nederlandse reanimatie databases geanalyseerd en gebieden met verschillende demografieën vergeleken. Deze databases hebben we naast de data van de uDCD pilot gezet en vergeleken met data van succesvolle uDCD programma's uit Spanje, Frankrijk en Rusland. De populatiedichtheid in combinatie met de grote van een gebied heeft een significant effect op de kans een potentiële donor te includeren als daadwerkelijke donor. De conclusie die we hieruit konden



trekken is dat het aan te raden is een uDCD programma alleen in een grote stad te starten om het succes te vergroten.

Ondanks dat het gebruik van MP standaard lijkt te worden in de klinische donatie en transplantatie setting, is er nog steeds onduidelijkheid over hoe en waarom het voordelig is om toe te passen. Voor preklinisch transplantatie onderzoek zijn varkensnieren zeer geschikt vanwege hun vergelijkbare anatomie en fysiologie. In **hoofdstuk 4** evalueren we of nieren verkregen uit een commercieel slachthuis mogelijk een bruikbaar onderzoeksmodel kunnen zijn voor transplantatie en preservatie onderzoek zodat we geen laboratorium varkens hoeven te gebruiken. Om verschillende gradaties schade te onderzoeken hebben we de

varkensnieren onderworpen aan variabele warme ischietijden (WIT) en preservatie technieken. Vervolgens hebben we ze geperfundeed met twee verschillende perfusie vloeistoffen welke gebaseerd zijn op autoloog bloed om zo de nierfunctie en schade te testen. Het effect van WIT en preservatie techniek waren duidelijk zichtbaar tijdens reperfusie op functiemarkers zoals creatinine klaring en de fractionele natrium terugresorptie. Slachthuis varkensnieren blijken een geschikt alternatief voor laboratoriumvarkens voor transplantatie en preservatie gerelateerde onderzoeksvragen.

Hypotherme machine perfusie (HMP) zonder actieve zuurstof toediening is standaard zorg aan het worden in vele transplantatiecentra voor de preservatie van nieren verkregen van overleden donoren in plaats van SCS. De mogelijke rol en veiligheid van het toedienen van zuurstof tijdens HMP is nog niet goed uitgezocht en daarom hebben wij verschillende zuurstofconcentraties (0, 21 en 100%) toegediend tijdens HMP en functie en oxidatieve stress beoordeeld in ons varkens slachthuis DCD-model in **hoofdstuk 5**. We vonden een significant betere nierfunctie in alle nieren welke gepreserveerd waren met HMP vergeleken met SCS. Echter zagen we geen effect van de verschillende zuurstofconcentraties. De toediening van zuurstof tijdens HMP resulteerde wel in minder oxidatieve stress en een verbeterde energy status. Belangrijke uitkomst is dat het toedienen van zuurstof veilig lijkt en er geen nadelige effecten optraden.

In **hoofdstuk 6** onderzochten we of een niet-fosfaat gebufferde preservatie oplossing (AQIX® RS-I) in combinatie met een colloïd (Bovine serum albumine (BSA) of Dextraan 40), met of zonder rode bloedcellen (RBC) kon dienen als substituut voor een op bloed gebaseerde perfusie oplossing tijdens normotherme machine perfusie (NMP). Wanneer RBC aanwezig waren zagen we een toename in zuurstofconsumptie die 4-6 hoger was dan zonder RBC. Tijdens reperfusie maten we nier en tubulaire metabolische markers en deze waren allemaal hoger wanneer er RBC aanwezig waren in het perfusie medium. Hierdoor kwamen wij tot de conclusie dat RBC nodig zijn om niermetabolisme te supporten tijdens NMP. De op bloed-gebaseerde controlegroep



gaf de beste resultaten, echter, leek de Aqix met BSA en RBC een mogelijke vervanging op basis van de resultaten.

In **hoofdstuk 7,8 en 9** hebben we het slachthuis DCD-model gebruikt om potentieel protectieve medicatie tegen IRI getest in verschillende fases van een transplantatie setting. In **hoofdstuk 7** hebben we een mitochondrieel protectief medicament (SUL-138) toegevoegd tijdens 24 uur HMP zonder zuurstof. De hypothese was dat wanneer de mitochondriën beter gepreserveerd zouden zijn dit zou resulteren in een verbeterde nierfunctie en minder schade tijdens 4 uur NMP. We zagen echter geen significante verschillen in de gemeten parameters behalve voor aspartate aminotransferase (ASAT). In dit model hebben we geen significantie

voordelen in nierfunctie kunnen vinden in nieren die behandeld waren met SUL-138. De lagere ASAT-waarden zouden mogelijk indicatief zijn voor verbeterde mitochondriële functie.

**Hoofdstuk 8** bestudeert het potentiële protectieve effect van metformine in het verminderen van IRI in nieren. In deze studie hebben we zowel het pre-conditioneren als post-conditioneren getest in een rat en varkensmodel. Ratten werden gepre-conditioneerd met twee verschillende doseringen (laag: 30 mg/kg en hoog: 300 mg/kg) voordat de nieren uitgenomen werden om vervolgens normotherm geperfundeed te worden met een van deze doseringen of met saline als controle. In het varkensmodels werden de nieren normotherm geperfundeed met een toenemende dosis metformine tijdens een totale duur van 4 uur. Metformine pre-conditioning van ratten nieren resulteerde in minder schade markers in het perfusaat en minder eiwit in de urine. Post-conditioning van ratten nieren resulteerde in een dosis-afhankelijke vermindering van tubulaire cel necrose en vacuolatie. De combinatie van beide had invloed op genexpressie van endotheel activatie en ontsteking. Het enige effect wat we konden aantonen in de varkens nieren was een verhoogde expressie van heat shock proteïne 70 in de metformine behandelde nieren. De combinatie van resultaten geeft niet een duidelijk antwoord op hoe je metformine het beste kunt gebruiken als nier-beschermende strategie aangezien pre- en postconditioning en de combinatie van beide uiteenlopende resultaten geeft.

Het is bekend dat metformine in patiënten met nierfalen kan leiden tot accumulatie van metformine welke melkzuuracidose als gevolg heeft. Metformine wordt actief uitgescheiden door de proximale tubuli en het is bekend dat metformine mitochondriën kan inhiberen. We waren daarom benieuwd of de toediening van metformine voor en tijdens NMP, effect heeft op de uitscheiding en dit hebben we bekeken in **hoofdstuk 9**. Dezelfde experimentele opzet als beschreven in **hoofdstuk 8** hebben we hiervoor gebruikt. We vonden dat de metformine uitscheiding 4-5 keer hoger is dan de creatinine uitscheiding in beide modellen. Daarnaast kwam naar voren dat metformine klaring minder werd wanneer de concentratie van het medicijn toenam. Dit effect kon verklaard worden door saturatie van de metformine transporters. Er was geen indicatie



dat de tubulaire functie veranderd was door toediening van hoge (*in vivo* toxische concentraties) metformine concentraties. Hierdoor concluderen we dat de toediening van metformine tijdens MP veilig is voor de nier zelf.

In dit proefschrift komen verschillende strategieën aan bod om de aantallen en kwaliteit van nieren voor transplantatie te vergroten. Machine perfusie zal een belangrijke rol spelen in de toekomst van orgaantransplantaties. Echter, is het belangrijk om onze kennis betreffende biologische mechanismen tijdens *ex vivo* orgaan perfusie te vergroten. De MP-modellen beschreven in dit proefschrift zijn bruikbaar om onze kennis te vergroten.