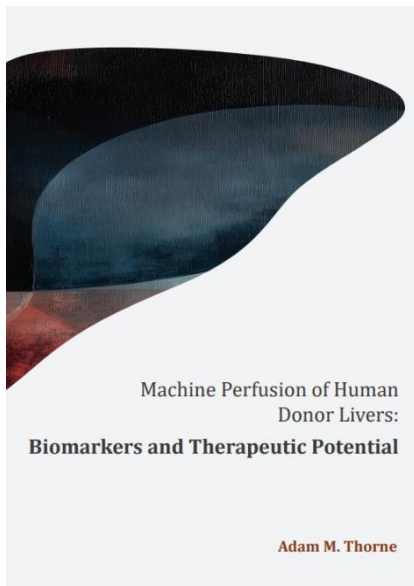




Samenvatting proefschrift A.M. Thorne

“Machine Perfusion of Human Donor Livers:
Biomarkers and Therapeutic Potential”

**Promotie: 7 mei 2025
Rijksuniversiteit Groningen**

Promotors:

Prof. V.E. de Meijer
Prof. R.J. Porte
Prof. F. Kuipers

Co-promotors:
Dr. J.C. Wolters

In deze thesis worden omics-technologieën gebruikt om moleculaire biomarkers en biologische processen van donorlevers te onderzoeken tijdens de ex vivo preservatie. Hiermee wordt geprobeerd om een beter inzicht te krijgen in de onderliggende mechanismen die betrokken zijn bij schade, herstel, levensvatbaarheid en de uitkomsten van therapeutische interventies.

Hypotherme (4-12°C) perfusie leidt tot resuscitatie van ECD-levers, en daarbij een vermindering van ischemie-reperfusieschade ten tijde van transplantatie. Echter, de lage metabole activiteit bij koude temperaturen belemmert de identificatie en beoordeling van functionele biomarkers in deze omstandigheden. Flavine-mononucleotide (FMN), een cofactor van mitochondriaal complex I, is voorgesteld als een potentiële biomarker die de functie van het transplantaat tijdens hypothermic machineperfusie kan voorspellen en mitochondriale schade weerspiegelt. Echter, eerder onderzoek naar FMN als biomarker is beperkt gebleven tot single-center studies en vereist externe validatie in internationale cohorten voordat het breed klinisch kan worden toegepast. **Hoofdstuk 2** heeft als doel FMN te valideren als een marker die transplantaatfunctie voorspelt tijdens (duale) hypotherme geoxygeneerde machineperfusie ([D]HOPE). Perfusaatsamples verkregen tijdens (D)HOPE werden verzameld uit 10 centra in 7 landen en centraal geanalyseerd. Onze bevindingen tonen aan dat fluorometrische FMN-niveaus significant correleren met massaspectrometrieanalyses. Daarnaast correleren FMN-waarden in perfusaat significant met symptomatische niet-anastomotische strictuur (NAS), evenals nierfalen waarvoor nierfunctie-vervangende therapie nodig was, en FMN presteerde beter in het voorspellen van transplantaatverlies vergeleken met conventionele scores gebaseerd op donor- en ontvangerkarakteristieken. We observeerden ook dat lage mitochondriale FMN-niveaus in het weefsel van niet-gebruikte levers correleerden met hoge FMN-niveaus in het perfusaat. De bevindingen van dit hoofdstuk ondersteunen de voorspellende waarde van FMN tijdens koude perfusie van humane donorlevers en kunnen bijdragen aan een verbeterde risico-inschatting van ECDlevers voorafgaand aan transplantatie.

In tegenstelling tot koude perfusie, is normotherme machine perfusie (NMP) in de afgelopen jaren uitgebreid onderzocht. Door de hoge metabole activiteit maakt NMP een uitgebreidere functionele



evaluatie van donorlevers mogelijk. De combinatie van hepatocellulaire functiemarkers in het perfusaat en cholangiocellulaire functiemarkers in gal heeft geresulteerd in de succesvolle transplantatie van initieel afgewezen donorlevers. Klinische kwaliteitsparameters zijn uitgebreid geëvalueerd, maar moleculaire processen die de kwaliteit kunnen beïnvloeden, met name in gal, blijven onderbelicht. NMP maakt eenvoudige en herhaalde verzameling van gal mogelijk voor analyse. Echter, de samenstelling van gal, rijk aan detergenten, zouten en lipiden, maakt het een uitdagend monstertype voor massaspectrometrieanalyse. We hebben in **hoofdstuk 3** verschillende in-house en kit-gebaseerde eiwitdigestiemethoden geëvalueerd om de proteomics data independent acquisition mass spectrometry (DIA LC-MS/MS)-workflows te optimaliseren. We ontdekten dat methoden waarbij eiwitten werden geprecipiteerd vóór digestie in alle gevallen gelijkwaardig waren aan of beter presteerden dan ruwe (niet-geprecipiteerde) methoden. Hoewel er verschillen in eiwitprofielen werden waargenomen tussen de methoden, bleef een kernset van eiwitten consistent in alle benaderingen. Daarnaast werd biologische variatie opgemerkt tussen oudere en jongere donoren, waarbij oudere donoren een verhoogde immuunrespons vertoonden en jongere donoren een hogere metabole activiteit.

Voortbouwend op de resultaten uit **hoofdstuk 3**, onderzoeken we in **hoofdstuk 4** veranderingen in de eiwit profielen van gal afkomstig van klinische NMP-levers, wat moleculair inzicht biedt in schade- en herstelmechanismen. Levers werden gecategoriseerd op basis van galwegschade (bile duct injury score [BDI]) en testcriteria om respectievelijk histologische en functionele uitkomsten te beoordelen. Histologische analyse toonde aan dat levers met lage BDI-scores een geschikte galchemie hadden voor transplantatie, terwijl levers met hoge BDI-scores minder voorspelbaar waren, wat suggereert dat histologie alleen onvoldoende is om de galwegfunctie te bepalen. Eiwit-analyse toonde een initiële flush-out van cellulair debris aan, wat wijst op vroege schade na statische koude bewaring. Bij levers die voldeden aan de testcriteria en werden getransplanteerd, waren regeneratieve eiwitten significant verhoogd in vergelijking met levers die ongeschikt werden geacht voor transplantatie. Eiwitten die sterk geassocieerd waren met functie en regeneratieprocessen, zoals MUC1, MUC5B en FCGBP, toonden een significante voorspellende waarde voor gunstige galsamenstelling. Bovendien konden we deze bevindingen valideren in leverweefsel, waarbij gerelateerde genen al vóór machine perfusie werden geïdentificeerd. Deze resultaten suggereren dat de huidige functiecriteria mogelijk niet volledige moleculaire veranderingen omvatten die de leverkwaliteit bepalen. De proteomics-data bieden een dieper inzicht in regeneratieve processen in cholangiocyten en benadrukken het potentieel van moleculaire profilering als objectieve beoordeling van de functie van donorlevers tijdens NMP.

Omdat de stofwisseling stijgt bij hogere temperaturen, kan de toepassing van milde hyperthermie (40°C) tijdens machineperfusie een therapeutische optie zijn voor ECD-levers, met name voor de levers met een hoog vetgehalte, om het metabolisme verder te verhogen en intracellulair vet te verbranden. De lever speelt een belangrijke rol in de regulatie van de kerntemperatuur van het lichaam en vertoont daarom significante fysiologische en metabole veranderingen in reactie op verschillende temperaturen. **Hoofdstuk 5** bespreekt de potentiële effecten van hyperthermie op leverfysiologie en metabolisme en stelt een rationale voor het gebruik van hyperthermische temperaturen voor de reconditionering van (vette) ECD-levers. Vette levers zijn bijzonder kwetsbaar voor ischemiereperfusieschade vanwege de intracellulaire vetophopingen, die perfusie belemmeren en oxidatieve stress verhogen. Door de temperatuur te verhogen, kan hyperthermie mogelijk de vorming van reactieve zuurstofspecies verminderen, de zuurstoftoevoer verbeteren en beschermende heat shockeiwitten activeren die celschade beperken. Dit hoofdstuk bespreekt de fysiologische en



metabole effecten van hyperthermie in leverperfusie en legt de basis voor experimenteel onderzoek naar deze benadering.

Hoofdstuk 6 bouwt hierop voort door de effecten van hyperthermische condities op menselijke levers te onderzoeken met behulp van twee modellen: volledige orgaanmachineperfusie en precision-cut liver slices (PCLS). De studie toonde een significante toename van triglyceriden en cholesterol aan in perfusaat na 3 uur bij 40°C, met name zeer lage-dichtheid lipoproteïne (VLDL)-deeltjes. Daarnaast waren eiwitten gerelateerd aan lipidenmetabolisme en heat shock-eiwitten verhoogd in perfusaatmonsters, hoewel 3 uur onvoldoende was om een detecteerbare eiwitrespons in leverweefsel te produceren. PCLS die gedurende 48 uur werden blootgesteld aan hyperthermische temperaturen, vertoonden na 24 uur een significante verhoging in heat shock-eiwitten vergeleken met plakjes geïncubeerd op normotherme temperaturen. Dit suggereert dat langere hyperthermische perioden nodig kunnen zijn voor een meetbare weefselrespons. Daarom kan de toepassing van milde hyperthermie tijdens langdurige perfusie een strategie zijn voor de reconditionering van ECD-levers.

Deze thesis laat zien dat de toepassing van omics-technologieën, waaronder proteomics en transcriptomics, de potentie heeft om de uitkomsten van ECD-levertransplantaties te verbeteren. Het beter begrijpen van de moleculaire mechanismen die schade, herstel en functie in donororganen aansturen tijdens machineperfusie biedt de mogelijkheid tot een verbeterde functionele beoordeling. Geavanceerde data-analyse en integratie is cruciaal om klinisch relevante inzichten te verkrijgen. Voor de vertaling van dit translationele onderzoek naar de klinische praktijk moeten omics-gestuurde onderzoeken geïntegreerd worden in klinische protocollen. Daarmee kan de preservatiestrategie verfijnd worden, de functionele beoordeling verbeterd, en uiteindelijk het de pool van organen voor transplantatie vergroot.