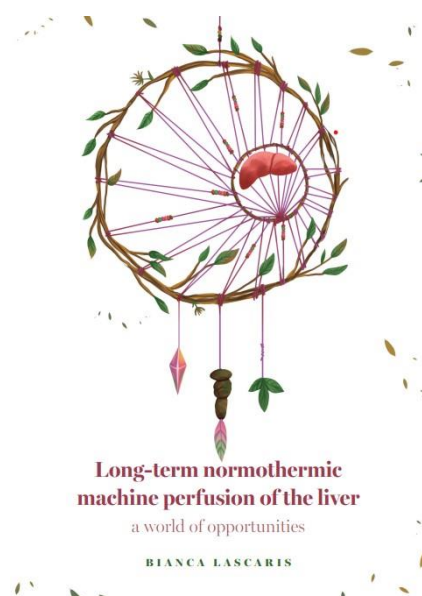




Samenvatting proefschrift B. Lascaris

“Long-term normothermic machine perfusion of the liver”

Promotie: 11 juni 2025
Rijksuniversiteit Groningen

Promotors:

Prof. dr. V.E. de Meijer
Prof. dr. R.J. Porte
Dr. M.W.N. Nijsten

Co-promotor:

Dr. Ir. A. van der Plaats

Voor de meeste patiënten met eindstadium leverfalen, sommige levertumoren of stofwisselingsstoornissen, is een levertransplantatie de enige curatieve behandeling. Als gevolg van ontwikkelingen in levertransplantatie die hebben geleid tot verbeterde uitkomsten na transplantatie en een uitbreiding van indicaties voor transplantatie bestaat er een toenemende vraag naar geschikte donorlevers. Aan deze vraag wordt tegenwoordig deels voldaan door het gebruik van “extended criteria” donorlevers die weliswaar suboptimaal zijn maar goede resultaten hebben in combinatie met machineperfusie. Met de huidige techniek van normotherme machineperfusie (NMP) worden levers die als te riskant worden beschouwd om direct te transplanteren nu op de machine geëvalueerd. Hierdoor kan een zorgvuldigere beslissing worden genomen om de lever wel of niet te transplanteren. Dit heeft geleid tot het gebruik van meer donorlevers met goede resultaten voor de ontvangers. Echter, de vraag naar donorlevers blijft groot. Lange termijn NMP (>24 uur) biedt het perspectief om nog meer donorlevers te kunnen gebruiken. Lange termijn NMP kan potentieel namelijk zorgen voor herstel of regeneratie van beschadigde levers die momenteel niet geschikt worden geacht voor transplantatie.

De studies beschreven in dit proefschrift zijn gericht op de ontwikkeling van een machine dat geschikt is voor het levensvatbaar houden van donorlevers gedurende perioden van enkele dagen of zelfs weken. Na de algemene introductie in **Hoofdstuk 1** is het onderzoek dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd onderverdeeld in drie delen. De delen zijn gericht op verschillende stappen in de ontwikkeling van lange termijn NMP en uiteindelijk de toekomstperspectieven van lange termijn NMP.

Deel 1: Geleerde lessen uit korte termijn NMP

Uitgebreide ervaring met klinische korte termijn NMP (<24 uur) in ons centrum leverde waardevolle inzichten op voor het verbeteren van de lange termijn NMP-protocollen. In **Hoofdstuk 2** onderzochten we of het verlagen van perfusiedrukken leidde tot afname van intra-hepatisch perivasculair oedeem met handhaving van een adequate zuurstofvoorziening naar de lever. Theoretisch zou oedeem kunnen leiden tot een vermindering van de diffusie- /uitwisselingscapaciteit van bepaalde stoffen en metabolieten, wat kan leiden tot verminderde zuurstofvoorziening en afname in de verwijdering van



afvalproducten. We ontdekten dat lagere perfusiedrukken resulteerden in vergelijkbare perfusie uitkomsten en posttransplantatie uitkomsten bij de ontvangers, terwijl het risico op oedeem mogelijk afnam. Met deze verlaagde drukken nam ook het gewicht van de levers na NMP af. Deze gewichtsafname heeft overigens waarschijnlijk meerdere oorzaken. De resultaten van **Hoofdstuk 8** laten een correlatie zien met een negatieve stikstofbalans, wat aangeeft dat ondersteuning van voedingsstoffen mogelijk een belangrijke factor zou kunnen zijn voor het behoud van het gewicht van de lever.

Met de introductie van machineperfusie zou er een extra risico op microbiële contaminatie kunnen ontstaan in vergelijking met de klassieke koude statische preservatie (static cold storage). In **Hoofdstuk 3** werd onderzocht of dit risico daadwerkelijk aanwezig was. Gelukkig werd er een lage incidentie van microbiële transmissie gevonden wat suggereert dat het risico tijdens machineperfusie laag is. Hoewel we geen reden vonden om ons antibioticabeleid tijdens machineperfusie aan te passen, raden we aan om routinematig microbiologische analyse van het perfusaat aan het einde van de perfusie te verrichten. Hiermee kan een mogelijke microbiële transmissie na machineperfusie tijdig opgespoord worden en de antibiotica toediening in de ontvanger eventueel worden aangepast.

Biliaire pH is een veel gebruikte vitaliteitscriteria voor de kwaliteit van de galwegen, maar de analyse is zeer gevoelig voor CO₂-diffusie van het galmonster naar de omgevingslucht. In **Hoofdstuk 4** wordt het belang van een correcte gal pH meting als criterium voor de functie van galwegen tijdens NMP benadrukt. Het verzamelen van gal onder een laagje mineraal olie en snelle analyse binnen vijf minuten kan zogenaamde pre-analytische pH veranderingen voorkomen. Biliaire bicarbonaat en glucose concentraties zijn stabielere alternatieven voor het beoordelen van de vitaliteit van de galwegen.

Deel 2: Ontwikkeling van de lange termijn NMP machine en het protocol

De bestaande klinische apparatuur voor NMP was ontoereikend om de duur van uren naar dagen of zelfs weken te verlengen. In **Hoofdstuk 5** hebben we de noodzakelijke vereisten en uitdagingen voor een lange termijn NMP machine proberen te definiëren. Essentiële onderdelen zijn het nabootsen van fysiologische kernfuncties, waaronder een kunstnier om afvalproducten te verwijderen en de stabiliteit in het perfusaat te behouden. Een grote uitdaging tijdens perfusie is het in stand houden van de homeostase van de lever in een steriele, gecontroleerde omgeving die potentieel orgaanherstel en -regeneratie mogelijk maakt. Hoewel belangrijke hoofdonderwerpen in dit hoofdstuk worden besproken, zullen vele technieken/methoden geleidelijk aan geoptimaliseerd moeten worden, zoals bijvoorbeeld de samenstelling van het perfusaat en de toediening van medicatie en voedingsstoffen.

Een van de belangrijkste componenten van lange termijn NMP lijkt een vorm van continue niervervangende therapie te zijn. Omdat de lever tijdens NMP metabolisch actief is, produceert de lever afvalproducten, zoals ureum. De studie beschreven in **Hoofdstuk 6** toonde aan dat al na 7 uur NMP de, met name ten gevolge van ureum-stijging, osmolaliteit boven de fysiologische waarden stijgt, hetgeen de lever kan beschadigen, vooral na transplantatie. Een vereenvoudigde en kosteneffectieve opstelling die continue niervervangende therapie combineert met NMP gedurende 7 dagen, handhaaft de samenstelling van het perfusaat op (bijna) fysiologische waarden. Daarnaast ontdekten we dat het ultraftraat kan worden gebruikt als alternatieve matrix om de perfusaat-concentraties van kleine moleculen zoals glucose en lactaat te monitoren, wat een aanzienlijk eenvoudiger gebruik van sensoren mogelijk maakt, omdat ze minder worden beïnvloed door biofouling.



Na de ontwikkeling van het lange termijn NMP systeem werden verschillende levers succesvol geperfundeerd gedurende maximaal 7 dagen. Tijdens klinische korte termijn NMP worden specifieke criteria gebruikt om de hepatobiliaire vitaliteit in levers te beoordelen. Hieronder vallen lactaatklaring, gal pH, bicarbonaat-uitscheiding en glucose-heropname uit de gal. Om de hepatobiliaire vitaliteit van de levers tijdens lange termijn NMP te bepalen, maakten we in **Hoofdstuk 7** gebruik van dezelfde criteria als gebruikt tijdens korte termijn NMP. De initiële resultaten van de vitaliteit criteria tijdens de 7 dagen perfusie van 9 levers waren uitstekend. Daarna werd een afname in deze criteriawaarden gezien, maar nog steeds op een niveau waarbij de levers geaccepteerd zouden worden voor transplantatie. Over het algemeen stabiliseerden deze criteriawaarden vanaf 12 uur NMP en bleven gedurende de perfusie gehandhaafd op dit niveau. Deze studie toonde aan dat ons protocol, om levers ten minste tot een week levensvatbaar te houden, effectief was.

Verder resulteerde het toedienen van galzouten en/of secretine in een significante toename van de galproductie. Hierbij zorgde secretine ook voor een toename van bicarbonaat-uitscheiding in de gal, wat leidde tot een verbeterde pH van de gal. Deze interventies kunnen de levensvatbaarheid van de lever tijdens lange termijn NMP verbeteren, terwijl de secretine-respons tevens kan worden gebruikt als een extra vitaliteitscriterium om de functie van galwegen te beoordelen.

Ondanks dat het lang termijn perfusie-systeem van essentieel belang is, zullen de levers uiteindelijk waarschijnlijk falen zonder verdere optimalisatie van het perfusaat en toediening van medicatie en voedingsstoffen. Het energieverbruik door de levers tijdens lange termijn NMP is geanalyseerd in **Hoofdstuk 8**. Aan het begin van de perfusie verbruikten de levers gemiddeld 306 kcal/dag, vergelijkbaar met het energieverbruik dat bij in vivo levers wordt waargenomen. Na 3 dagen bereikten de levers echter een soort rusttoestand, waarbij de levers slechts 180 kcal/dag gebruikten. Toediening van aminozuren tijdens de perfusie was noodzakelijk om de levers in een anabole toestand te houden.

Een belangrijke functie van de lever is de productie van stollingsfactoren. Omdat de lever metabool actief is tijdens NMP, wordt verwacht dat deze eiwitten ook tijdens NMP door de levers worden geproduceerd, maar hoeveel en in welke mate van functionaliteit was nog onbekend. In **Hoofdstuk 9** kwantificeerden we de concentraties en de mate van activiteit van verschillende hemostatische eiwitten tijdens lange termijn NMP. Al binnen 24 uur werd een vrijwel adequate stolling waargenomen, wanneer deze werd gemeten met de internationale genormaliseerde ratio (INR) en de geactiveerde partiële tromboplastinetijd (APTT). Dit was het gevolg van de synthese van aanzienlijke hoeveelheden functioneel actieve stollingseiwitten en -remmers. Vergeleken met normaal plasma was de specifieke activiteit van verschillende eiwitten echter verlaagd. Gedurende de eerste dagen stegen de eiwit concentraties in het perfusaat waarna ze na 3 tot 4 dagen stabiliseerden.

Wij denken dat dit nieuw ontwikkelde perfusie-systeem de deur heeft geopend voor het gebruik van lange termijn NMP als een platform voor specifieke medicijntesten, wat de mogelijkheid biedt voor bredere klinische en onderzoekstoepassingen buiten het veld van transplantatie. Verder roept deze studie de vraag op of heparinisatie van het perfusaat, welke meestal wordt gebruikt tijdens (lange termijn) NMP, de beste antistollingsmethode is tijdens NMP. Ondanks de continue heparinisatie werd verhoogde stollingsactivatie gedetecteerd, wat suggereert dat er fibrinestolsels ontstaan tijdens NMP. Hoewel het mogelijk is dat deze complexen al in de lever aanwezig waren vóór de perfusie, is activatie van de stolling tijdens perfusie een belangrijk probleem. De vorming van stolsels in de lever kan het



risico op ischemie vergroten, maar kan ook leiden tot systeem falen, zoals niet-functionerende oxygenatoren. Ondanks dat we geen stollingsproblemen hebben waargenomen tijdens onze perfusies, moet het gebruik van andere anticoagulantia tijdens (lange termijn) NMP, zoals directe FXa- of FIIa-remmers, verder worden onderzocht.

Deel 3: Toekomst van lange termijn NMP

Tenslotte verkent het laatste deel van dit proefschrift de toekomstige mogelijkheden van lange termijn NMP voor levertransplantaties en de regeneratieve geneeskunde. **Hoofdstuk 10** schetst therapeutische opties voor het herstellen of regenereren van donorlevers die te beschadigd zijn voor directe transplantatie, wat hopelijk zal leiden tot een toename van de pool van transplanteerbare organen en het verkorten van wachtlijsten. NMP biedt een dynamisch platform voor therapieën, zoals ontvettingscocktails, RNA-interferentie, senolytica en stamceltherapie. Deze behandelingen zouden huidige ongeschikte donorlevers kunnen redden, hetgeen de balans tussen vraag en aanbod van organen aanzienlijk verbetert. Vanzelfsprekend moeten echter nog veel uitdagingen worden opgelost voordat deze technieken in de klinische praktijk kunnen worden geïmplementeerd.