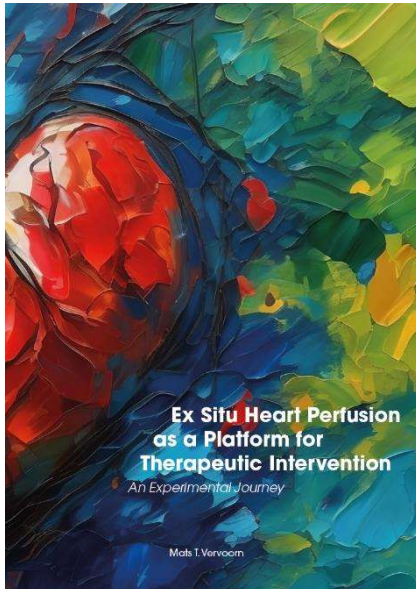




Samenvatting proefschrift M.T. Vervoorn

“The Creation of a Cardiac Bioreactor – Ex Situ Heart Perfusion as a Platform for Therapeutic Intervention”

**Promotie: 15 juli 2025
Universiteit Utrecht**

Promotors:
Prof. Dr. P.A.F.M. Doevendans

Co-promotors:
Dr. N.P. van der Kaaij

Inleiding

Hartfalen is een groeiend probleem wereldwijd, dat naar schatting 1-3% van de algehele volwassen populatie treft. Hartfalen is een klinisch syndroom dat wordt gekarakteriseerd door symptomen als vermoeidheid en kortademigheid, veroorzaakt door structurele of functionele afwijkingen van het hart. Belangrijke oorzaken hiervoor zijn o.a. ischemische hartziekten, hypertensie, en genetisch bepaalde moleculaire afwijkingen, die de knijpkracht van het hart beperken. Gezien de progressieve aard van de ziekte, komen patiënten uiteindelijk in een gevorderd stadium terecht die enkel behandeld kan worden met invasieve therapieën, zoals een steunhart of harttransplantatie. Hoewel steunharttechnologie de afgelopen jaren enorm verbeterd is, blijft harttransplantatie de gouden standaard voor de behandeling van patiënten met gevorderd hartfalen. Echter is deze behandeling slechts voor een selecte groep patiënten beschikbaar door een groeiend tekort aan donorharten. Een belangrijke factor die bijdraagt aan het vergroten van het aanbod aan donorharten, is de klinische introductie van ex situ hartperfusie (ESHP) in de recente jaren. Door introductie van deze preservatietechniek is het o.a. mogelijk gebleken om harten te transplantaren die gedoneerd zijn na circulatoir overlijden van de donor (DCD-donatie) met goede klinische resultaten. Ook is het mogelijk gebleken om harten over een groter geografisch gebied te koppelen aan een geschikte ontvanger. In sommige centra is hiermee het aantal harttransplantaties met 48% toegenomen. Desalniettemin zijn er aanvullende maatregelen nodig om het aantal beschikbare donorharten te vergroten en de wereldwijde hartfalen-epidemie te stutten.

Ex situ hartperfusie

De traditionele manier van orgaanpreservatie is statische preservatie op een lage temperatuur door het orgaan “op ijs” te bewaren. Hier zitten echter een aantal belangrijke beperkingen aan die de kwaliteit van het orgaan in negatieve zin beïnvloeden, o.a. door het bestaande zuurstofgebrek ten tijde van preservatie. Daarnaast zijn er geen mogelijkheden meer voor kwaliteitscontrole van het orgaan na preservatie en vóór implantatie in de ontvanger. Vanwege het zuurstofgebrek tijdens statische preservatie, is de preservatietijd voor harten beperkt tot ongeveer 4 uur, waarna de kwaliteit van het orgaan exponentieel afneemt. Hierdoor bestaat er tegelijkertijd een geografische beperking, omdat de organen binnen 4 uur van de donor in de ontvanger moeten worden geplaatst. De opkomst van ESHP heeft hier verandering in gebracht. Door het hart gecontroleerd te doorstromen met een



preservatievloeistof op een vooraf bepaalde temperatuur, is het mogelijk om het hart van zuurstof en voedingsstoffen te voorzien tijdens preservatie. Daarnaast biedt het een mogelijkheid om schadelijke afvalstoffen af te voeren. Hiermee is het mogelijk om preservatieschade van harten te verminderen en de organen voor langere tijd buiten het lichaam te bewaren.

Momenteel zijn er twee soorten ESHP, gebaseerd op de temperatuur van preservatie. Normotherme ESHP (34-38 °C) heeft als voordelen dat het hart normaal metabolisch actief is, waardoor het makkelijker is om de kwaliteit van het orgaan te beoordelen. Nadelen zijn echter vooral gerelateerd aan de complexiteit van deze manier van preservatie en de kwetsbaarheid van het orgaan voor technisch falen van de ESHP-machine, waarbij het hart door de hoge temperatuur niet beschermd is en dus snel beschadigd raakt.

Tijdens hypotherme ESHP (4-10 °C) wordt het metabolisme van het hart naar beneden gebracht door koeling, waardoor de zuurstofbehoefte van het hart daalt. Dit maakt dat de vereisten voor succesvolle perfusie ook minder zijn dan in vergelijking tot normotherme ESHP, wat het technisch minder complex maakt. Door de lage temperatuur is het hart automatisch beschermd tegen eventueel technisch falen van de ESHP-machine. Het heeft als belangrijk nadeel echter dat het door de lage temperatuur en het geremde metabolisme moeilijk is om de kwaliteit van het orgaan te beoordelen.

Hoewel er theoretische voordelen aan beide benaderingen zitten, is er tot op heden geen studie gepubliceerd die de superioriteit van de ene benadering boven de andere benadering heeft aangetoond. Om deze reden kunnen beide manieren van ESHP naast elkaar bestaan en lijkt het mogelijk dat de keuze voor de ene benadering boven de andere in de toekomst vooral afhankelijk is van het doel van preservatie, bijvoorbeeld preservatie om logistieke redenen, of juist voor regeneratieve doeleinden.

Voorbij preservatie: ex situ hartperfusie voor regeneratieve doeleinden?

Een belangrijk voordeel van ESHP is dat het hart geïsoleerd is buiten het menselijk lichaam, waardoor selectieve manipulatie van het orgaan mogelijk is zonder risico op bijwerkingen. Dit maakt het theoretisch mogelijk om specifieke therapeutische interventies toe te passen, die gericht zijn op regeneratie of anderszins verbetering van de orgaankwaliteit. Omdat de meeste klinische toepassingen van regeneratieve geneeskunde in de patiënt vooral beperkt worden door zorgen om bijwerkingen en zogenaamde “off-target” effecten in andere organen, zou ESHP toegepast kunnen worden om deze obstakels te overwinnen en de effectiviteit van regeneratieve therapieën (zoals stamceltherapie en gentherapie) te vergroten. Hierdoor zou het theoretisch mogelijk zijn om patiënten met een genetische afwijking die leidt tot hartfalen in een vroeg stadium op te sporen, hun hart uit te nemen en te conserveren met behulp van ESHP om een bepaalde regeneratieve therapie toe te passen, om het hart vervolgens weer te reïmplanteren in dezelfde patiënt, waarna de genetische hartafwijking genezen is. Ook zou het mogelijk zijn om de kwaliteit van gedoneerde organen te verbeteren, waardoor harten die tegenwoordig worden afgekeurd voor transplantatie, wellicht toch getransplanteerd kunnen worden. Daarnaast zouden organen zodanig bewerkt kunnen worden, dat het gebruik van immuunonderdrukkende medicatie om afstoting van het orgaan te voorkomen niet meer nodig is. In feite zou dit betekenen dat ESHP wordt ingezet als **bioreactor**, om het geïsoleerde orgaan te behandelen.

Inhoud proefschrift

De bovenstaande hypothese is de basis gebleken voor dit proefschrift, waarin enerzijds gestreefd is naar het verlengen en optimaliseren van ESHP, en anderzijds naar het verkennen van de mogelijkheden tot het toepassen van ESHP voor therapeutische interventie en biologische modificatie van het orgaan.



In **hoofdstuk 2** hebben wij met behulp van elektronenmicroscopie gekeken naar schadepatronen als gevolg van normotherme ESHP om aanknopingspunten te vinden voor verbetering van perfusie. Hiermee werden aanwijzingen gevonden voor zowel structurele, als mitochondriële schade ten gevolge van ESHP. Tevens werd vastgesteld dat harten die minder schadepatronen lieten zien, ook een betere functie hadden na 4 uur perfusie, indicatief voor verbeterde preservatie.

In **hoofdstuk 3** is geëxperimenteerd met het toepassen van hemoadsorptie tijdens ESHP. Het doel van hemoadsorptie was om schadelijke cytokines uit het perfusaat te filteren, in de hoop hiermee de ontstekingsreactie geassocieerd met ESHP te verminderen. Er werd gedurende de experimenten echter geen significant effect op hartfunctie gezien, ook bleek het minimaal effectief in het verminderen van circulerende cytokines. Op basis van dit experiment werd geconcludeerd dat hemoadsorptie niet van toegevoegde waarde lijkt om ESHP te verbeteren in de gebruikte experimentele opzet, en is het concept nadien verlaten.

In **hoofdstuk 4** werd een geoptimaliseerd perfusieprotocol gevalideerd door het te vergelijken met een conventioneel perfusieprotocol. Het geoptimaliseerde protocol is erop gericht om meerdere mechanismen die bijdragen aan preservatieschade te doorbreken, om zo de kwaliteit van perfusie te verbeteren. Dit protocol bleek effectief in het verbeteren van functie en ook was er minder sprake van verval gedurende 4 uur normotherme perfusie. Op basis hiervan werd geconcludeerd dat het mogelijk is om normotherme ESHP te verbeteren door de perfusie gericht aan te passen.

In **hoofdstuk 5** werd dit geoptimaliseerde protocol getest tijdens verlengde normotherme ESHP. Het doel van het experiment was om tenminste 9 uur lang normotherme perfusie toe te passen, zonder significante afname van orgaankwaliteit. Het geoptimaliseerde protocol bleek in staat om dit te realiseren. Hiermee is de basis gelegd voor verdere verlenging en optimalisatie van perfusie, met als doel om langere preservatie zonder verlies aan kwaliteit mogelijk te maken.

In **hoofdstuk 6** werd een nieuw-ontwikkelde compliantieballon getest die het mogelijk maakt om hartfunctie te simuleren in een onbelast varkenshart tijdens normotherme ESHP. Deze manier van functiemeting biedt in de toekomst wellicht mogelijkheden om op een innovatieve manier de hartfunctie van een hart tijdens preservatie te bepalen. Dit is van belang, aangezien functionele metingen een betere voorspellende waarde hebben dan metabole biomarkers als lactaat, die in de kliniek gebruikt worden.

In **hoofdstuk 7** hebben wij de voor- en nadelen van het gebruik van rode bloedcellen tijdens hypotherme ESHP belicht en op een rij gezet.

In **hoofdstuk 8** hebben wij onderzocht welke biomarkers er mogelijk te vinden zijn tijdens hypotherme ESHP, die voorspellend zijn voor hartfunctie na hypotherme preservatie. Dit is relevant, aangezien er tot op heden beperkte mogelijkheden tot kwaliteitscontrole tijdens hypotherme ESHP zijn. Een aantal kandidaat-biomarkers werden aangewezen.

In **hoofdstuk 9** hebben wij een systematische analyse van alle geregistreerde klinische trials op het gebied van cardiale regeneratieve geneeskunde gedaan om de huidige staat van dit stagnerende veld in kaart te brengen. We ontdekten dat veel geregistreerde trials niet worden afgemaakt en dat er een opvallende heterogeniteit is in opzet van de verschillende studies. We hebben op basis van onze



resultaten een aantal aanbevelingen geformuleerd en gespeculeerd op mogelijke andere opties om het veld verder te brengen.

In **hoofdstuk 10** hebben wij een systematische literatuurstudie gedaan naar de toepassing van gentherapie tijdens ESHP, om in kaart te brengen wat er tot op heden bekend is over de benodigdheden om gentherapie tijdens ESHP mogelijk te maken. Op basis hiervan hebben wij geconcludeerd dat het mogelijk is om gentherapie toe te passen tijdens zowel hypotherme als normotherme ESHP, dat de manier van perfusie invloed heeft op de resultaten en dat er enige mate van endotheeldysfunctie noodzakelijk lijkt te zijn om gentherapie effectief toe te passen.

In **hoofdstuk 11** beschrijven wij de resultaten van een proof-of-principle studie naar het gebruik van vetbolletjes (lipid nanoparticles) om genetisch materiaal naar hartspiercellen te krijgen. Het gebruik van deze vetbolletjes om genetische materiaal naar de hartspiercellen te vervoeren, leidde tot de expressie van het beoogde eiwit in het hartspierweefsel. Hiermee beogen wij de deur open te zetten voor verder onderzoek naar het gebruik van vetbolletjes om gentherapie toe te passen tijdens normotherme ESHP.

In **hoofdstuk 12** hebben wij een systematische literatuurstudie gedaan naar de bestaande risicofactoren voor het ontwikkelen van primary graft dysfunction na klinische harttransplantatie. Het doel hiervan was om te onderzoeken welke risicofactoren mogelijk te manipuleren zijn gedurende een periode van ESHP, om zo de uitkomsten van harttransplantatie te verbeteren.

Discussie

In dit proefschrift is de basis gelegd voor de ontwikkeling van een cardiale bioreactor ter regeneratie en biologische modificatie van het hart buiten het lichaam. Cruciaal voor de verdere ontwikkeling van bioreactortechnologie ten bate van orgaanpreservatie en -regeneratie, is het verder optimaliseren van biocompatibiliteit. Hierbij is het bovenal van belang dat het systeem het hart in staat stelt om de inwendige homeostase te herstellen in deze extreem afysiologische omgeving, ter behoud van diens functionele, metabole en moleculaire integriteit als orgaan. Om een perfusiesysteem zo biocompatibel mogelijk te maken, dienen alle onderdelen van het systeem ontworpen te worden met dit specifieke doel in gedachten. Het lijkt hierbij echter niet noodzakelijk om volledige normofysiologie na te streven, gezien het gegeven dat het hart zich op meerdere fronten anders lijkt te gedragen tijdens ESHP, dan in het menselijk lichaam. Zodra we leren wat het hart nodig heeft om de eigen homeostase gedurende ESHP in stand te houden, zullen we in staat zijn om perfusie verder te verlengen en breder toe te passen dan slechts voor logistieke doeleinden. Kijkende naar de ontwikkelingen binnen perfusie van andere organen, zoals lever, nieren en longen, lijkt de realisatie van een volwaardige cardiale bioreactor dichterbij dan initieel gedacht.