

Levertransplantatie is het slachtoffer geworden van zijn eigen succes. De afgelopen tien jaar is het aantal patiënten op de wachtlijst steeds verder gestegen door het groeiende tekort aan en de toenemende vraag naar te transplanteerbare organen. In Nederland heeft dit geleid tot een toename in het gebruik van organen verkregen via donatie na circulatiestilstand (donation after circulatory death (DCD)), ondanks dat deze organen van slechtere kwaliteit zijn vergeleken met organen verkregen bij donatie na hersendood (donation after brain death (DBD)). Door de langere, warme ischemietijd tijdens de orgaanuitname procedure ontstaat er uitgebreidere ischemie-reperfusie schade aan de hepatocyten en cholangiocyten van DCD organen. Daarom hebben ontvangers van dergelijke levers een hoger risico op het ontwikkelen van ernstige complicaties vlak na levertransplantatie, zoals primaire non-functie (PNF), vroege transplantaat dysfunctie (early allograft dysfunction (EAD)) en non-anastomotische galwegstricturen (NAS). Deze laatste staan ook wel bekend als ischemie-achtige galweg laesies (ischemic-type biliary lesions (ITBL)) of ischemische cholangiopathie.

Het transplanteren van levers van minder goede kwaliteit, zoals bij DCD, is echter onvermijdelijk vanwege het toenemende orgaantekort. Momenteel worden dergelijke levers vaak en wellicht onterecht afgewezen voor levertransplantatie op basis van ongunstige klinische karakteristieken, zoals een hoge donorleeftijd of op basis van de empirische beoordeling door de chirurg. Dit probleem blijkt uit de cijfers van de Nederlandse Transplantatie Stichting. In 2015 waren er 130 potentiële DBD donoren, waarvan 97% bruikbaar waren voor transplantatie in het algemeen en 79% voor levertransplantatie. Hoewel het aantal DCD donoren bijna tweemaal zo hoog was (218), was slechts 64% van deze donoren geschikt voor orgaantransplantatie en werd in slechts 22% van de gevallen de lever getransplanteerd. Kortom, van het totale aantal levertransplantaties uitgevoerd in Nederland in 2015 (n=152) werd dat in 32% gedaan met een DCD lever. Dit percentage zou op basis van bovenstaande getallen echter veel hoger kunnen zijn. Een objectievere beoordeling van de kwaliteit van het levertransplantaat met behulp van biomarkers zou kunnen bijdragen aan het vergroten van het donorpotentieel. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift had daarom tot doel om conventionele en nieuwe biomarkers te evalueren op hun vermogen om de kwaliteit van het transplantaat en de uitkomst na levertransplantatie te voorspellen.

DEEL I: BIOMARKERS IN LEVERTRANSPLANTATIE

In **hoofdstuk 1** worden de verschillende definities van de term biomarker besproken en wordt een overzicht gegeven van de gangbare markers in de context van levertransplantatie. Leverenzymen zoals aspartaat aminotransferase (AST) en alanine aminotransferase (ALT) worden vaak gebruikt als dynamische markers in serum om hepatocellulaire

schade na levertransplantatie te monitoren. Deze markers zijn verhoogd in serum ten tijde van complicaties als PNF, EAD en resectie. Bij schade door cholestase zijn gamma-glutamyl transferase (GGT) en alkalisch fosfatase (ALP) serummarkers die kunnen wijzen op galwegobstructie, bijvoorbeeld ten gevolge van anastomotische galwegstricturen of NAS. Tenslotte zijn er markers die iets zeggen over de functie van het transplantaat, zoals bilirubine, albumine en protrombinetijd. Al deze markers zijn *dynamische* markers, waarvan de meetwaardes fluctueren naar gelang de pathofysiologische toestand van het levertransplantaat. Behalve dynamische markers in bloed en serum kunnen ook histologische karakteristieken gebruikt worden om de mate van resectie te bepalen, zoals de Banff-score of de rejection activity index. Nadelen van het gebruik van histologie zijn echter dat het verkrijgen van het biopt gepaard gaat met weefselinvasie en dat een biopt slechts een lokale representatie geeft van de toestand van de lever, terwijl serummarkers meer zeggen over de toestand van de lever als geheel. Bovendien stijgen serummarkers normaliter sneller dan dat er veranderingen in histologie kunnen worden waargenomen. Daarom is histologie over het algemeen een minder dynamische marker.

Surrogaat markers voor cholangiocyt schade zoals GGT en ALP hebben een vertraagde stijging na levertransplantatie en zijn daarom minder geschikt als vroege marker voor ernstige galwegschaade zoals NAS. De toepassing van MicroRNAs (miRNAs) als potentiële vroege markers voor galwegcomplicaties wordt apart besproken in deel III van dit hoofdstuk.

Tenslotte wordt in **hoofdstuk 1** ingegaan op genetische profielen in donoren en ontvangers waarmee de uitkomst na levertransplantatie beter voorspeld kan worden. Genetische polymorfismen zijn statische factoren die niet veranderen gedurende het beloop van een ziekte of na levertransplantatie, en kunnen dus eigenlijk niet als biomarkers maar meer als risicofactoren worden beschouwd.

Door het toenemend gebruik van donoren met uitgebreidere criteria en de daarmee gepaard gaande complicaties, worden wereldwijd door transplantatiecentra strategieën onderzocht om de kwaliteit van het transplantaat en de uitkomst in ontvangers te verbeteren. Een op biomarkers gebaseerde evaluatie van de kwaliteit van het transplantaat voorafgaand aan implantatie zou donorlevers kunnen opsporen met een verhoogd risico op PNF, EAD, NAS, of andere complicaties. Een andere moderne strategie om preservatie van het transplantaat te optimaliseren is machineperfusie. **Hoofdstuk 2** is een systematisch review van studies die biomarkers hebben onderzocht om de kwaliteit van het transplantaat te bepalen gedurende conventionele- en machinepreservatie in levertransplantatie. Sinds 2010 zijn verschillende technieken van machineperfusie geïntroduceerd in de klinische praktijk en de eerste resultaten in humane levertransplantatie zijn veelbelovend. Een bijkomend voordeel van het gebruik van machineperfusie is dat het extra tijd creëert voor het meten van biomarkers om de kwaliteit van het transplantaat objectief te kunnen beoordelen. Behalve een vergelijking van de verschillende

machineperfusie technieken worden in **hoofdstuk 2** tevens de voor- en nadelen van het gebruik van verschillende biomaterialen voor het meten van leverschade tegen elkaar afgewogen. Met behulp van bipten kan histologisch bewijs worden verkregen van voornamelijk cellulaire schade, en kan een groot aantal cellen verkregen worden voor de analyse van de expressie van biomarkers. Nadelen bestaan echter uit de invasieve aard waarmee de bipten worden verkregen, de lokale representatie en de kans op inter- en intra-individuele variabiliteit van de beoordeling. Dit in tegenstelling tot preservatievloeistoffen die gebruikt worden om het transplantaat mee te spoelen, zogenaamde perfusaten. Perfusaten zijn in grote volumina aanwezig tijdens verschillende preservatietechnieken, kunnen non-invasief verzameld worden en geven een betere representatie van het gehele transplantaat. Daarnaast biedt machineperfusie op hogere temperaturen de mogelijkheid om gal te verzamelen. De productie en samenstelling van gal is in het bijzonder interessant om de functie van het transplantaat te bepalen. Helaas produceert de lever vrijwel geen gal bij preservatie op lagere temperaturen. Een belangrijke conclusie van **hoofdstuk 2** is dat hoewel veel studies, evenals de studies beschreven in dit proefschrift, een discriminerend vermogen aantonen van verschillende biomarkers, robuuste validatie in grotere cohorten vaak achterwege blijft. Allereerst zijn de onderzochte studiecohorten vaak klein door het lage aantal levertransplantaties dat op jaarbasis wordt uitgevoerd. Daarnaast is het prospectief verzamelen en opslaan van biomaterialen tijdrovend, logistiek uitdagend en het toepassen van nieuwe meettechnieken vaak kostbaar. Al deze factoren dragen bij aan het gebrek aan validatie bij biomarker studies, hoewel dit cruciaal is voordat biomarkers daadwerkelijk toegepast kunnen worden in de klinische praktijk. Een ander belangrijk punt betreft het feit dat veel studies enkel biomarkers hebben onderzocht in DBD levertransplantaties. De grenswaarden voor biomarkers om complicaties in DBD levertransplantaties te voorspellen zijn echter niet zomaar toepasbaar in DCD levertransplantaties[1, 2]. Tenslotte maakt de variatie in uitkomstdefinities tussen verschillende studies het moeilijk om een betrouwbare meta-analyse uit te voeren. Het introduceren van internationale richtlijnen voor uitkomstdefinities van veel voorkomende complicaties bij levertransplantaties zou de vergelijkbaarheid van studies ten goede kunnen komen[3].

DEEL II: RISICOFACITOR VOOR GALWEGCOMPLICATIES

Biomarkers kunnen meerdere doelen dienen. De uitkomst van een transplantatie kan gedefinieerd worden door biomarkers die boven een vooraf gestelde grenswaarde stijgen, zoals het geval is bij EAD. Minder dynamische biomarkers, zoals histologie of genetische polymorfismen, kunnen daarentegen geïnterpreteerd worden als risicofactor

voor een bepaalde uitkomst. In deel II van dit proefschrift zijn twee markers onderzocht die een mogelijke risicofactor zijn voor het ontwikkelen van NAS na levertransplantatie.

De vorming van microtrombi als onderliggende oorzaak van NAS: feit of fabel?

In **hoofdstuk 3** is onderzocht of DCD levers een verhoogde neiging hebben om microtrombi te vormen in hun microvasculatuur ten tijde van preservatie. In de laatste 10 jaar is door meerdere groepen onderzocht of de extra warme ischemietijd en vasculaire stase in DCD levers leidt tot het ontstaan van microtrombi in de peribiliaire vasculaire plexus van de galwegen. Dit zou vervolgens leiden tot het ontstaan van NAS. Volgens de triade van Virchow zijn drie factoren verantwoordelijk voor de vorming van een trombus; hypercoagulatie, schade aan endotheelcellen en een verstoorde bloedstroom. Deze gebeurtenissen kunnen een coagulatie cascade induceren waarbij bloedplaatjes geactiveerd worden via twee onafhankelijke mechanismen. Bij de collageen route initieert de blootstelling van sub-endotheliaal collageen de activatie van bloedplaatjes. Bij de weefselfactor route wordt trombine gegenereerd door weefselfactoren afkomstig uit de vaatwand of het bloed[4]. Het risico op de vorming van een trombus bij levertransplantatie, met name van de arteria hepatica (HAT), is gerelateerd aan het aantal arteriële anastomosen, afwijkende arteriële anatomie, een laag gewicht van de donor of ontvanger, voorgaande buikchirurgie, CMV-mismatch, re-transplantatie en verlengde operatietijd[5, 6]. Er wordt gedacht dat onvoldoende spoelen van het transplantaat tijdens orgaanuitname en voorafgaand aan implantatie het risico op microtrombi verder verhoogt. Om de vorming van microtrombi te voorkomen gebruiken sommige transplantatiecentra potentieel gevaarlijke intra-operatieve fibrinolytica, die grote bloedingen kunnen veroorzaken in patiënten.

De gedachte achter onze studie was om te bepalen of er eigenlijk wel bewijs is voor de vorming van microtrombi in leverweefsel die de toepassing van fibrinolytica zou kunnen rechtvaardigen. Voor de studie in **hoofdstuk 3** werden levercoupes, naast een conventionele kleuring met hematoxyline-eosine, ook gekleurd voor Von Willebrand Factor VIII (een marker voor endotheel activatie vroeg in de coagulatie cascade), en Fibrine Lendrum dat zich aan het eind van deze cascade bevindt. Onze studie leverde geen overtuigend bewijs voor de vorming van microtrombi gedurende verschillende tijdstippen van preservatie. Dit ondanks grondige evaluatie van intrahepatische bipten die waren verkregen uit verschillende leversegmenten van uitgebreide criteria DCD levers die waren afgewezen voor levertransplantatie. Maar ook in getransplanteerde DCD levers was het aantal microtrombi niet verhoogd ten opzichte van vergelijkbare DBD levers, noch was het aantal microtrombi verhoogd na reperfusie of in levers die NAS ontwikkelden. Hoewel in sommige coupes een deel van het vasculaire lumen positief kleurde voor Von Willebrand Factor VIII, bleven gepaarde coupes negatief voor Fibrine Lendrum en waren geen trombi waarneembaar met hematoxyline-eosine. DCD levers

lijken dus geen verhoogde neiging te hebben om microtrombi te vormen ten tijde van preservatie, die de verhoogde incidentie van NAS in deze organen zou verklaren. De vorming van microtrombi op een later moment tijdens de follow-up is echter niet uitgesloten.

Een belangrijke limitatie van onze studie is de mogelijkheid van sampling bias, met name in getransplanteerde levers waar enkel biopsies van het linker laterale segment werden afgenomen. En ondanks het grote aantal coupes dat geanalyseerd is op de aanwezigheid van microtrombi, zijn deze van slechts een klein aantal levers verzameld. Desalniettemin komen onze resultaten overeen met andere histologische studies die de vorming van microtrombi en cholangiocyt schade van intra- en extrahepatische galwegen evalueerden[7-10]. Een onderzoek van Vendrell et al. laat bovendien zien dat DCD levertransplantatie hyperfibrinolyse veroorzaakt, wat de hypothese van verhoogde vorming van microtrombi en hypercoagulatie in DCD verder ondermijnt[11].

Met twee studies die een mogelijke voordelig effect aantonen[12, 13] en twee andere studies waarin geen effect wordt gezien[14, 15], lijkt er geen overtuigend bewijs te zijn voor een preventief effect van intra-operatieve fibrinolytica op NAS in interventiestudies. Alle studies betreffen echter retrospectieve analyses, terwijl een gerandomiseerde trial uitgevoerd zou moeten worden om het sterkste bewijs te leveren. Voor nu concluderen we dat het histologisch bewijs voor de vorming van microtrombi marginaal is. Dit, in combinatie met de tegenstrijdige resultaten in klinische studies, maakt dat we het gebruik van intra-operatieve fibrinolytica tijdens levertransplantatie afraden.

Schade aan de peribiliaire klieren als mogelijke oorzaak van NAS

Hoewel de betrokkenheid van de peribiliaire klieren (peribiliary glands (PBG)) bij de ontwikkeling van NAS niet is onderzocht in dit proefschrift, maken de resultaten van andere onderzoeksgroepen dit onderwerp wel de moeite van discussie waard. Al in 1994 beschreven Nakanuma et al. dat PBGs een niche zouden zijn die stamcellen bevat voor de regeneratie van cholangiocyten[16]. Een elegante studie van DiPaola et al., welke gebruik maakte van confocale microscopie in muizen, laat zien dat PBGs zich bevinden in het submucosale compartiment van de gehele extrahepatische galweg, met uitzondering van de galblaas[17]. De PBGs vormen intramurale epitheliale netwerken tussen verschillende segmenten van de grote galwegen en staan in verbinding met het galweglumen via kleine kanalen. Verder laat deze studie zien dat de proliferatie van cellen in PBGs toeneemt na ligatie van de galweg. Onlangs vonden Carpino et al. hyperplasie van PBGs die zich uitbreidde tot het oppervlakte epitheel van de galwegen in patiënten met primaire scleroserende cholangitis (PSC) en biliaire fibrose[18]. Deze PBGs brachten componenten van de hedgehog route en markers van senescence en autofagie tot expressie. De expressie van de cystische-fibrose transmembraan receptor was echter verminderd, waardoor de cholangiocyten minder beschermd waren tegen

toxische galzouten door middel van de zogenaamde 'bicarbonate umbrella', welke later in dit hoofdstuk nog aan bod zal komen. Belangrijk was de aanwezigheid van epitheliale naar mesenchymale transitie, een risicofactor voor maligne degeneratie in PSC.

Deze bevindingen zijn in overeenstemming met een eerdere studie door de groep van Porte uit Groningen, Nederland[19]. Behalve verlies van het lumenale galweg-epitheel vond deze groep een verhoogde expressie van Ki-67 en keratine-19 in PBGs van geëxplanteerde donorlevers van patiënten met ernstige NAS. In patiënten die chirurgische interventie nodig hadden vanwege cholangitis was de expressie van Ki-67 en keratine-19 meer uitgesproken in cholangiocyten. Op basis van deze bevindingen suggereren de auteurs dat in geval van milde galweschade een eerstelijns regeneratie plaatsvindt door cholangiocyten, maar dat in geval van uitgebreidere schade een tweedelijns regeneratie geactiveerd wordt door PBGs. Dit heeft geleid tot een nieuw paradigma binnen de levertransplantatie, namelijk dat insufficiënte regeneratie van cholangiocyten door schade aan de PBGs in de grotere galwegen ten grondslag ligt aan NAS[20]. Vervolgens bestudeerden Op den Dries et al. de schade aan PBGs in een grote serie extrahepatische galwegbiopten van getransplanteerde DBD en DCD levers[7]. Zij vonden een hogere mate van vasculaire schade, necrose van het murale stroma en schade aan de dieper gelegen PBGs in levers welke later NAS ontwikkelden. Interessant genoeg bleek niet de schade aan PBGs, maar de vasculaire schade significant verhoogd in DCD levers. Dit suggereert dat de hogere incidentie van NAS in DCD levers toch zou kunnen voortkomen uit de vasculaire schade en verminderde bloedvoorziening. De histologische schade die werd gezien in de distale extrahepatische galweg bleek bovendien representatief voor de grotere intrahepatische galwegen[21].

Fucosyltransferase-2 dysfunctie in de pathofysiologie van galwegziekten

Genetische polymorfismen worden vaak toegepast als biomarker om de uitkomst van een levertransplantatie te voorspellen. In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of een single-nucleotide polymorfisme (SNP) in het fucosyltransferase-2 gen (FUT2) een risicofactor is voor het ontwikkelen van NAS. De mutatie rs608133 (G>A), die gevonden is bij een genomewijde associatie studie, is een prevalent polymorfisme dat voorkomt onder 20% van de algemene populatie, maar die ook in verband is gebracht met PSC[22, 23]. De mutatie veroorzaakt een dysfunctioneel FUT2 eiwit, wat resulteert in verminderde glycosylering van oppervlakte epitheliale cellen. Men denkt dat deze verminderde glycosylering de barrière functie van cellen tegen pathogenen verlaagt[24]. Vanwege de klinische overeenkomsten tussen NAS en PSC rees de vraag of deze mutatie van het FUT2 gen in levertransplantatiedonoren en ontvangers een risicofactor zou kunnen zijn voor NAS. Daarop hebben we retrospectief een genotypering van de FUT2 secretor status uitgevoerd op het DNA van donoren en ontvangers van in totaal 418 levertransplantatie procedures. De donor FUT2 status was niet geassocieerd met de ontwikkeling van NAS.

In patiënten met PSC bleek echter dat een FUT2 non-secretor status van de ontvanger (AA-genotype) een onafhankelijke risicofactor was voor NAS (HR 2.34, $P=0.034$), waarbij het sterkste effect werd gezien in de eerste vijf jaar na transplantatie. FUT2 status was geen risicofactor voor levertransplantatiepatiënten die een andere onderliggende ziekte dan PSC hadden.

FUT2 dysfunctie is ook gecorreleerd aan inflammatoire darmziekten (IBD), zoals de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa, die kunnen voorkomen in combinatie met PSC[25, 26]. Er wordt gedacht dat de verlaagde barrièrefunctie en de minder diverse bacteriële samenstelling van het darmepitheel leiden tot een 'lekkende darm' in FUT2 non-secretors, waardoor bacteriën en pathogenen door de darmwand kunnen passeren naar de circulatie[27-29]. Om de rol van bacteriële translocatie te onderzoeken, hebben we het gelijktijdig voorkomen van IBD geanalyseerd in ons cohort van patiënten met onderliggend PSC en de relatie met FUT2 secretor status. Er was een sterke correlatie tussen PSC en het gelijktijdig bestaan van colitis ulcerosa, met een incidentie van 56%. We konden echter niet aantonen dat FUT2 non-secretor status vaker voorkwam bij patiënten met gecombineerd PSC en IBD, noch was de incidentie van NAS verhoogd in deze groep. Mogelijk was het aantal patiënten met gelijktijdig voorkomen van PSC en IBD in ons cohort te klein om dit verband goed te onderzoeken. Dit belemmerde tevens een betrouwbare analyse van het preventieve effect van colectomie op het ontwikkelen van NAS, wat aangetoond is in voorgaande studies betreffende PSC[30].

De resultaten van **hoofdstuk 4** zouden ook kunnen duiden op een verhoogde immuunrespons, veroorzaakt door ongunstige FUT2 combinaties. Analyse van gecombineerde donor- en ontvangergenotypen liet zien dat de incidentie van NAS het hoogste was (80%) onder PSC patiënten met een FUT2 non-secretor status (AA), die een donor lever ontvingen van een FUT2 secretor donor (GG of GA). Een experimentele studie in transgene muizen ondersteunt deze hypothese. Hierbij werd door een verhoogde immuunrespons een verkorte transplantaatoverleving aangetoond van huid en hartweefsel met overexpressie van fucosyltransferase, welke getransplanteerd werden naar wild-type ontvangers[31]. Daarnaast sluiten de resultaten van onze studie niet uit dat cholangiocyten uit de resterende galweg van de ontvanger de nieuwe donor galweg repopuleren. Dit type chimerisme is al eens eerder aangetoond, maar niet in de context van NAS[32].

Behalve het darmepitheel hebben FUT2 non-secretors ook een veranderde glycosylering van cholangiocyten en een veranderde bacteriële samenstelling van gal, welke beiden kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van NAS[22]. Een veranderde samenstelling van de glycocalyx beïnvloedt het alkaline milieu van cholangiocyten, welke normaliter in stand wordt gehouden door de 'bicarbonate umbrella'. Dit maakt cholangiocyten meer kwetsbaar voor toxische galzouten[33, 34]. Bovendien is een veranderde samenstelling van de gal in verband gebracht met een hogere incidentie van cholangitis,

galwegcomplicaties en een verkorte transplantatievrije overleving[35-37]. Onze studie levert echter geen direct bewijs voor een verhoogde toxiciteit door galzouten in FUT2 non-secretors, hoewel dit een interessant onderwerp blijft voor toekomstig onderzoek.

Tenslotte blijkt dat de detectie van biomarkers die afhankelijk zijn van synthese door FUT2 enzymactiviteit, beïnvloed kan worden door het FUT2 genotype. Dit is aangetoond door Wannhoff et al. voor kanker antigen 19-9 (CA 19-9), welke vaak toegepast wordt als biomarker bij de screening op cholangiocarcinoom in patiënten met PSC[38]. Het blijkt dat PSC patiënten met een FUT2 non-secretor status hogere serumwaardes hebben van CA 19-9 vergeleken met FUT2 secretors. Om een betere voorspelbaarheid van deze biomarker te verkrijgen in termen van sensitiviteit, specificiteit en postief- of negatief voorspellende waarde, zou de grenswaarde van CA 19-9 hoger moeten liggen in FUT2 non-secretors. Dus onderzoekers moeten zich bewust zijn van mogelijke genotype-afhankelijkheid van biomarker waardes in toekomstige studies.

Andere polymorfismen geassocieerd met NAS en PSC in levertransplantatie

Naast FUT2 zijn ook andere SNPs onderzocht in de context van NAS na levertransplantatie. Ten Hove et al. lieten zien dat een mutatie in het gen coderend voor matrix metalloproteïnase-2 (MMP-2) in zowel donoren als ontvangers een verhoogd risico geeft op het ontwikkelen van NAS[39]. MMP-2 is een enzym dat matrixdegradatie in weefsels reguleert en in verband is gebracht met leverfibrose en cirrose. Een polymorfisme aanwezig in zowel de donor als de ontvanger heeft een synergistisch effect en vergroot het risico op NAS (HR 3.48). Serumwaardes van MMP-2 veranderden echter niet door de SNP. Een vervolgstudie van dezelfde onderzoeksgroep liet zien dat het polymorfisme ook geassocieerd is met slechtere uitkomsten in termen van transplantatie-vrije overleving en mortaliteit in PSC patiënten[40].

Een andere SNP gerelateerd aan NAS is die van chemokine receptor CCR5 (CCR5-Δ32 mutatie)[41]. CCR5 wordt tot expressie gebracht op verschillende cellen van zowel het aangeboren als het verworven immuunsysteem. Homo- en heterozygote dragers van de mutatie hebben bijvoorbeeld een verminderde chemotaxis van regulatoire T-cellen. CCR5-Δ32 in ontvangers, maar niet in donoren, geeft een viervoudig verhoogd risico op het ontwikkelen van NAS. De mutatie in ontvangers is een onafhankelijke risicofactor voor NAS, met name in patiënten met PSC. Helaas is er geen duidelijke gestratificeerde analyse uitgevoerd op het effect van de mutatie in niet-PSC patiënten.

Al deze studies betreffende genetische polymorfismen en de ontwikkeling van NAS, inclusief onze eigen studie, tonen een sterke associatie aan met PSC. Dit leidt tot de discussie of de presentatie van NAS in deze studiecohorten in feite een terugkeer van de onderliggende ziekte is. Meerdere studies hebben aangetoond dat PSC een risicofactor is voor het ontwikkelen van NAS[42, 43]. De criteria voor recidief PSC, welke zijn geformuleerd in 1999, bestaan uit; (i) een bestaande diagnose van PSC voorafgaand aan

levertransplantatie, met (ii) intra- en/of extrahepatische galweg stricturen, kralensnoer aspect of irregulariteiten, optredend na tenminste 90 dagen follow-up en aangetoond met cholangiografie, of fibreuze cholangitis en/of fibro-obliteratieve laesies met of zonder ductopenie, met histologische aangetoonde biliaire fibrose of biliaire cirrose[44, 45]. Criteria die recidief PSC excluseren bestaan uit vastgestelde ductopene resectie, HAT, enkelvoudige anastomotische stricturen, NAS optredend voor dag 90 na levertransplantatie en ABO-incompatibiliteit. Ondanks deze duidelijke beschrijving blijkt de diagnose van recidief PSC in de praktijk niet altijd even gemakkelijk. Ten eerste wordt de primaire diagnose van PSC in een minderheid van de gevallen pas duidelijk na een grondige histologische evaluatie van het leverexplantaat door de patholoog. Daarnaast wordt het typische kralensnoer aspect van PSC, zoals te zien is met cholangiografie, vaak pas duidelijk in een verder gevorderd stadium van de ziekte, terwijl meer geïsoleerde intrahepatische stricturen en dilataties vaker voorkomen in een vroeger stadium. Soms worden de eerste symptomen van de ziekte al duidelijk voor de 90^e postoperatieve dag. En op basis van histologisch onderzoek op naaldbiopsen kan het lastig zijn om recidief PSC te onderscheiden van andere aandoeningen zoals chronische resectie[46, 47].

Vanwege het moeilijke onderscheid tussen recidief PSC en NAS verdient het de aanbeveling om, indien mogelijk, altijd een gestratificeerde analyse uit te voeren voor apart PSC en niet-PSC patiënten in transplantatie cohorten. Bepaalde SNPs geassocieerd met recidief PSC en NAS kunnen gebruikt worden voor het in kaart brengen van risicoprofielen in patiënten. Bovendien verschaffen dergelijke SNPs meer inzicht in de onderliggende mechanismen en pathofysiologie van complicaties na levertransplantatie. De kennis dat bepaalde donor-ontvanger combinaties kunnen leiden tot ongunstige uitkomsten kan in de toekomst van invloed zijn op de toewijzing van donor organen, die momenteel vooral wordt bepaald door de MELD-score en de bloedgroep.

Risicofactoren voor galwegcomplicaties in perspectief

De bovenstaande paragrafen beschrijven een samenhangend geheel van risicofactoren die elkaars invloed op de ontwikkeling van NAS lijken te versterken. Samengevat lijkt galwegschaade te ontstaan door verlengde ischemie van het transplantaat, wat de hogere incidentie van NAS verklaart in DCD levers[48]. De vitaliteit van de galweg is sterk afhankelijk van bloedvoorziening door de arteria hepatica, maar verminderde bloedtoevoer vanuit de vena porta is ook in verband gebracht met NAS[10, 49, 50]. De hierop volgende reperfusie vergroot de schade aan het galwegepitheel en de PBGs. Dit tast niet alleen de regeneratie van cholangiocyten aan, maar ook de integriteit van de biliaire glycocalyx en 'bicarbonate-umbrella', die normaliter cholangiocyten beschermt tegen het toxische effect van galzouten. Patiënten met PSC hebben vaker een verstoorde biliaire glycocalyx, die daardoor makkelijker doordringbaar wordt voor pathogenen zoals bacteriën. Dit kan vervolgens een verhoogde translocatie veroorzaken van bacteriën

vanuit de darm naar de lever, maar kan ook leiden tot een versterkte immuunrespons als een lever van een FUT2 secretor donor geïmplant wordt in een FUT2 non-secretor ontvanger.

DEEL III: MICRORNAS ALS NIEUWE BIOMARKERS IN LEVERTRANSPLANTATIE

Deel III van dit proefschrift richt zich op de toepassing van microRNAs (miRNAs of miRs) als biomarkers voor transplantaatfunctie en schade bij levertransplantatie. Als introductie op dit onderwerp wordt in **hoofdstuk 5** een overzicht gegeven van de literatuur betreffende miRNAs in leverziekten en levertransplantatie, met speciale aandacht voor extracellulaire miRNAs. Na hun ontdekking in 2001 is het aantal publicaties over miRNAs als biomarkers explosief toegenomen, maar ook over de betrokkenheid bij andere pathologieën. MiRNAs zijn 20-23 nucleotiden lange, niet-coderende RNAs die post-transcriptioneel genexpressie kunnen reguleren. In het bloed, maar ook in andere lichaamsvloeistoffen, bevinden zich cel-specifieke miRNAs die stabiel zijn en beschermd blijven tegen degradatie. Dit maakt miRNAs een populair onderwerp voor non-invasief biomarker onderzoek. Een mogelijke verklaring voor de stabiliteit van miRNAs in lichaamsvloeistoffen is dat ze ingebed zijn in, of gebonden zijn aan, andere cellulaire componenten. Extracellulaire miRNAs zijn bijvoorbeeld gevonden in vesikels en kleinere exosomen, gebonden aan lipoproteïnen, of gebonden aan het eiwit argonaute-2 in reactie op schadelijke processen. Binnen de hepatologie geven serumwaardes van miRNAs informatie over leverschade in patiënten met virale hepatitis, non-alcoholische leververvetting, leverfibrose, maligniteit en meer. In de context van levertransplantatie is de hoeveelheid literatuur over extracellulaire miRNAs als biomarkers echter schaars.

MicroRNAs als markers voor schade aan hepatocyten en cholangiocyten post-levertransplantatie

Hepatocyten en cholangiocyten brengen verschillende miRNAs tot expressie. Een elegante studie uitgevoerd door Chen et al. gebruikte laser-capture microdissectie om cholangiocyten en hepatocyten te isoleren uit leverweefsel, waarna voor deze cellen afzonderlijk met behulp van genoomwijde microarray analyse werd bepaald welke miRNAs aanwezig waren[51]. Gebaseerd op de resultaten van Chen et al. heeft onze groep als eerste het vrijkomen van hepatocyt-afgeleide miRNAs (HDmiRs) in serum onderzocht op het moment van leverschade en acute resectie na levertransplantatie[52]. De belangrijkste bevindingen van deze studie waren dat expressie van HDmiR-122 en HDmiR-148a significant verlaagd was in post-reperfusie biopten wanneer de warmeschemie tijd verlengd was. Omgekeerd bleken de waardes van deze miRNAs te stijgen in serum en sterk te correleren met AST en ALT waardes gedurende de eerste maand na

levertransplantatie. Sterker, de waardes van HDmiRs waren al significant verhoogd in serum wanneer de transaminaselevels nog <50 IU/L waren. De piekwaardes van HDmiRs in serum liepen 24 uur voor op de piekwaardes van serum transaminases in patiënten met histologisch bewezen acute resectie. Deze resultaten suggereren dat serum HDmiRs een vroegere en misschien zelfs sensitievere marker voor leverschade zijn dan de klassieke serum transaminases, welke momenteel nog de gouden standaard zijn als biomarker voor leverschade.

Om meer inzicht te verkrijgen in de biologie en dynamiek van miRNAs, hebben we in **hoofdstuk 6** het vrijkomen van miRNAs in gal en serum onderzocht gedurende verschillende (patho)fysiologische condities van de lever na transplantatie. In deze studie zijn behalve HDmiR-122 en -148a ook cholangiocyt-afgeleide miRNAs (CDmiRs) getest, welke tevens zijn geïdentificeerd door de eerder genoemde studie van Chen et al. (CDmiR-30e, -200c en -222)[51]. De weefsel-specificiteit van deze miRNAs werd bevestigd in leverbiopten en galwegweefsels die verzameld werden gedurende levertransplantatie. In leverweefsel was HDmiR-122 het meest overvloedig, terwijl in galwegweefsel CDmiR-222 het hoogst tot expressie kwam. Over het algemeen waren miRNA waardes in gal hoger dan in gepaarde serummonsters. Fractioneringsproeven lieten zien dat de meerderheid van extracellulaire miRNAs in gal aanwezig waren in de niet te pelletteren fractie, en dat ze hierin gedurende tenminste 1-4 uur beschermd werden tegen degradatie door verbindingen met proteïnes. Er werd een sterke correlatie gevonden tussen de excretie van HDmiR-122 en bilirubine naar gal, met hoge niveaus van HDmiR-122 als de lever een goede excretiefunctie had. De waardes van HDmiR-122 in gal daalden drastisch wanneer de excretiefunctie van de lever verminderde. Interessant was de observatie dat CDmiR-222 waardes in gal een omgekeerde dynamiek vertoonden, met lagere waardes ten tijde van goede excretiefunctie en een stijging als de excretiefunctie verminderde. Veranderingen in excretiefunctie werden het duidelijkst weerspiegeld in miRNA waardes in gal, zonder significante veranderingen van miRNAs in gepaarde serummonsters. Leverschade en acute resectie werden echter het duidelijkst weerspiegeld door serum miRNAs. Ten tijde van schade stegen waardes van HDmiR-122 in gal en tegelijkertijd nog sterker in serum. Opnieuw vertoonde CDmiR-222 een tegenovergestelde dynamiek.

Op basis van deze resultaten lijkt het erop dat het vrijkomen van HDmiRs en CDmiRs in gal en bloed gepolariseerd is, afhankelijk van de transplantaatfunctie en de mate van schade. De tegenovergestelde dynamiek tussen HDmiRs en CDmiRs lijkt bovendien meer te berusten op een actief mechanisme van uitscheiding dan op slechts passieve lekkage vanuit beschadigde cellen. De excretie van miRNAs naar gal gedurende goede transplantaatfunctie kan wijzen op een rol van miRNAs in de biliare homeostase. Voorgaande studies hebben bijvoorbeeld laten zien dat expressie van miR-506, miR-222 en miR-199a-3p invloed hebben op de activiteit van anion exchanger 2 en de farnesoid-x

receptor[53, 54]. Verder laat onze studie de potentie van het gebruik van gal zien als medium om met biliaire miRNAs de functie van het transplantaat te bepalen. Beperkingen van onze studie bestonden uit het kleine aantal patiënten van wie gal en serummonsters werden verzameld (n=10) en de afwezigheid van een 3D experimenteel model om het gepolariseerd vrijkomen van HDmiRs en CDmiRs te valideren. Met de voortdurende recente ontwikkelingen wat betreft het opbouwen en groeien van orgaanweefsel in het laboratorium kan dit laatste doel hopelijk in de nabije toekomst gerealiseerd worden [55, 56].

De betrokkenheid van miRNAs in cholangiopathieën is voornamelijk onderzocht bij cholangiocarcinomen[57]. In deze studies is gal de meest gebruikte bron voor miRNA analyse, gevolgd door serum. De expressie van miRNAs in weefsel is vooral gerelateerd aan de regulatie van doelwitgenen die betrokken zijn bij fibrose, apoptose, proliferatie, invasie, inflammatie, migratie, tumor groei, oncogenese, chemo-resistentie en andere pathofysiologische factoren. Opmerkelijk genoeg is er minder bekend over miRNAs in andere cholangiopathieën zoals primaire biliaire cirrose, PSC en biliaire atresie. De kennis over miRNA regulatie in de pathofysiologie van PSC zou in het bijzonder van belang kunnen zijn voor een beter begrip van NAS, gezien de overeenkomsten in klinische presentatie. In de context van PSC is miR-7a gerelateerd aan cholangiocytoproliferatie[58]. Andere studies beschrijven vooral miRNA profielen in gal en serum om PSC te onderscheiden van cholangiocarcinoom, wat lastig kan zijn op basis van slechts borstelcytologie[59, 60]. Door de regulerende aspecten van CDmiRs verder te ontrafelen kunnen deze miRNAs de basis vormen van nieuwe therapeutische doelwitten in NAS of andere cholangiopathieën, wat eerder al succesvol is gebleken voor HDmiRs in virale hepatitis[61, 62].

MicroRNAs als potentiële markers voor cholangiocytschade voorafgaand aan levertransplantatie

Markers voor schade aan cholangiocyten en het voorspellen van NAS zijn schaars. De meeste studies betreffen onderzoek naar galwegweefsels, welke hiervoor al uitvoerig beschreven zijn. Vanwege het chirurgische trauma en de lokale representativiteit geassocieerd met het verzamelen van biopten, zochten we naar een cholangiocytspecifieke biomarker die non-invasief gemeten kon worden voorafgaand aan implantatie van de donorlever. De studie in **hoofdstuk 7** is geïnitieerd om te bepalen of extracellulaire miRNAs vrijkomen in perfusaten die gebruikt worden om het transplantaat te spoelen en of deze miRNAs een vroege marker zouden kunnen zijn voor NAS. Waardes van HDmiRs (miR-122 en -148a) en CDmiRs (miR-30e, -222 en -296) in het supernatant van perfusaten verkregen van levers die ITBL ontwikkelden (n=20) werden vergeleken met die van levers die geen galwegcomplicaties ontwikkelden (n=37). Om te corrigeren voor mogelijke verschillen in concentratie tussen perfusaten, werden ratio's van HD-

miRs/CDmiRs gebruikt voor analyse. Ontvangers van een donorlever die hoge HDmiR/CDmiR ratio's bevatte in het perfusaat, met name door lage CDmiR waarden, hadden een drie- tot zesmaal verhoogd risico op het ontwikkelen van ITBL tijdens follow-up. Het onderscheidend vermogen van HDmiR/CDmiR ratio's was redelijk, met C-statistiek waarden tussen de 0.74-0.77. Er bestond echter wel een substantiële overlap in biomarker waarden tussen de ITBL en de niet-ITBL groep.

Een mogelijke verklaring voor de lagere CDmiR waarden in perfusaten van de ITBL groep zou het verlies aan cholangiocyten kunnen zijn[7]. Analyse van gepaarde leverbiopsen (n=24), welke overigens minder goed presteerden als voorspellende biomarker, liet echter geen verminderde weefselexpressie zien van CDmiRs. Deze observatie is op zijn beurt weer te verklaren door de manier waarop de biopsen zijn verzameld; dit waren namelijk wigbiopsen van leverweefsel afkomstig van het linker laterale segment. Wellicht dat CDmiRs in perfusaat beter correleren met de expressie in galwegweefsel, dat meer cholangiocyten bevat. Dit moet toekomstig onderzoek nog uitwijzen. Verder zou het kunnen dat door hun overvloedigheid in weefsel kleine veranderingen in miRNA expressie niet significant zijn, terwijl de effecten van kleine veranderingen duidelijker naar voren komen in cel-armere perfusaten. Daarnaast zou het vrijkomen van CDmiRs in gal gedurende galwegschaade, zoals aangetoond in **hoofdstuk 6**, de lagere waarden van CDmiRs in perfusaten kunnen verklaren. De redenering dat CDmiRs vrijkomen in het galweglumen vormde de basis van een andere studie die profielen van miRNAs onderzocht in de context van ITBL. Lankisch et al. hebben miRNA profielen in gal beschreven bij patiënten met verschillende soorten galwegcomplicaties, met specifieke aandacht voor ITBL[63]. Zij opperden dat veranderingen in het galwegepithelium zoals bij ITBL het best weerspiegeld worden in de samenstelling van de gal, terwijl complicaties als choledocholithiasis voornamelijk voor een obstructie van gal zorgen. De onderzoekers screenen op relevante miRNAs in ongefractioneerde galmonsters die waren verkregen door middel van endoscopische retrograde cholangiografie (ERC) bij levertransplantatiepatiënten met ernstige ITBL (n=4) versus patiënten met enkele anastomotische stricturen (n=4). Uit een pool van 905 miRNAs identificeerden zij zeven potentiële miRNAs van belang, die vervolgens gevalideerd werden in een groter patiëntencohort (ITBL n=37, anastomotische stricturen n=39 en patiënten met galstenen n=12). Zo resteerden drie relevante miRNAs, miR-517a, miR-892a en miR-106a*, welke significant verschillende waarden hadden in gal van patiënten met ITBL ten opzichte van patiënten met anastomotische stricturen en galstenen. Deze miRNAs waren echter niet in staat om onderscheid te maken in de ernst of de mate van ITBL. Limitaties van de studie betreffen de relatief lage niveaus van miRNAs, als ook de lage sensitiviteit en specificiteit van miRNAs bij het voorspellen van ITBL. En door het achterwege laten van een multivariate analyse blijft het onbekend of de geïdentificeerde miRNAs in gal voorspellers zijn voor ITBL, onafhankelijk van andere patiëntkarakteristieken.

Fracties extracellulaire miRNAs: meer dan een ingewikkelde manier om schade te meten?

Redenerend dat schade aan hepatocyten en cholangiocyten leidt tot het actief of passief vrijkomen van miRNAs uit cellen, hebben we in **hoofdstuk 6 en 7** de aanwezigheid van extracellulaire miRNAs geanalyseerd in het supernatant van gal en perfusaten. MiRNAs waren echter ook aanwezig in andere cel-vrije fracties, zoals organellen en kleinere vesikels zoals exosomen. Het percentage miRNAs dat zich in deze fracties bevond was echter laag, met minder dan 1% van de miRNAs aanwezig in kleinere vesikels.

Er is veel discussie gaande over de vraag welke fractie van gal, perfusaat of andere biovloeistoffen geanalyseerd dient te worden bij de bestudering van extracellulaire miRNAs. Lankisch et al. gebruikten ongefractioneerde galmonsters voor miRNA analyse. Daarom blijft het onduidelijk welke van de door hen geïdentificeerde miRNAs in gal aanwezig waren in cellen of in de vloeibare fractie. Shigehara et al., die als eerste diagnostische miRNA profielen in gal beschreven voor cholangiocarcinoom, vonden een meerderheid van de gedetecteerde miRNAs in cellen, terwijl een veel lagere hoeveelheid teruggevonden werd in de fractie met microvesikels[64]. Voorgaande studies betreffende microvesikels en exosomen in gal laten zien dat deze fracties wel degelijk verschillende miRNAs kunnen bevatten. Li et al. hebben bijvoorbeeld een diagnostische miRNA assay ontworpen voor cholangiocarcinoom, gebruikmakend van geïsoleerde microvesikels in gal[65]. Analyse van miRNAs in exosomen in gal kan waarschijnlijk meer informatie opleveren over cholangiocyten-regulerende mechanismen en transmissie van ziekte[66-68]. Waarschijnlijk is er geen goed of fout in het besluit om exosomen of supernatant te analyseren op extracellulaire miRNAs, afhankelijk van de onderzoeksvraag. Maar onderzoekers dienen er rekening mee te houden dat de keuze om een bepaalde fractie te analyseren, kan leiden tot verschillen in de prestatie van miRNAs als biomarkers. Sommige miRNAs zullen namelijk voorspellende waarde hebben in exosomen maar niet in supernatant en vice versa[69]. Bovendien kan de aanwezigheid van miRNAs afwijken tussen verschillende populaties exosomen[70]. Ons besluit om het supernatant van gal en perfusaten te analyseren werd voornamelijk gedreven door het feit dat slechts een minderheid van de miRNAs zich in exosomen bevond en dat een dergelijke studieopzet het risico met zich meebrengt dat andere belangrijke miRNAs over het hoofd zouden worden gezien[71].

De vraag blijft of extracellulaire miRNAs een ingewikkelde manier zijn om simpele cellekkage te detecteren, die ook gemakkelijker bepaald zou kunnen worden met conventionele markers als AST en ALT. Zoals besproken in **hoofdstuk 2** zijn waarden van AST en ALT in perfusaten immers voorspellend voor het optreden van EAD en PNF na levertransplantatie. Bovendien laten Den Dulk et al. zien dat piekwaardes van serum ALT

>1300 IU/L voorspellend zijn voor NAS na DCD levertransplantatie[2]. Dus waarom zou men dan een dure en arbeidsintensieve meting verrichten naar miRNAs? Een argument in het voordeel van miRNAs is de vroege stijging in biovloeistoffen, die meer sensitief lijkt te zijn dan die van levertransaminasen[52, 72]. Daarnaast zijn CDmiRs meer specifiek voor schade aan cholangiocyten dan transaminasen die voornamelijk aanwezig zijn in hepatocyten. De correlatie tussen piek serum ALT en NAS komt dan ook waarschijnlijk voort uit ernstige ischemische schade die zowel hepatocyten als cholangiocyten aantast. Het vrijkomen van CDmiRs kan echter ook gerelateerd zijn aan andere factoren die samenhangen met cholangiocyten schade, wat moet blijken uit toekomstig onderzoek. Tenslotte, het feit dat miRNAs ook aanwezig zijn in andere extracellulaire fracties maakt ze meer geschikt voor het bestuderen van onderliggende mechanismen van schade. Een versnelde en geoptimaliseerde detectie van miRNAs, welke in een latere paragraaf nog aan bod zal komen, maakt ze aantrekkelijker en beter toepasbaar bij klinische levertransplantatie.

Het effect van heparine op de detectie van microRNAs

Een van de grote voordelen van miRNAs boven messenger RNA als biomarker is hun stabiliteit op kamertemperatuur, zoals aangetoond in **hoofdstuk 6 en 7**, en hun stabiliteit na herhaalde cycli van vriezen en ontdooien. Nadelen zijn de tijdsintensieve procedures van RNA isolatie en reverse-transcriptase kwantitatieve PCR (RT-qPCR). Hoewel RT-qPCR een sensitieve techniek is die zeer kleine hoeveelheden miRNAs en andere genen kan meten, zijn er factoren beschreven die qPCR kunnen inhiberen en zodoende foutieve resultaten opleveren. **Hoofdstuk 8 en 9** van dit proefschrift focussen op een dergelijke PCR-inhiberende component, namelijk heparine, en het effect ervan op miRNA detectie. **Hoofdstuk 8** is een re-analyse van onze studie beschreven in **hoofdstuk 7**, nadat we vermoedens kregen dat perfusaten sporen konden bevatten van heparine die was toegediend gedurende de orgaanuitname procedure. Heparine gaat een sterke verbinding aan met endotheelcellen en kan daarom nog steeds aanwezig zijn in de donorlever, zelfs na veelvuldig spoelen met preservatie vloeistof[73]. We analyseerden onze monsters opnieuw met qPCR, maar ditmaal nadat de RT-stap was uitgevoerd in aanwezigheid van heparinase I, een enzym dat heparine afbreekt[74]. Dit gaf een lichte verbetering van de detectie van vrijwel alle miRNAs in perfusaten, wat er op duidt dat kleine hoeveelheden heparine aanwezig waren die de eerste meting van verschillende miRNAs in eenzelfde mate hebben beïnvloed. Het effect was echter sterker bij de detectie van HDmiR-148a. Dit kan verklaard worden doordat de niveaus van HDmiR-148a in sommige monsters, voorafgaand aan de behandeling met heparinase I, boven de detectielimiet was, maar waarvan de detectie in een aantal monsters na behandeling met Heparinase I drastisch verbeterde. Een mogelijke vervuiling met heparine had echter geen effect op de voorspellende waarde van miRNAs zoals beschreven in **hoofdstuk 7**, want HDmiR/CDmiR ratio's veranderden niet significant tussen de monsters. Het verdient dus aanbeveling om bij de analyse van miRNA ratio's te bepalen in plaats van enkelvoudige miRNA's

om het risico op foutieve resultaten te vermijden wanneer er mogelijk heparine in de monsters aanwezig is.

In **hoofdstuk 9** zijn meer technische aspecten met betrekking tot de inhiberende effecten van heparine en het tegengaan hiervan met heparinase I bestudeerd. Naast gal en bloed is er steeds meer interesse voor het bepalen van non-invasieve biomarkers in andere, wellicht nog gemakkelijker te verkrijgen lichaamsvloeistoffen. MiRNAs in urine blijken stabiele biomarkers te zijn bij niertransplantatie en hepato-pancreato-biliaire maligniteiten[75-78]. De meeste studies die miRNAs in urine onderzochten, verzamelden monsters van gehospitaliseerde patiënten die vaak profylactisch anticoagulantia ontvingen, zoals ongefractioneerde- of laag-moleculair-gewicht heparine (UH en LMWH, respectievelijk). Heparine wordt deels uitgescheiden naar de urine door de nieren, maar potentiële inhiberende effecten op de detectie van miRNAs in urine zijn nog niet eerder onderzocht. Voor onze studie hebben we het supernatant van urinemonsters onderzocht die waren verkregen van gezonde nierdonoren en levertransplantatie ontvangers, met gehepariniseerde en niet-gehepariniseerde individuen in beide groepen. De detectie van miRNAs in urine met RT-qPCR was sterk geïnhibeed en dosis afhankelijk in monsters van gehepariniseerde individuen. Dit veroorzaakte een sterke variatie in de waarden van miRNAs in urine en zou dus kunnen leiden tot vertekende uitkomsten bij biomarker studies. De variatie nam echter sterk af wanneer monsters tijdens de RT-stap behandeld werden met heparinase I, waardoor de inhiberende effecten van heparine bijna volledig teniet werden gedaan. De detectie van miRNAs in weefsel werd niet beïnvloed door systemische toediening van heparine. De inhibitie van de RT-qPCR reactie komt voort uit de co-isolatie van heparine met het RNA. De mate van heparine co-isolatie varieert waarschijnlijk tussen verschillende isolatie methoden. In onze studie is RNA geïsoleerd op basis van molecuul grootte, waarbij ook andere moleculen zoals LMWH de isolatie kolom kunnen passeren en terecht kunnen komen in het geïsoleerde materiaal. Protocollen die een andere aanpak hebben voor de isolatie van miRNAs, zoals elektrochemische magnetische bolletjes, ondervinden mogelijk minder problemen van heparine vervuiling in RNA monsters[79]. De resultaten uit onze studie wijzen er echter op dat in gehospitaliseerde patiënten die systemisch anticoagulantia toegediend krijgen, monsters gebruikt wordendie bij biomarker onderzoek gecontamineerd kunnen zijn met heparine, met mogelijke effecten op de uitkomst van het onderzoek.

Optimalisatie en validatie van miRNA detectie

Geoptimaliseerde detectie en validatie van miRNAs is tevens afhankelijk van verschillende andere factoren die aandacht verdienen. Een van de vragen die opkomt is op welk materiaal een miRNA array uitgevoerd dient te worden voor het identificeren van potentieel interessante miRNAs. In veel studies wordt gekozen om een array uit te voeren op weefsel van een klein identificatie cohort (zo'n vier tot zeven patiënten per

groep) en om de meest significante miRNAs te valideren in een groter validatie cohort. Het uitvoeren van een array op weefsel om later te valideren in lichaamsvloeistoffen zoals serum en gal kan echter teleurstellende resultaten opleveren. Sommige miRNAs in weefsels zijn nauwelijks detecteerbaar in lichaamsvloeistoffen. Daarnaast bevat weefsel vaak een grote variatie aan celtypen, wat kan leiden tot ongelijkheid binnen groepen en niet significante resultaten in validatie cohorten, zelfs bij gebruik van vergelijkbare biomaterialen[80]. Dit probleem kan wellicht vermeden worden door bijvoorbeeld celtypen te selecteren door middel van laser capture microdissectie, in plaats van het gebruik van hele biopten voor de isolatie van miRNAs[51].

Ten tweede kan het opwerken van weefsels en biovloeistoffen verschillen tussen transplantatiecentra, wat het vergelijken van de bruikbaarheid van biomarkers bemoeilijkt. Dit is vooral het geval bij het verzamelen van perfusaten. Niet alleen het type preservatie vloeistof, maar ook het volume en de manier waarop het transplantaat wordt gespoeld verschilt tussen ziekenhuizen. Bovendien kan de keuze van het biomateriaal gevolgen hebben voor de kwaliteit van het geïsoleerde RNA. Formaline-gefixeerde biopten ingebed in paraffine (FFPE) worden als inferieur beschouwd voor de isolatie van RNA vergeleken met direct bevroren biopten. De laatste jaren is echter duidelijk geworden dat ook FFPE biopten een waardevolle en betrouwbare bron vormen voor miRNA onderzoek[81-83].

Tenslotte richt steeds meer onderzoek zich op het versnellen en vereenvoudigen van de isolatie en detectie van miRNAs. De normale RT-qPCR techniek, momenteel de gouden standaard voor miRNA detectie, maakt het voor klinici onaantrekkelijk om miRNAs toe te passen tijdens levertransplantatie vanwege de tijdrovende en arbeidsintensieve procedure. Maar nieuwere technieken om miRNA detectie te versnellen lijken veelbelovend. Liu et al. hebben bijvoorbeeld onlangs een biosensor ontwikkeld die direct miRNAs kan detecteren door middel van lichtfase veranderingen tussen complementaire DNA probes en doelwit miRNA. Op deze manier duurt de detectie van miRNAs in urine ongeveer 15 minuten[84]. Dit is slechts een voorbeeld van de vele innovatieve ontwikkelingen om miRNA detectie te versnellen en optimaliseren. Met de opmars van machine preservatie om de kwaliteit van het transplantaat te optimaliseren, wordt vroeg-detectie van galwegschade met behulp van versnelde miRNA metingen in recirculerende perfusaten extra interessant.

Conclusies en toekomstperspectieven

De studies beschreven in dit proefschrift dragen bij aan een betere evaluatie van de kwaliteit van het transplantaat en de prestatie van potentiële biomarkers om accuraat het risico op complicaties na levertransplantatie te voorspellen. De introductie van machineperfusie creëert extra tijd waarin biomarkers in perfusaat gemeten kunnen worden voor de evaluatie van levers afkomstig uit kwalitatief marginale donoren. Maar

ook de productie en samenstelling van gal geven informatie over transplantaatfunctie. DCD levers lijken geen verhoogde neiging te hebben op het vormen van microtrombi gedurende transplantaat preservatie. Daarom lijkt het intra-operatief toedienen van fibrinolytica ter preventie van NAS niet gerechtvaardigd. Genetische predispositie is een extra risicofactor op het ontwikkelen van NAS in levertransplantatie patiënten die tevens PSC als onderliggend lijden hebben. Donor-ontvanger mismatch in FUT2 secretor status verhoogt het risico op vroege ontwikkeling van NAS nog sterker. Een aangepaste toewijzing van donorlevers op basis van genetische screening van donoren en PSC patiënten zou daarom kunnen bijdragen aan betere uitkomsten in deze groep. Met de toenemende hoeveelheid levers afkomstig van uitgebreide criteria donoren zijn meer objectieve en sensitieve biomarkers noodzakelijk om ernstige galwegcomplicaties als NAS te voorspellen. MiRNAs, in het bijzonder CDmiR, hebben potentie als vroege voorspellers van NAS al ten tijde van transplantaat preservatie. De toepassing van miRNAs in de klinische praktijk is echter afhankelijk van het optimaliseren en versnellen van detectie technieken. Nieuwe ontwikkelingen in dit veld lijken veelbelovend en miRNAs in biovloeistoffen kunnen een waardevolle toevoeging zijn naast de klassieke biomarkers. Met objectieve biomarkers kan de donorvoorraad en het aantal geëffectueerde DCD donoren voor levertransplantatie in de nabije toekomst hopelijk worden vergroot.