

DISS. ETH Nr. 26434

Development of a long-term *ex vivo* liver perfusion system

A dissertation submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
Dustin Alexander Becker
MSc ETH
born on May 25th, 1991
from Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Dr. h.c. Philipp Rudolf von Rohr, examiner
Prof. Dr. med. Pierre-Alain Clavien, co-examiner
Prof. Dr. Christopher Onder, co-examiner
Prof. Dr. Mark Tibbitt, co-examiner

2020

Abstract

Life outside the body, or *ex vivo* organ perfusion, has interested the scientific community for almost a century. With the first successful liver transplantation in the 1960s by Thomas Starzl, excitement around *ex vivo* liver perfusion intensified. However, the main competitor of *ex vivo* perfusion – placing the organ on ice – remained the most commonly applied method for storing an organ prior to transplantation. In recent years, with more and more people requiring an organ and consequently two to three times more patients awaiting one as compared to transplantations taking place, interest in *ex vivo* organ perfusion has revived. Currently, organ perfusion for up to a day allows to prolong storage time and assess graft quality prior to transplantation, thereby enhancing organ reach and outcome certainty. Extending this duration lays the foundation to enable further treatment such as organ recovery and repair. Taking it one step further, one would provide a sufficient time window to enable *ex vivo* liver regeneration, which is possible within one week *in vivo*. In this thesis, an *ex vivo* perfusion technology has been developed which is capable of perfusing pig and human livers for one week.

The perfusion system was developed based on pig liver experiments. Initial experiments were conducted with a commercially available machine. Based on this experience, a first prototype was constructed. From this point on, incremental changes were conducted, evaluating their effect on the perfusion quality of the liver. First, glucose supplementation and metabolism was improved by controlling the glucose infusion rate, hence ensuring physiological blood glucose levels and avoiding hyperglycemia. Secondly, pulsatile operation of the pump and, thereby, hepatic artery (HA) pressure lead to reduced hemolysis rates in the perfusion system. Thirdly, an integrated dialysis unit provided a mean to ensure physiological electrolyte levels in the perfusate and enabled the removal of metabolic waste products such as urea from the system. Further, hematocrit could be controlled with the dialysis by defining the amount of fluid

within the blood. Lastly, a physiological oxygen concentration in the portal vein (PV) reduced the vascular resistance in the HA, leading to a lower demand for vasodilator infusion. With the final machine prototype, livers could be perfused viably for seven days, which was evaluated based on various parameters such as metabolic function, damage markers and tissue integrity.

The liver plays a central role in maintaining the body's glucose homeostasis. With the motivation of ensuring physiological perfusate conditions in the perfusion system, the liver's functionality was utilized to control the glucose level in the perfusate. Thereby, insulin and glucagon are infused in a closed-loop manner based on a continuous glucose sensor. The insulin controller was elaborated in detail and two controllers were compared, namely a P-controller and a model based controller. There was no significant difference in the performance of the two controllers with respect to their ability to maintain glucose in the physiological range. Further, blood glucose could be kept within the physiological range for most of the perfusion time for both, human and pig livers. The main reason for occasions of blood glucose lying outside of the physiological range was the initial ischemia reperfusion injury, when the liver releases glucose in an uncontrollable manner. Concluding, blood glucose can be maintained in the physiological range and a P-controller is able to ensure such in the presented *ex vivo* liver perfusion system.

With the presented system, hemodynamic studies were conducted with pig livers. More specifically, the hepatic arterial buffer response (HABR) was studied in the *ex vivo* system. The HABR describes the relation of PV flow to HA flow resistance, where an increase in PV flow leads to an increase in HA flow resistance and vice versa. In order to study the HABR on the perfusion systems, the in- and outputs of the liver, namely HA, PV and vena cava (VC), were controlled and varied individually. First, the HABR showed to be unimpaired in the *ex vivo* perfusion system with a similar behaviour as previously reported *in vivo*. Secondly, in addition to the already known effect of PV flow variations on the HA resistance, an influence of VC pressure on the HA resistance was identified. By applying a hemodynamic model, the interpretation of the HABR and VC pressure variation experiments was supported and a sole washout theory - which is commonly applied for HABR nowadays - seems unlikely. A myogenic response must also play a role during HABR.

Concluding, washout and myogenic effects both influence the HABR, and hepatic sinusoidal pressure levels strongly influence the HA resistance.

The developed system was further evaluated with declined human livers, which were rejected for transplantation in entire Switzerland due to poor quality. These livers were declined for various reasons and, hence, very heterogeneous in their quality. Of ten livers, six livers were able to recover on the perfusion system and could be perfused for seven days. In the case of the other four livers, the livers could not show viability on the system and failed after four days latest. With the ability to evaluate borderline organs prior to transplantation, such organs could already be transplanted back into a patient if the perfusion on the machine renders those as transplantable. In the end, this would at this stage allow more organs to be brought to patients, ultimately showing the potential of the developed system.

Zusammenfassung

Das Wunder des Lebens ausserhalb des Körpers interessiert die wissenschaftliche Gemeinschaft seit fast einem Jahrhundert. Mit der ersten erfolgreichen Lebertransplantation in den 1960er Jahren durch Thomas Starzl wuchs das Interesse an der *ex vivo* Leberperfusion. Der Hauptkonkurrent der *ex vivo* Perfusion - die Lagerung des Organs auf Eis - blieb jedoch für lange Zeit die Standardmethode zur Aufbewahrung eines Organs vor der Transplantation. In den letzten Jahren, in denen immer mehr Menschen ein Organ benötigen und damit zwei- bis dreimal mehr Patienten auf ein Organ warten als zur Transplantation verfügbar sind, hat sich das Interesse an der *ex vivo* Organperfusion wieder verstärkt. Die derzeitigen Systeme ermöglichen es, Lebern bis zu einem Tag aufzubewahren und erlauben es dadurch einerseits, die Reichweite für den Organtransport zu vergrössern und andererseits, die Organe vor der Transplantation zu beurteilen - wodurch die Sicherheit einer Transplantation erhöht werden kann. Diese Aufbewahrungsdauer zu verlängern bildet die Grundlage für weitere Behandlungsmöglichkeiten - wie zum Beispiel Organerholung oder -reparatur vor einer Transplantation. Zieht man dies einen Schritt weiter, bietet dies ein ausreichendes Zeitfenster, um *ex vivo* Leberregeneration zu ermöglichen, was *in vivo* innerhalb einer Woche gelingt. In dieser Arbeit wurde eine *ex vivo* Perfusionstechnologie entwickelt, die in der Lage ist, Schweine- und Menschenleber eine Woche lang am Leben zu erhalten.

Das Perfusionssystem wurde anhand von Schweinelebern entwickelt. Erste Versuche wurden mit einer kommerziellen Maschine durchgeführt. Basierend auf diesen Erfahrungen wurde ein erster Prototyp gebaut. Darauffolgend wurden inkrementelle Veränderungen durchgeführt und deren Einfluss auf die Perfusionsqualität der Leber evaluiert. In einem ersten Schritt wurde der Glukosestoffwechsel durch die Kontrolle der Glukoseinfusionsrate verbessert, wodurch physiologische Blutzuckerwerte gewährleistet und eine Hyperglykämie vermieden wurde. Als zweiter

Schritt führte die pulsierende Betriebsweise der Pumpe, respektive Druck in der Leberarterie (HA), zu einer reduzierten Hämolyserate im Perfusionssystem. Drittens konnten anhand einer integrierten Dialyseeinheit physiologische Elektrolytwerte im Perfusat gewährleistet werden und Stoffwechsellendprodukte, wie zum Beispiel Harnstoff, aus dem System entfernt werden. Darüber hinaus erlaubte die Dialyse die Kontrolle des Hématokrits, indem die Menge der Flüssigkeit im Blut definiert wurde. Schlussendlich reduziert eine physiologische Sauerstoffkonzentration in der Portalvene (PV) den Gefäßwiderstand in der HA, was zu einem geringeren Bedarf an gefässerweiternden Medikamenten führte. Mit dem finalen Maschinenprototypen konnten die Leber sieben Tage lang lebensfähig perfundiert werden, was anhand verschiedener Parameter wie Stoffwechselfunktion, Schadensmarker und Gewebeategrität bewertet wurde.

Die Leber spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase des Körpers. Mit der Motivation, physiologische Perfusatbedingungen im Perfusionssystem zu gewährleisten, wurde diese Funktionalität der Leber genutzt, um den Blutzuckerspiegel im Perfusat zu kontrollieren. Dabei werden Insulin und Glukagon mithilfe eines Reglers basierend auf einen kontinuierlichen Glukosesensor infundiert. Der Insulinregler wurde detailliert ausgearbeitet und zwei Regler verglichen, nämlich ein P-Regler und ein modellbasierter Regler. Es gab keinen signifikanten Unterschied in den Resultaten der beiden Regler im Bezug auf deren Fähigkeit den Blutzucker im physiologischen Bereich zu halten. Der Blutzuckerspiegel konnte für einen Grossteil der Perfusionszeit im physiologischen Bereich gehalten werden. Der Hauptgrund, dass der Blutzucker teilweise ausserhalb des physiologischen Bereichs war, war der anfängliche Ischämie-Reperfusionsschaden, wodurch die Leber Glukose auf unkontrollierbare Weise freisetzt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Blutzuckerspiegel im physiologischen Bereich gehalten werden kann und ein P-Regler in der Lage ist, dies im vorgestellten *ex vivo* Leberperfusionssystem zu gewährleisten.

Mit dem entwickelten System wurden hämodynamische Studien mit Schweinelebern durchgeführt. Genauer gesagt wurde die sogenannte hepatisch-arterielle Pufferreaktion (HABR) im *ex vivo* System untersucht. Die HABR beschreibt das Verhältnis von PV Strömung zu HA Strömungswiderstand, wobei eine Erhöhung der PV Strömung zu einer

Erhöhung des HA Strömungswiderstandes führt und umgekehrt. Um die HABR mittels des Perfusionssystems zu untersuchen, wurden die Ein- und Ausgänge der Leber, nämlich HA, PV und Vena Cava (VC), einzeln kontrolliert und variiert. Einerseits wurde gezeigt, dass die HABR im *ex vivo* Perfusionssystem ähnlich ausgeprägt ist wie in zuvor berichteten *in vivo* Untersuchungen. Andererseits wurde neben der bereits bekannten Wirkung der HABR auch ein Einfluss des VC-Drucks auf den HA Strömungswiderstandes identifiziert. Anhand eines hämodynamischen Modells wurde die Interpretation der HABR- und VC Druckvariationsexperimenten unterstützt. Eine reine Auswaschtheorie, anhand deren aktuell HABR beschrieben wird, erscheint unwahrscheinlich. Eine myogene Reaktion muss auch bei HABR eine Rolle spielen. Schlussendlich kann geschlossen werden, dass beides, auswaschende und myogene Effekte, die HABR beeinflussen und die intrahepatischen Druckniveaus einen starken Einfluss auf den HA Strömungswiderstand haben.

Das entwickelte System wurde mit menschlichen Lebern evaluiert, die aufgrund schlechter Qualität zur Transplantation in der ganzen Schweiz abgelehnt wurden. Diese Lebern wurden aus verschiedenen Gründen abgelehnt und waren daher in ihrer Qualität sehr heterogen. Von zehn Lebern konnten sich sechs Leber am Perfusionssystem erholen und sieben Tage lang lebensfähig perfundiert werden. Im Falle der anderen vier Lebern konnten die Lebern keine Lebensfähigkeit auf dem System zeigen und fielen spätestens nach vier Tagen aus. In Anbetracht der Tatsache, dass alle Leber für die Transplantation abgelehnt wurden, zeigt diese Studie das Potenzial des entwickelten *ex vivo* Leberperfusionssystems. Dadurch, dass grenzwertige Organe auf dem System evaluiert werden können, könnten solche Organe nach einer positiven Beurteilung auf der Maschine wieder einem Patienten transplantiert werden. Schlussendlich könnten dadurch bereits jetzt mehr Organe an Patienten gebracht werden und zeigt damit den Mehrwert des entwickelten Systems.