

Research Progress of Mechanical Perfusion in Liver Transplantation

Guangyi Zhu¹ Xuyong Sun^{2*}

1. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541001, China

2. The Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530007, China

Abstract

Liver transplantation is the most effective treatment for end-stage liver disease. The shortage of donor organs is becoming more and more serious. More and more standard donor livers are used in clinical liver transplantation. Following a series of problems put forward higher requirements for organ preservation and repair technology. Mechanical perfusion can repair the marginal donor liver, reduce ischemia-reperfusion injury, promote the recovery of liver transplantation function, and reduce the risk of postoperative complications. A series of clinical studies have preliminarily proved its safety and effectiveness. However, if it is to be widely used in clinical practice, it still needs to face the problems of high cost, complex operation and perfusion parameter setting. This paper reviews the different types of mechanical liver transplantation.

Keywords

liver transplantation; mechanical perfusion; organ preservation; perfusate; low temperature mechanical perfusion; moderate temperature mechanical perfusion; sub normal temperature mechanical perfusion; normal temperature mechanical perfusion

机械灌注在肝移植中的研究进展

朱广艺¹ 孙煦勇^{2*}

1. 桂林医学院, 中国·广西 桂林 541001

2. 广西医科大学第二附属医院, 中国·广西 南宁 530007

摘要

肝移植是治疗终末期肝病最有效的手段。供体器官短缺问题日趋严重, 越来越多的扩大标准供体供肝被应用于临床肝移植。随之而来的一系列问题, 对器官保存和修复技术提出了更高的要求。机械灌注可修复边缘供肝, 减轻缺血-再灌注损伤, 促进移植肝功能的恢复, 降低术后并发症的风险。一系列临床研究已经初步证明了其安全性和有效性, 但要广泛应用于临床, 还需面临费用昂贵、操作复杂、灌注参数设置等难题。论文针对应用于肝移植的不同类型机械灌注技术进行综述。

关键词

肝移植; 机械灌注; 器官保存; 灌注液; 低温机械灌注; 中温机械灌注; 亚常温机械灌注; 常温机械灌注

1 引言

肝移植是治疗终末期肝病最有效的手段。然而, 供体器官短缺问题日趋严重, 严重制约了中国肝移植的发展。近年来, 为了应对供肝短缺的问题, 越来越多的扩大标准供体(extended criteria donor, ECD)供肝被应用于临床肝移植。其中, ECD包括心脏死亡器官捐献(donation after cardiac death, DCD)供体; 供体年龄 > 65岁; 体质指数(body mass index,

BMI) > 30kg/m²; 胆红素 > 51 mmol/l; 天冬氨酸转氨酶(spartate aminotransferase, AST)或丙氨酸转氨酶(lanine aminotransferase, ALT) > 正常值3倍; 血清钠 > 165 mmol/l; 重症监护室(intensive care unit, ICU)住院时间 > 7天; 脂肪变性程度 > 40%等^[1]。

ECD供肝具有热缺血时间长、不可控因素多、术后并发症率高等特点, 这就要求我们对ECD供肝实施更好的器官保存和修复技术。研究表明, 机械灌注(machine perfusion, MP)有助于提高ECD供肝质量^[2], 改善临床预后。论文根据机械灌注温度设置进行分类^[3], 综述了不同的肝脏机械灌注方法, 简要讨论了每种技术的优点和局限性, 探讨从动物

【基金项目】国家自然科学基金(项目编号: 81670596)。

【通讯作者】孙煦勇, 博士生导师, 主任医师, 任职于中国广西医科大学第二附属医院器官移植科, 通讯邮箱: sunxuyong@gxmu.edu.cn。

实验到临床应用的当前趋势和未来前景。

2 灌注液的发展

1969年, Collins等^[4]发明了世界上最早在临床使用的器官保存液——Collins液。该液是一种高钾、高镁、低钠的细胞内液型溶液,通过逆转Na⁺/K⁺的比例来实现细胞内离子平衡。但其用于保存肾脏时,易形成磷酸镁沉淀物,影响肾脏功能。

1976年,欧洲移植中心在Collins液的基础上去除镁离子,研发了EC(Euro-Collins)液,使用非渗透性物质葡萄糖来防止细胞水肿,但易导致组织产生明显的酸中毒,目前临床上已较少使用。

1988年, Belzer等^[5]研发了UW(University of Wisconsin)溶液,这是目前肝移植应用最为普遍的灌注液。UW液是一种高钾、低钠的细胞内液型溶液,其使用大分子物质乳糖醛酸、棉子糖和羟乙基淀粉代替Collins液中的葡萄糖,防止细胞、组织水肿,以磷酸盐作为缓冲系统防止酸中毒,增加了谷胱甘肽、别嘌呤醇对抗氧自由基对组织的损伤,并加入腺苷作为合成ATP的前体。

随后, Belze教授在UW液的基础上进行改良,研制出UW-G(UW-Gluconate, 又称KPS-1)溶液,用葡萄糖盐代替乳糖醛酸盐和棉子糖,并保留了羟乙基淀粉,以维持胶体渗透压。此外, UW-G液中增加了甘露醇、核糖及HEPES缓冲液,并用腺嘌呤代替了腺苷。UW-G液已成为动物机械灌注实验中常用的灌注溶液。

HTK(Histidine Tryptophan Ketoglutarate)液是由德国的Brtschneider教授^[6]创制的,最初作为心脏停搏液应用于临床上。其具有低钾、低钠、低钙的特点,可防止钙超载导致的缺血再灌注损伤,并加入了比磷酸盐作用更加强大的组氨酸

作为缓冲对,此外HTK液中含有色氨酸和α-酮戊二酸,作为能量底物和细胞膜保护剂,并加入甘露醇防止细胞水肿。与UW液相比,HTK液黏性低、流动性高,更利于器官的灌注。

Celsior液由Menasche等^[7]于1994年研发,是一种高钠、低钾的细胞外液型保存液,限制了钙离子的内流。其结合了UW液与HTK液的优点,去除了羟乙基淀粉,具有低黏度的优势,含有乳糖醛酸、甘露醇、组氨酸以及谷氨酸和谷胱甘肽。

2005年开发的Polysol液,含有谷氨酰胺、组氨酸、色氨酸、精氨酸等多种氨基酸,抗坏血酸、维生素E等维生素及谷胱甘肽等抗氧化剂,更富含有利于功能恢复的组织培养基。研究表明^[8], Polysol液对肝脏的保存效果优于UW液和UW-G液。

Vasosol液在UW-G的基础上添加了抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸、维生素E,及血管扩张剂α-酮戊二酸、硝酸甘油、前列腺素E1和L-精氨酸。Guarrera等^[9]的临床试验结果显示,相较于静态冷保存,使用Vasosol液作为灌注液的低温机械灌注,能降低早期移植植物无功能率及血清损伤标记物水平,减少受者的住院时间。

IGL-1(institut georges lopez-1)液是由法国里昂集团Georges Lopez研究所在UW液的基础上研发,是一种高钠、低钾的细胞外液型保存液。该液采用黏度较小的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)代替UW液中的羟乙基淀粉来维持胶体渗透压,其余成分与UW液基本相同。在临床肝移植中, IGL-1液对肝脏的保存效果不次于UW液、Celsior液和HTK液^[10,11],见表1。

3 低温机械灌注(hypothermic machine perfusion, HMP)

低温机械灌注是在低温(0°C~12°C)条件中,持续向供

表1 灌注液成分

保存液	电解质	胶体	非渗透性物质	缓冲对	氧自由基清除剂	能量底物
Collins	高钾、高镁、低钠			磷酸盐		
EC	高钾、低钠		葡萄糖	磷酸盐		
UW	高钾、低钠	羟乙基淀粉	乳糖醛酸、棉子糖	磷酸盐	谷胱甘肽、别嘌呤醇	腺苷
UW-G	高钾、低钠	羟乙基淀粉	葡萄糖、甘露醇	磷酸盐	谷胱甘肽、甘露醇、别嘌呤醇	腺嘌呤
HTK	低钾、低钠、低钙		甘露醇	组氨酸	谷胱甘肽、甘露醇、组氨酸	色氨酸、α-酮戊二酸
Celsior	高钠、低钾		乳糖醛酸、甘露醇	组氨酸	谷胱甘肽、甘露醇、组氨酸	谷氨酸
Polysol	高钠、低钾	聚乙二醇	葡萄糖	葡萄糖	谷胱甘肽、抗坏血酸、维生素E	色氨酸、谷氨酸
Vasosol	高钾、低钠	羟乙基淀粉	葡萄糖、甘露醇	磷酸盐	N-乙酰半胱氨酸、甘露醇	α-酮戊二酸
IGL-1	高钠、低钾	聚乙二醇	乳糖醛酸、棉子糖	磷酸盐	谷胱甘肽、别嘌呤醇	腺苷

肝泵入灌注液,降低组织代谢,并提供必要的代谢底物,清除代谢废物,从而减轻获取及保存供肝过程中的损伤,延长离体肝脏的保存时间,改善供肝质量。多篇文章显示^[12, 13], HMP 能降低线粒体衍生的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生,减少损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)的释放,进而减轻线粒体 ROS 导致的下游炎症(包括胆道损伤)的激活,减轻缺血再灌注损伤。2010年,Guarrera等^[9]首次报道了采用 HMP 保存供肝的肝移植临床试验,与采用静态冷保存(static cold storage, SCS)保存供肝的肝移植受者进行比较,HMP 组的受者早期移植物无功能率、胆道并发症发生率、血清损伤指标水平更低,平均住院时间更短。该团队在随后的研究^[14]中发现,HMP 明显降低了促炎细胞因子的表达,减轻了粘附分子的下游激活和中性粒细胞、巨噬细胞的迁移,减轻了肝脏的缺血再灌注损伤。初步证明了 HMP 的临床可行性。此外,HMP 期间肝脏处于“低代谢”状态,胆汁合成较少,不能很好地实时对供肝功能进行评估。

4 低温氧合机械灌注(hypothermic oxygenated machine perfusion, HOPE)

低温氧合机械灌注在 HMP 的基础上,改变了肝脏的代谢模式,将无氧代谢转变为有氧代谢。Dutkowski 等^[15]首次在大鼠肝移植模型中使用 HOPE,结果显示,经过 1h 的低温氧合灌注后,ATP 含量上升,肝酶释放减少,胆汁合成增多,且肝窦内皮细胞未发现损伤。2014年,Dutkowski 等^[16]报道了首次使用 HOPE 保存 DCD 供肝的肝移植临床试验,结果显示,DCD 组的肝酶、肾功能以及住院时间不次于配对的脑死亡供体(donation after brain death, DBD)组,随访 8.5 个月,没有发现胆道并发症。在随后的一年中,他们将 HOPE 保存的 25 例 DCD 供肝与静态冷保存的 50 例 DCD 供肝进行肝移植,比较发现,HOPE 组的肝移植受者肝内胆管病变和胆道并发症显著降低,并且移植物 1 年存活率为 90%^[17]。保护胆管在肝移植中至关重要。众所周知,胆道的血液供应主要来自肝动脉,单靠门静脉灌注可能不足以维持胆道。van Rijn 等^[18]最先采用了一种新的灌注模式“D-HOPE”(双重低温氧合机械灌注),同时通过门静脉和肝动脉进行氧合灌注,研究显示,D-HOPE 组的 10 例肝移植受者中没有出现非吻合性胆道狭窄,而对照组的 20 例肝移植受者中出现 5 例

非吻合性胆管狭窄。最近该团队报道了一项国际多中心随机对照试验^[19],结果显示,与静态冷保存相比,D-HOPE 组的肝细胞功能改善,线粒体和内皮功能得到更好的保存,缺血再灌注损伤减轻。其他的研究中也得出了相似的结果^[20-22]。Schlegel 等^[23]最近的一项研究显示,采用 HOPE 的 DCD 肝移植的 5 年移植物存活率与 DBD 肝移植相似,优于未经治疗的 DCD 肝移植。尽管以上动物及临床研究取得了不错的成果,但其临床效果仍需更多大样本、多中心的临床研究进行验证。

5 中温机械灌注(midthermic machine perfusion, MMP)和亚常温机械灌注(subnormothermic machine perfusion, SNMP)

中温机械灌注和亚常温机械灌注的温度介于 HMP 和 NMP 之间,能避免低温带来的器官损伤,同时也能避免因供肝温度急剧升高而引起氧化应激的风险,此外,也无需额外的温度控制,且设备相对简便,更具实际操作性。最初,人们结合了 HMP 与 NMP 的优点,提出亚常温机械灌注的概念,将温度设置在 12~35°C^[24]。考虑到温度在 12~35°C,细胞代谢率存在巨大差异,2016年 Karangwa 等^[25]提出了新的命名:“中温机械灌注”,温度设置在 13~24°C;“亚常温机械灌注”,温度设置在 25~34°C。Knaak 等^[26]比较了 SNMP 和 SCS 保存猪 DCD 供肝的效果,结果显示,SNMP 减轻了肝移植术后胆管和内皮细胞的损伤。Ishihara 等^[27]的研究证明,MMP 有可能修复了胆管,抑制了胆管微绒毛的收缩,进一步减轻了胆管损伤。Okamura 等^[28]在脂肪肝大鼠模型上证明 SNMP 减轻了肝窦血管和肝细胞线粒体的损伤。Beijert 等^[29]对弃用的脂肪供肝进行 SNMP,结果表明,SNMP 能改善肝脏内皮细胞功能,减轻肝脏损伤。ATP 耗竭是胆道损伤的主要诱因。Morito^[30]等比较了 HMP 与 SNMP 保存猪 DCD 供肝的耗氧量,结果显示,耗氧量与灌注温度密切相关,高耗氧量的 SNMP 相比 HMP 更利于 DCD 供肝保存。研究认为^[31,32],亚常温机械灌注有望提高肝移植的移植物存活率。Bruinsma 等^[33]首次对废弃肝采用 SNMP,灌注时间 3h 后,乳酸水平降低,ATP 含量升高,摄氧量和胆汁产量增加,结果表明 SNMP 可有效地维持肝脏功能、减少肝脏损伤。Ciria 等^[34]最近的临床研究也证明了 SNMP 在挽救严重边缘供肝方面的潜力。MMP 与 SNMP 技术在临床肝移植中的应用效果,还需进一步的临

床研究支持。

6 可控氧合复温 (controlled oxygenated re-warming, COR)

可控氧合复温通常联合亚常温机械灌注使用, 在携氧灌注过程中缓慢复温来提高移植温度。Minor 等^[35]在猪实验模型中, 将猪供肝静态冷保存 18 个小时后, 分别进行 90 分钟的 SNMP, HMP 与 COR, 然后用自体血进行异位常温再灌注以模拟肝移植, 结果显示, COR 改善了肝胆功能, 减少了再灌注损伤。在其他类似的猪和大鼠的实验模型中也证实了这一结论^[36, 37]。2016 年, Hoye 等^[38]完成了首个使用 COR 保存供肝的肝移植临床试验, 在移植前将供肝进行 90 分钟的 COR, 随访 6 个月, 6 例肝移植受者的肝功能均恢复正常。最近, 该中心报告的一次临床试验中^[39], 18 例供肝在移植前接受 120 分钟 COR, COR 组肝移植受者 1、3、5 年生存率分别为 100%、100% 和 93.8%, 而对照组为 84.5%、82.0% 和 75.8%。

7 常温机械灌注 (normothermic machine perfusion, NMP)

常温机械灌注通过在保持常温 (35~38°C) 的环境中提供氧气和必需的底物, 模拟肝脏的生理状态, 维持正常的新陈代谢。大量动物实验^[40-42]证实了 NMP 在保存 DCD 供肝方面的优越性。此外, NMP 可通过检测肝脏代谢指标 (胆汁产量, 乳酸, 肝酶释放水平等) 对供肝质量进行评估。2013 年, op den Dries 等^[43]首次对 4 例弃用的人供肝进行 6h 的 HMP, 灌注液中的生化指标提示, 乳酸水平下降至正常值, 胆汁分泌正常, 肝脏的缺血再灌注损伤减轻, 功能改善, 且灌注 6h 前后组织学无损伤表现。最近报道的一项突破性研究, Eshmuminov 等^[44]对 10 例废弃人供肝采用 NMP 保存 1 周后, 其中 6 例供肝任能分泌胆汁, 合成凝血因子, 生成 ATP, 且肝脏结构保持完整。2016 年, Perera 等^[45]报道了首例采用 NMP 保存边缘供肝肝移植的临床试验, 受者术后恢复顺利, 随访 15 个月, 未出现胆道并发症。随后, Ravikumar 等^[46]报道了采用 NMP 保存供肝肝移植的一期临床试验结果, NMP 组包括 16 例 DBD 供肝和 4 例 DCD 供肝, 30 天移植存活率与对照组相当。Jassem 等^[47]的肝移植临床试验研究表明, NMP 能有效保护肝脏功能, 减少缺血再灌注损伤。最近发表

的一项国际多中心随机对照试验^[48]显示, 与常规静态冷保存相比, NMP 组的移植损伤水平降低了 50%, 器官弃用率降低了 50%, 而平均保存时间延长了 54%, 胆管并发症、受者生存率及移植存活率无显著性差异。虽然关于 NMP 的一系列临床研究取得了令人鼓舞的成果, 但其设备复杂、费用昂贵、保存过程中的感染风险等, 是我们在临床应用中需要面对的挑战。

8 常温局部灌注 (normothermic regional perfusion, NRP)

常温局部灌注是常温下将经过氧合的供体自身血液灌注入体内, 同时通过预置的动脉球囊阻断胸主动脉, 使氧合血液灌注局限于腹部器官^[49]。NRP 通常维持 1~4h, 以使腹部器官充分恢复功能并恢复能量底物, 减少缺血缺氧引起的器官损伤。实验证据表明^[50-52], NRP 能有效降低缺血性胆病的发生率。在西方国家, NRP 技术已广泛应用于临床 DCD 供体维护。2007 年, 来自西班牙的 Fondevila 教授团队^[53]首次对 40 例马氏 II 型 DCD 供体采用了 NRP 技术, 其中的 10 例供体进行了肝移植, 结果显示, 1 例发生原发性移植无功能 (primary nonfunction, PNF), 1 例出现肝动脉血栓。随后, 该团队报道了使用 NRP 维护的 34 例 DCD 供体进行肝移植, 随访 24 个月, 移植受者和移植物的 1 年存活率分别为 82% 和 70%^[54]。Blasi 等^[55]将使用 NRP 维护的 uDCD 供肝进行肝移植发现, 再灌注后, 移植受者出现血流动力学不稳定和凝血功能紊乱。此外, 一项观察性队列研究^[56]指出, 与常规供肝保存方法相比, 使用 NRP 维护 DCD 供体, 可减少术后胆道并发症、缺血型胆道病变和移植弃用率。Watson 等^[57]的研究也得出相似的结论。

9 结论

随着器官短缺问题的日益突出, 逐步扩大标准供体的利用, 尽管 SCS 技术凭借其经济、有效、便捷的优势, 至今依然是临床离体肝脏保存的金标准, 但机械灌注技术在保存供肝, 尤其是保存 ECD 供肝方面的优势逐渐体现。大量临床研究已经初步证明了其安全性和有效性, 但要广泛应用于临床, 还需面临费用昂贵、操作复杂、灌注参数设置等难题。机械灌注技术已经进入高速发展期, 随着研究的不断深入、机械灌注设备的改进以及灌注参数的优化, 机械灌注技术将成为

中国供肝保存的重要手段。

参考文献

- [1] Fischer-Fröhlich CL, Lauchart W. Expanded criteria liver donors (ECD): effect of cumulative risks[J]. *Ann Transplant*, 2006(03):38–42.
- [2] Czigany Z, Lurje I, Tolba RH, et al. Machine perfusion for liver transplantation in the era of marginal organs—New kids on the block[J]. *Liver Int*, 2019(02):228–249.
- [3] Karangwa SA, Dutkowski P, Fontes P, et al. Machine Perfusion of Donor Livers for Transplantation: A Proposal for Standardized Nomenclature and Reporting Guidelines[J]. *Am J Transplant*, 2016(10):2932–2942.
- [4] Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage[J]. *Lancet*, 1969(7632):1219–1222.
- [5] Belzer FO, Glass NR, Sollinger HW, et al. A new perfusate for kidney preservation[J]. *Transplantation*, 1982(03):322–323.
- [6] Isemer FE, Ludwig A, Schunck O, et al. Kidney procurement with the HTK solution of Bretschneider[J]. *Transplant Proc*, 1988(05):885–886.
- [7] Menasché P, Termignon JL, Pradier F, et al. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1994(04):207–213.
- [8] Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, et al. Improved rat liver preservation by hypothermic continuous machine perfusion using polysol, a new, enriched preservation solution[J]. *Liver Transpl*, 2005(05):539–546.
- [9] Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, et al. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series[J]. *Am J Transplant*, 2010(02):372–381.
- [10] Savier E, Brustia R, Golmard JL, et al. Influence of 4 preservation solutions on ICU stay, graft and patient survival following liver transplantation[J]. *J Visc Surg*, 2020(02):87–97.
- [11] Kiyoshi Takano de Saidneuy AE, Bruno de Rezende M, Rogerio de Oliveira Salvalaggio P. A Direct Comparison Between Institut Georges Lopez 1 and Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate Preservation Solutions in Liver Transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2020(05):1262–1264.
- [12] Martins RM, Teodoro JS, Furtado E, et al. Recent insights into mitochondrial targeting strategies in liver transplantation[J]. *Int J Med Sci*, 2018(03):248–256.
- [13] Olthof PB, Reiniers MJ, Dirkes MC, et al. Protective Mechanisms of Hypothermia in Liver Surgery and Transplantation[J]. *Mol Med*, 2016(01):833–846.
- [14] Henry SD, Nachbar E, Tulipan J, et al. Hypothermic machine preservation reduces molecular markers of ischemia/reperfusion injury in human liver transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2012(09):2477–86.
- [15] Dutkowski P, Graf R, Clavien PA. Rescue of the cold preserved rat liver by hypothermic oxygenated machine perfusion[J]. *Am J Transplant*, 2006(5 Pt 1):903–912.
- [16] Dutkowski P, Schlegel A, de Oliveira M, et al. HOPE for human liver grafts obtained from donors after cardiac death[J]. *Journal of hepatology*, 2014(04):765–772.
- [17] Dutkowski P, Polak WG, Muiesan P, et al. First Comparison of Hypothermic Oxygenated Perfusion Versus Static Cold Storage of Human Donation After Cardiac Death Liver Transplants: An International-matched Case Analysis[J]. *Annals of surgery*, 2015(05):764–770.
- [18] van Rijn R, Karimian N, Matton APM, et al. Dual hypothermic oxygenated machine perfusion in liver transplants donated after circulatory death[J]. *Br J Surg*, 2017(07):907–917.
- [19] van Rijn R, van den Berg AP, Erdmann JI, et al. Study protocol for a multicenter randomized controlled trial to compare the efficacy of end-ischemic dual hypothermic oxygenated machine perfusion with static cold storage in preventing non-anastomotic biliary strictures after transplantation of liver grafts donated after circulatory death: DHOPE-DCD trial[J]. *BMC Gastroenterol*, 2019(01):40.
- [20] Patrono D, Lavezzo B, Molinaro L, et al. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion for Liver Transplantation: An Initial Experience[J]. *Exp Clin Transplant*, 2018(02):172–176.
- [21] Patrono D, Surra A, Catalano G, et al. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion of Liver Grafts from Brain-Dead Donors[J]. *Sci Rep*, 2019(01):9337.
- [22] van Rijn R, van Leeuwen OB, Matton APM, et al. Hypothermic oxygenated machine perfusion reduces bile duct reperfusion injury

- after transplantation of donation after circulatory death livers[J]. *Liver Transpl*, 2018(05):655–664.
- [23] Schlegel A, Muller X, Kalisvaart M, et al. Outcomes of DCD liver transplantation using organs treated by hypothermic oxygenated perfusion before implantation[J]. *J Hepatol*, 2019(01):50–57.
- [24] Vairetti M, Ferrigno A, Rizzo V, et al. Subnormothermic machine perfusion protects against rat liver preservation injury: a comparative evaluation with conventional cold storage[J]. *Transplant Proc*, 2007(06):1765–1767.
- [25] Karangwa SA, Dutkowski P, Fontes P, et al. Machine perfusion of donor livers for transplantation: a proposal for standardized nomenclature and reporting guidelines[J]. *Am J Transplant*, 2016(10):2932–2942.
- [26] Knaak JM, Spetzler VN, Goldaracena N, et al. Technique of subnormothermic ex vivo liver perfusion for the storage, assessment, and repair of marginal liver grafts[J]. *J Vis Exp*. 2014(90):e51419.
- [27] Ishihara Y, Bochimoto H, Kondoh D, et al. The ultrastructural characteristics of bile canaliculus in porcine liver donated after cardiac death and machine perfusion preservation[J]. *PLoS One*, 2020(05):e0233917.
- [28] Okamura Y, Hata K, Tanaka H, et al. Impact of Subnormothermic Machine Perfusion Preservation in Severely Steatotic Rat Livers: A Detailed Assessment in an Isolated Setting[J]. *Am J Transplant*, 2017(05):1204–1215.
- [29] Beijert I, Mert S, Huang V, et al. Endothelial Dysfunction in Steatotic Human Donor Livers: A Pilot Study of the Underlying Mechanism During Subnormothermic Machine Perfusion[J]. *Transplant Direct*, 2018(05):e345.
- [30] Morito N, Obara H, Matsuno N, et al. Oxygen consumption during hypothermic and subnormothermic machine perfusions of porcine liver grafts after cardiac death[J]. *J Artif Organs*, 2018(04):450–457.
- [31] Kakizaki Y, Miyagi S, Shimizu K, et al. Effects of Subnormothermic Perfusion Before Transplantation for Liver Grafts from Donation After Cardiac Death: A Simplified Dripping Perfusion Method in Pigs[J]. *Transplant Proc*, 2018(05):1538–1543.
- [32] Furukori M, Matsuno N, Meng LT, et al. Subnormothermic Machine Perfusion Preservation With Rewarming for Donation After Cardiac Death Liver Grafts in Pigs[J]. *Transplant Proc*, 2016(04):1239–43.
- [33] Bruinsma BG, Yeh H, Ozer S, et al. Subnormothermic machine perfusion for ex vivo preservation and recovery of the human liver for transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2014(06):1400–1409.
- [34] Ciria R, Ayllon-Teran MD, González-Rubio S, et al. Rescue of Discarded Grafts for Liver Transplantation by Ex Vivo Subnormothermic and Normothermic Oxygenated Machine Perfusion: First Experience in Spain[J]. *Transplant Proc*, 2019(01):20–24.
- [35] Minor T, Effertz P, Fox M, et al. Controlled oxygenated rewarming of cold stored liver grafts by thermally graduated machine perfusion prior to reperfusion[J]. *Am J Transplant*, 2013(06):1450–60.
- [36] Hoyer DP, Paul A, Luer S, et al. End-ischemic reconditioning of liver allografts: controlling the rewarming[J]. *Liver Transpl*, 2016(09):1223–1230.
- [37] von Horn C, Baba HA, Hannaert P, et al. Controlled oxygenated rewarming up to normothermia for pretransplant reconditioning of liver grafts[J]. *Clin Transplant*, 2017(11):34–36.
- [38] Hoyer DP, Mathé Z, Gallinat A, et al. Controlled Oxygenated Rewarming of Cold Stored Livers Prior to Transplantation: First Clinical Application of a New Concept[J]. *Transplantation*, 2016(01):147–52.
- [39] Hoyer DP, Benkő T, Manka P, et al. Long-term Outcomes After Controlled Oxygenated Rewarming of Human Livers Before Transplantation[J]. *Transplant Direct*, 2020(04):e542.
- [40] Zhang ZB, Liu L, Gao W, et al. Retracted: normothermic machine perfusion protects against liver ischemic reperfusion injury during reduced-size liver transplantation in pigs[J]. *Liver Transpl*, 2018(10):4276–4279.
- [41] Xu H, Berendsen T, Kim K, et al. Excorporeal normothermic machine perfusion resuscitates pig DCD livers with extended warm ischemia[J]. *J Surg Res*, 2012(02):83–88.
- [42] Boehnert MU, Yeung JC, Bazerbachi F, et al. Normothermic acellular ex vivo liver perfusion reduces liver and bile duct injury of pig livers retrieved after cardiac death[J]. *Am J Transplant*, 2013(06):1441–1449.
- [43] op den Dries S, Karimian N, Sutton ME, et al. Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of discarded human donor livers[J]. *Am J Transplant*, 2013(05):1327–1335.
- [44] Eshmuminov D, Becker D, Bautista Borrego L, et al. An integrated perfusion machine preserves injured human livers for 1 week[J]. *Nat*

- Biotechnol, 2020(02):189–198.
- [45] Perera T, Mergental H, Stephenson B, et al. First human liver transplantation using a marginal allograft resuscitated by normothermic machine perfusion. *Liver Transpl*. 2016 Jan;22(1):120–4.
- [46] Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, et al. Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase I (First-in-Man) Clinical Trial[J]. *Am J Transplant*, 2016(06):1779–1787.
- [47] Jassem W, Xystrakis E, Ghnewa YG, et al. Normothermic Machine Perfusion (NMP) Inhibits Proinflammatory Responses in the Liver and Promotes Regeneration[J]. *Hepatology*, 2019(02):682–695.
- [48] Nasralla, D.; Coussios, C.C.; Mergental, H.; et al. A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation[J]. *Nature*, 2018(557):50–56.
- [49] Hessheimer AJ, Riquelme F, Fundora–Suárez Y, et al. Normothermic perfusion and outcomes after liver transplantation[J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2019(04):200–208.
- [50] Net M, Valero R, Almenara R, et al. The effect of normothermic recirculation is mediated by ischemic preconditioning in NHBD liver transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2005(05):2385–2392.
- [51] Kerforne T, Allain G, Giraud S, et al. Defining the optimal duration for normothermic regional perfusion in the kidney donor: a porcine preclinical study[J]. *Am J Transplant*, 2018(09):317–322.
- [52] Liu Q, Nassar A, Farias K, et al. Sanguineous normothermic machine perfusion improves hemodynamics and biliary epithelial regeneration in donation after cardiac death porcine livers[J]. *Liver Transpl*, 2014(08):987–999.
- [53] Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, et al. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria[J]. *Am J Transplant*, 2007(07): 1849–1855.
- [54] Fondevila C, Hessheimer AJ, Flores E, et al. Applicability and results of Maastricht type 2 donation after cardiac death liver transplantation[J]. *Am J Transplant*, 201(01):162–170.
- [55] Blasi A, Hessheimer AJ, Beltrán J, et al. Liver transplant from unexpected donation after circulatory determination of death donors: a challenge in perioperative management[J]. *Am J Transplant*, 2016(06):1901–1908.
- [56] Hessheimer AJ, Coll E, Torres F, et al. Normothermic regional perfusion vs. super-rapid recovery in controlled donation after circulatory death liver transplantation[J]. *J Hepatol*, 2019(04):658–665.
- [57] Watson CJE, Hunt F, Messer S, et al. In situ normothermic perfusion of livers in controlled circulatory death donation may prevent ischemic cholangiopathy and improve graft survival[J]. *Am J Transplant*, 2019(06):1745–1758.