

1. Titel

Optimalisering van cel therapie voor patiënten met perifeer vaatlijden.

Afdeling Vaatchirurgie

E-mail

2. Verantwoordelijkheden

Onderzoeker (belast met de dagelijkse leiding):

Art. 9

Begeleider:

Wie verzorgt de dieren?

Art. 9

Wie voert de handelingen met de dieren uit?

Art. 9

Art. 9

Art. 12

3. Aanvraag

3a. Nieuwe aanvraag?: J

3b. Vergunning(en) biotechnologische handelingen: nvt

4. Doel van de aanvraag**4a. Primaire doel**

Klinische trials waarin patiënten met ernstig perifeer vaatlijden worden behandeld met intra-musculaire injecties met autologe beenmerg cellen tonen wisselende resultaten. Naast patiënten die een goede respons hebben (verbetering van enkel/arm index, pijnvrije loopafstand en rustpijn) is er ook een aanzienlijk aantal patiënten dat niet of nauwelijks respondeert op deze celtherapie. De reden hiervoor is onduidelijk. Derhalve is verfijning van celtherapie noodzakelijk om een zo efficiënt en optimaal mogelijke therapie te ontwikkelen voor patiënten met perifeer vaatlijden. Het primaire doel van deze studie is het onderzoeken van de rol van verschillende cellen afkomstig uit het beenmerg (CD4 T cellen en regulatoire T cellen) bij collateraalvorming. Tevens zullen verschillende basis elementen (bijvoorbeeld dosis, toedieningsplaats) van celtherapie met autologe beenmerg injecties worden onderzocht.

4b. Doel onderzoeksprogramma

De inductie van collateraalvorming (ook wel arteriogenese genoemd) middels cel therapie is een nieuwe, veelbelovende therapie voor patiënten met perifeer vaatlijden. Zowel dier- als klinische trials tonen veelbelovende resultaten, echter het is duidelijk dat we onze kennis moeten verfijnen om bijvoorbeeld de precieze subset van celtypen aan te duiden die betrokken zijn bij collateraalvorming. Dit alles om een zo efficiënt mogelijke cel therapie te ontwikkelen voor patiënten met perifeer vaatlijden.

Het doel van het onderzoeksprogramma waar dit project deel van uit maakt, is het bestuderen van de rol van verschillende cellen afkomstig uit het beenmerg (voorlopercellen, inflammatoire cellen) in relatie tot het induceren van collateraalvorming bij ischemie. Uiteindelijk zullen onze resultaten bijdragen aan een verbeterde celtherapie voor patiënten met perifeer vaatlijden.

4c. Wetenschappelijke achtergrond

Collateralen zijn arteriën die als een natuurlijke bypass om een vaatafsluiting heen kunnen groeien waardoor de lagergelegen weefsels toch van bloed worden voorzien. In dit proces wordt door een toename van de schuifspanning op de vaatwand het aanwezige endotheel geactiveerd. Hierdoor ontstaat een inflammatoire reactie, waarbij een groot aantal cytokines vrijkomen. Uiteindelijk leidt dit tot arteriogenese waarbij collateralen gevormd worden. Er zijn steeds meer aanwijzingen, dat het

immuunsysteem een belangrijke rol speelt bij collateraalvorming. Zo heeft Stabile et al. de positieve invloed van CD4+ T cellen en CD8+ T cellen op de arteriogene respons aangetoond (Stabile E et al. Circulation 2006; 113:118-124). Op basis hiervan zou stimulatie en modulering van het immuunsysteem en daarmee stimulatie van de collateraalvorming, een alternatieve therapie kunnen zijn voor patiënten met perifeer vaatlijden. Uit onderzoek van onze eigen onderzoeksgroep blijkt, dat ook Natural Killer cellen een belangrijke rol spelen bij collateraalvorming (van Weel V et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27(11):2310-8).

De rol van een subtype inflammatoire cel zal in dit experiment worden bestudeerd, namelijk de CD4+CD25+FoxP3+ T cel, de zogenaamde regulatoire T cel. Deze regulatoire T cel is fundamenteel voor het voorkomen van auto-immuun ziekten. Regulatoire T cellen functioneren als suppressor T cellen. Recente studies toonden de belangrijke suppressieve rol van de regulatoire T cel bij atherosclerose in muismodellen aan (Steffens S et al. Circulation 2006;114:1977-1984, Heller E et al. Circulation 2006;113:2301-2312). De rol van de regulatoire T cel bij collateraalvorming is zover wij weten nog niet eerder onderzocht. In experimenten in een muismodel welke perifeer vaatlijden nabootst (het zgn. achterpoot ischemie model) zullen met behulp van antilichaam en een vaccin tegen alle FoxP3 positieve cellen alle regulatoire T cellen worden uitgeschakeld. Zo kan de specifieke rol van dit celtype bij collateraalvorming in de achterpoot worden onderzocht.

Naast inflammatoire cellen is er de laatste tijd ook veel aandacht voor beenmergtransplantaties in relatie tot het stimuleren van collateraalvorming. Klinische trials tonen wisselende resultaten; naast patiënten met perifeer vaatlijden die responderen, is er ook een aanzienlijk aantal patiënten dat niet of nauwelijks respondeert op deze therapie. Het is voor de optimalisatie van deze therapie dus noodzakelijk het werkingsmechanisme van deze therapie te achterhalen. Een aantal beginselen van deze therapie zullen in dit experiment worden getest, namelijk de optimale dosis, de plaats van toediening van de beenmergcellen en het bepalen van de locatie waar deze beenmergcellen na toediening naar toe verplaatsen ("homing"). De kennis die hieruit voortkomt, zal worden toegepast bij een volgend experiment (buiten de scope van deze DEC-aanvraag) waarbij wij in een muismodel humane beenmergcellen van responders en non responders uit de klinische trial willen onderzoeken op hun capaciteit om collaterale bloedvaten te vormen.

In dit experiment zullen tevens beenmergtransplantaties van verschillende donoren (verschillende muizenstammen) plaatsvinden. Na ligatie van de arteria femoralis van de ontvanger zullen beenmergcellen van de verschillende donoren worden toegediend. Deze donoren verschillen doordat zij allen een andere respons van het immuunsysteem hebben. Derhalve kunnen wij met dit experiment aantonen dat inflammatoire cellen van het beenmerg al dan niet van invloed zijn op het stimuleren van collateraalvorming.

5. Belang van de aanvraag

5a. Medisch belang

Voor patiënten met eindstadium perifeer vaatlijden zijn vaak reguliere revascularisatie procedures middels endovasculaire technieken (percutane transluminale angioplastiek met of zonder stent) of chirurgie (bypass) niet meer mogelijk. Amputatie van onder- of bovenbeen is dan vaak het enige alternatief. In Nederland betreft dit jaarlijks ongeveer 1600 patiënten. Kortom, er is dus dringend behoefte aan nieuwe therapeutische opties voor deze groep patiënten. De inductie van collateraalvorming (arteriogenese) middels cel therapie is een nieuwe, veelbelovende therapie voor patiënten met eindstadium perifeer vaatlijden. Zowel dier- als klinische trials tonen veelbelovende resultaten, echter het is duidelijk dat we onze kennis moeten verfijnen om de precieze subset van celtypen aan te duiden die betrokken zijn bij collateraalvorming. Dit alles om een zo efficiënt mogelijke cel therapie te ontwikkelen voor patiënten met eind stadium perifeer vaatlijden.

5b. Maatschappelijk belang

Perifeer stenoserend vaatlijden is een belangrijk gezondheidsprobleem. Door de toename van incidentie van diabetes mellitus en hart- en vaatziekten zal dit een steeds groter probleem worden binnen de gezondheidszorg. Patiënten met perifeer vaatlijden hebben klachten van claudicatio intermittens (etalage

benen), ischemische rustpijn of gangreen. Veel patiënten ontkomen niet aan een amputatie. Perifeer vaatlijden gaat dus gepaard met aanzienlijke afname van kwaliteit van leven, morbiditeit en mortaliteit. Derhalve is het van groot belang nieuwe therapeutische strategieën te ontwikkelen voor deze groep patiënten.

5c. Wetenschappelijk belang

Om een zo efficiënt en optimaal mogelijke therapie te ontwikkelen is verfijning noodzakelijk van celtherapie voor patiënten met perifeer vaatlijden. Uit eerder onderzoek blijkt dat verschillende lymfocyten (T cellen, NK cellen, monocytën) een rol spelen bij het stimuleren van collateraalvorming. Momenteel moet worden ingezoomd op verschillende subsets lymfocyten om optimaal gebruik te maken van deze cellen voor celtherapie. In dit experiment zoomen we in op de CD4+CD25+FoxP3+ T cel. In zowel klinische als dierexperimentele studies is ook de betrokkenheid van beenmergcellen bij collateraalvorming aangetoond. Echter, welke cellen uit het beenmerg direct betrokken zijn bij het ontwikkelen van collaterale bloedvaten is niet bekend. Ook hier is verfijning noodzakelijk. In dit experiment zullen enkele basis principes van beenmergtransplantaties worden getest.

6a. Proefopzet

Inleiding "achterpoot ischemie muis model"

In deze studie maken we regelmatig gebruik van experimenten in muismodellen die perifeer vaatlijden nabootsen, het zgn. achterpoot ischemie model. In dit model wordt onder algehele narcose, na een kleine incisie in de lies, de arteria femoralis proximaal vrijgeprepareerd en gecoaguleerd (eenzijdig) en vervolgens wordt het herstel in bloodflow gemeten met Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) op verschillende tijdstippen (T=PT (pre-treatment), 0,3,7,14,21,28 dagen). Tevens zullen angiogrammen worden vervaardigd om de collaterale bloedvaten in de achterpoot in kaart te brengen. Voor het maken van een angiogram, wordt een mediane laparotomie verricht, waarna contrast medium in de aorta wordt gespoten onder een constante druk. Dit medium stolt in de bloedvaten. Middels cervicale dislocatie zullen de dieren nu worden ge-eutaniseerd. Hierna zullen röntgenfoto's worden vervaardigd van het kadaver om zo de collaterale bloedvaten in de achterpoot in beeld te brengen.

A. Rol van regulatoire T cel in collateraalvorming

A1.

In dit onderdeel worden C57Bl6 muizen gerandomiseerd voor 3 onderzoeksgroepen, namelijk de controle groep, CD4+ depletie en CD25+ depletie. Twee maal voor ligatie van de arteria femoralis en 1 maal per week na ligatie zullen de muizen worden behandeld (injectie i.p.) met respectievelijk controle antilichaam, anti CD4+ antilichaam (GK1.5) of anti CD25+ antilichaam (PC 61). Op verschillende tijdstippen (t=PT, 0,3,7,14,21,28 dagen) zal met behulp van Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) het herstel van bloodflow worden bestudeerd.

Op een later tijdstip zal dit experiment worden herhaald, omdat angiogrammen zullen worden vervaardigd om de ontwikkelde collateralen in beeld te brengen. Het juiste tijdstip voor een angiogram hangt af van de uitslag van de laser doppler metingen (het juiste tijdstip voor een angiogram is het tijdstip waarop de 3 groepen het grootste verschil in herstel van bloodflow hebben, gemeten met de laser doppler).

Indien uit onderdeel A1 een verschil in herstel van bloodflow tussen de studiegroepen blijkt, continueren we met onderdeel A2.

A2.

In onderdeel A2 worden milt cellen uit een wildtype (donor) muis geïsoleerd. Hieruit worden CD4⁺ cellen en CD25⁺ cellen gedestilleerd (5×10^5 cellen per muis). Deze cellen worden intraveneus toegediend aan de muizen op dezelfde dag dat immunisatie met het antilichaam plaats vindt. Op verschillende tijdstippen ($t = PT, 0, 3, 7, 14, 21, 28$ dagen) zal met behulp van Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) het herstel van bloedflow worden bestudeerd.

In het immunologische wetenschappelijke onderzoek is het gebruikelijk dat je pas uitspraken kan doen over de rol van bepaalde celtypen als je na uitschakeling van een bepaald celtype het effect weer ongedaan kan maken door toediening van de uitgeschakelde cel zoals in dit experiment omschreven (rescuen van het fenotype).

A3. In dit onderdeel worden C57Bl6 muizen gerandomiseerd voor 2 onderzoeksgroepen, namelijk de controle groep versus een behandeling met een vaccin tegen FoxP3⁺ cellen. 3 maal voor ligatie van de arteria femoralis zal deze groep muizen oraal worden behandeld met dit vaccin. Op verschillende tijdstippen ($t = 0, 3, 7, 14, 21, 28$ dagen) zal met behulp van Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) het herstel van bloedflow worden bestudeerd.

Op een later tijdstip zal dit experiment worden herhaald, omdat angiogrammen zullen worden vervaardigd om de ontwikkelde collaterale bloedvaten in beeld te brengen. Het juiste tijdstip voor een angiogram hangt af van de uitslag van de laser doppler metingen (het juiste tijdstip voor een angiogram is het tijdstip waarop de 3 groepen het grootste verschil in herstel van bloodflow hebben, gemeten met de laser dopper).

B. Beginselen van beenmerg transplantaties

In dit onderdeel zullen we een aantal basisprincipes van beenmergceltherapie testen.

B1. nude C57Bl6 muizen zullen worden gerandomiseerd voor 3 onderzoeksgroepen met respectievelijk een behandeling van 1×10^3 , 1×10^5 en 1×10^7 beenmergcellen. Bij alle muizen zal een ligatie van de arteria femoralis (eenzijdig) plaatsvinden waarna de beenmergcellen van een donormuis (C57Bl6 muis) intraveneus worden toegediend. Het herstel in bloodflow na ligatie zal op verschillende tijdstippen ($t = PT, 0, 3, 7, 14, 21, 28$ dagen) met behulp van Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) worden gemeten.

B2. nude C57Bl6 muizen zullen worden gerandomiseerd voor 3 onderzoeksgroepen met respectievelijk een behandeling van beenmergcellen tijdens operatie, 24 uur na ligatie en 48 uur na ligatie. Bij alle muizen zal een ligatie van de arteria femoralis (eenzijdig) plaatsvinden waarna de beenmergcellen van een donormuis intraveneus worden toegediend. Het herstel in bloodflow na ligatie zal op verschillende tijdstippen ($t = PT, 0, 3, 7, 14, 21, 28$ dagen) met behulp van Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) worden gemeten.

B3. nude C57Bl6 muizen zullen worden gerandomiseerd voor 2 onderzoeksgroepen met respectievelijk een behandeling met beenmergcellen welke intraveneus worden toegediend en een behandeling met intramusculair toegediende beenmergcellen. Bij alle muizen zal een ligatie van de arteria femoralis (eenzijdig) plaatsvinden waarna de beenmergcellen van een donormuis intraveneus worden toegediend. Het herstel in bloodflow na ligatie zal op verschillende tijdstippen ($t = PT, 0, 3, 7, 14, 21, 28$ dagen) met behulp van Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) worden gemeten.

C. Beenmergtransplantaties met beenmerg afkomstig van verschillende muizenstammen.

In dit onderdeel zullen we beenmerg van verschillende muizenstammen (BalbC, C57Bl6, BCB en APOE3*Leiden) toedienen na ligatie van de arteria femoralis (eenzijdig) van nude B6 muizen. Beenmergcellen van de verschillende donoren worden uit het femur gehaald. Nude C57Bl6 muizen worden na ligatie van de arteria femoralis gerandomiseerd voor 4 behandelgroepen; respectievelijk toediening van C57Bl6-beenmerg, BalbC-beenmerg, BCB-beenmerg en APOE3*L-beenmerg. Bij alle muizen zal een ligatie van de arteria femoralis (eenzijdig) plaatsvinden waarna de beenmergcellen van de donormuis worden toegediend. Het herstel in bloodflow na ligatie zal op verschillende tijdstippen (t=0,3,7,14,21,28 dagen) met behulp van Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI) worden gemeten.

D. Tracing van beenmergcellen

In dit onderdeel zullen wij met behulp van beenmergcellen van een GFP muis onderzoeken of de toegediende beenmergcellen migreren naar ischemische locaties.

In dit onderdeel zullen aan C57Bl6 muizen na ligatie van de arteria femoralis (eenzijdig) beenmergcellen van een GFP muis worden toegediend. Op verschillende tijdstippen (t=24u na ligatie, 3, 7, 14, 28 dagen) wordt bekeken of GFP cellen terug te vinden zijn in de ischemische achterpoot (immunohistochemie) .

6b. Motivatie diersoort

In onderdeel A,B en D wordt gebruik gemaakt van C57Bl6 muizen en nude C57Bl6 muizen. In ons laboratorium hebben wij veel ervaring met het zogenaamde achterpoot ischemie model. Deze 2 muizen zijn geschikt voor dit model. Nude C57Bl6 muizen zijn immuun-gecompromiteerd (geen B-cellen en T-cellen) en accepteren de toediening van humane beenmergcellen of beenmergcellen van een andere muizenstam. Deze muis zullen we uiteindelijk gebruiken voor het transplanteren van humane beenmergcellen van de responders en non-responders van de klinische trial om de revascularizatie capaciteit van deze cellen te onderzoeken (buiten de scope van deze DEC-aanvraag).

In onderdeel C maken we ook gebruik van BalbC, BCB en APOE3*Leiden muizen. Deze verschillen in hun respons van het immuunsysteem. In dit experiment kunnen we de revascularizatie capaciteit van beenmergcellen van muizen met een verschillend immuunrespons onderzoeken.

6c. Berekening aantal dieren

Toename van bloodflow gemeten met de laser doppler is de voornaamste parameter in dit experiment. De variatie binnen de groep is 10-15% en voor de power-berekening gaan we uit van een minimaal verschil in toename van bloodflow van 30%. Uit de power-berekening met een alpha van 0.05 en een power van 0.9 blijkt dat 10 dieren per groep nodig zijn voor het bereiken van statistische significantie.

6d. Aantal benodigde dieren:

Onderdeel A1 : n= 60 dieren (n=30 voor Laser Doppler, n=30 voor angiogram)
Onderdeel A2: n= 60 dieren (n=30 voor Laser Doppler, n=30 voor angiogram)
Onderdeel A3: n= 40 dieren (n=20 voor Laser Doppler, n=20 voor angiogram)
Onderdeel B1: n= 30 dieren + donoren (n=10)
Onderdeel B2: n= 30 dieren + donoren (n=10)
Onderdeel B3: n= 20 dieren + donoren (n=7)
Onderdeel C: n= 40 dieren (ontvangers)
n= 12 dieren (donoren)
Onderdeel D: n= 15 dieren (ontvanger)
N= 3 dieren (GFP muizen)

7a. Ongerief

Bloedafname (ter controle of depletie geslaagd is): gering/matig ongerief
Injectie antilichaam i.p.: gering/matig ongerief
Vaccin oraal toedienen: gering ongerief
Injectie beenmergcellen i.m/i.v.: matig ongerief
LDPI opvolging: gering / matig ongerief
Opofferen donoren: gering / matig ongerief
Ondergaan van narcose: matig ongerief
Post-operatieve periode (inclusief postoperatieve pijnstilling): matig/ernstig ongerief

7b. Anesthesie

Een mix van Dormicum, Domitor en Fentanyl.

8a. Bestemming van de dieren na de proef

De muizen worden aan het einde van de onderzoeksperiode (28 dagen na ligatie) opgeofferd dmv. cervicale dislocatie/decapitatie.

8b. Herkomst dieren: Jackson

8c. Hergebruik dieren: Nee

8d. Locatie huisvesting: proefdiercentrum XXXXXXXXXX

8e. Locatie behandeling: proefdiercentrum XXXXXXXXXX

9a. Vervanging

Voor de geplande experimenten vinden interacties plaats tussen cellen en weefsels enerzijds en haemodynamische invloeden anderzijds. Voor de invloeden, van het voornoemde, op de vorming van collaterale bloedvaten *in vivo* zijn geen *in vitro* alternatieven beschikbaar.

9b. Vermindering

Wij proberen zo weinig mogelijk controle groepen in te plannen en tevens zullen wij niet continueren met onderdeel A2 indien uit A1 geen resultaat blijkt.

9c. Verfijning - Pijn bestrijding

Het mogelijke ongerief wordt geminimaliseerd door anesthesie toe te passen en na operatie afdoende pijnbestrijding toe te dienen. Gedurende 24 uur na operatie krijgen alle dieren 2x daags Buprenorphine.

9d. Verfijning - Humane eindpunten

Als bijkomende risico's zijn postoperatief ernstige, irreversibele verlammingen en/of ernstige necrose van de achterpoot mogelijk. In geval van tekenen van ernstige ischemie (necrose e.d.) of verlamming zal het dier geëuthanaseerd worden.

10. Wetenschappelijke beoordeling

Wetenschapscommissie [REDACTED] LUMC.

11. Registratie

Bijzonderheid dier:	2	Transgeen dier
Code diersoort:	01	Muizen
Herkomst dieren:	5	Andere herkomst
Doel van de proef:	31	Wetensch. vraag mbt. hart- en vaatziekten bij mensen
Belang van de proef:	1	Gezondheid/voeding ja
Wettelijke bepalingen:	1	Geen wettelijke bepaling
Toxicologisch onderzoek:	01	Geen toxicologisch onderzoek
Bijzondere technieken:	01	Geen van deze technieken/ingrepen
Anesthesie:	4	Wel toegepast
Pijnbestrijding:	4	Wel toegepast
Mate van ongerief:	2	Gering/matig
Toestand dier na de proef:	1	Dood tijdens/na de proef
Geplande einddatum proef:	01-12-2008	
Ingevuld door:	[REDACTED]	
Datering:	11-06-2008	