

Bepaling en farmacologische correctie van defecten in chloride (Cl-), bicarbonaat (HCO₃⁻) en mucus transport in rectumbiopten van CF patiënten

Gepubliceerd: 11-04-2012 Laatste bijgewerkt: 10-08-2024

Dit project heeft tot doel om de nieuwe inzichten in het mechanisme van HCO₃⁻ en mucus transport uit recente studies in CF muismodellen te toetsen in rectumbiopten van controle personen en van CF patiënten. Hiertoe worden de biopten in een zgn....

Ethische beoordeling	Goedgekeurd WMO
Status	Werving gestart
Type aandoening	Congenitale en erfelijke aandoeningen NEG
Onderzoekstype	Observationeel onderzoek, met invasieve metingen

Samenvatting

ID

NL-OMON43631

Bron

ToetsingOnline

Verkorte titel

Anion- en mucussecretie in CF patiënten

Aandoening

- Congenitale en erfelijke aandoeningen NEG

Synoniemen aandoening

Cystic Fibrosis, Taaislijmziekte

Betreft onderzoek met

Mensen

Ondersteuning

Primaire sponsor: Universitair Medisch Centrum Utrecht

Overige ondersteuning: Nederlandse Cystic Fibrosis Stichting

Onderzoeksproduct en/of interventie

Trefwoord: Bicarbonaat, CF, Correctors, Intestinal Current Measurement

Uitkomstmaten

Primaire uitkomstmaten

HCO₃⁻ and mucus transport in humaan colonweefsel, en mogelijke effecten van farmacologische correctors op deze parameters in CF patienten en gezonde vrijwilligers, door meting van:

1. Vergelijkende ionenstroom metingen in aanwezigheid en afwezigheid van HCO₃⁻ and koolzuuranhydrase (Car) remmers.
2. pH-stat metingen van de totale HCO₃⁻ secretie om te bepalen of een electroneutrale component bijdraagt aan HCO₃⁻ secretie van het colon.
3. HCO₃⁻ transport in aanwezigheid van bestrophine-2 remmers.
4. Cl⁻, HCO₃⁻ en mucustransport in bipten van CF patiënten, geïncubeerd met CFTR correctors.
5. HCO₃⁻ transport in distaal colonweefsel, geïncubeerd met PPAR-γ agonisten of de Sanofi NHE3 remmer.

Secundaire uitkomstmaten

Daarnaast zal confocale microscopie worden toegepast om zicht te krijgen op eventuele veranderingen in de expressie and localisatie van Best2 in de CF

biopten.

Stase van mucus zal worden bepaald door Alcian Blue kleuring van biopten[11,14,17], en expressie en (re)distributie van transporters (CFTR, Best2) en enzymen (Car4, Car2) zal worden onderzocht met behulp van immunokleuring van biopt coupes en confocale microscopie. [11,14]

Toelichting onderzoek

Achtergrond van het onderzoek

Cystic fibrosis (CF; mucoviscidose) wordt gekenmerkt door de ophoping van taai slijm (mucus) in epitheelweefsels waardoor de afvoer van bacteriën in de longen, van spijsverteringsenzymen en gal in de pancreas en galgangen, en van voedselresten in de darm belemmerd wordt. Recent onderzoek in CF muis modellen laat zien dat voor de normale uitscheiding van mucus een gelijktijdige secretie van bicarbonaat (HCO_3^-) nodig is en dat de vorming van taai slijm een gevolg is van een defect in de uitscheiding van bicarbonaat in CF. Bij de mens is tot nu toe alleen het rectumslijmvlies toegankelijk om na biopt afname zowel HCO_3^- als chloride en mucus secretie te meten en een mogelijk corrigerend effect van farmaca op CF defecten in deze functies buiten het lichaam te testen.

In het verleden werd de HCO_3^- secretie van het darmepitheel alleen gemeten in de dunne darm [9,10], de invloed van het colon werd verwaarloosbaar geacht. Echter, recente studies in distaal colon van CF muizen en van muizen die een Ca^{2+} -geactiveerd chloride/bicarbonaat kanaal in de basolaterale membraan van gobletcellen, het bestrofine2 (Best2), missen, laten zien dat een aanzienlijk deel van de anion stroom na stimulatie met de Ca^{2+} agonist carbachol HCO_3^- en Best2 afhankelijk is, en dat Best2 in serie met apicale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ uitwisselaars intraluminale HCO_3^- secretie kan uitvoeren, parallel aan mucinesecretie. [11] Het uitgescheiden bicarbonaat bevordert de secretie en volume expansie van het mucus uit de gobletcellen via locale pH verhoging en sequestratie van Ca^{2+} ionen.[12] Ook kunnen colon crypten HCO_3^- secreteren via een basolaterale NBC1 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter en apicale CFTR kanalen, en kunnen cellen aan het epitheeloppervlak netto secretie van HCO_3^- uitvoeren via de apicale SLC26a3 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ uitwisselaar onder condities waarin de NHE3 Na^+/H^+ uitwisseling is geremd door Ca^{2+} , cAMP- of cGMP-verhogende secretagogen. [10,13]

De HCO_3^- secretie in CF colon kan defect zijn door verschillende oorzaken: disfunctie van CFTR, dat zelf als een HCO_3^- -kanaal kan dienen of als een Cl^- -shunt om SLC26a3 gemedieerde HCO_3^- secretie te faciliteren [10]; verminderde

expressie van Best2 [11]; of verminderde expressie van HCO₃⁻ producerende enzymen, zoals de carbonzuuranhydrases Car2 en Car4. [14]

Tot nu toe heeft onderzoek naar HCO₃⁻ secretie voornamelijk plaatsgevonden in knaagdiermodellen en zijn er weinig of geen gegevens over humaan colon. Bovendien is de HCO₃⁻ secretie uitsluitend onderzocht met behulp van transepitheliale ionen stroom metingen, waarbij alleen de electrogene en niet de electroneutrale component geregistreerd wordt .

Verbazingwekkend genoeg is er nog minder bekend over het vermogen van CFTR correctors om, naast hun invloed op het transepitheliale Cl⁻ transport, ook defecten in HCO₃⁻ en mucine secretie te corrigeren .[15] Helaas geeft tot nu toe geen enkele parameter in klinisch onderzoek (NPD, zweetest, FEV₁, etc) directe informatie over HCO₃⁻ en mucine secretie in CF-aangedaan epitheel. Daarom zijn onderzoeken naar meting van HCO₃⁻ en mucine secretie in gemakkelijk bereikbaar weefsel (zoals rectumbiopsen) dringend noodzakelijk.

Doel van het onderzoek

Dit project heeft tot doel om de nieuwe inzichten in het mechanisme van HCO₃⁻ en mucus transport uit recente studies in CF muismodellen te toetsen in rectumbiopsen van controle personen en van CF patiënten. Hiertoe worden de biopsen in een zgn. Ussing kamer electrofysiologisch en biochemisch onderzocht op hun vermogen om HCO₃⁻ en mucus uit te scheiden. Vervolgens wordt ex vivo het vermogen van een aantal recent ontwikkelde farmaca (zgn. CFTR correctors; onstekingsremmers, met name PPAR-gamma agonisten; en remmers van de Na⁺/H⁺ uitwisselaar NHE3) onderzocht om het defect in Cl⁻, HCO₃⁻ en/of mucus uitscheiding te corrigeren. De hiervoor benodigde electrofysiologische technieken zijn in de laatste 2 decennia door de aanvragers ontwikkeld en geperfectioneerd, maar tot nu toe alleen toegepast om het chloride (Cl⁻) transport defect in het CF darmslijmvlies te meten, waarbij de bijdrage van HCO₃⁻ aan de ionenstroom nog niet is geevalueerd (zie de Engelse versie voor een meer gedetailleerde beschrijving van de doelstellingen).

Onderzoeksopzet

1. Bestuderen van HCO₃⁻ secretie, stase van mucus en expressie en localisatie van transporteiwitten en enzymen die betrokken zijn bij HCO₃⁻ secretie in rectale biopsen van gezonde vrijwilligers en CF patiënten.

Transepitheliale ionen stroom metingen in rectale zuigbiopsen van gezonde vrijwilligers en homozygote F508del CF patiënten (4 per patient) zullen worden uitgevoerd in de *Rotterdam* mini-Ussing kamers (oppervlak 1.13 mm²), verbonden met een DVC-1000 voltage clamp (WPI) en Powerlab voor digitalizatie en registratie (LabChart software), zoals gedetailleerd beschreven in ref. 6. De serosale oplossing (Meyler buffer met 10 mM glucose) circuleert door een carbogeen gas-lift systeem (95% O₂, 5% CO₂) bij pH 7.4, en de ongebufferde oplossing aan de lumenale zijde (154 mM NaCl met 10 µM amiloride ENaC

kanaaltjes te remmen) circuleert m.b.v. 100% O₂. Na een equilibratietijd van 1 uur wordt de electrogene component van het basale and secretagoog-gestimuleerde anionen transport (i.e. HCO₃⁻ + Cl⁻) bepaald door middel van short-circuit current (Isc) metingen, en de totale HCO₃⁻ secretie (i.e. electrogeen+electroneutraal) door meting van de luminale alkalinisatie met behulp van een continue pH-stat titratiemethode (Radiometer, Copenhagen). Hierbij wordt de luminale pH constant gehouden op 7.4 door toevoeging van een isotone oplossing met 2 mM HCl uit een automatische buret (*pH stat* methode). Vervolgens worden de secretagogen uitgewassen door de oplossing meerdere malen te vervangen, en de Isc metingen worden herhaald na isotone vervanging van HCO₃⁻ aan de serosale zijde door Na-HEPES (pH 7.4) en Na-gluconaat, bilaterale toevoeging van de Car remmer methazolamide (100 µM), en overgang op 100% O₂ gas. De electrogene component van het HCO₃⁻ transport wordt bepaald door vergelijking van de Isc responsen in de eerste en tweede periode, in aan- en afwezigheid van serosaal HCO₃⁻. Om de HCO₃⁻ secretie respons op verschillende intracellulaire signalen te evalueren, zullen de volgende secretagogen achtereenvolgens getest worden: carbachol (Ca²⁺-verhogend)-[uitwassen]-guanyline (cGMP-verhogend)-STa (idem)-[uitwassen]- forskolin+ IBMX (cAMP-verhogend)-genistein (verbetert de transportfunctie van F508del-CFTR)-carbachol. De HCO₃⁻ en mucus secretie meting zullen eerst in muize darmepitheel worden uitgetest om de methode te optimaliseren.

In aparte experimenten zal de bijdrage van het Ca²⁺-afhankelijke anionkanaaltje bestrophine-2 aan de HCO₃⁻ secretie in humaan colon epitheel worden bepaald door vergelijking van Isc and pH-stat responsen na toevoeging van carbachol in aan- of afwezigheid van de Best2 remmer indomethacin.[11] Hierbij zal PGE₂ worden toegevoegd als compensatie voor de remming van endogene PGE vorming door indomethacine.

Stase van mucus zal worden bepaald door Alcian Blue kleuring van biopten[11,14,17]. De expressie en (re)distributie van ionen transporteurs (CFTR, Best2) en enzymen (Car4, Car2) in de biopten zal worden onderzocht met behulp van immunokleuring en confocale microscopie. [11,14]

Wij schatten dat voor het uitvoeren van onderdeel 1 van deze studie de participatie nodig is van 10 gezonde proefpersonen en 8 CF patienten (5 biopten/patient).

2. Ex vivo repair van CF defecten in HCO₃⁻ secretie and mucus excretie in het colon door farmaca.

We hebben recent condities voor weefselbehoud vastgesteld waarin humane rectale biopten in een Ussing kamer bij 37C tenminste 24u volledig functioneel blijven. Ons doel is die bevinding in dit project te gebruiken om ex vivo de lange termijn effecten te testen van 3 verschillende klassen potentiële farmacologische correctors in rectale biopten van homozygote F508del CF

patienten:

(i) Correctors van F508del misprocessing waarvan bekend is dat ze verbetering geven van het CFTR-afhankelijke Cl⁻ transport, maar die nog niet zijn getest op hun vermogen om HCO₃⁻ and mucus transport bij CF te verbeteren. De Vertex corrector VRT-809, waarvan eerder werd gevonden dat deze CFTR-afhankelijke Cl⁻ secretie verbetert in humane bronchiale epithelial cellen (nu in de klinische testfase), zal het eerst worden getest als een positieve controle. Tevens zullen 4 recent door EPIX ontwikkelde F508del-CFTR correctors (ons ter beschikking gesteld door de CFFT-USA) in hetzelfde protocol worden getest. Na de Isc en pH-stat metingen in verse biopten als beschreven onder (1), zullen de biopten 24u worden geïncubeerd in aanwezigheid van de CFTR corrector of vehicle (2 biopten/conditie), gevolgd door herhaling van de Isc en pH-stat metingen en Alcian Blue staining.

(ii) Potentiele correctors van het defect in PPAR-γ signaling in CF, i.e. de synthetische PPAR-γ ligand rosiglitazon[14] en het bicyclische vetzuur en PGE1 afgeleide lubiproston [18], beide klinisch in gebruik voor behandeling van respectievelijk diabetes type 2 en chronische obstipatie.

(iii) S3226 (beschikbaar gesteld door Sanofi Aventis), een nieuwe remmer van NHE3 die mogelijk de positieve effecten van NHE3-KO op CF pathologie (o.a. stimulatie van HCO₃⁻ secretie) imiteert zoals eerder aangetoond in Cftr^{-/-} muizen. [17]

We schatten dat voor het uitvoeren van onderdeel 2 van deze studie (testen van 8 potentiele correctors) de participatie nodig is van 32 F508del CF patienten. Poweranalyse laat zien dat, voor het aantonen van een statistisch significante verbetering van anion secretie in de Ussing kamer door een corrector (tot een Isc waarde >10% van gezonde controles) elke corrector of vehicle dient te worden getest in 2 biopten van tenminste 4 CF patienten.

Werving gezonde proefpersonen en CF patienten:

Na informed consent op papier en met toestemming van de medisch ethische commissie van het UMCU, zullen rectale biopten (5/proefpersoon) worden afgenomen bij volwassen homozygote F508del CF patienten en gezonde vrijwilligers met behulp van een zuigbiopteur (Meeker Instruments, Utrecht) en precies verwerkt worden zoals eerder beschreven. [18]

Inschatting van belasting en risico

Belasting en risico afname rectumbiopt: minimaal

Risico van bloeding volgens literatuur:

N= 389, comp. 2 (bleeding 0.5%) [19]

Contactpersonen

Publiek

Universitair Medisch Centrum Utrecht

Heidelberglaan 100
Utrecht 3508 GA
NL

Wetenschappelijk

Universitair Medisch Centrum Utrecht

Heidelberglaan 100
Utrecht 3508 GA
NL

Locaties

Landen waar het onderzoek wordt uitgevoerd

Netherlands

Deelname eisen

Leeftijd

Volwassenen (18-64 jaar)
65 jaar en ouder

Belangrijkste voorwaarden om deel te mogen nemen (Inclusiecriteria)

Voor patiënten: CF (F508del homozygoten)
Voor controles: niet-CF, gezond

Belangrijkste redenen om niet deel te kunnen nemen

(Exclusiecriteria)

Voor patiënten: niet-CF

Voor controles: CF of CF drager

Onderzoeksopzet

Opzet

Type: Observationeel onderzoek, met invasieve metingen

Blinding: Open / niet geblindeerd

Controle: Geen controle groep

Doel: Preventie

Deelname

Nederland

Status: Werving gestart

(Verwachte) startdatum: 08-05-2014

Aantal proefpersonen: 42

Type: Werkelijke startdatum

Ethische beoordeling

Goedgekeurd WMO

Datum: 11-04-2012

Soort: Eerste indiening

Toetsingscommissie: METC NedMec

Goedgekeurd WMO

Datum: 22-06-2016

Soort: Amendement

Toetsingscommissie: METC NedMec

Registraties

Opgevolgd door onderstaande (mogelijk meer actuele) registratie

Geen registraties gevonden.

Andere (mogelijk minder actuele) registraties in dit register

Geen registraties gevonden.

In overige registers

Register	ID
CCMO	NL35551.041.11