

VU Research Portal

Composite Tissue Allotransplantation by Modulation of Immunosuppression

Larsen, M.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Larsen, M. (2011). *Composite Tissue Allotransplantation by Modulation of Immunosuppression*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samengestelde Weefsel Allotransplantatie door Modulatie van Immunosuppressie

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we een nieuwe werkwijze van levend bot allotransplantatie gecombineerd met microvasculaire reparatie van de natente circulatie, implantatie van gastheer-afgeleide arterioveneuze (AV) bundels, en korte termijn immunosuppressie. Onze hypothese was dat neoangiogenese vanuit de geïmplanteerde vaten de levensvatbaarheid en de bloedsomloop van de transplantaten zou handhaven na intrekking van de FK506 (Tacrolimus) immunosuppressie. In deze studie werd gevasculariseerde femorale allotransplantatie uitgevoerd tussen DA en PVG ratten. In aanvulling op microchirurgische anastomosen, was een AV bundel van het ontvangende dier ingeplant in de medullaire ruimte. Zevenennegentig ratten werden willekeurig toegewezen aan groepen die verschilden in immunosuppressie en AV-bundel doorgankelijkheid. Geïmplanteerde vaten gaven een aanzienlijk verbeterde capillaire dichtheid en botdoorbloeding in de immunosuppressie groepen. Een lagere incidentie van spontane AV-bundel trombose werd gevonden met FK506 behandeling. Meer levensvatbare osteocyten werden gezien na 4 weken wanneer de AV-bundel patent bleef.

In **Hoofdstuk 3** is hetzelfde model gebruikt om na een periode van 18 weken de overleving van achtendertig bottransplantaten te meten. Onafhankelijke variabelen waren doorgankelijkheid van de geïmplanteerde AV bundel, en het gebruik van 2 weken FK-506 immunosuppressie. Bot doorbloeding en capillaire dichtheid waren significant groter in immunosuppressie ontvangers met een patente AV bundel. Deze experimentele studie toonde aan dat neoangiogenese vanuit geïmplanteerde ontvanger-afgeleide AV bundels in combinatie met korte termijn immunosuppressie de bloedtoevoer in bot allotransplantaten op de lange termijn kan handhaven.

Hoofdstuk 4 is een validatie van onze methode van samengestelde weefsel allotransplantatie (composite tissue allotransplantation, CTA) door vergelijking met isotransplantaten en conventionele allografts, en onderzoekt of donor-specifieke tolerantie heeft plaatsgevonden. Drieënnegentig ratten ondergingen femorale allotransplantatie, isotransplantatie of allografting. Gepaarde vergelijking resulteerde in evaluatie van het AV-bundel effect (geligeerd versus patent), de allogeniteit

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34

(isogenetisch in plaats van allogene transplantaties), en van de levensvatbaarheid (allotransplantaat versus allograft). Nogmaals, twee weken van immunosuppressie werd gegeven. Bij 18 weken werden huidtransplantaties van de donor, de ontvanger en derde type ratten bij iedere studierat uitgevoerd om de competentie van het immuunsysteem en donor-specifieke tolerantie te testen. Bij 21 weken werd de bloeddoorstroming gekwantificeerd en de vorming van nieuw bot gemeten. De definitieve status van de bloedsomloop hing af van zowel de initiële graft levensvatbaarheid als de succesvolle ontwikkeling van een neoangiogenetische circulatie. Corticale doorbloeding was het hoogst in allotransplantaten, intermediair in isotransplantaten en afwezig in anderen. Capillaire proliferatie en vorming van nieuw bot was het hoogst en gelijk in de allo- en isotransplantaten met patente AV bundels, en minder in andere dieren. Donor- en derde-type huidtransplantaties werden verworpen. Dit bewijst immunocompetentie zonder donor-specifieke tolerantie.

In **Hoofdstuk 5** onderzoeken we de rol van angiogenetische cytokine levering door biologisch afbreekbare micropartikels om het proces van neoangiogenese van de geïmplanteerde AV bundel te verbeteren. Drieënveertig microchirurgische femorale allotransplantaties werden uitgevoerd van DA naar PVG ratten. Poly (D, L-lactide-co-glycolide) micropartikels geladen met buffer, basic fibroblast groeifactor (FGF2), vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF), of beide werden intramedullair samen met een ontvanger-afgeleide AV bundel geplaatst. FK-506 werd daags toegediend gedurende 14 dagen, daarna gestaakt. Na 28 dagen werd de botdoorbloeding gemeten met behulp van waterstof wash-out. Microangiografie, histologische en histomorfometrische analyses werden uitgevoerd. De capillaire dichtheid was groter in de FGF2 + VEGF-groep (35,1%) dan de controle (13,9%) ($p < 0,05$), en een lineaire trend werd gevonden van controle, FGF2, VEGF, FGF2 + VEGF ($p < 0,005$). Botvorming was groter met VEGF ($p < 0,01$) en FGF2 + VEGF ($p < 0,05$). VEGF of FGF2 alleen verhoogde bloedtoevoer meer dan wanneer deze werden gecombineerd.

In **Hoofdstuk 6** bestuderen we de lange-termijn effecten van angiogenetische cytokine levering door biologisch afbreekbare micropartikels op ons CTA-model. Opnieuw werden drieënveertig microchirurgische femorale allotransplantaties

uitgevoerd van DA naar PVG ratten en werden micropartikels geladen met buffer, FGF2, VEGF, of beide intramedullair samen met een ontvanger-afgeleide AV bundel geplaatst. FK-506 werd daags toegediend gedurende 14 dagen, daarna gestaakt. De overlevingstijd werd verhoogd tot 18 weken, wanneer de botcirculatie werd gemeten en microangiografie, histologische, histomorfometrische en alkalische fosfatase analyses werden uitgevoerd. De botcirculatie was groter in de FGF2 + VEGF-groep dan controle- en VEGF groepen ($p = 0,04$). De capillairdichtheid was groter in de FGF2 groep dan in de VEGF en VEGF + FGF2 groepen ($p < 0,05$). Bot levensvatbaarheid, histomorfometrische analyse en meting van alkalische fosfatase verschilde niet significant tussen de groepen. We vonden weer dat lokale toediening van vasculaire en fibroblast groeifactoren de angiogenese en botcirculatie stimuleerde, maar dat de botgroei op de lange termijn niet versterkt werd.

In **Hoofdstuk 7** onderzoeken we verdere toepassing van de bevindingen van onze CTA studies en de studies met biologisch afbreekbare micropartikels bij conventionele allografts. Dit is een tussenstap naar het gebruik van onze bevindingen in een klinische setting. Rat femorale diafyse allografts werden bevroren bij -80°C en heterotoop getransplanteerd. Veertig ratten werden willekeurig toegewezen aan vier groepen op basis van de toegediende groeifactor: I) Fosfaatgebufferde zoutoplossing, II) FGF2, III) VEGF en IV) FGF2 + VEGF. Na 4 weken werd angiogenese gemeten door de waterstof wash-out methode en microangiografie. Botremodellering werd geëvalueerd door kwantitatieve histomorfometrie en histologie. De botcirculatie was significant hoger in de groepen III en IV in vergelijking met de controlegroep ($p < 0,05$). Ook botremodellering was hoger in VEGF groepen. FGF2 alleen had weinig effect op allograft revascularisatie. Geen synergistisch effect werd waargenomen met gebruik van beide cytokines. Geleverd in micropartikels bleek VEGF een potente angiogene cytokine, die de doorbloeding van corticaal bot en de daaropvolgende botvorming in bevroren allografts kon verhogen.

Om de mechanismen te bestuderen die ten grondslag liggen aan succesvolle CTA, wordt in **Hoofdstuk 8** een nieuwe methode beschreven om het geslacht van geselecteerde cellen in ons model van gevasculariseerd bot allotransplantatie te bepalen. Real-time PCR werd uitgevoerd op DNA uit met laser capture microdissectie

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34

gewonnen corticale bot regio's om de omvang van chimerisme te bepalen in de bot allotransplantaten. Om dit te doen, analyseerden we de relatieve expressie verhouding van het sex-bepalend gebied Y (Sry)-gen, specifiek alleen voor het mannelijke ontvanger rat DNA, aan het cyclofiline huishoudster gen. We vonden aanzienlijke transplantatie chimerisme in corticaal bot (77-97%). Ratten zonder immunosuppressie en met een patente AV bundel bleken significant hogere chimerisme te hebben dan die met immunosuppressie en een geligeerde AV bundel. We beschrijven de laser capture microdissectie van geselecteerde bot regio's, en de berekening van de relatieve expressie verhouding.

Hoofdstuk 9 schetst de toepassing van ons model op gewrichtallotransplantatie. Microvasculaire knie CTA werd uitgevoerd in 9 ratten over een afstotingsbarrière met zowel natente pedikel reparatie als implantatie van gastheer-afgeleide AV bundels. In de controle groep (N = 3), was de pedikel geligeerd. Immunosuppressie werd dagelijks gegeven. Bewegelijkheid van de gewrichten, gewicht-dragende functie, pedikel doorgankelijkheid, bot doorbloeding en neoangiogenese vanuit de AV bundels werden beoordeeld na drie weken. Alle behalve de controle knieën hadden volledige passieve beweging en volle gewicht-dragende functie. De circulatie was meetbaar in transplantaten met patente pedikels. Geïmplanteerde AV bundels produceerde nieuwe vasculaire netwerken bij angiografie. Dit nieuwe model faciliteert verdere studies naar gewrichtallotransplantatie.

De waterstof wash-out-methode die wij in onze studies gebruiken om botcirculatie te meten is uniek in dat het een wijziging van de bestaande technieken omvat die zeer omslachtig zijn. In **Hoofdstuk 10** wordt de achtergrond voor de meting van de bloedstroom in zowel klinische als experimentele situaties beschreven. Wij ontwikkelden modificaties op de waterstof-wash-out-methode waaronder het gebruik van moderne waterstofsensoren, een micromanipulator voor sonde plaatsing en aangepaste software die sterk de originele techniek vereenvoudigen. De waterstof wash-out methode vereist het inademen van een gasmengsel dat de waterstofconcentratie in het weefsel tot een evenwicht brengt. De waterstoftoevoer wordt dan gestopt. De snelheid van afname van de waterstofconcentratie die volgt is evenredig met de weefselperfusie. Omwille van technische problemen en het risico

van een explosie met waterstof tanks, is waterstof wash-out in het verleden niet vaak toegepast. We beschrijven een eenvoudige en veilige manier van het gebruik van deze methode om de botcirculatie in het laboratorium te meten.

Hoewel we enige tijd met onze gemodificeerde waterstof wash-out techniek werkten, was het gebruik ervan in botweefsel nog niet gevalideerd. Hiertoe worden in **Hoofdstuk 11** de corticale botcirculatiemetingen van radioactief-gelabelde micropartikelbeknelling vergeleken met die van waterstof wash-out. De circulatie werd gemeten in tibia corticaal bot van 12 Nieuw Zeeland witte konijnen door radioactieve micropartikelbeknelling en door waterstof wash-out. Naast een controlegroep (n = 6), werden vier dieren behandeld met systemische epinefrine (0,8 ug / kg / min) (Groep 2) en twee met nitroprusside (100 ug / kg / min) (Groep 3). Verder werden 9 femora van 7 ratten geïsoleerd op hun vasculaire steeltjes en werden herhaalde circulatiemetingen uitgevoerd met de waterstof wash-out methode om de reproduceerbaarheid vast te stellen. Een gemiddelde doorstroming van $2,3 \pm 2,0$ mL/min/100g werd verkregen met de micropartikel methode en $2,0 \pm 0,5$ g mL/min/100 met de waterstof wash-out-methode. Er was een significante correlatie en overeenkomst: $R^2 = 0,97$ (p <0,01). Geen consistente flowvariantie werd gevonden met systemische vasoactieve geneesmiddeltoediening. Waterstof wash-out gaf reproduceerbare resultaten en toonde een hoge gevoeligheid voor veranderingen in doorstroming.

Elke verhandeling over een nieuwe methode van CTA is incompleet zonder een analyse van de potentiële risico's. **Hoofdstuk 12** biedt een klinisch voorbeeld waarop deze discussie gebaseerd kan worden. Studies tonen aan dat zenuwtransplantaten immuunsuppressie vereisen slechts totdat eindorgaan verbindingen gemaakt zijn, zonder dat de latere beëindiging van deze geneesmiddelen een effect heeft op de functionele uitkomst. Hoewel het type weefsel anders is dan die van onze vorige studies, is het mechanisme vergelijkbaar met de vervanging van de botcellen die zich voordoet in ons CTA-model. Momenteel is zenuwlotransplantatie de enige vergelijkbare methode die gebruikt wordt in een klinische setting. Bij de pediatrische populatie, met een verhoogde ziektelast en zenuwregeneratie, en de frequente aanwezigheid van een levend-verwante donor, vormt dit een des te meer aantrekkelijke

R1
R2
R3
R4
R5
R6
R7
R8
R9
R10
R11
R12
R13
R14
R15
R16
R17
R18
R19
R20
R21
R22
R23
R24
R25
R26
R27
R28
R29
R30
R31
R32
R33
R34

oplossing voor reconstructieve problemen van het perifere zenuwstelsel. Echter, de risico's van immunosuppressie moeten niet worden onderschat, en verdienen meer aandacht in de huidige transplantatie literatuur. Wij beschrijven een casus van een kind dat een levend-verwant zenuwtransplantaat ontving van zijn vader, die positief was voor het Epstein-Barr-virus (EBV). Hij ontwikkelde al snel een symptomatische EBV virale infectie gelijktijdig met de immunosuppressieve geneesmiddelen. Terwijl de patiënt slechts een korte tijd ziek was daar de immunosuppressie voortijdig gestopt werd, kon de EBV-infectie zich ontwikkeld hebben tot een levensbedreigende post-transplantatie lymfoproliferatieve aandoening (PTLD). Dit is een mononucleosis-type lymfoom veroorzaakt door het EBV, en de potentiële risico's van PTLD, waar hij aanleg voor heeft ontwikkeld, zullen moeten worden gecontroleerd over zijn verdere leven. Dit geval onderstreept het belang van aandacht voor de mogelijk fatale risico's in verband met de klinische toepassing van een CTA procedure, ook die waarbij immuunsuppressie tijdelijk wordt toegepast.