



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Evaluating the microcirculation in early phase clinical trials: novel methodologies and interventions

Kraaij, S.J.W. van

Citation

Kraaij, S. J. W. van. (2024, March 6). *Evaluating the microcirculation in early phase clinical trials: novel methodologies and interventions*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3719988>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3719988>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

CHAPTER IX

SUMMARY IN DUTCH

Dit proefschrift onderzoekt bestaande en nieuwe beeldvormende technieken om de functie of disfunctie van de bloedvaten in de mens te evalueren. Centraal in dit vasculaire systeem staat de functie van het endotheel, een laag cellen die de binnenzijde van alle bloedvaten bedekt. Essentieel voor de functie van dit endotheel is de balans tussen vaatverwijding en vernauwing, die bepaald wordt door een aantal substanties afkomstig uit het endotheel. Een van de belangrijkste stoffen die door het endotheel geproduceerd wordt is stikstofdioxide (NO). NO is een klein molecuul met een zeer korte halfwaardetijd dat voortdurend door nitric oxide synthase (NOS) enzymen geproduceerd wordt, en dat haar effecten voornamelijk via het activeren van het enzym soluble guanylyl cyclase (sGC) uitoefent. Wanneer sGC door NO geactiveerd wordt, zet dit enzym guanosine trifosfaat om in cyclisch guanosine monofosfaat (cyclisch GMP, cGMP). Cyclisch GMP vervult vervolgens diverse rollen als signaal molecuul in de cel, waaronder ontspanning van het gladde spierweefsel dat bloedvaten omhult, resulterend in vaatverwijding. Deze NO-sGC-cGMP cascade wordt in gang gezet door de productie van NO door verschillende isovormen van het NOS-enzym, eNOS, nNOS en iNOS, die respectievelijk primair aanwezig zijn in endotheelcellen, neuronen en witte bloedcellen. De locatie van NO-productie bepaalt mede haar functie, waardoor dit molecuul invloed heeft op een breed scala aan processen in het lichaam. NO afkomstig uit endotheelcellen is met name belangrijk voor de functie van bloedvaten. NO geproduceerd in neuronen speelt een rol bij cognitieve processen en chronische ontsteking in de hersenen. Tot slot maken verschillende celtypen, waaronder witte bloedcellen, grote hoeveelheden NO aan via iNOS als reactie op infectie. NO in deze concentraties heeft celdodende effecten en versterkt de ontstekingsreactie, om op deze manier de verdediging van het lichaam tegen micro-organismen te assisteren.

Vanwege deze breedte van invloed op lichaamsfuncties is het NO-sGC-cGMP systeem een aantrekkelijk doelwit voor (medicamenteuze) interventies ter behandeling van onder andere cardiovasculaire, neurodegeneratieve en immunologische ziekten. Deze interventies pogen de signaaltransductie van NO naar cGMP te versterken door de beschikbaarheid van NO te verhogen, de productie van NO te vergroten, de activiteit van sGC te versterken of de afbraak van cGMP te verminderen. Bekende voorbeelden van interventies op de NO-sGC-cGMP -as zijn nitroglycerine, dat via NO-donatie vaatverwijding bewerkstelligt en gebruikt wordt in de behandeling van pijn op de borst, en sildenafil, een middel dat de afbraak van cGMP door bepaalde enzymen,

zogenoemde fosfodiesterases, remt. De resulterende vaatverwijdende effecten van sildenafil worden ingezet bij behandeling van erectiele disfunctie en pulmonale hypertensie.

Een obstakel bij de ontwikkeling van dergelijke behandelingen is het meten van de farmacodynamische effecten van de onderzochte interventies in vroege fase onderzoek. NO en producten van NO-metabolisme zijn moeilijk te meten omdat ze kortstondig, lokaal en in lage concentraties aanwezig zijn in de bloedsomloop, en het meten van voorlopers of de afbraakproducten van NO zoals arginine, nitriet en nitraat geeft weinig informatie over de stroomafwaartse effecten in de NO-sGC-cGMP cascade. Bovendien geeft het meten van enkele of meerdere biochemische waarden te weinig informatie over de balans van het systeem op weefselniveau door de aanwezigheid van interacties en feedback-mechanismen in dit weefsel.

Dit probleem kan deels ondervangen worden door het gebruik van beeldvormende technieken die de functionele status van de bloedvaten pogen te meten. Voordelen van deze aanpak zijn het non-invasieve karakter van beeldvorming en het feit dat de functie van het doelwit-weefsel, de vasculatuur, als geheel beoordeeld kan worden. Diverse technieken, onder andere gebaseerd op (Doppler) echografie, kernspintomografie (MRI) en plethysmografie (registratie van volumeveranderingen in een ledemaat), zijn in de loop der jaren ontwikkeld om vaatfunctie in kaart te brengen. Deze methodes worden vaak gecombineerd met manoeuvres die bloedvaten activeren om zo vaatverwijding en het evenwicht van het vaatstelsel te beoordelen. In dit proefschrift is een aantal nieuwe technieken onderzocht in studies uitgevoerd in het Centre for Human Drug Research (CHDR) met het doel intra- en interindividuele consistentie, geschiktheid voor evaluatie van NO-afhankelijke processen en de toegevoegde waarde voor klinisch onderzoek met therapeutische interventies te beoordelen.

De beeldvormende modaliteiten die in deze studies zijn onderzocht zijn laser speckle contrast beeldvorming (laser speckle contrast imaging, LSCI), passieve beweging van het onderbeen (passive leg movement, PLM), zijstroom donkerveldmicroscopie (sidestream dark field imaging, SDFM), nabij-infrarood licht spectroscopie (near infrared spectroscopy, NIRS) en stroom-gemedieerde huid fluorescentie (flow mediated skin fluorescence, FMSF).

LSCI is een beeldvormende techniek gebaseerd op het analyseren van veranderingen in 'speckle patroon'. Een typische LSCI-opstelling bestaat uit een laserlichtbron met een camera. Laserlicht wordt op het te-onderzoeken-gebied,

doorgaans de huid, geprojecteerd en de reflectie van dit licht wordt opgevangen door de camera. Niet alle lichtstralen worden perfect gereflecteerd, hetgeen resulteert in een karakteristiek 'speckle patroon', met gebieden van meer en minder intense lichtreflectie, dat wordt opgevangen door de camera. Dit 'speckle patroon' is constant wanneer een onbeweeglijk object wordt bekeken, maar verandert als er minieme beweging is in het onderzochte oppervlak. Wanneer dit de huid betreft, zijn deze minieme bewegingen het gevolg van stroming van rode bloedcellen in de microscopische vaten van de huid. Veranderingen in het 'speckle patroon' kunnen daarom gebruikt worden om de doorbloeding van de microscopische vaten in de huid te meten. Door vervolgens deze meting te combineren met een tweetal manoeuvres die de bloeddoorstroom veranderen kan de mate van reactiviteit van bloedvaten in de huid beoordeeld worden. De eerste handeling bestaat uit het kortstondig afklemmen en weer openstellen van de bloedstroom met een bloeddrukmanchet, ook wel occlusie-reperfusie of post-occlusieve reactieve hyperemie (PORH) genoemd. Een tweede veelgebruikte handeling is het opwarmen van de huid tot 43 °C (local thermal hyperaemia, LTH). Beide interventies induceren een reactieve toename van de doorbloeding, veroorzaakt door verschillende mechanismen, waaronder NO-afhankelijke processen, en kunnen zo gebruikt worden om de functie van microscopische bloedvaten in de huid te onderzoeken.

PLM is een beeldvormende methode waarbij Doppler echografie wordt gebruikt om de snelheid van bloeddorstroom in de liesslagader te meten. Tijdens deze meting wordt het onderbeen van de onderzochte patiënt of deelnemer passief, dat wil zeggen zonder spierspanning van de deelnemer, bewogen. Deze passieve beweging resulteert in vaatverwijding van de vaten in het onderbeen en is meetbaar als een toename in bloedstroomsnelheid in de liesslagader. Uit eerder onderzoek is gebleken dat deze toename in stroomsnelheid voor 70 tot 80 procent afhankelijk is van NO. De techniek kan dus gebruikt worden om de beschikbaarheid van NO in een groot bloedvat zoals de liesslagader te meten.

SDFM is een microscopische techniek waarbij licht met een specifieke golflengte die geabsorbeerd wordt door rode bloedcellen en bloedvaten wordt uitgezonden door een lichtbron en vervolgens wordt opgevangen door een camera geïntegreerd in de microscoop. Dit licht penetreert ongeveer 0,5 mm in menselijk weefsel. Door het SDFM-toestel op weefsel met oppervlakkige bloedvaten zoals de het slijmvlies onder de tong te plaatsen kunnen zo opnames gemaakt

worden waarin bloedvaten en erythrocyten zichtbaar zijn. Hiermee kan de dichtheid van bloedvaten in het weefsel en de beweging van erythrocyten door deze bloedvaten gemeten worden om zo de doorbloeding het weefsel te beoordelen. NIRS benut licht met een golflengte in het nabije infrarode spectrum, dat op verschillende golflengtes wordt geabsorbeerd door hemoglobine. Specifiek absorbeert zuurstofhoudend hemoglobine infrarood licht met een andere golflengte dan hemoglobine dat geen zuurstof bevat. Door het uitgezonden licht op te vangen en te bepalen in welke mate de verschillende golflengtes geabsorbeerd zijn kan de relatieve concentratie van hemoglobine met en zonder zuurstof bepaald worden ('zuurstofsaturatie'), evenals de totale hoeveelheid hemoglobine in het gemeten weefsel. Deze meting kan wederom gecombineerd worden met interventies. In het geval van NIRS betreft dit aderlijke (veneuze) en slagaderlijke (arteriële) occlusie van de bloedstroom. Bij veneuze occlusie wordt een bloeddrukmanchet, geplaatst rond de bovenarm, opgepompt tot een druk tussen de boven- en onderdruk in, waardoor arterieel bloed de arm in kan stromen, maar veneus bloed de arm niet uit kan stromen. Dit resulteert in een toename van de totale hemoglobine concentratie in de arm, waaruit het volume bloed dat de arm instroomt berekend kan worden. Bij arteriële occlusie wordt de bloeddrukmanchet opgepompt tot boven de bovendruk, waardoor het totaal bloedvolume in de arm constant blijft. De afname in zuurstofsaturatie die tijdens deze occlusie gemeten kan worden is een maat voor zuurstofgebruik in het onderzochte weefsel.

FMSF meet de fluorescentie van gereduceerd nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in cellen van de opperhuid. NADH en de geoxideerde versie van nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) zijn belangrijke cofactoren in cellulair zuurstofmetabolisme. De ratio tussen NADH en NAD⁺ is daarmee een maat van de metabole balans in de cel en van mitochondriële functie, maar aangezien oxidatief metabolisme afhankelijk is van de toevoer van zuurstof via de microcirculatie ook van vaatfunctie. Door de NADH-fluorescentie meting te combineren met occlusie-reperfusie kan inzicht verkregen worden in de reactie van zowel microscopische bloedvaten als cellulair metabolisme op gebrek aan en overdaad van bloedtoevoer.

De eerste helft van dit proefschrift beschrijft studies waarin de kwaliteit en het nut van deze verschillende beeldvormende technieken is onderzocht. In de tweede helft van het proefschrift worden vervolgens studies met medicamenteuze interventies gericht op het NO-sGC-cGMP systeem besproken.

In **Hoofdstuk 2** wordt de inter- en intra-individuele variabiliteit van LSCI, PLM en SDFM beschreven, evenals het effect van toediening van een vet- eiwit- en suikerrijke maaltijd ('mixed meal challenge') op deze maten van vasculaire functie. In deze studie bleek dat LSCI gecombineerd met PORH en LTH de meest consistentie meetmethode was, waarbij LSCI-PORH tevens een mogelijk negatief effect van de mixed meal challenge op vaatverwijzend vermogen suggereerde, zoals ook in andere studies is beschreven. Zowel SDFM als PLM toonden in deze studie een hoge mate van variabiliteit en konden het uit de literatuur bekende negatieve effect van de 'mixed meal challenge' op de vaatfunctie niet aantonen.

In **Hoofdstuk 3** zijn patiënten met een mitochondriële aandoening en even oude gezonde vrijwilligers van hetzelfde geslacht en met hetzelfde BMI vergeleken met behulp van LSCI, PLM, SDFM, NIRS en FMSF. PLM toonde in deze studie een significant lagere vaatverwijding in de liesslagader bij patiënten vergeleken met gezonde vrijwilligers, terwijl FMSF significant hogere NADH-concentraties in de huid van patiënten mat. De eerste bevinding wijst erop dat PLM slechtere vaatfunctie samenhangend met mitochondriële disfunctie bij patiënten kan detecteren. De tweede bevinding toont aan dat FMSF de verschuiving van cellulaire metabole balans die optreedt als gevolg van disfunctie in cellulair zuurstofmetabolisme bij mitochondriële disfunctie kan meten. In dezelfde studie werden ook *ex vivo* metingen van mitochondriële functie in circulerende perifere mononucleaire bloedcellen verricht, maar deze maten geen verschil tussen patiënten en gezonde vrijwilligers. De studie laat daarmee de toegevoegde waarde van beeldvorming bij onderzoek naar vasculaire en mitochondriële disfunctie zien. De afwezigheid van significante verschillen in LSCI-, SDFM- en NIRS-metingen benadrukken de noodzaak tot verdere verfijning en selectie van de te gebruiken modaliteiten.

Hoofdstuk 4 beschrijft de resultaten van een onderzoek naar de effecten van een pleister die titaniumdioxide bevat op het lokale vaatsysteem. Het hypothetisch werkingsmechanisme van deze pleister is de reflectie van ver-infrarood licht dat uitgezonden wordt door de huid waarop de pleister geplakt is. Dit ver-infrarode licht heeft in eerdere studies positieve effecten gehad op vaatfunctie en gezondheid. Met gebruik van LSCI in combinatie met PORH en LTH, SDFM, NIRS en thermografie werd in deze studie aangetoond dat de pleister een kortstondig vaatverwijzend effect heeft (gemeten met LSCI), een langdurigere toename van zuurstofconsumptie in het onderliggend weefsel veroorzaakt (gemeten met NIRS) en een toename in huidtemperatuur geeft. Zowel

vaatverwijding als toegenomen zuurstofconsumptie zijn effecten die eerder waargenomen zijn als gevolg van therapie met ver-infrarood licht, waarmee deze studie het werkingsmechanisme van de pleister ondersteunt. Met deze studie is ook aangetoond dat LSCI en NIRS effecten van interventies op microscopische vaten kunnen blootleggen.

In **Hoofdstuk 5** worden de resultaten van de eerste studie in gezonde vrijwilligers met de sGC-stimulator zagociguat beschreven. Zagociguat wordt ontwikkeld voor de behandeling van neurodegeneratieve aandoeningen, zoals dementie, en ziekten geassocieerd met mitochondriële disfunctie. Zagociguat bleek in deze studie veilig in enkele doseringen tot 50 mg en meerdere doseringen tot 15 mg eenmaal daags gedurende 14 dagen. Tevens werd aangetoond dat het middel de bloed-hersenbarrière kan passeren door het meten van zagociguat concentraties in hersenvocht ('cerebrospinale vloeistof'). De studie liet ook zien dat zagociguat effecten geassocieerd met activatie van NO-sGC-cGMP, zoals een verlaging van de bloeddruk, induceert. Testen gericht op de mogelijke effecten van zagociguat in het centraal zenuwstelsel toonden echter geen veranderingen in diverse cognitieve functies in de onderzochte populatie.

Hoofdstuk 6 beschrijft de vervolgstudie met zagociguat, waarin de effecten van dit middel op cerebrale perfusie en een batterij van neurocognitieve testen werden onderzocht bij gezonde ouderen. In deze studie werd ook onderzocht wat de effecten van zagociguat op PLM waren. Wederom bleek zagociguat veilig in doseringen van 15 mg eenmaal daags gedurende 15 dagen en werden bloeddrukverlagende effecten van de medicatie aangetoond. De studie kon echter geen statistisch significant effect op hersendoorbloeding, neurocognitieve testen of PLM aantonen, mogelijk omdat de onderzochte populatie al optimale functie van de onderzochte systemen heeft, waardoor zagociguat geen verdere verbetering kon bewerkstelligen.

Hierna wordt in **Hoofdstuk 7** het effect van een fosfodiesterase 2 (PDE2) remmer op cGMP concentraties in cerebrospinale vloeistof onderzocht. De studie bevestigt dat deze PDE2 remmer in de cerebrospinale vloeistof terechtkomt en daar een toename van cGMP concentratie veroorzaakt, alhoewel deze toename niet dosisafhankelijk was. Bovendien werd een mogelijk dag- en nachtritme in cGMP concentraties in cerebrospinale vloeistof geobserveerd. De bevindingen van de studie ondersteunen de ontwikkeling van fosfodiesteraseremmers voor de behandeling van aandoeningen van het centraal zenuwstelsel die baat kunnen hebben bij een verhoging van cGMP concentratie in de hersenen.

Tot slot worden in **Hoofdstuk 8** de verschillende beeldvormende technieken en studies kritisch geëvalueerd. Uit de onderzoeken beschreven in de eerste helft van het proefschrift blijkt dat PLM en SDFM hoge variabiliteit vertonen, mogelijk veroorzaakt door zowel natuurlijke als technische factoren, die het vermogen van deze methoden om effecten te meten belemmert. LSCI bleek daarentegen een technisch consistente methode die de effecten van zowel een maaltijd als een therapeutische interventie in de vorm van een pleister kan detecteren. NIRS en FMSF toonden potentie door respectievelijk het effect van een interventie en verschillen tussen gezonde vrijwilligers en patiënten met een mitochondriële aandoening aan te tonen. Alle onderzochte methoden hebben baat bij consistente toepassing door bekwame onderzoekers in gestandaardiseerde omstandigheden, en zijn daarmee het meest geschikt voor toepassing in centra met ervaring met de genoemde technieken. Bovendien zou het waardevol zijn om in vervolgonderzoek deze nieuwe methoden te vergelijken met bestaande vasculaire functionele testen, zoals stroom-gemedieerde verwijding (flow mediated dilation, FMD) en circulerende vasculaire biomarkers in bloed. Daarnaast kan toevoeging van een interventie die het evenwicht van de vaten verstoort nuttig zijn, aangezien zo een verbetering van vaatfunctie in gezonde proefpersonen met (bijna) optimale vaten mogelijk meetbaar wordt. Concluderend stelt dit proefschrift dat beeldvorming kan bijdragen aan de wetenschappelijke waarde van vroege fase klinisch onderzoek met medicatie, mits de gebruikte beeldvormende techniek zorgvuldig is geselecteerd op basis van het hypothetisch werkingsmechanisme van de te onderzoeken interventie, en bij voorkeur wordt gecombineerd met biochemische metingen.

