



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mesenchymal stem cells in skeletal muscle regeneration

Garza-Rodea, A.S. de la

Citation

Garza-Rodea, A. S. de la. (2011, September 28). *Mesenchymal stem cells in skeletal muscle regeneration*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17877>

Version: Corrected 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/1887/17877>

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

Samenvatting

Samenvatting

Stamcel implantatie is veelbelovend voor de behandeling van degeneratieve ziekten en beschadigde weefsels omdat stamcellen het vermogen hebben van zelf replicatie en in staat zijn te differentiëren tot gespecialiseerde eindcellen. Voor de ontwikkeling van klinische toepassingen van stamceltherapie is kennis nodig van de interactie tussen stamcellen en beschadigd of verziekt weefsel en de mechanismes die een rol spelen bij de regeneratie.

Het onderwerp van dit proefschrift is één bepaalde stamcel populatie, mesenchymale stamcellen (MSC) afkomstig van menselijke donors, en de bijdrage die deze cellen kunnen leveren aan de regeneratie van beschadigde skeletspieren. Voor het onderzoek dat hieraan ten grondslag ligt werden verschillende *in vivo* modellen van spierbeschadiging gebruikt. De meeste experimenten werden verricht met immuundeficiënte NOD/SCID muizen om te voorkomen dat deze menselijke cellen werden afgestoten.

MSC hebben het voordeel boven andere stamcellen dat ze gemakkelijk uit diverse weefsels van levende donors kunnen worden geïsoleerd en in kweek tot grote aantallen kunnen uitgroeien. De meeste klinische ervaring is tot dusverre opgedaan met MSC uit beenmerg, die worden toegepast bij de behandeling van graft versus host ziekte. Er was echter weinig gedetailleerde informatie over het vermogen van menselijke MSC uit beenmerg (BM) bij te dragen aan skeletspier regeneratie. In hoofdstuk 2 wordt onderzoek beschreven waarbij deze MSC werden geïmplantieerd in de m. tibialis anterior (TAM) van muizen nadat deze spier was beschadigd met cardiotoxine, een stof die specifiek de spiervezels elimineert. De histologische karakteristieken van deze fibrolyse en de daaraanvolgende regeneratie van de spier zijn met het verloop van de tijd vastgelegd zodat in daaropvolgende experimenten de relevante momenten voor het verrichten van histologisch onderzoek konden worden gekozen.

Vervolgens werden met LacZ gemarkeerde MSC in door cardiotoxine beschadigde TAM geïmplantieerd en 4 maanden lang vervolgd door histochemisch onderzoek van op regelmatige afstanden geselecteerde transversale coupes over de volledige lengte van de spier. Daarin werden de mens-muis hybride spiervezels (LacZ positief) geteld. Vanaf dag 10 na de implantatie nam hun aantal gestaag af tot een waarde van gemiddeld 10^4 per TAM na 120 dagen, wat overeenkomt met 5% van het totaal aantal spiervezels in deze spier. De hybride vezels bleken te worden aangekleurd met mensspecifieke merkstoffen als β spectrine, wat suggereert dat er myogene herprogrammering van de kernen van de humane MSC plaats vindt.

MSC kunnen betrekkelijk eenvoudig uit diverse weefsels van zoogdieren worden geïsoleerd, zoals beenmerg, vet en synovium membraan. In verschillende studies is aangetoond dat deze cellen kunnen bijdragen aan de regeneratie van skeletspieren. Het ontbrak echter aan een vergelijkende studie waarbij in een en hetzelfde laboratorium deze drie bronnen met elkaar zijn vergeleken. Die gegevens zijn noodzakelijk om uit te maken welk bronweefsel het beste gebruikt kan worden bij de klinische toepassingen van MSC. Daarbij zijn ook de verkrijgbaarheid en de hoeveelheid beschikbaar bronweefsel per donor van praktische betekenis, vooral als het gaat om behandelingen met autologe MSC.

In hoofdstuk 3 worden resultaten beschreven van een vergelijking tussen MSC verkregen uit beenmerg, vet en synovia van telkens dezelfde donor van met name hun myogene eigenschappen. Het blijkt dat de MSC afkomstig van de drie weefsels verschillen in phenotype, proliferatie capaciteit en differentiatie vermogen. De delingssnelheid van vet MSC was duidelijk groter dan die van beenmerg en synovia MSC. Ook werden er verschillen tussen de donors ten aanzien van een duurzaam hoog delingsvermogen van de MSC.

Hoewel het fuserende vermogen van de verschillende MSC met gekweekte muis-myoblasten *in vitro* niet verschilde, liep de bijdrage aan de vezelregeneratie in het TAM model wel uiteen. Deze was het hoogst voor de vet MSC. De resultaten geven aan dat voor klinische behandelingen het gebruik van vet als bronweefsel de voorkeur verdient boven dat van beenmerg of synovia.

Hoofdstuk 4 behelst een onderzoek naar de regeneratie van de m. panniculus carnosus (PC) van de muis na ischemische beschadiging. In een model dat is opgezet voor onderzoek van decubitus worden circumschreven stukjes van de rug huid ischemisch gemaakt door een huidplooi tussen twee krachtige magneten te klemmen. Na reperfusie ontstaat een typische zweer die langzamer herstelt naarmate de ischemische periode langer heeft geduurd. Er is een kwantitatieve methode ontwikkeld om de snelheid van het herstel vast te leggen. Uitgebreide histologische analyse van deze laesies toonde vele overeenkomsten aan met doorlig zweren bij patiënten. Een belangrijk verschil is echter dat het proefdier jong en gezond is en dat daarbij het herstel van de laesie niet het chronische verloop heeft dat de problemen in de kliniek veroorzaakt. Om te proberen het model meer aan de kliniek aan te passen werd de studie uitgebreid met diabetische muizen en met een aan de ischemie voorafgaande bestraling van de huid. Tegen de verwachting, die is gebaseerd op klinische ervaring en de waargenomen vertraagde genezing van experimentele chirurgische wonden bij diabetische muizen, bleek het herstel

van de ulcera niet te worden vertraagd door diabetes. Daaruit moet worden geconcludeerd dat het pathofysiologische mechanisme van decubitus verschilt van dat van chirurgische wonden.

Daarentegen veroorzaakte voorafgaande röntgenbestraling van de huid een sterke vertraging van het herstel. Macroscopisch nam de genezing van de ulcera twee maal zoveel tijd in beslag en microscopisch bleek de regeneratie van dermis nog meer vertraagd. Zelfs drie maanden na de inductie van decubitus waren er geen tekenen van regeneratie van de PC in de bestraalde groep.

Tenslotte werd onderzocht of het herstelproces – met name dat van de PC – kan worden ondersteund door implantatie van MSC na afloop van de ischemische periode. De implantaties vonden plaats in de ulcera van tevoren bestraalde en van niet bestraalde muizen.

Deze behandeling had geen invloed op de hersteltijd van de ulcera. Er was slechts een marginale bijdrage van de MSC in de regeneratie in termen van het aantal MSC dat differentieerde naar huid specifieke cellen en deze werden slechts gedurende een beperkte tijd waargenomen. Ook deze uitkomst verschilt duidelijk van de therapeutische effecten van MSC die zijn beschreven bij chirurgische wonden.

Voor het onderzoek naar de invloed van diabetes op het herstel van druk ulcera werd diabetes in de muizen opgewekt door toediening van streptozotocine, een verbinding met specifieke toxiciteit voor de bèta cellen van de eilandjes van Langerhans. Hoewel deze methode al decennia algemeen wordt toegepast in het experimentele diabetes onderzoek, bleken de resultaten met de in de literatuur meest gebruikelijke inductieprotocollen dermate variabel en inefficiënt, dat nader onderzoek nodig was om een reproduceerbare en betrouwbare inductie te verkrijgen. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in hoofdstuk 5. De oorzaak van dit probleem bleek te liggen in een foutieve aanbeveling van een commissie van experts om de STZ zo snel mogelijk en in ieder geval binnen 10 minuten na het oplossen in te spuiten. Op geleide van de chemische literatuur en met behulp van HPLC analyse konden we aantonen dat STZ in de vaste vorm die wordt aangeleverd uit 2 anomenen met verschillende biologische activiteit is samengesteld. Na oplossing vindt er equilibratie van de anomenen plaats die na twee uur is voltooid. Met 1 injectie van deze gestabiliseerde oplossing kan reproduceerbaar een hoge opbrengst van diabetische muizen worden verkregen en is de acute mortaliteit gering. De gestabiliseerde oplossing blijft tenminste 40 dagen houdbaar indien bij 4 C in het donker bewaard zonder verlies aan biologische activiteit. De verse

oplossing had een hogere toxiciteit die tot uiting kwam in hogere bloed glucose spiegels en een hoge acute mortaliteit, hetgeen wordt veroorzaakt door een overwegend aandeel van de meer toxische alfa anomer. Gestabiliseerde STZ oplossing is derhalve sterk aan te bevelen boven de vers bereide omdat de inductie van diabetes reproduceerbaarder verloopt en met minder verlies aan proefdieren en agens. Bovendien worden de resultaten van de verschillende researchgroepen beter vergelijkbaar als iedereen de gestabiliseerde oplossing gebruikt.

Bijna alle *in vivo* interventie onderzoek van spierregeneratie vindt noodgedwongen plaats met proefdieren omdat zulk onderzoek bij patiënten vrijwel onmogelijk is en de regeneratie *in vitro* niet kan worden nagebootst. De translationele waarde van diermodellen is in veel gevallen onduidelijk, in het bijzonder als het gaat om studies over de curatieve eigenschappen van stamcellen en voorlopercellen. Indien syngene stamcellen worden gebruikt zijn er vertaalslagen nodig van proefdier naar de mens voor zowel de eigenschappen van de stamcellen als van de spierregeneratie zelf. Indien het effect van menselijke stamcellen op de regeneratie van skeletspieren wordt bestudeerd is men vrijwel altijd aangewezen op diermodellen. In die situatie rijst de vraag of de interacties van weefsels afkomstig van verschillende soorten als mens en muis wel op dezelfde wijze verloopt als bij syngene combinaties, ook al is een immunologische afstoting uitgesloten. In hoofdstuk 6 worden pogingen beschreven om inzicht in deze problematiek te verkrijgen met behulp van een nieuwe techniek. Naar analogie van de xenogene hematopoiëtische mens-muis chimera werden spierfragmenten onderhuids geïmplantatoerd bij immunodeficiënte muizen. In zulke implantaten treedt vanaf dag 7 myoregeneratie op, beginnend in de periferie en geleidelijk voortschrijdend naar het centrum. Dergelijk fijngemaakt spierweefsel kan voorafgaand aan de implantatie met de gewenste soort en aantallen stamcellen worden vermengd, zodat er syngene of xenogene spier-stamcel combinaties ontstaan. Aanvankelijk werd gewerkt met verse spierfragmenten, maar voor de mengproeven van spier met stamcellen vormde de onregelmatige beschikbaarheid van menselijk spierweefsel een onoverkomelijk obstakel. Daarom moest worden overgegaan op cryopreservatie van het spierweefsel zodat er voldoende van in voorraad is op het tijdstip dat de benodigde stamcellen uit de kweek beschikbaar komen. De standaard vriesprocedure bleek geen nadelige invloed te hebben op het regeneratievermogen van muizenspierweefsel, maar toxisch te zijn voor menselijke satelietcellen. Muizen MSC bleken in gelijke mate hybride spiervezels te vormen in vers en bevroren bewaarde muizenspier implantaten. Dat was echter niet het geval met humane MSC, waarbij dit vermogen uitsluitend werd waargenomen in bevroren bewaarde muizenspier. Dit wijst er

op dat er in verse muizenspieren factoren voorkomen die de myodifferentiatie van humane MSC onderdrukken, factoren die bij de cryopreservatie worden uitgeschakeld. Deze waarneming zou kunnen betekenen dat het vermogen van humane MSC om door cellulaire participatie bij te dragen aan spierregeneratie in muizenmodellen, een onderwaarding is van datzelfde vermogen bij de mens.

Deze voorlopige resultaten laten zien dat de hier geïntroduceerde methode uitstekende kansen biedt om meer kennis te verzamelen over de klinische betekenis van MSC voor spierregeneratie en de behandeling van degeneratieve spierziekten. Daarvoor is onder meer nodig voor humane spier een techniek van cryopreservatie te ontwikkelen die de satellietcellen spaart en daarmee het regeneratievermogen intact laat.

Een bijkomend interessant aspect van dit nieuwe model is de overeenkomst in morfologie van de ingevroren humane spierimplantaten met die van de spieren van DMD patiënten in een laat stadium van de ziekte, hetgeen van nut kan zijn voor het experimentele onderzoek van deze aandoening.

Ofschoon in de literatuur door velen wordt aangenomen dat MSC niet immunogeen zijn en dus in allogene donors universeel kunnen worden aangewend, blijkt uit het onderzoek van weefselregeneratie dat cellulaire participatie van MSC middels *in situ* differentiatie en/of fusie met cellen van de gastheer alleen plaats vindt bij gebruik van syngene en autologe MSC en dat in alle andere gevallen de ontvanger immuun deficiënt dient te zijn. Ook de toepassing van MSC als transport vehikels van therapeutica vereist immunologische compatibiliteit met de ontvanger. De afstoting van MSC vindt plaats via MHC I herkenning. In hoofdstuk 7 worden experimenten beschreven waarbij de expressie van MHC I op humane MSC wordt onderdrukt door transfectie van immunoevasines afkomstig van herpes virus, waaronder het US11. Dergelijke MHC-ABC negatieve MSC werden door immuuncompetente muizen even goed geaccepteerd als ongemodificeerde MHC I positieve MSC na transplantatie in immuun deficiënte muizen, doch alleen indien de normale muizen voorbehandeld waren met een specifieke antistof die NK cellen elimineert. Deze resultaten laten zien dat het mogelijk is universeel toepasbare humane MSC te genereren, maar dat daarvoor waarschijnlijk transductie van verscheidene immunoevasine genen vereist is.

