



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cellular therapy after spinal cord injury using neural progenitor cells

Vroemen, Maurice

Citation

Vroemen, M. (2006, January 17). *Cellular therapy after spinal cord injury using neural progenitor cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4319>

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/1887/4319>

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

Nederlandse samenvatting

Het ruggenmerg bevat een groot gedeelte van alle verbindingen tussen de hersenen en de rest van het lichaam, samengepakt op een kleine ruimte. Een letsel aan het ruggenmerg heeft daarom vaak zwaarwegende gevolgen, omdat een relatief kleine beschadiging een groot gedeelte van de verbindingen kan verbreken. Het daaruit resulterende functieverlies is meestal onomkeerbaar omdat het centrale zenuwstelsel (CZS) van hogere werveldieren, en dus ook van de mens, een zeer beperkte capaciteit heeft om reeds ontstane schade te herstellen. Ondanks de grote vorderingen die de medische wetenschap de laatste 50 jaar heeft gemaakt is er nog steeds geen effectieve therapie beschikbaar die regeneratie in het CZS mogelijk maakt. Dit gebrek aan perspectief in combinatie met het feit dat de meeste dwarslaesie patiënten jonge volwassenen zijn zorgt ervoor dat een ruggenmergletsel een zware belasting vormt voor zowel het slachtoffer als ook voor de maatschappij in het algemeen.

Er zijn meerdere oorzaken aan te wijzen die voor het gebrek aan zelfherstellend vermogen van het beschadigde ruggenmerg verantwoordelijk zijn. Het is daarbij van belang om aan te merken dat het niet in de eerste plaats de beschadigde axonen zijn die geen nieuwe verbindingen kunnen aangaan, maar dat vooral de algemene omstandigheden zoals die in het CZS voorkomen een eventueel herstel van de verbindingen tegenwerken. Een therapie die gebaseerd is op het transplanteren van adulte neurale progenitor cellen (NPC) is een veelbelovende methode om herstel na ruggenmergletsel mogelijk te maken. NPC zijn ongespecialiseerde cellen die veel op stamcellen lijken en die uit het CZS-weefsel van volwassen individuen gewonnen kunnen worden. Het is dus in principe mogelijk dat de dwarslaesiepatiënt zelf als donor fungeert. Onder de juiste omstandigheden kunnen geïsoleerde NPC gekweekt en vermeerderd worden. Daarnaast zijn nakomelingen van NPC in staat om uit te groeien tot de drie belangrijkste celtypen van het CZS: neuronen, astrocyten en oligodendrocyten. NPC zijn daarom in staat om de cellen die door een beschadiging van het ruggenmerg verloren zijn gegaan organotypisch te vervangen. Aangezien er onder normale omstandigheden geen spontane regeneratie in het CZS mogelijk is, is het simpelweg vervangen van CZS-cellen waarschijnlijk niet voldoende. Doel van het transplanteren van NPC is daarom het opnieuw creëren van de omstandigheden zoals die tijdens de aanleg van de axonale verbindingen tijdens de ontwikkeling voorhanden zijn.

In de studies die in dit proefschrift beschreven zijn wordt deze hypothese getest door NPC te transplanteren in het beschadigde ruggenmerg van de rat. Hiervoor wordt er gebruik gemaakt van een proefdiermodel voor traumatisch ruggenmergletsel waarbij het belangrijkste deel van de piramidebaan wordt doorgesneden. De piramidebaan is

Nederlandse samenvatting

de directe verbinding tussen de motorcortex in de hersenen en het ruggenmerg. Direct aansluitend worden er in de ruimte die ontstaat door het letsel de te bestuderen cellen getransplanteerd. De piramidale axonen worden ten slotte een week na het ruggenmergletsel gemarkeerd waardoor een eventueel herstel van de piramidale axonen zeer specifiek aan te tonen is.

Een belangrijke voorwaarde voor het mogelijk maken van axonaal herstel na ruggenmergletsel is het vervangen van de cyste die op de plaats van het ruggenmergletsel ontstaat. Een transplantaat bestaande uit enkel NPC blijkt echter niet in staat te zijn om de cyste te vervangen aangezien de getransplanteerde cellen van de plaats van transplantatie weg migreren zonder dat het beschadigde weefsel wordt gerepareerd (*Hoofdstuk 2*). Door de NPC echter gezamenlijk met andere cellen te transplanteren is het mogelijk om het weefseldefect door het transplantaat te vervangen. Het zijn vooral fibroblasten die het mogelijk maken om voldoende NPC in de cyste te transplanteren (*Hoofdstuk 3*). Worden de NPC gezamenlijk met Schwann cellen getransplanteerd is het weliswaar mogelijk om de cyste door Schwann cellen te vervangen, de NPC in het transplantaat worden echter door de Schwann cellen afgestoten en migreren in het ruggenmergweefsel (*Hoofdstuk 4b*).

Getransplanteerde NPC stoppen met delen en differentiëren in meer ontwikkelde neurale celtypes (*Hoofdstuk 2*). Opvallend daarbij is dat de getransplanteerde cellen nauwelijks meer te onderscheiden zijn van de reeds aanwezige neurale cellen. Dit wijst erop dat de getransplanteerde cellen in staat zijn om naadloos in het bestaande weefsel te integreren. Om de functie van deze cellen te kunnen vaststellen is het van groot belang dat de getransplanteerde cellen betrouwbaar geïdentificeerd kunnen worden. In dit proefschrift zijn daarvoor 2 verschillende methodes gebruikt. Enerzijds zijn de getransplanteerde NPC gemarkeerd met de thymidine analoog Bromodeoxyuridine (BrdU). Het BrdU wordt in het DNA van de te transplanteren NPC ingebouwd en kan door middel van immunohistochemische kleuringreacties zichtbaar gemaakt worden. Anderzijds is geprobeerd om de te transplanteren cellen genetisch te markeren door middel van virale transductie. De NPC worden hiervoor genetisch gemanipuleerd waardoor deze het groen fluorescerende eiwit GFP produceren. GFP producerende NPC kunnen na transplantatie door middel van fluorescentie microscopie zichtbaar gemaakt worden. In een gedetailleerde studie die deel uitmaakt van dit proefschrift blijkt echter dat alle virale vectoren die getest werden enkel en alleen in staat zijn om ongedifferentieerde NPC te markeren. Na differentiatie van de NPC onder celweek omstandigheden of na transplantatie van de cellen in het ruggenmerg, blijkt dat de meeste NPC stoppen met het produceren van GFP en dus hun markering verliezen (*Hoofdstuk 5*). Dit betekent dus ook dat het toedienen van herstel bevorderende groeifactoren door middel van het

transplanteren van genetisch gemanipuleerde NPC niet goed mogelijk is.

De getransplanteerde cellen blijken enkel in gliacellen te differentiëren, waarbij de meeste cellen het eiwit GFAP exprimeerden hetgeen typisch is voor astrocyten. Daarbij valt op dat de meeste van deze GFAP exprimerende cellen een afwijkend langgerekt uiterlijk hebben, en het eiwit BLBP bevatten, hetgeen erop wijst dat deze astrocyten nog onrijp zijn (*Hoofdstuk 2, 3, 4b*). Verder neemt een kleiner deel van de getransplanteerde cellen de vorm aan van oligodendrocyten. Dit zijn gliacellen die de myelineschede rond de axonen kunnen vormen. Of de getransplanteerde NPC daadwerkelijk in staat zijn om nieuwe myelineschedes te vormen kan echter niet worden aangetoond, omdat een kleuring die de myelineschede zichtbaar maakt niet te combineren is met de gebruikte BrdU markering (*Hoofdstuk 2, 3, 4b*). Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het ontwikkelen van verbeterde methodes om de getransplanteerde NPC met bijvoorbeeld GFP te markeren.

Naast het vervangen van cellen die door de beschadiging van het ruggenmerg verloren zijn gegaan moeten de getransplanteerde NPC in staat zijn om het herstel van beschadigde axonen te ondersteunen. Als voorwaarde hiervoor moeten de getransplanteerde NPC daadwerkelijk op de juiste plaats in het traumatische weefseldefect blijven zitten. Zoals beschreven in dit proefschrift lukt dit het beste in dieren die getransplanteerd worden met een mengsel van NPC en fibroblasten. In deze groep blijkt dan ook de meeste regeneratie van beschadigde axonen plaats te vinden. Bovendien blijken bij deze dieren piramidale axonen in het transplantaat te groeien (*Hoofdstuk 3*). Dit is opvallend want juist piramidale axonen staan erom bekend dat deze zich uiterst moeilijk kunnen herstellen. Typerend hierbij is dat herstellende axonen contact opnemen met getransplanteerde NPC die zich hebben ontwikkeld tot onrijpe astrocyten (*Hoofdstuk 3*). Worden de NPC gezamenlijk met Schwann cellen getransplanteerd vindt er weliswaar in geringe mate axonaal herstel plaats, een herstel van piramidale axonen blijft echter nagenoeg uit. (*Hoofdstuk 4b*).

Er kan dus geconcludeerd worden dat door middel van het transplanteren van NPC na ruggenmergletsel verloren CZS cellen vervangen kunnen worden. Verder zijn de getransplanteerde NPC in staat om regenererende axonen te geleiden, hetgeen vergelijkbaar is met de functie van onrijpe gliacellen die gedurende de ontwikkeling de aanleg van axonale verbindingen ondersteunen. Deze veelbelovende resultaten roepen de vraag op of door het transplanteren van NPC ook functioneel herstel geïnduceerd kan worden. Door middel van de beschreven studies kan dit echter niet aangetoond worden omdat het gebruikte proefdiermodel geen blijvende uitval van functies veroorzaakt. Er zijn dus vervolgstudies nodig waarbij gebruik gemaakt wordt van een functi-

Nederlandse samenvatting

oneel relevant diermodel waarin de mate van herstel gemeten kan worden in gedragsstudies. Het is daarbij van groot belang dat het functioneel herstel gerelateerd kan worden aan de structurele reorganisatie die daarbij optreedt. De *in vivo* imaging door middel van magneet resonantie tomografie (MRT) zoals die beschreven is in *hoofdstuk 6* kan daarbij in vergaande mate van dienst zijn.