

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/24265> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Ritfeld, Gaby Jane

**Title:** Bone marrow stromal cell : mediated neuroprotection for spinal cord repair

**Issue Date:** 2014-02-27

# Chapter 8

---

## Samenvatting

## INTRODUCTIE

Een dwarslaesie leidt tot verlies van zenuwcellen en een onderbreking van zenuwbanen in het ruggenmerg, leidend tot gedeeltelijke of volledige verlamming, gevoelsverlies en autonome functiestoornissen onder het niveau van het letsel. Tot de meest voorkomende oorzaken van traumatische dwarslaesies behoren verkeersongelukken, sportongevallen en geweld. Niet-traumatische oorzaken zijn onder andere tumorcompressie en infecties. De initiële impact leidt tot direct verlies van neuronen en gliacellen en schade aan axonen en bloedvaten. De impact zet vervolgens een pathofysiologische cascade op gang die nog dagen tot maanden tot secundaire weefselschade kan leiden, onder andere door influx van ontstekingscellen en vrijkomen van cytotoxische moleculen. De formatie van littekenweefsel en een met vocht gevulde cyste dragen bij aan een vijandig milieu waarin geen regeneratie van axonen plaatsvindt. Er is vooralsnog geen therapie beschikbaar die deze verbindingen kan herstellen, waardoor de meeste mensen met een dwarslaesie moeten leven met permanente verlamming.

## STAMCEL THERAPIE

In **hoofdstuk 1** wordt in deel 1 een algemene introductie gegeven over stamcellen voor herstel van het centrale zenuwstelsel (CZS). Verschillende typen stamcellen kunnen worden gebruikt als therapie voor CZS schade, elk met specifieke voor- en nadelen. Embryonale en foetale stamcellen hebben het voordeel van mogelijkheid tot differentiatie tot bijna elke cel in het lichaam en daarmee de potentie om beschadigde/verloren zenuwcellen te vervangen. Nadelen van deze cellen zijn ethische problemen met celoogst en een risico op tumorformatie door ongeremde proliferatie. Volwassen stamcellen en precursorcellen hebben doorgaans minder differentiatiepotentie, maar tonen tegelijkertijd ook minder risico op tumorvorming. De werkzaamheid van deze volwassen stamcellen is gelegen in de afgifte van groeifactoren die een beschermend en/ of proliferatief effect of neuraal weefsel hebben. Een makkelijk te oogsten type volwassen stamcel is de uit het beenmerg afkomstige mesenchymale stamcel, ook wel BeenMerg Stromale Cel (BMSC) genoemd. In deel 2 van de introductie wordt specifiek ingegaan op

deze BMSC's als therapie voor het beschadigde ruggenmerg. BMSC's zijn relatief makkelijk te verkrijgen uit volwassen beenmerg en eenvoudig te kweken in groeimedium. Zij geven diverse groeihormonen af, waaronder neurotrofe factoren, en hebben na transplantatie in het beschadigde ruggenmerg een beschermend effect op neuraal weefsel in ratmodellen van dwarslaesie. Dit proefschrift heeft twee hoofddoelstellingen: (1) om onze kennis over BMSC therapie voor herstel van het ruggenmerg te vergroten en (2) om middelen te vinden om de werkzaamheid van intraspinale BMSC transplantaten te vergroten. De experimenten in dit proefschrift maakten gebruik van een in vivo rattenmodel, waarbij na laminectomie van thoracaal segment T9, met behulp van een geautomatiseerde impactor een contusielaesie wordt aangebracht. Dit resulteert in paralyse van achterpoten en staart. Histologisch leidt de impact tot schade aan neuronen, axonen, gliacellen en bloedvaten en tot influx van ontstekingscellen, wat bijdraagt aan progressieve secundaire weefsel schade. Dit model bootst de consequenties van ruggenmergletsel in mensen na.

### **BMSC-GEMEDIEERDE NEUROPROTECTIE EN HERSTEL**

In **hoofdstuk 2** is gekeken of de door BMSC-gemedieerde neuroprotectie een positief effect heeft op herstel van motoriek en sensibiliteit na transplantatie in een ratmodel van dwarslaesie. Het verband tussen BMSC-gemedieerde weefselparing en verschillende facetten van functie werd onderzocht. De resultaten toonden dat BMSC transplantatie een positief effect heeft op verschillende parameters voor (sensori)motoriek (BBB-subscore, voetprintanalyse, vaardigheid op een horizontale ladder) en sensibiliteit (thermische hyperalgesie en mechanische allodynie) en dat deze effecten gecorreleerd zijn aan het gespaarde weefselvolume. Daarnaast vonden we dat BMSC-getransplanteerde segmenten meer bloedvaten bevatten dan controles, wat mogelijk een bijdrage heeft geleverd aan de grotere volumes gespaard weefsel. Ook bleek dat ratten met BMSC meer axonen hadden afkomstig van de raphe kernen in de herstenstam, wat mogelijk een bijdrage heeft geleverd aan de verbeterde locomotie.

## DE ROL VAN BDNF IN BMSC-GEMEDIEERDE NEUROPROTECTIE

In **hoofdstuk 3** werd de rol onderzocht die Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), een van de neurotrofe factoren die BMSC uitscheidt, speelt in BMSC-gemedieerde neuroprotectie. Hiertoe werd de expressie van BDNF in BMSC door middel van lentivirale factoren verlaagd en verhoogd. *In vitro* bleek BDNF geen noodzakelijke factor voor het geobserveerde beschermende effect op motoneuronen in de ventrale horn; ook BMSC zonder BDNF (BMSC-shRNA-BDNF) hadden een gunstig effect op neurale overleving, mogelijk door het compensatoire effect van andere uitgescheiden groeifactoren. Echter, overexpressie van BDNF (BMSC-BDNF) resulteerde wel in een geprolongerd effect op motoneuron overleving dat met BMSC en BMSC-shRNA-BDNF niet werd gezien. Ook *in vivo* bleek overexpressie van BDNF voordelig; meer motoneuronen overleefden in de ventrale hoorn na BMSC-BDNF therapie, een effect dat met BMSC en BMSC-shRNA-BDNF niet werd gezien. Ook werden meer bloedvaten gevonden in de grijze stof van deze BMSC-BDNF behandelde ratten, wat mogelijk een mediator is geweest voor de verbeterde motoneuron overleving. Verder bleek BDNF expressie noodzakelijk voor BMSC overleving *in vivo*. BMSC-shRNA-BDNF overleefden de eerste week na transplantatie niet, wat mogelijk het gebrek aan een weefselparend effect in deze ratten verklaart.

## OVERLEVING BMSC

De overleving van BMSC's in het beschadigde ruggemerg is matig en beperkt de therapeutische werking. Een week na transplantatie overleeft ongeveer 20% van de getransplanteerde cellen. Verschillende factoren dragen mogelijk bij aan deze matige overleving van BMSC's, waaronder fagocytose door macrofagen, gebrek aan voedingsstoffen en zuurstof door gescheurde bloedvaten en de aanwezigheid van reactieve zuurstofverbindingen en andere toxische moleculen ter plaatse van het letsel. In **hoofdstuk 4** werd gekeken of de overleving van BMSC's kon worden verbeterd door onderdrukking van de ontstekingsreactie. Drie klinisch beschikbare ontstekingsremmers, Minocycline, Methylprednisolon en Cyclosporine, werden onderzocht op hun vermogen om het aantal macrofagen in het beschadigde ruggemerg te onderdrukken en zodoende

de overleving van BMSC's te verbeteren. Alle drie medicijnen waren effectief in het remmen van de macrofaagrespons, maar we detecteerden geen verbeterde overleving van BMSC's.

In **hoofdstuk 5** werd onderzocht of de overleving van BMSC's kon worden verbeterd door de cellen te transplanteren in de thermaal reversibele biogel poly(ethylene glycol) - poly(serinol hexamethylene urethane), ofwel ESHU, een gel met anti-oxidatieve eigenschappen. BMSC's overleefden de eerste week na transplantatie beter wanneer de cellen getransplanteerd werden in ESHU en deze verbeterde overleving ging gepaard met meer weefselparing en verbeterd motorisch herstel. Een mogelijke verklaring voor de verbeterde BMSC overleving is het anti-oxidatieve effect van het poly-urethaan element van ESHU. Het anti-oxidatieve effect werd bevestigd *in vitro*.

## **CONCLUSIE**

BMSC transplantatie heeft positieve histologische effecten, geassocieerd met verbeterd herstel van motorische en sensibele functies in een rattenmodel van dwarslaesie. Sommige van deze effecten kunnen verder verbeterd worden door upregulatie van BDNF in BMSC's. Korte termijn overleving van BMSC kan verbeterd worden door de cellen te transplanteren in ESHU, en deze verbeterde overleving gaat gepaard met meer weefselparing en functioneel herstel, wat impliceert dat celoverleving een determinant is voor de werkzaamheid van BMSC transplantaten. Toekomstig onderzoek zal zich moeten richten op het combineren van de neuroprotectieve BMSC therapie met axon regenererende therapieën om BMSC-gebaseerde therapieën voor dwarslaesies verder te verbeteren.

