Modulation of myelin phagocytosis by means of anti-inflammatory treatment as a therapy of spinal injury

Citation for published version (APA):

Wu, S. (2021). *Modulation of myelin phagocytosis by means of anti-inflammatory treatment as a therapy of spinal injury*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.
<https://doi.org/10.26481/dis.20210909sw>

Document status and date:
Published: 01/01/2021

DOI:
[10.26481/dis.20210909sw](https://doi.org/10.26481/dis.20210909sw)

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 26 Apr. 2023

SUMMARY

Spinal cord injury causes severe and irreversible motor and sensory dysfunction. A major reason for this dysfunction is neuro-inflammation, which plays a complex role in all stages of SCI. The accumulation of debris from degenerating cells and fiber tracts contributes to these inflammatory responses, which spread the damage to the surrounding tissue. This further exacerbates apoptotic cell death and impairs spontaneous regeneration and functional recovery. The present study was designed to reduce these detrimental consequences of SCI-induced inflammation. Two approaches were used for this end: Improving the phagocytosis capacity reducing local inflammation by macrophages.

In this thesis, we found that two anti-inflammatory treatments, retinoic acid (RA) and tauroolithocholic acid (TLCA) enhanced myelin phagocytosis by bone marrow-derived macrophages (BMDM). Using the phagocytosis of fluorescence labeled myelin by BMDM as the principal readout, we discovered that this important physiological function was significantly improved by activating nuclear receptors RAR and RXR. Other nuclear receptor ligands were not effective. On the molecular level, the activation of gene and protein expression of transglutaminase-2 and the scavenger receptor CD36 were involved (**Chapter II**). We conclude that treatment with RA, which also reduced neuroinflammation, may improve myelin clearance after SCI and therefore should be considered for therapeutic approaches.

Bile acids have recently been described to suppress the inflammatory activation of NFkB pathway. In addition, they regulate lipid metabolism, such as occurs in the degradation of phagocytosed myelin. We simulated an inflammatory stress condition *in vitro* to investigate how this influences myelin clearance by macrophages and whether it could be modified with bile acids (**Chapter III**). Cells

were pretreated with TLCA, tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) or hyodeoxycholic acid (HDCA) and subsequently stimulated with LPS. All three bile acids partially rescued myelin phagocytosis in Raw264.7 cells, when this activity was suppressed by LPS, but only TLCA had this effect in BMDM. The results suggest two conclusions: activation of the LPS-TLR4/NF κ B pathway reduces myelin phagocytosis by BMDM in vitro; TLCA rescues myelin phagocytosis when suppressed by LPS in BMDM. These findings suggest that activation of bile acid receptors may be used to improve myelin clearance in neuropathologies.

We studied two anti-inflammatory treatments, TUDCA and bone marrow-derive stromal cells (bmSC) and their combination in an animal model of SCI. The main outcome was that the transplantation of bmSC significantly improved the recovery of motor functions in comparison to antiphlogistic treatment with methylprednisolone. Adult male rats were subjected to T9 spinal cord contusion injury. Their urinary and sensory-motor functions were monitored for a duration of 9 weeks after surgery. In addition, effects were characterized with histological and gene expression experiments. As treatment we implanted bmSC by injection into the cisterna magna. A novel preparation of bmSC by negative selection without expansion in culture was used. Animals displayed a better recovery of SCI-induced motor deficit in bmSC treatment group than the group which received methylprednisolone, an approved clinical drug for SCI (**Chapter IV**). In conclusion, human bmSC has neuroprotective properties after SCI, but was not sufficient to induce motor function recovery when implanted in the acute phase. Due to their immune modulatory properties, however, allogeneic implants of bmSC can be used in combinatorial therapies of SCI.

One such approach was perused using bile acids (**Chapter V**). Animals were treated with TUDCA and in combination with transplantation of human bmSC. Immediately after the lesion, animals received one intraperitoneal injection of TUDCA, consisting of either two or five injections. The recovery of motor functions was assessed during a surveillance period of six weeks. Rats were sacrificed after four days for

biochemical and histological investigation or after six weeks for histology of the tissue. There was short term but no lasting benefits of TUDCA treatment on the recovery of bladder control and motor function, but no additional therapeutic benefit when combined with bmSC implants. Bile acid also reduced the transcription of genes that are associated with the M2 phenotype. Finally, the main results and findings in chapters II to V are discussed in a broader context (**Chapter VI**).

Overall, our results suggest that neuroprotection by reducing neuroinflammation and increasing the clearance of myelin debris could be used as a therapy for spinal cord injury.

SAMENVATTING

Ruggenmergletsel veroorzaakt ernstige en onomkeerbare motorische en sensorische stoornissen. Een belangrijke reden voor deze disfunctie is neuro-inflammatie, die een complexe rol speelt in alle stadia van spinal cord injury [SCI]. De ophoping van afval van degenererende cellen en vezelkanalen draagt bij aan deze ontstekingsreacties, die de schade naar het omringende weefsel verspreiden. Dit verergert apoptotische celdood verder en schaadt spontane regeneratie en functioneel herstel. De huidige studie was bedoeld om deze nadelige gevolgen van SCI-geïnduceerde ontsteking te verminderen. Hiervoor werden twee benaderingen gebruikt: Verbetering van de fagocytosecapaciteit door lokale ontsteking door macrofagen te verminderen.

In dit proefschrift ontdekten we dat twee ontstekingsremmende behandelingen, retinoïnezuur (retinoic acid, RA) en tauroolithocholzuur (tauroolithocholacid, TLCA), de fagocytose van myeline versterkten door uit beenmerg afkomstige macrofagen (bone marrow derived macrophages; BMDM). Gebruikmakend van de fagocytose van fluorescentie gelabeld myeline door BMDM als de belangrijkste uitlezing, ontdekten we dat deze belangrijke fysiologische functie significant werd verbeterd door de nucleaire receptoren RAR en RXR te activeren. Andere nucleaire receptorliganden waren niet effectief. Op moleculair niveau waren de activering van gen- en eiwitexpressie van transglutaminase-2 en de scavenger receptor CD36 betrokken (**Hoofdstuk II**). We concluderen dat behandeling met RA, die ook neuro-inflammatie verminderde, de myeline-klaring na SCI kan verbeteren en daarom moet worden overwogen voor therapeutische benaderingen.

Van galzuren is onlangs beschreven dat ze de inflammatoire activering van de NFκB-route onderdrukken. Bovendien reguleren ze het lipidenmetabolisme, zoals dat

gebeurt bij de afbraak van gefagocyteerd myeline. We hebben in vitro een inflammatoire stressconditie gesimuleerd om te onderzoeken hoe dit de klaring van myeline door macrofagen beïnvloedt en of het kan worden gemodificeerd met galzuren (**Hoofdstuk III**). Cellen werden voorbehandeld met TLCA, tauroursodeoxycholzuur (TUDCA) of hyodeoxycholzuur (hyodeoxycholid, HDCA) en vervolgens gestimuleerd met lipopolysaccharide van E.coli (LPS). Alle drie de galzuren redden gedeeltelijk myeline-fagocytose in Raw264.7-cellen, toen deze activiteit werd onderdrukt door LPS. Maar alleen TLCA had dit effect bij BMDM. De resultaten suggereren twee conclusies: activering van de LPS-TLR4 / NFκB-route vermindert myeline-fagocytose door BMDM in vitro; TLCA redt myeline-fagocytose wanneer het wordt onderdrukt door LPS bij BMDM. Deze bevindingen suggereren dat activering van galzureceptoren kan worden gebruikt om de klaring van myeline bij neuropathologie te verbeteren.

We bestudeerden twee ontstekingsremmende behandelingen, TUDCA en beenmerg-afgeleide stromacellen (bmSC) en hun combinatie in een diemodel van SCI. Een nieuwe bereiding van bmSC door negatieve selectie zonder uitbreiding in kweek werd gebruikt. De belangrijkste uitkomst was dat de transplantatie van bmSC het herstel van motorische functies significant verbeterde in vergelijking met antiflogistische behandeling met methylprednisolon. Volwassen mannelijke ratten worden onderworpen aan T9-verwondingen aan het ruggenmerg. Hun urinaire en sensorische motorische functies werden gedurende 9 weken na de operatie gevolgd. Bovendien werden effecten gekarakteriseerd met histologische en genexpressie-experimenten. Als behandeling hebben we bmSC geïmplanteerd door middel van injectie in de cisterna magna. Dieren vertoonden een beter herstel van SCI-geïnduceerde motorische stoornissen in de bmSC-behandelde groep dan de groep die methylprednisolon kreeg, een goedgekeurd klinisch medicijn voor SCI (**Hoofdstuk IV**). Concluderend, menselijk bmSC heeft neuroprotectieve eigenschappen na SCI, maar was niet voldoende om herstel van de motorische functie te induceren bij implantatie in de acute fase. Vanwege hun immuun modulerende eigenschappen kunnen allogene

implantaten van bmSC echter worden gebruikt in combinatorische therapieën van SCI.

Een van die benaderingen werd bestudeerd met behulp van galzuren (**Hoofdstuk V**). Ratten worden behandeld met TUDCA en in combinatie met transplantatie van menselijk bmSC. Direct na de laesie kregen de dieren één intraperitoneale injectie met TUDCA, bestaande uit twee of vijf injecties. Het herstel van motorische functies werd beoordeeld gedurende een bewakingsperiode van zes weken. Ratten werden na vier dagen opgeofferd voor biochemisch en histologisch onderzoek of na zes weken voor histologie van het weefsel. Er waren korte termijn maar geen blijvende voordelen van TUDCA-behandeling op het herstel van blaascontrole en motorische functie, maar geen bijkomend therapeutisch voordeel in combinatie met bmSC-implantaten. Galzuur verminderde ook de transcriptie van genen die geassocieerd zijn met het M2-fenotype. Ten slotte worden de belangrijkste resultaten en bevindingen in de hoofdstukken II t / m V in een bredere context besproken (**Hoofdstuk VI**).

Over het algemeen suggereren onze resultaten dat neuroprotectie door het verminderen van neuro-inflammatie en het vergroten van de klaring van myeline-afval kan worden gebruikt als een therapie voor ruggenmergletsel.