

Little by little : perinatal asphyxia and the developing spinal cord

Citation for published version (APA):

de Louw, A. J. A. (2002). *Little by little : perinatal asphyxia and the developing spinal cord*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20020920a1>

Document status and date:

Published: 01/01/2002

DOI:

[10.26481/dis.20020920a1](https://doi.org/10.26481/dis.20020920a1)

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.

Summary

The present thesis was designed to investigate the effects of perinatal asphyxia on the spinal cord in order to better understand the pathophysiological mechanisms of spasticity in children with cerebral palsy. Moreover, based on the findings in an animal model, an attempt is made to introduce a treatment option for spasticity.

Chapter 1

In Chapter 1, an introduction is given on the present knowledge of the pathophysiology of perinatal asphyxia, cerebral palsy and spasticity in relation to the current treatment options and the morphological and biochemical concepts used in this thesis. Furthermore, the general aims of the studies in this thesis are introduced.

Chapter 2

In Chapter 2 an immunocytochemical technique was used to study the localization and developmental aspects of GMP-synthesizing structures in the cervical spinal cord of 2 weeks and 3 months old Lewis rats in response to the nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) and/or atrial natriuretic peptide (ANP). By using cell-specific markers, the cell structures involved were investigated. NOS-mediated cGMP synthesis was observed in the cervical spinal cord in laminae I, II and III in 14 days old rats, which activity was mainly absent at the age of 3 months. Using confocal laser microscopy, NO-mediated cGMP synthesis was observed in large cholinergic terminals nearby motor neurons in the ventral horn. An extensive co-localization between NO-stimulated cGMP synthesis and parvalbumin-positive (GABAergic) neurons and fibres was observed in all laminae. In the ANP-stimulated condition a colocalization with parvalbumin structures was found in laminae II and III.

In conclusion, our data show the presence of an abundant NO-cGMP signalling

system in all layers of the spinal cord. The NO-mediated cGMP synthesis takes place in parvalbumin (GABAergic) neurons and in the ventral horn in axon terminals probably connecting to the motor neurons. In addition cGMP synthesis can be found in a subpopulation of glial cells either through activation of pGNC and/or sGNC.

Chapter 3

In Chapter 3 we investigated developmental apoptosis in the white matter of the neonatal rat cervical spinal cord at postnatal day 2, 5, and 8. Apoptotic cells were labelled using TUNEL and caspase-3 immunostaining. Apoptotic cells were diffusely distributed throughout the white matter of the spinal cord. The total amount of apoptotic cells in the cervical spinal cord white matter was related to postnatal age, being the lowest at P2 (mean 7.9 , SD 5.6) and the highest at P8 (mean 109, SD 21.4). Using double immunostaining for ED1 and O4, apoptotic cells could be identified as microglia and oligodendrocytes.

Chapter 4

In Chapter 4, we investigated the effect of perinatal asphyxia on developmental apoptosis in the cervical and lumbar spinal cord in the neonatal rat.

Perinatal asphyxia was induced by keeping pups at term in utero in a water bath at 37° C for 20 min, followed by resuscitation. Effects of this treatment on developmental apoptosis were studied at postnatal day 2, 5 and 8 using TUNEL and caspase-3 staining. TUNEL positive cells were characterized using double immunostaining.

On postnatal day 2 an increase of 215% in TUNEL positive cells was detected ($p = 0.005$) in laminae IV-VII of the lumbar spinal cord of rats that underwent perinatal asphyxia compared to controls. TUNEL positive cells could be partly characterized as microglial cells (ED1 positive) and oligodendrocytes (O4 positive).

As the effect of perinatal asphyxia on programmed cell death in the neonatal rat spinal cord was mainly observed in the intermediate zone and dorsal horn of the lumbar spinal cord, it is concluded that this may have a profound effect on the

development of motor networks.

Chapter 5

In Chapter 5 we report an inhibitory effect of Baclofen on the ANP- mediated cGMP synthesis in the superficial dorsal horn (laminae I-III) of the rat cervical spinal cord. This inhibitory effect of Baclofen could not be detected after incubation with the NO donor SNP. Baclofen is the drug of choice in treating spasticity, therefore these results point to a possible role of ANP in controlling spinal locomotor networks.

Chapter 6

In Chapter 6 we investigated the effects of perinatal asphyxia and the influence of Baclofen on the ANP and/or SNP mediated cGMP synthesis in the adult rat cervical spinal cord. In normal rats, a decreasing effect of Baclofen on ANP mediated cGMP synthesis was observed, while an increasing effect on NO mediated cGMP synthesis was observed after perinatal asphyxia. Our results suggest that the effects of Baclofen in the spinal cord are at least partially NO- cGMP mediated.

Chapter 7

In Chapter 7 we investigated the long-term effects of a RF-DRG treatment on the spinal cord using c-Fos immunoreactivity. Furthermore, we used different immunocytochemical markers to identify c-Fos immunoreactive (c-Fos IR) cells.

In 6 Wistar rats a laminectomy was performed. RF-DRG treatments were performed adjacent to 6 dorsal root ganglions, and 6 ganglions were used as sham operated controls. Moreover, one rat was used as double control. Tissue was investigated at postoperative day 7.

C-Fos IR cells were detected both ipsi- and contra-lateral of the treatment side. Furthermore, c-Fos IR cells could be identified as activated microglia, astrocytes and motor neurons but not as oligodendrocytes.

We conclude that the long-term effects of a RF-DRG treatment can be detected

in all Rexed's laminae both ipsi- and contra-lateral after an unilateral treatment. We furthermore suggest that the clinical effects of a RF-DRG treatment in spasticity are possibly due to interference with both afferent input into the spinal cord and efferent output from the spinal cord.

Chapter 8

In Chapter 8, in a review, the present pathophysiological mechanisms of spasticity and its treatment options are reviewed. Furthermore, the use of radiofrequency lesions of the dorsal root ganglion in the treatment of spasticity in children with cerebral palsy is reviewed.

Chapter 9

In Chapter 9 we investigated the effects of a radiofrequency lesion of the dorsal root ganglion in the treatment of spasticity in children with cerebral palsy on muscle tone and daily activities of life. We found a beneficial effect 4 weeks and 6 months after treatment without signs of side effects.

Chapter 10

In Chapter 10, the morphological and biochemical findings in the spinal cord after perinatal asphyxia in the rat are discussed. Furthermore, an attempt is made to put the findings in the rat model in a clinical perspective. Especially for the use of the radiofrequency treatment of the dorsal root ganglion as a treatment for spasticity in children with cerebral palsy. Moreover, in this chapter, future studies on the role of the spinal cord in the pathophysiological mechanism of spasticity are described

With the studies that form this thesis we "little by Little" have started to investigate the effects of perinatal asphyxia on the developing spinal cord.

Samenvatting

Het leven van een kind met cerebraal palsy kan ernstig beperkt zijn. Deze beperkingen worden ondermeer veroorzaakt door de gevolgen van spasticiteit, zoals verminderde mobiliteit, pijnklachten en verzorgingsproblemen. Het exacte pathofysiologische mechanisme van spasticiteit bij cerebraal palsy is nog niet geheel bekend. Tot op heden wordt de oorzaak van cerebraal palsy vooral gezocht in de hersenen, zoals het woord *cerebral* in cerebraal palsy al aangeeft. De invloed van de hersenen op het klinisch beeld van cerebraal palsy is ongetwijfeld groot, alhoewel niet alle klinische verschijnselen zijn te verklaren door hersenschade. Met name de beperkingen in motoriek zouden ook een oorsprong kunnen hebben op een lager niveau van het centrale zenuwstelsel namelijk het ruggenmerg. Deze klinische constatering vormt de basis van de studies waaruit dit proefschrift bestaat.

Op dit moment bestaat er nog geen behandeling waarmee we spasticiteit kunnen voorkomen. De huidige behandeling richt zich dan ook vooral op het verminderen van bovengenoemde problemen. Een beter inzicht in de pathofysiologie van spasticiteit kan mogelijk leiden tot meer rationele behandelmethoden.

Het klinisch beeld van cerebraal palsy wordt veroorzaakt door uiteenlopende aandoeningen welke voor een deel onbekend zijn. Bij een deel van de kinderen is perinatale asphyxie de oorzaak van cerebraal palsy. In dit proefschrift worden de effecten van perinatale asphyxie op het ruggenmerg van de rat onderzocht, om een beter inzicht te krijgen in het pathofysiologische mechanisme van spasticiteit bij kinderen met cerebraal palsy. Daarnaast wordt de radiofrequente laesie naast het dorsale ganglion als mogelijke behandeling voor spasticiteit bij kinderen geïntroduceerd.

Hoofdstuk 1

Hoofdstuk 1 bestaat uit een algemene introductie van de onderwerpen die in de verschillende hoofdstukken aan de orde komen. De huidige inzichten in de pathofysiologische mechanisme van perinatale asphyxie, cerebraal palsy en

spasticiteit worden besproken in relatie tot de morphologische (geprogrammeerde celdood) en biochemische (NO-cGMP signaal transductie) concepten die voor de verschillende studies worden gebruikt. Daarnaast worden de doelen van de verschillende studies beschreven.

Hoofdstuk 2

In hoofdstuk 2 hebben we de expressie van cGMP in reactie op stimulatie met de NO donor sodium nitropursside (SNP) en /of atrial natriuretic peptide (ANP) in het ruggenmerg gedurende de normale ontwikkeling van de rat bestudeerd. Met behulp van immunocytochemische technieken en celspecifieke markers hebben we de betrokken celstructuren onderzocht. Op de 14^e postnatale dag wordt NOS gemedieerde cGMP synthese waargenomen in laminae I-III van het cervicale ruggenmerg, deze activiteit is vrijwel geheel verdwenen op de leeftijd van 3 maanden. Met behulp van confocale laser microscopie wordt NO gemedieerde cGMP synthese gezien in grote cholinerge axon-uiteinden op motor neuronen in de ventrale hoorn. In alle laminae hebben we een overvloedige co-lokalisatie waargenomen tussen NO gemedieerde cGMP synthese en parvalbumine (GABAerge) positieve neuronen en vezels. Na stimulatie met ANP wordt deze co-lokalisatie tussen cGMP en parvalbumine waargenomen in laminae I en II.

Concluderend laten onze resultaten een overvloedige aanwezigheid van het NO-cGMP signaal transductie systeem in alle laminae van het cervicale ruggenmerg zien. Bovendien vindt de NO-gemedieerde cGMP synthese plaats in parvalbumine positieve (GABAerge) neuronen en in axon-uiteinden die mogelijk uitkomen op motor neuronen in de ventrale hoorn. Daarnaast wordt cGMP synthese waargenomen in een subpopulatie van gliale cellen na stimulatie van zowel particulated guanylaat cyclase (ANP) of soluble guanylaat cyclase (SNP).

Hoofdstuk 3

In hoofdstuk 3 wordt de aanwezigheid van apoptose in de witte stof van het ruggenmerg van neonatale ratten gedurende de normale ontwikkeling beschreven. Door middel van TUNEL en caspase-3 immunocytochemische kleuringen worden

apoptotische cellen gezien in de gehele witte stof van het ruggenmergvan de rat. Het totale aantal apoptotische cellen in de witte stof is het laagste op de tweede dag post nataal en het hoogste op de achtste dag postnataal. Met behulp van dubbelkleuringen hebben we een deel van de apoptotische cellen geïdentificeerd als microgliale cellen (ED1 positief) en oligodendrocyten (O4 positief).

Hoofdstuk 4

In hoofdstuk 4 wordt het effect van perinatale asphyxie op apoptose gedurende de ontwikkeling in het cervicale en lumbale ruggenmerg van de rat beschreven. Perinatale asphyxie wordt geïnduceerd door à terme rattenpups in utero bloot te stellen aan onderdompeling in water van 37° C gedurende 20 minuten, gevolgd door resuscitatie. De effecten van deze behandeling zijn bestudeerd door middel van TUNEL en caspase-3 immunocytochemische kleuringen op dag 2, 5 en 8 postnataal. We hebben de TUNEL positieve cellen geïdentificeerd met behulp van dubbelkleuringen.

Na perinatale asphyxie zagen we op dag 2 postnataal een toename in TUNEL positieve cellen in laminae IV-VII van het lumbale ruggenmerg van 215% ($p = 0,005$). De TUNEL positieve cellen hebben we gedeeltelijk kunnen identificeren als microgliale cellen (ED1 positief) en oligodendrocyten (O4 positief).

In de pathofysiologie van spasticiteit spelen spinale interneuronen een belangrijke rol. Aangezien in deze studie de meeste toename van apoptotische celdood na asphyxie is waargenomen in gebieden waar zich veel interneuronen bevinden, vermoeden wij dat deze toename een effect kan hebben op de ontwikkeling van spinale locomotor netwerken.

Hoofdstuk 5

In hoofdstuk 5 rapporteren wij een remmend effect van baclofen op de ANP-gemedieerde cGMP synthese in de dorsale hoorn (laminae I-III) van het cervicale ruggenmerg van de rat. Het remmende effect van baclofen kan niet worden geobserveerd na incubatie met de NO donor SNP. Aangezien Baclofen een veel gebruikt medicijn voor de behandeling van spasticiteit is, wijzen onze resultaten

naar een mogelijke rol van ANP in de controle van spinale locomotor netwerken.

Hoofdstuk 6

In hoofdstuk 6 hebben we het effect van perinatale asphyxie in combinatie met baclofen op de ANP- en SNP-gemedieerde cGMP synthese in het ruggenmerg van volwassen ratten onderzocht. In normale ratten zagen we een remmend effect van baclofen op de ANP-gemedieerde cGMP synthese, terwijl na asphyxie een stimulerend effect van baclofen op de NO-gemedieerde cGMP synthese is gezien. Onze resultaten suggereren dat de effecten van baclofen op het ruggenmerg na perinatale asphyxie ten minste gedeeltelijk via het NO-cGMP signaaltransductie systeem verlopen.

Hoofdstuk 7

In hoofdstuk 7 hebben we de lange termijn effecten van een RF-DRG behandeling op het ruggenmerg bestudeerd met behulp van c-Fos immunoreactiviteit. Daarnaast zijn verschillende immunocytochemische markers gebruikt om de c-Fos immunoreactieve (c-Fos IR) cellen te identificeren.

We hebben bij 6 Wistar ratten een cervicale laminectomie verricht. De RF-DRG behandeling is toegepast naast 6 dorsale ganglions, 6 ganglions zijn behandeld met een sham operatie en 1 rat is gebruikt als dubbele controle. De weefsels zijn zeven dagen na de ingreep onderzocht. We zagen een hoog significante toename in c-Fos positieve cellen na RF-DRG behandeling in vergelijking met de sham-geopereerde ratten. We hebben na een unilaterale ingreep zowel contra- als ipsi-lateraal c-Fos positieve cellen waargenomen. Bovendien hebben we de c-Fos positieve cellen kunnen identificeren als geactiveerde microglia en astrocyten, maar niet als oligodendrocyten.

We concluderen dat de lange termijn effecten van een RF-DRG behandeling in alle Rexed's laminae waarneembaar zijn, zowel ipsi- als contra-lateraal. Daarnaast zijn de klinische effecten van een RF-DRG behandeling voor spasticiteit mogelijk het gevolg van een effect op zowel de afferente input als de efferente output van het ruggenmerg.

Hoofdstuk 8

In hoofdstuk 8 worden de pathofysiologische mechanismen van spasticiteit en de huidige behandelopties besproken. Daarnaast wordt het gebruik van de RF-DRG voor de behandeling van spasticiteit bij kinderen met cerebraal palsy besproken.

Hoofdstuk 9

In hoofdstuk 9 hebben we de klinische effecten van de RF-DRG op spasticiteit bij kinderen met cerebraal palsy onderzocht. Met behulp van de Ashworth schaal vinden we een verbetering van de spasticiteit op zowel 4 weken als 6 maanden na behandeling zonder dat er bijwerkingen zijn gezien. Daarnaast zien we een verbetering van de verzorging na RF-DRG behandeling.

Hoofdstuk 10

In hoofdstuk 10 worden de morfologische en biochemische bevindingen in het ruggenmerg na perinatale asphyxie bediscussieerd. Daarnaast worden deze bevindingen in het rattenmodel in een klinisch perspectief geplaatst, met name voor de RF-DRG behandeling. Tevens worden de toekomstige studies over de rol van het ruggenmerg voor de pathofysiologische mechanismen van spasticiteit beschreven.

We zijn stukje bij beetje (little by Little) begonnen met het bestuderen van de effecten van perinatale asphyxie op het ruggenmerg.

Dankwoord

Dit proefschrift is tot stand gekomen vanuit een gezamenlijke inspanning van een aantal mensen van een zeer divers pluimage. De initiator en naar mijn inziens geestelijk vader van het onderzoek naar de effecten van perinatale asphyxie op het ruggenmerg en spasticiteit bij kinderen met cerebrale palsy is professor doctor Vles. Zonder zijn gave om relatief laat in zijn levensloop vanuit een klinische vraagstelling terug te gaan naar het basale onderzoek, zou er in Maastricht geen onderzoek over het effect van perinatale asphyxie op het ruggenmerg zijn geweest. Ondermeer daarom, Hans, beschouw ik je als mijn mentor (en getuige) in de breedste zin van het woord. Hiervoor mijn dank en respect.

Professor doctor Troost, Jaap, ik ben je veel dank verschuldigd voor het gestelde vertrouwen. Jij hebt er uiteindelijk voor gezorgd dat ik in staat ben gesteld om dit onderzoek uit te voeren.

Professor doctor Steinbusch, Harry, bedankt voor je begeleiding bij het perfectioneren van de manuscripten

Doctor de Vente, Jan, ik bewonder je beschouwelijke, bescheiden, altijd ter zake doende inbreng in ons project. Het maakt je tot een groots wetenschapper en mijn "basale" leermeester.

De technische vaardigheden die nodig zijn om cellen te "verven" zijn bij mij maar summier ontwikkeld. Hellen, ik dank je voor de prettige samenwerking en je waardevolle technische inbreng. Het was goed om te zien dat je steeds enthousiaster werd over ons onderzoek. Daarnaast wil ik Marianne bedanken voor de ondersteuning en de samenwerking.

De asphyxie groep vormt de broedkamer van ons laboratorium onderzoek, beste Wilma, Arjan, Danillo, Tom en Carlos, bedankt voor de samenwerking en discussie.

Professor doctor van Kleef en "collega" van Zundert, beste Maarten en Jan, zonder jullie inzet zou het onderzoek naar de effecten van de RF-DRG behandeling, zowel in de kliniek als in de rat, niet op dit peil zijn gekomen. Ik zie uit naar de toekomstige samenwerking.