

Transplantation of cell/biomatrix complexes in experimental spinal cord injury

Citation for published version (APA):

Deumens, R. (2006). *Transplantation of cell/biomatrix complexes in experimental spinal cord injury*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2006

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

10

In this thesis we studied the effects of a multifactorial transplantation strategy including aligned glial cell/biomatrix complexes on regrowth of injured corticospinal axons and functional recovery after dorsal hemisection injury in the adult rat. In addition, *in vitro* studies were performed to gain insights into neurite outgrowth stimulating effects of glial cell/biomatrix complexes or glial cells in combination with a neurotrophic factor.

Chapter 1 provides an overview on neuropathological and functional implications of SCI and the requirements of a repair strategy to obtain axon regrowth and functional recovery. In addition, the study aims (research questions) and the outline of this thesis are presented. The research questions are addressed in the following chapters.

In **chapter 2**, an overview is given of the current state of knowledge regarding axon-tract-specific requirements for regrowth. Six main descending axon tracts are discussed with respect to intervention strategies to promote regrowth, which is of utmost importance to the ultimate goal: obtaining recovery of lost body functions.

In **chapter 3**, neurite outgrowth promoting effects of mixed OEC/ONF cultures and purified OEC cultures are compared (research question 1). In the view of the ongoing discussion about the optimal composition of olfactory glia cultures in the stimulation of axon outgrowth *in vitro* or axon regrowth *in vivo*, this study focused *in vitro* on two frequently used olfactory glia cultures. The OEC was clearly more stimulatory to neurite outgrowth than ONF, but neurite outgrowth on the surface of OEC was not enhanced in mixed OEC/ONF cultures as compared to purified OEC cultures. These data suggest that the ONF does not affect the neurite outgrowth stimulating effects of OEC. Hence, OEC promote neurite outgrowth *in vitro* to a similar extent in both mixed OEC/ONF and purified OEC cultures.

In **chapter 4** we focused on the development of aligned glial cell/biomatrix complexes (research question 2), which were later used as a transplant to bridge spinal lesion gaps. In the *in vitro* study described in chapter 3 we show that the phenotype of both OEC/ONF and immature astrocytes is aligned on oriented poly(D,L)-lactide matrices as compared to their phenotype in a Petri dish. When the poly(D,L)-lactide matrix is slightly modified, making it more amphiphilic, the phenotype of OEC/ONF is even further aligned. We furthermore showed that the aligned glial cell/biomatrix complexes stimulated a directional neurite outgrowth of cocultured cerebral cortical neurons. This interesting finding suggests possibilities with respect to directing regrowth of injured axons across spinal lesion gaps upon transplantation of these glial cell/biomatrix complexes into these gaps.

Chapter 5 describes the neurobiological (research question 3) and functional effects (research question 4) of the multifactorial transplantation strategy that included the transplantation of the most-aligned OEC/ONF-biomatrix complexes,

described in chapter 4, into dorsal hemisection lesion gaps. The observed neurobiological effects included an increased presence of injured CS axons directly rostral to the injury site, but none of these supraspinal axons were observed to regrow into the OEC/ONF-biomatrix complex. Compared to control animals there was also no difference in CS axon regrowth underneath and caudal to the lesion gap. However, the OEC/ONF-biomatrix complex was heavily invaded by host axons of unknown origin. The neurobiological effects were accompanied by a modest locomotor recovery with respect to the swing speed and the stride length of the hind limbs, the latter of which has been correlated with the integrity of the CS tract [1]. The rather limited neurobiological and functional outcome of our multifactorial transplantation strategy may at least be partly explained by the low survival of transplanted OEC/ONF. Although these transplanted cells were able to survive within the injection areas rostral and caudal to the lesion gap, none of these cells survived on the biomatrix within the lesion gap.

The aim of the study described in **chapter 6** was similar to that described in chapter 5, but now using immature astrocytes instead of OEC/ONF (research questions 3 and 4). The neurobiological findings we reported here are basically the same as those in chapter 5: an increased presence of injured CS axons directly rostral to the injury site, which likely reflects a reduced dieback of these axons. However, this time the neurobiological findings were not accompanied by any improvement in locomotor parameters assessed by the BBB or CatWalk gait analysis, including swing speed and stride length of the hind limbs. Parallel to this, the immature astrocytes only survived within the injection areas and not on the biomatrix within the lesion gap.

An identical multifactorial transplantation approach, as that described in chapter 5, was tested in a chronic dorsal hemisection model described in **chapter 7** (research questions 3 and 4). A four-weeks old spinal lesion is generally regarded as chronic [2] and hence the transplantation was delayed for four weeks. Similar to our findings in an acute lesion, we observed an increase in CS axons present directly rostral to the lesion, but none of them penetrating the OEC/ONF-biomatrix transplant within the lesion gap. No effects were found on injured CS axons underneath and caudal to the lesion gap. Behaviorally, the animals did not show any functional recovery on locomotor parameters assessed with the BBB or CatWalk gait analysis.

The aim of the study presented in **chapter 8** was to assess the possibly beneficial effect of a combined BDNF-immature astrocytes approach on neurite outgrowth in vitro (research question 5). We show that BDNF significantly enhanced neurite outgrowth of neonatal cerebral cortical neurons on immature astrocytes. Although this study was restricted to neurite outgrowth in vitro, the results suggest the

potential of BDNF and immature astrocytes as components in a new multifactorial strategy to stimulate axon regrowth and functional recovery after experimental SCI.

Final conclusions

Aligned OEC/ONF-biomatrix complexes and aligned astrocyte-biomatrix complexes were developed in vitro and were then used in a multifactorial transplantation strategy. This strategy was designed to create a continuous (aligned) growth promoting bridge within spinal lesion sites with large lesion gaps, but was mostly unsuccessful in the stimulation of CS axon regrowth and subsequent functional recovery. A lack of survival of the transplanted cells on the biomatrices within the lesion gaps and a lack of migration of the transplanted cells from the injection sites towards the lesion gap may have influenced strongly the final study outcome. In order to correctly evaluate a possible role of OEC/ONF transplants in spinal cords with large lesion gaps, survival and migration of these cells should be improved. Future studies may address these issues by improving the mode of transplantation (e.g. the use of biomatrices with characteristics more optimal for the survival of transplanted cells within the lesion gap and/or the use of multiple cell injections through the spinal cord). Next to this, our results demonstrate that the dorsal hemisection is a suitable model to anatomically study regrowth of injured CS axons, but has a rather limited use in investigations focusing on functional recovery.

References

1. Starkey, M.L., et al., Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp Neurol*, 2005. 195(2): p. 524-39.
2. Houle, J.D. and A. Tessler. Repair of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2003. 182(2): p. 247-60.

Samenvatting

11

In dit promotie-onderzoek hebben we de effecten bestudeerd van een multi-facoriële transplantatie strategie met georiënteerde glia cel/biomatrix complexen op de hergroei van beschadigde corticospinal axonen en functioneel herstel na dorsale hemisectie in de adulte rat. Daarnaast zijn in vitro studies uitgevoerd om inzichten te krijgen in de neuriet uitgroei stimulerende effecten van glia cel/biomatrix complexen of glia cellen in combinatie met een neurotrope factor.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de neuropathologische en functionele implicaties van dwarslaesie en de benodigdheden van een repair strategie om axonale hergroei en functioneel herstel te verkrijgen. Daarnaast worden de studie doelen (onderzoeksvragen) en een schets gemaakt van dit proefschrift. De onderzoeksvragen worden besproken in de volgende hoofdstukken.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de huidige status van kennis over de axon-baan-specifieke benodigdheden voor hergroei. Zes voorname afdalende axon banen worden bediscussieerd met betrekking tot interventie strategieën die hergroei stimuleren, iets wat van het grootste belang is voor het ultieme doel: verkrijgen van herstel van verloren lichaamsfuncties.

In **hoofdstuk 3** wordt een vergelijk gemaakt tussen de neuriet uitgroei stimulerende effecten van gemengde OEC/ONF kweken en gezuiverde OEC kweken (onderzoeksvraag 1). Met het oog op de voortdurende discussie over de optimale compositie van olfactorische glia kweken voor het stimuleren van axon uitgroei in vitro en axon hergroei in vivo, is deze studie gericht op twee frequent gebruikte olfactorische glia kweken in vitro. De OEC was duidelijk meer stimulerend voor neuriet uitgroei dan ONF, maar neuriet uitgroei op het oppervlak van OEC was niet verhoogd in gemengde kweken vergeleken met gezuiverde OEC kweken. Deze data suggereren dat ONF geen invloed uitoefenen op de neuriet uitgroei stimulerende effecten van OEC. OEC stimuleren neuriet uitgroei in vitro dus in dezelfde mate wanneer ze voorkomen in gemengde OEC/ONF kweken of in gezuiverde OEC kweken.

In **hoofdstuk 4** richtten we ons op de ontwikkeling van georiënteerde glia cel/biomatrix complexen (onderzoeksvraag 2), die later gebruikt werden als een transplantaat om letselvaviteiten in het ruggenmerg te overbruggen. In het in vitro experiment dat besproken is in hoofdstuk 3 lieten we zien dat het phenotype van zowel OEC/ONF als immature astrocyten georiënteerd is op georiënteerde poly(D,L)-lactide matrices vergeleken met hun phenotype in een Petri schaalteje. Wanneer de poly(D,L)-lactide matrix licht veranderd wordt, waardoor het meer amphiphiel wordt, wordt het phenotype van OEC/ONF zelfs nog meer georiënteerd. Verder laten we zien dat georiënteerde glia cel/biomatrix complexen een directionele uitgroei van neurieten van gecultiveerde cerebrale corticale neuronen stimuleren. Deze interessante bevinding suggereert mogelijkheden met betrekking

tot het 'de juiste kant op sturen' van hergroeiende beschadigde axonen over een ruggenmergletsel heen nadat deze glia cel/biomatrix complexen in de letselcavititeiten zijn getransplanteerd.

Hoofdstuk 5 beschrijft de neurobiologische en functionele effecten (onderzoeksvraag 4) van de multi-factoriële transplantatie strategie waarin ook de meest-georiënteerde OEC/ONF-biomatrix complexen, beschreven in hoofdstuk 4, werden getransplanteerd in de dorsale hemisectie letselcavititeiten. De waargenomen neurobiologische effecten waren een verhoogde aanwezigheid van beschadigde corticospinale axonen direct rostraal van het letsel, maar er werd geen hergroei gezien van deze supraspinale axonen het OEC/ONF-biomatrix complex in. Vergeleken met controle dieren waren er geen verschillen in corticospinale axon hergroei onder en caudaal van de letselcaviteit. Wel werd het OEC/ONF-biomatrix complex sterk voorzien van ingroeiende gastheer axonen van onbekende origine. De neurobiologische effecten werden vergezeld van een matige functionele herstel met betrekking tot swing speed en stride length van de achterpoten, waarvan stride length gecorreleerd is geworden met de integriteit van de corticospinale baan [1]. De vrij beperkte neurobiologische en functionele uitkomsten van onze multi-factoriële transplantatie strategie zouden ten minste ten dele verklaard kunnen worden door de geringe overleving van de getransplanteerde OEC/ONF. Hoewel deze getransplanteerde cellen overleefden in de injectiegebieden rostraal en caudaal van de letselcaviteit was geen van deze cellen in staat te overleven op de biomatrix in de letselcaviteit.

Het doel van de studie beschreven in **hoofdstuk 6** was vergelijkbaar met die beschreven in hoofdstuk 5, waarbij nu gebruik gemaakt werd van immature astrocyten in plaats van OEC/ONF (onderzoeksvragen 3 en 4). De neurobiologische bevindingen die we hier rapporteerden zijn in het grondbeginsel gelijk aan die van hoofdstuk 5: een verhoogde aanwezigheid van beschadigde corticospinale axonen direct rostraal van de letselcaviteit, wat wellicht duidt op een verminderde dieback van deze axonen. Dit keer werden de neurobiologische effecten echter niet vergezeld van verbeteringen in locomotie parameters die beoordeeld worden in de BBB of CatWalk gait analyse, waaronder swing speed en stride length van de achterpoten. Parallel aan dit overleefden de getransplanteerde immature astrocyten alleen in de injectiegebieden rostraal en caudaal van de letselcaviteit, maar niet op de biomatrix in de letselcaviteit.

Een identieke multi-factoriële transplantatie benadering als die beschreven in hoofdstuk 5 werd getest in een chronisch dorsaal hemisectie model en werd beschreven in **hoofdstuk 7** (onderzoeksvragen 3 en 4). Een vier-weken-oud ruggenmergletsel wordt in het algemeen beschouwd als chronisch [2] en vandaar dat de transplantatie werd uitgesteld voor vier weken. Vergelijkbaar met onze resultaten in het acute ruggenmergletsel, namen we een verhoogde aanwezigheid van

corticospinale axonen waar direct rostraal van de letselcaviteit en geen van deze axonen penetreerde het OEC/ONF-biomatrix transplantaat in de letselcaviteit. Geen effecten werden waargenomen op beschadigde corticospinale axonen onder en caudaal van de letselcaviteit. Gedragmatig lieten de dieren geen verbeteringen zien op gedragsparameters beoordeeld met de BBB of CatWalk gait analyse.

Het doel van de studie beschreven in **hoofdstuk 8** was om de mogelijk gunstige effecten van een gecombineerde BDNF-immature astrocyte benadering op neuriet uitgroei in vitro te onderzoeken (onderzoeksvraag 5). We laten zien dat BDNF de neuriet uitgroei van neonatale cerebraal corticale neuronen op immature astrocyten significant vergroot. Hoewel deze studie zich beperkte tot neuriet uitgroei in vitro, suggereren deze gegevens de potentie van BDNF en immature astrocyten als componenten van een nieuwe multi-factoriële strategie om axonale hergroei en functioneel herstel na experimentele dwarslaesie te stimuleren.

Eind conclusies

Georiënteerde OEC/ONF-biomatrix complexen en georiënteerde astrocyte-biomatrix complexen werden in vitro ontwikkeld en daarna gebruikt in een multi-factoriële transplantatie strategie. Deze strategie was ontworpen om een continue (georiënteerde) groei-stimulerende brug in ruggenmergletsels met grote letselcaviteiten te creëren, maar was relatief onsuccesvol in de stimulatie van corticospinale axon hergroei en functioneel herstel. Het gebrek aan overleving van de getransplanteerde cellen op de biomatrix in de letselcaviteiten en het gebrek aan migratie van de getransplanteerde cellen uit de injectiegebieden in de richting van de letselcaviteit heeft waarschijnlijk een sterke invloed gehad op de uiteindelijke uitkomst van de studie. Om op een correcte wijze de mogelijke rol van OEC/ONF transplantaten in ruggenmergen met grote letselcaviteiten te evalueren, dienen overleving en migratie van deze cellen bevorderd te worden. Toekomstig onderzoek kan zich mogelijk tot deze items richten door de manier van transplantatie te verbeteren (bijvoorbeeld door gebruik te maken van biomatrices met betere eigenschappen voor de overleving van getransplanteerde cellen in letselcaviteiten of door gebruik te maken van vele celinjecties in het ruggenmerg). Hiernaast laten onze resultaten zien dat het dorsale hemisectie model geschikt is voor anatomisch onderzoek naar hergroei van beschadigde corticospinal axonen, maar relatief beperkt is voor onderzoeken gericht op functioneel herstel.

Referenties

1. Starkey, M.L., et al., Assessing behavioural function following a pyramidotomy lesion of the corticospinal tract in adult mice. *Exp Neurol*, 2005. 195(2): p. 524–39.
2. Houle, J.D. and A. Tessler, Repair of chronic spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2003. 182(2): p. 247–60.