

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Lage rugpijn is een groot en veelvoorkomend medisch probleem in de westerse wereld, 80% van de bevolking ervaart minstens één periode van lage rugpijn in zijn of haar leven. De lage rugpijn klachten hebben hoge kosten tot gevolg. Deze worden deels veroorzaakt door de medische zorg die verleent dient te worden maar anderzijds ook door een verminderde productiviteit op het werk of zelfs ziekteverzuim. De exacte oorzaak van deze lage rugpijn klachten is helaas nog niet gevonden, echter wordt slijtage van de tussenwervelschijf gecorreleerd aan deze klachten. Dit wordt ook wel tussenwervelschijf degeneratie genoemd. De tussenwervelschijf is een kraakbeenachtig weefsel wat zich tussen de wervellichamen in de wervelkolom bevindt. Tussenwervelschijven hebben als functie het verlenen van flexibiliteit aan de wervelkolom, daarnaast zorgen deze schijven er ook voor dat de mechanische krachten, uitgeoefend op het lichaam tijdens de alledaagse activiteiten als lopen en springen, evenredig over de wervelkolom worden verdeeld.

Het weefsel waaruit de tussenwervelschijf is opgebouwd, ook wel de extracellulaire matrix genoemd, is van groot belang voor het uitvoeren van de functie van de tussenwervelschijf. De buitenzijde van de tussenwervelschijf, de annulus fibrosus, is opgebouwd uit stijve collageen type I vezels. Deze vezels omringen de nucleus pulposus, de binnenkant van de schijf, die is opgebouwd uit proteoglycanen en collageen type II. De tussenwervelschijf heeft geen toevoer van bloed wat de herstel mogelijkheden, ook wel regeneratieve eigenschappen, van de schijf limiteert. Ondanks dat bij vele mensen de tussenwervelschijf degenerereert en pijnklachten veroorzaakt is er momenteel nog geen behandeling mogelijk waarbij het weefsel en daarmee de functie van de tussenwervelschijf hersteld wordt. Het onderzoek in dit proefschrift heeft als uiteindelijke doel om bij te dragen aan een therapie waarbij het weefsel van de tussenwervelschijf hersteld wordt zodat deze weer juist kan functioneren. Deze vorm van therapie wordt ook wel tissue engineering genoemd. De nadruk van dit proefschrift ligt op het verbeteren van diverse technieken en methoden die nodig zijn om te kunnen analyseren of een nieuwe tissue engineering therapie heeft geholpen in de behandeling van tussenwervelschijf degeneratie. Voor de beschreven experimenten zijn de tussenwervelschijven van geiten gebruikt. De geit is hiervoor een goed model, aangezien de extracellulaire matrix, geometrie, cellen en krachten die worden uitgeoefend op de tussenwervelschijf vergelijkbaar zijn met de mens.

De opbouw van de extracellulaire matrix bepaalt hoe de tussenwervelschijf functioneert. Tijdens degeneratie verandert deze opbouw en daarmee het functioneren van de schijf. Kennis over de opbouw van dit weefsel en de reactie van cellen op het veranderen van de extracellulaire matrix is van groot belang bij het ontwikkelen van behandeltherapieën. Proteoglycanen vormen de belangrijkste component van de extracellulaire matrix van de

schijf. Deze moleculen verhinderen echter het isoleren van het RNA uit de cellen in dit weefsel. Ze storen bovendien ook de meting van de hoeveelheid RNA en daarmee de expressie van de verschillende eiwitten door de cellen. In hoofdstuk 2 hebben we daarom gezocht naar de beste methode om het RNA te kunnen isoleren uit de cellen in de extracellulaire matrix van de tussenwervelschijf en dit vervolgens te meten met real time qPCR. De RNeasy Fibrous kit bleek het beste te zijn om RNA te isoleren uit de tussenwervelschijf. Deze toonde bovendien de meest constante metingen tijdens de real-time qPCR analyse. In vergelijking met de gouden-standaard methode om RNA te isoleren uit weefsel was de opbrengst RNA met RNeasy Fibrous kit minder, echter waren de metingen van betere kwaliteit. Het onderzoek besproken in hoofdstuk 2 geeft alleen informatie over de cellen en welke eiwitten deze aan het produceren zijn, de opbouw van de extracellulaire matrix wordt hier echter niet geanalyseerd. In hoofdstuk 3 onderzoeken we daarom een nieuwe techniek die meet uit welke soorten weefsels de extracellulaire matrix van de tussenwervelschijf is opgebouwd. Deze techniek, Fourier Transform Infra Red spectroscopy (FTIR), werkt op basis van infrarood trillingen. Met behulp van een nieuw ontwikkelde analyse methode voor deze techniek waren we in staat om vijf verschillende componenten van de extracellulaire matrix van de tussenwervelschijf te detecteren en te kwantificeren. Bovendien konden we onderscheid maken tussen gezonde en gedegenererde tussenwervelschijven met behulp van deze techniek.

De stamcel is een type cel die veelvuldig gebruikt wordt in het onderzoek naar regeneratieve therapieën. Deze stamcellen kunnen zich namelijk nog ontwikkelen tot verschillende type cellen uit het lichaam waaronder ook tot tussenwervelschijf cellen. Bovendien kunnen stamcellen de reeds aanwezige cellen in het weefsel stimuleren. Daarnaast kunnen de cellen eenvoudig geïsoleerd worden uit het lichaamsvet door middel van liposuctie. Hiermee vormen deze stamcellen een geschikte bron om in de tussenwervelschijf nieuwe extracellulaire matrix te gaan produceren. Als er momenteel stamcellen in een tussenwervelschijf worden geïnjecteerd kan men deze cellen niet meer volgen en zal men tot het einde van het experiment moeten wachten om het effect van deze cellen te zien. Hoofdstuk 4 beschrijft een nieuwe methode waarbij de stamcellen worden gelabeld met het licht van een vuurvliegje, ook wel luciferase genaamd. De cellen gaan hierdoor stralen en kunnen met een speciale techniek, bioluminescence imaging, worden gedetecteerd. Op deze manier kunnen de cellen over de tijd en in de ruimte gevolgd worden en deze informatie kan bijdragen aan het ontwikkelen en verbeteren van celtherapieën.

Zoals al eerder geschreven, is de opbouw van de tussenwervelschijf enorm belangrijk voor de functie van de schijf, met name de rol van de proteoglycanen. Deze proteoglycanen kunnen het best vergeleken worden met een spons, aangezien deze zeer veel water aantrekken. Dit gebonden water zorgt dat de tussenwervelschijf weerstand kan bieden

tegen alle biomechanische krachten die de wervelkolom gedurende de dag te voorduren krijgt en deze evenredig verdeeld kunnen worden over de wervelkolom. Het water wordt de tussenwervelschijf ingetrokken door middel van een osmotische druk. In hoofdstuk 5 onderzochten we het effect van een vermindering van de osmotische druk, daarbij zagen we een verandering in het biomechanisch gedrag van de tussenwervelschijf. Het biomechanisch gedrag vertoonde grote vergelijking met het gedrag van een gedegeneerde tussenwervelschijf. Bovendien hebben we gekeken naar het effect van het veranderen van deze osmotische druk op de cellen en met name welke eiwitten tot expressie worden gebracht. Hierbij vonden we een merkwaardige verandering in een osmotisch gerelateerd eiwit. Ons onderzoek vertoonde een verlaging in de RNA expressie van dit eiwit waar de huidige literatuur een stijging laat zien. De exacte oorzaak hebben we tot op heden niet kunnen achterhalen maar dit kan zitten in het verschil in experimentele set up namelijk een 3D set up in vergelijking met 2D.

Als laatste onderzoek in dit proefschrift hebben we een tissue engineering therapie voor de behandeling van mild gedegeneerde tussenwervelschijven toegepast in hoofdstuk 6. Hierbij hebben we een hydrogel gebruikt die is opgebouwd uit fibrine en hyaluron zuur en een daarmee een surrogaat vormt voor de extracellulaire matrix van de tussenwervelschijf. In deze hydrogel zitten groeifactoren gebonden waarvan bekend is dat ze een stimulerend effect hebben op de cellen in de extracellulaire matrix. Deze gel met groeifactoren is ingespoten in de gedegeneerde tussenwervelschijf van een geit. Doormiddel van een nieuwe innovatieve MRI T2\* techniek en histologische en biochemische analyse technieken hebben we gezocht naar regeneratieve effecten van de gel met de groeifactoren. Het inbrengen van de gel heeft geen nadelige gevolgen voor de gezondheid van de geit en de tussenwervelschijf gehad, echter bleef de regeneratie van de tussenwervelschijf ook uit.

Als ik alle beschreven studies en de opgedane kennis uit de afgelopen jaren combineer, kan ik slechts concluderen dat de tussenwervelschijf een zeer complex orgaan is. Zowel de degeneratieve als regeneratieve processen vormen een groot raadsel waarvan verschillende factoren al ontrafeld zijn maar velen nog niet. Zoals met veel onderzoek, leidt elk experiment tot meer vragen dan antwoorden. Het onderzoek naar tussenwervelschijven is complex. Ondanks de vele onderzoekers die op dit gebied werkzaam zijn denk ik dat het, helaas, nog vele jaren zal duren voor regeneratieve therapieën in de kliniek beschikbaar zullen zijn. Dit proefschrift is slechts een kleine bijdrage aan het vele onderzoek wat nog moet gebeuren. Het vormt een basis voor basale analyse technieken waar nieuw onderzoek veelvuldig gebruik van kan maken voor adequate en consistente analyse van nieuw te ontwikkelen tissue engineering strategieën voor de behandeling van tussenwervelschijf degeneratie.