

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20891> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ruiter, Godard de

Title: Misdirection and guidance of regenerating motor axons after experimental nerve injury and repair

Issue Date: 2013-05-21

Samenvatting en toekomstige richting van het onderzoek

MISDIRECTIE VAN ZENUWREGENERATIE

De functionele resultaten na chirurgisch herstel van perifere zenuwletsels zijn vaak teleurstellend. Verschillende factoren kunnen dit tegenvallende herstel verklaren zoals een tijdsverloop tussen het ontstaan van het letsel en chirurgisch herstel en de leeftijd van de patiënt. Een andere verklarende factor, die in dit proefschrift werd onderzocht, is de verkeerde uitgroei van zenuwvezels; genaamd *misdirectie*. Deze misdirectie treedt op doordat zenuwvezels niet altijd recht vooruit groeien naar het oorspronkelijke distale gedeelte van de zenuw, maar ter plaatse van de coaptatieplaats (de plek van beschadiging en chirurgisch herstel) kunnen afdwalen en terechtkomen in het verkeerde distale gedeelte van de zenuw (zie figuur 1, **hoofdstuk 2**). Dit kan vervolgens leiden tot een verminderd herstel van functie, bijvoorbeeld doordat de zenuwvezels uit één zenuw uitkomen in meerdere spieren met verschillende functies.

Kwantificatie van misdirectie

Hoewel het bovenbeschreven fenomeen van misdirectie als ontdekt is in het begin van de vorige eeuw [1], zijn er slechts enkele studies die deze misdirectie hebben gekwantificeerd (zie **hoofdstuk 2** voor een overzicht van deze studies). De meeste van deze studies hebben zich daarbij gericht op de nauwkeurigheid van motorische versus sensibele regeneratie naar respectievelijk spier en huid. Er is weinig bekend over de nauwkeurigheid van regeneratie van motorische zenuwvezels naar verschillende spieren en met name ook over het effect op functioneel herstel. In het eerste gedeelte van dit proefschrift onderzochten wij deze nauwkeurigheid van motor axon regeneratie in het nervus ischiadicus model in de rat. Deze zenuw splitst zich distaal in twee motorische takken, de nervus tibialis en de nervus peroneus, die verschillende spieren aansturen, respectievelijk betrokken bij plantair en dorsiflexie van de enkel (figuur 1, **hoofdstuk 4**). We kwantificeerden misdirectie in dit model met behulp van een *sequentiële retrograde tracing* techniek, waarbij de eerste tracer werd toegediend aan de nervus peroneus voor het aanbrengen van het letsel en de tweede tracer acht weken daarna. Vervolgens werd het percentage motoneuronen dat was gelabeld door beide tracers en dus juist was uitgegroeid, berekend door het aantal dubbel gelabelde motoneuronen te delen door het totale aantal motoneuronen dat voor het letsel was gelabeld. Dit onderzoek toonde dat 8 weken na een crush letsel 71% van de motoneuronen van de nervus peroneus correct was uitgegroeid naar de oorspronkelijk zenuw. Na doorsnijding van de zenuw en chirurgische coaptatie bedroeg het percentage correcte uitgroei slechts 42% en na herstel met een autologe donorzenuw zelfs maar 25%. Dit verschil in percentages correcte uitgroei na doorsnijding en herstel vergeleken met het crush letsel, kan worden verklaard door onderbreking van de continuïteit van de basale

lamina kokers na doorsnijding van de zenuw. Het nog lagere percentage na herstel met een autograft kan worden verklaard doordat axonen twee keer een coaptatie oversteken en daardoor meer kans hebben om af te dwalen en uiteindelijk terecht te komen in de verkeerde distale tak.

Effect van misdirectie op functioneel herstel

Voor de analyse van het effect van de *misdirectie* op functioneel herstel ontwikkelden wij een nieuwe methode, genoemd *2D-digital video ankle motion analysis*. Deze methode werd in eerste instantie gevalideerd in normale dieren en na crush letsels van de nervus ischiadicus, tibialis en peroneus (**hoofdstuk 3**). We vergeleken onze methode met de toen geldende standaard methode voor functionele analyse, genaamd de *sciatic function index*, waarbij de voetafdruk van de rat wordt geanalyseerd door bijvoorbeeld de poot in inkt te dopen en de rat vervolgens over een stuk papier te laten lopen [2]. Voor onze nieuwe methode maakten wij gebruik van een digitale camera en computersoftware om bewegingen van de enkel te analyseren. Deze apparatuur wordt ook gebruikt bij sporters, bijvoorbeeld om de slag van honkballers en de swing van golfers te analyseren. Wij toonden aan dat onze methode gevoeliger is voor de detectie van herstel dan de *sciatic function index*. Daarbij heeft onze methode het voordeel dat deze ook kan worden gebruikt voor de afzonderlijke analyse van herstel van functie van de nervus tibialis en nervus peroneus door bestudering van respectievelijk plantair- en dorsiflexie van de enkel.

169

In **hoofdstuk 4** gebruikten wij deze methode van *ankle motion analysis* om herstel te analyseren na verschillende typen zenuwletsel: crush letsel, doorsnijding en coaptatie en herstel met een autograft. De resultaten van deze studie toonden dat misdirectie inderdaad een negatief effect heeft op functioneel herstel. Zo was de hoek van de enkel tijdens de *midswing* fase (normaal het moment van maximale dorsiflexie) zoals verwacht na letsel en herstel afgenomen, maar in de loop van de tijd nam deze steeds verder af, in plaats van dat herstel optrad. Deze onverwachte uitkomst kan worden verklaard door een verkeerde uitgroei van een groot gedeelte van de motoneuronen van de nervus peroneus richting de nervus tibialis. Zoals aangetoond in ons experiment met *sequentiële tracing* was maar 42% van de peroneus motoneuronen correct uitgegroeid. Omdat het aantal motoneuronen dat was uitgegroeid niet verschilde van het aantal in controle dieren, kan worden aangenomen dat de rest van de peroneus motoneuronen (58%) was uitgegroeid naar de nervus tibialis. Deze verkeerde uitgroei kan dus leiden tot actieve plantairflexie tijdens de *swing* fase en daardoor een verminderde hoek van dorsiflexie.

Vergelijking met de literatuur

Onze studie uit **hoofdstuk 4** toont aan dat de uitgroei van motor axonen na doorsnijding onnauwkeurig is en dat dit de functionele resultaten van zenuwherstel beperkt. Er is één andere studie die de nauwkeurigheid van motor axon regene-

ratie heeft gekwantificeerd [3]. In deze studie werd gebruik gemaakt van hetzelfde model en dezelfde techniek van sequentiële tracing, alleen werd in die studie uitgroei naar de nervus tibialis in plaats van de nervus peroneus onderzocht. De auteurs vonden dat 88% van de tibialis motoneuronen correct was uitgegroeid 8 weken na doorsnijding en chirurgisch herstel en concludeerden op basis van deze resultaten dat coaptatie van een zenuw tot een hoog percentage van correctie uitgroei van axonen leidt. Echter, ook in die studie was ongeveer 1/3 van de motoneuronen dat alleen gelabeld was door de tweede tracer (tabel 1 artikel Puiggellivol), hetgeen wijst op misdirectie van >50% van de peroneus motoneuronen. Dit kan worden berekend op basis van de aantallen motoneuronen van de nervus tibialis en nervus peroneus (ongeveer 800 en 400 respectievelijk, figuur 4 Hoofdstuk 7). Het verschil in percentages (88% correcte uitgroei voor tibialis motoneuronen versus 42% correctie uitgroei voor peroneus motoneuronen) toont dus aan dat het belangrijk is rekening te houden met de grootte van de motoneuronpool.

Correctiemechanismen voor misdirectie

De resultaten van ons motion analysis experiment toonden geen aanwijzingen voor het optreden van correctiemechanismen voor misdirectie (zie **hoofdstuk 2** voor een overzicht van deze mechanismen). De verdere afname van de enkelhoek tijdens de midswing ontstond na acht weken en bleef verlaagd gedurende de gehele follow-up periode van zestien weken. Het mag worden verwacht, dat eventuele *pruning*, het verdwijnen van verkeerd uitgegroeide zenuwvezels, bij 16 weken zou hebben plaats gevonden, omdat dit fenomeen in het rat femoralis model optreedt na ongeveer drie tot acht weken [4]. Het is mogelijk dat andere mechanismen, zoals bijvoorbeeld plastische veranderingen (remodulatie van verbindingen in het ruggenmerg [5]), welke de effecten van misdirectie zouden kunnen reduceren, pas na 16 weken optreden. In toekomstige studies zou daarom voor een langere follow-up kunnen worden gekozen (zie hieronder).

Conclusie eerste deel proefschrift en toekomstig richting van het onderzoek

Op basis van de resultaten in het eerste gedeelte van het proefschrift kan worden geconcludeerd dat misdirectie inderdaad een belangrijke beperkende factor is welke het functioneel herstel na letsels van zenuwen die verschillende spieren aansturen beperkt zoals bijvoorbeeld de nervus ischiadicus [6], de nervus ulnaris [7] en de nervus suprascapularis [8]. De resultaten na klinisch zenuwherstel zijn waarschijnlijk vaak nog slechter doordat hierbij ook andere beperkende factoren een rol spelen, zoals een tijdsverloop tussen het optreden van het letsel en de operatie en een relatief hoge leeftijd van de patiënt. Daarbij kan in de praktijk de originele oriëntatie van de fascikels vaak niet worden hersteld, zoals in onze studie wel het geval was. Toekomstige experimenten zouden daarom de rol van misdirectie in een model van *delayed nerve repair* kunnen onderzoeken en/of herstel met verschillende fasciculaire oriëntaties. Ander onderzoek zou gericht kun-

nen zijn op eventueel herstel van functie op langere termijn door het optreden van correctiemechanismen. Deze mechanismen zouden verder kunnen worden onderzocht door het percentage correcte uitgroei te bepalen mbv sequentiële retrograde tracing op meerdere tijdstippen na het letsel en herstel. Daarbij zou in hetzelfde experiment gekeken kunnen worden naar de chaotische verdeling van de verschillende gelabelde motoneuronen in de voorhoorn van het ruggenmerg om te onderzoeken of er meer organisatie ontstaat (zie observaties van simultane retrograde tracing in **hoofdstuk 7** en **9**). Verder zouden bij de functionele analyse tegelijkertijd ook de compound muscle action potentials (CMAP) kunnen worden gemeten en zou sensibel herstel kunnen worden onderzocht.

TWEEDE DEEL PROEFSCHRIFT

GELEIDING VAN ZENUWREGENERATIE

In het tweede deel van dit proefschrift onderzochten wij de toepassing van twee verschillende strategieën om de correctie uitgroei van axonen tijdens zenuwregeneratie te verbeteren. De eerste strategie was fysische geleiding met behulp van een gefabriceerde zenuwbuis met meerdere kanalen (multichannel). De tweede strategie was biologische geleiding met behulp van genterapie. De resultaten en toekomstige perspectieven van deze twee strategieën worden hieronder apart besproken.

171

Multichannel zenuwbuis

Holle zenuwbuisen worden op dit moment al veelvuldig toegepast als alternatief voor het autoloog zenuwtransplantaat in de overbrugging van defecten <3 cm in sensibele zenuwen, zoals bijvoorbeeld digitale zenuwen in de hand (voor overzicht zie **hoofdstuk 5**). Deze buizen worden maar weinig gebruikt in het herstel van motorische zenuwen. Een mogelijke reden hiervoor is dat herstel met holle buis kan leiden tot de afdwaling van regenererende axonen (zie figuur 1B, **hoofdstuk 10**). Dit in vergelijking met het autoloog zenuwtransplantaat dat bestaat uit meerdere basale lamina kokers waardoorheen de axonen uitgroeien (figuur 1A, **hoofdstuk 10**). De hypothese waarvoor wij de multichannel zenuwbuis ontwikkelden, was dan ook dat de interne structuur van deze buis de afdwaling die optreedt na herstel met holle buizen kan beperken door de aparte geleiding van groepen zenuwvezels in de kanalen (figuur 1C, **hoofdstuk 10**).

De ontwikkeling van de multichannel zenuwbuis

Om deze hypothese te testen, ontwikkelden wij een nieuwe multichannel zenuwbuis gemaakt van poly(lactic co-glycolic acid) (PLGA) met behulp van een gemodificeerde *injection-molding* techniek (figuur 1, **hoofdstuk 6**). Dezelfde injection-

molding techniek werd gebruikt voor de fabricatie van holle zenuwbuizen. Voor *in vivo* implantatie werden eerst holle zenuwbuizen van verschillende co-polymeer ratio's (50:50, 75:25, 85:15 PLGA) getest *in vitro* om de optimale co-polymeer eigenschappen te bepalen met als doel enerzijds flexibiliteit te maximaliseren en anderzijds zwelling te minimaliseren. Flexibiliteit van de buis is een belangrijke eigenschap voor zenuwherstel, omdat zenuwletsels kunnen optreden thv gewrichten (bijvoorbeeld letsels van de nervus ulnaris ter hoogte van de elleboog). Het minimaliseren van zwelling van de wand van de buis is belangrijk, omdat dit primair het lumen kan blokkeren of secundair compressie kan geven van uitgegroeide zenuwvezels. Op basis van dit *in vitro* experiment werd de ratio van 75:25 PLGA gekozen voor de fabricatie van de multichannel zenuwbuizen, omdat de flexibiliteit groter was dan voor de hogere ratio (85:15), er minder zwelling was vergeleken met de lagere ratio (50:50). Deze 75:25 multichannel zenuwbuizen werden ook getest *in vitro* en de resultaten werden vergeleken met de resultaten voor holle zenuwbuizen gemaakt van dezelfde ratio. Vervolgens werd een nieuwe methode ontwikkeld om *in vitro* permeabiliteit van holle en multichannel zenuwbuizen te vergelijken. Permeabiliteit van de buis is van belang voor de diffusie van nutriënten voor regeneratie. Uit de resultaten van deze *in vitro* studie bleek dat de structuur van de multichannel zenuwbuis geen negatief effect heeft op de eigenschappen voor permeabiliteit en flexibiliteit van de zenuwbuis. Multichannel zenuwbuizen gemaakt van 75:25 PLGA waren zelfs meer doorlaatbaar en flexibeler dan holle zenuwbuizen gemaakt van dezelfde ratio. Theoretisch zou men verwachten dat een multichannel zenuwbuis minder doorlaatbaar is en minder flexibel. Echter, mogelijk leidt de injection-molding techniek van fabricatie tot meer verbindingen tussen de poriën in de wand van de multichannel zenuwbuis vergeleken met de poriën in de wand van de holle buis (figuur 2, **hoofdstuk 6**). Dit toont het belang aan van *in vitro* analyse van een zenuwbuis, voordat deze *in vivo* wordt geïmplantateerd. De meeste van de holle zenuwbuizen die op dit moment klinisch worden toegepast zijn niet *in vitro* getest (zie **hoofdstuk 5**). De toevoeging van een interne structuur aan de buis beïnvloedt niet alleen de geleiding van axonen, maar kan ook belangrijke fysische eigenschappen van de buis veranderen, zoals aangetoond in **hoofdstuk 6**. De methoden en resultaten van deze studie kunnen worden gebruikt als basis voor de ontwikkeling van buizen met een complexere interne structuur.

Analyse van zenuwregeneratie door de multichannel zenuwbuis

Na de *in vitro* analyse, werden de holle en multichannel zenuwbuizen gemaakt van 75:25 PLGA geïmplantateerd in een gap van 1 cm lang defect in de nervus ischiadicus van de rat om de nauwkeurigheid van motor axon regeneratie door deze buizen te onderzoeken met behulp van simultane en sequentiële tracing technieken (**hoofdstuk 7**). De resultaten van deze eerste studie toonden aan dat herstel met een holle zenuwbuis inderdaad leidt tot meer afdwaling; er was een hoger percentage motoneuronen met dubbele projecties naar de nervus tibialis en nervus peroneus (21,4%) vergeleken met herstel met een autograft (5,9%). Na herstel met een mul-

tichannel zenuwbuis was er een trend naar afname van afdwaling (16,9% van de motoneuronen had dubbele projecties), maar dit verschil was niet significant vergeleken met de afdwaling na herstel met een holle zenuwbuis. Het feit dat in deze eerste studie geen significante reductie van afdwaling werd gevonden kan worden verklaard doordat tijdens het regeneratie proces in de multichannel zenuwbuis maar drie van de zeven kanalen gevuld waren met gemyeliniseerde axonen. Daarbij was het succes percentage in deze studie laag: groei door de buis werd maar gevonden in 53% van de gevallen na herstel met een holle zenuwbuis en 43% na herstel met een multichannel zenuwbuis. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat er toch te veel zwelling op was getreden van het 75:25 PLGA co-polymeer, waardoor zenuwregeneratie door de buizen werd belemmerd.

Na het experiment met de multichannel 75:25 zenuwbuis, werd een nieuwe serie van multichannel zenuwbuizen ontwikkeld met één, twee, vier en zeven kanalen [9]. Deze buizen werden gemaakt van het natuurlijk voorkomend materiaal collageen (type I) middels een *multiple step-molding* techniek (figuur 2, Hoofdstuk 10). De fysische eigenschappen van deze buis werd eerst getest *in vitro* volgens de methoden gepresenteerd in **hoofdstuk 6**.

De resultaten van de tweede *in vivo* studie toonden aan dat de multichannel structuur inderdaad de afdwaling van axonen kan reduceren (**hoofdstuk 8**). Na herstel met een 2 en 4 kanaals zenuwbuis hadden respectievelijk 2,7 en 2,4% van de motoneuronen dubbele projecties naar de nervus tibialis en nervus peroneus, vergeleken met 7,1% na herstel met een holle zenuwbuis. Alhoewel dit verschil misschien klein lijkt, is het belangrijk te realiseren dat dit percentage slechts een deel van de afdwaling betreft. Daarnaast kan er afdwaling zijn van enkele projecties (hetgeen niet kan worden aangetoond met simultane tracing, figuur 1D **hoofdstuk 10**) en kan afdwaling weliswaar leiden tot regeneratie naar dezelfde distale zenuw, maar naar verschillende fascikels in die zenuw (figuur 1E **hoofdstuk 10**). Verder is het belangrijk in de analyse van de resultaten rekening te houden met het tijdpunt van evaluatie. In onze eerste studie in **hoofdstuk 7** was de periode van observatie acht weken, terwijl in de tweede studie de resultaten na 16 weken werden geëvalueerd. We vonden bijvoorbeeld hogere percentages motoneuronen met dubbele projecties in de eerste studie (16,9% na herstel met een multichannel zenuwbuis en 21,4% na herstel met een holle zenuwbuis) dan in de tweede studie. De resultaten van deze twee studies kunnen echter niet worden vergeleken, omdat in de tweede studie buizen met twee en vier kanalen werden gebruikt (in plaats van zeven zoals in de eerste studie) en de buizen van verschillende materialen werden gemaakt. Meer onderzoek is daarom nodig om te onderzoeken of het percentage daalt in de loop van de tijd.

Kwantitatieve resultaten van zenuwregeneratie

De kwantitatieve resultaten van zenuwregeneratie (voor wat betreft het aantal gemyeliniseerde axonen en retrograad gelabelde motoneuronen) waren zowel

na herstel met een PLGA als na herstel met een collageen multichannel zenuwbuis niet significant verlaagd vergeleken met na herstel met een holle zenuwbuis gemaakt van hetzelfde materiaal. Dit ondanks het verminderde doorsnede oppervlak dat in een multichannel zenuwbuis beschikbaar is voor regeneratie. Daarnaast was het succespercentage na herstel met een collageen buis groter dan na herstel met een PLGA buis: in 39 van de 40 operaties waren bijna alle kanalen gevuld met regenererende fascikels met gemyeliniseerde axonen. De eerste fase van regeneratie door een buis is de vorming van een fibrine matrix tussen de zenuwuiteinden (figuur 2, **hoofdstuk 5**). Mogelijk voordeel van de multichannel zenuwbuis tov de holle buis is dat meerdere van dit soort kabels worden gevormd. Meer onderzoek is nodig voor verdere analyse van de eerste fases in regeneratie door multichannel zenuwbuizen.

Tenslotte waren de kwantitatieve resultaten van regeneratie in beide studies nog steeds het beste na herstel met een autograft. Alhoewel dit niet leidde tot betere functionele resultaten is het belangrijk te realiseren dat een ideaal alternatief voor de autograft het beter zou moeten doen, omdat zelfs na herstel met een autograft de klinische resultaten vaak teleurstellend zijn [10].

Conclusie en toekomstige richting van het onderzoek met multichannel zenuwbuizen

Zoals wij aantoonen in dit proefschrift kunnen multichannel zenuwbuizen dus de afdwaling van axonen die optreedt na herstel met een holle zenuwbuis voorkomen, doordat deze meer lijken op de structuur van een autograft. Opmerkelijk is dat het aantal kanalen dat in de buis kan worden gemaakt in ons geval werd beperkt door de fabricatietechniek. Wellicht kan het aantal kanalen in de multichannel zenuwbuizen met behulp van nieuwe fabricatietechnieken in de toekomst bij multichannel zenuwbuizen worden vergroot. De ideale structuur hierbij is die van een honingraat, omdat met deze opbouw de hoeveelheid biomateriaal tussen de kanalen kan worden verkleind en daarmee het doorsnede oppervlak dat beschikbaar is voor regeneratie kan worden vergroot. Een andere doel zou kunnen zijn om zenuwbuizen te bouwen, waarvan de interne structuur meer lijkt op die van de beschadigde zenuw die nu op het proximale niveau niet bestaat uit parallel verloopende kanalen maar uit een netwerk van fascikels die slingerend lopen, splitsen en fuseren. Deze zogenaamde intraneurale plexus structuur zou kunnen worden nageemaakt door gebruik te maken van 3D-printing technieken.

Naast de multichannel structuur, kunnen ook andere modificaties van de holle zenuwbuis worden onderzocht, zoals de toevoeging van gels met collageen, filamenten, cellen en groeifactoren (zie tabel 3, **hoofdstuk 5** voor een overzicht van deze factoren). Deze aanpassingen kunnen ook worden toegepast in combinatie met de multichannel structuur. Een additioneel voordeel van de multichannel zenuwbuis hierbij is dat deze meer oppervlak biedt voor de hechting van cellen en een intern framework biedt voor gecontroleerde afgifte van groeifactoren door

bijvoorbeeld gebruik te maken van microspheres. Door deze microspheres in te bouwen in de structuur is het mogelijk dat groeifactoren geleidelijk worden afgegeven. Bij losse microspheres ingebracht in het lumen van de zenuwbuis treedt direct na implantatie een hoge afgifte op [11]. Daarnaast zouden groeifactoren ook kunnen worden gebruikt om zenuwvezels aan te trekken richting de kanalen (om zo afdwaling bij de overgang van de zenuw naar de buis te voorkomen) en/of om verschillende typen axonen selectief te geleiden naar aparte kanalen door gebruik te maken van verschillende groeifactoren in de verschillende kanalen.

Gentherapie

In het laatste deel van dit proefschrift hebben wij de toepassing van lentivirale vectoren (LV) voor de selectieve geleiding van motor axonen onderzocht (**hoofdstuk 9**). De basis voor dit project was de observatie in **hoofdstuk 4** dat met name motoneuronen van de nervus peroneus terecht kwamen in de verkeerde distale tak doordat de nervus peroneus in doorsnede kleiner is dan de nervus tibialis. Dit leidde ook tot een verminderd herstel van functie van de nervus peroneus. Het doel van dit project was daarom om het aantal motoneuronen waarvan axonen uitgroeiden naar de nervus peroneus te vergroten. Dit werd nagestreefd door selectief een lentiviral vector coderend voor de neurotrofe factor GDNF (LV-GDNF) in de nervus peroneus te injecteren. Wij kozen hierbij voor de factor GDNF, omdat deze met name de uitgroei van motorische axonen stimuleert. De factor wordt na zenuwletsel voor een bepaalde periode geproduceerd door Schwann cellen in de distale zenuw. Injectie van LV-GDNF in de distale zenuw leidt tot een verhoogde expressie van GDNF. Dit werd aangetoond in een pilot studie, waarin het virus distaal van de bifurcatie naar de nervus peroneus en tibialis werd geïnjecteerd. De expressie van GDNF werd onderzocht mbv een ELISA uitgevoerd voor 0,5 cm segmenten van zenuw proximaal en distaal van de plaats van injectie. De resultaten toonden aan dat met behulp van deze injectie techniek hoge concentraties GDNF kunnen worden bereikt in de nervus peroneus, net distaal van de bifurcatie, zonder verhoging van de concentratie in de proximale nervus ischiadicus of in de andere distale tak, de nervus tibialis. Wel wisselden de concentraties GDNF van dier tot dier.

Vervolgens onderzochten wij in een grotere studie het effect van GDFN injectie in de nervus peroneus met behulp van simultane retrograde tracing 4 weken na transectie en chirurgisch herstel van de nervus ischiadicus. Deze studie toonde dat een verhoogd aantal motoneuronen waren uitgroeid richting de nervus peroneus na LV-GDNF injectie vergeleken met de controle groep waarbij een lentivirale vector coderend voor green fluorescent protein (LV-sGFP) werd geïnjecteerd. Hoewel dit verschil niet statistisch significant was, werd in twee van de acht dieren na LV-GDNF injectie een opvallend uitgesproken effect gevonden. De normale ratio van tibialis en peroneus motoneuronen van 2:1 bleek volledig omgekeerd naar 1:2. Daarnaast toonde immunohistochemie met choline acetyl transferase (ChAT) een verhoogd aantal motor axonen in de nervus peroneus na LV-GDNF injectie,

alhoewel dit laatste ook kan worden verklaard door *sprouting* (het splitsen van axonen in meerdere distale uitlopers).

Conclusie en toekomstige richting van het onderzoek met genterapie

De resultaten van **hoofdstuk 9** zijn een eerste aanwijzing dat motor axonen kunnen worden geleid met behulp van genterapie. Meer onderzoek is echter nodig om constante concentraties van groeifactoren na de injectie te verkrijgen. Daarnaast worden op dit moment reguleerbare vectoren ontwikkeld om de *trapping* van axonen bij de plaats van verhoogde concentratie groeifactor (*candy store phenomenon*) te voorkomen. Mogelijke toekomstige toepassing van selectieve injectie zou zijn om motor axonen te geleiden naar de motorische tak, zoals bijvoorbeeld na herstel van de nervus medianus bij de pols (figuur 3) [12]. Andere mogelijke toekomstige toepassingen van genterapie in zenuwchirurgie zijn upgradering van de autograft door selectieve overexpressie van groeifactoren of verhoging van de snelheid van regeneratie. Dit laatste is met name van belang in het herstel van proximale zenuwletsels, waarbij er een grote afstand is naar het uiteindelijk doelorgaan, zoals bijvoorbeeld het herstel van handfunctie in letsels van de plexus brachialis [13]. Tenslotte, zouden combinaties van de bovenvermelde strategieën (bijvoorbeeld multichannel zenuwbuizen met genetisch gemodificeerd Schwann cellen) kunnen leiden tot verbetering van de resultaten na chirurgisch zenuwherstel.