

CHAPTER 9

Samenvatting

Samenvatting

Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding van dit proefschrift met als titel: “Activated Microglia After Traumatic Brain Injury, The Neuroinflammatory Mastermind”. Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (WGO) zal traumatisch hoofd-hersenletsel de belangrijkste oorzaak zijn van overlijden en handicap in het jaar 2020 (1). Naast emotionele, financiële en sociale beperkingen voor de patiënt, zijn familie en omgeving, legt overlijden en ziekte als gevolg van traumatisch hoofd-hersenletsel, een heterogene ziekte wat betreft oorzaak, pathologie, ernst en prognose, een grote druk op het gezondheidszorgsysteem.

In de afgelopen decennia is er een aanzienlijke vooruitgang geboekt in een beter begrip van de pathofysiologische processen na traumatisch hoofd-hersenletsel. Het is tegenwoordig algemeen aanvaard dat traumatisch hoofd-hersenletsel niet een alleen een enkelvoudige gebeurtenis is, maar een complexe entiteit met voortdurende pathofysiologische mechanismen (106, 152, 153). Posttraumatische neuroinflammatoire gevolgen kunnen worden onderverdeeld in twee componenten: een cellulaire component, waaronder microglia activering, en een component met het vrijkomen van immuun mediators (161). Geactiveerde microglia hebben een tweeledige en tegenovergestelde rol onder pathologische condities zoals traumatisch hoofd-hersenletsel. Enerzijds zijn het de initiators van een intern auto-protectief mechanisme, met als doel herstellen van de hersencel (18). Anderzijds nemen ze een sleutelpositie in wat betreft het initiëren en continueren van een acute posttraumatische neuroinflammatoire respons, gekarakteriseerd door een massaal vrijkomen van inflammatoire cytokinen, waaronder interleukin (IL)-1 β and IL-6, chemokinen en complement activatie eiwitten (17).

Vanwege het feit dat traumatisch hoofd-hersenletsel een heterogene ziekte is zijn dierexperimentele modellen nodig, onderverdeeld in focaal en diffuus hersenletsel, om posttraumatische pathofysiologische mechanismen onder stabiele en gecontroleerde omstandigheden te onderzoeken. Wij hebben gebruik gemaakt van de radionuclide (*R*)-[¹¹C]PK11195, welke bindt aan de microgliale translocator eiwit (TSPO) en positron emissie tomografie

(PET) om microglia activatie te meten. Als een reflectie op de posttraumatische neuroinflammatoire respons hebben we gebruik gemaakt van cerebrale microdialyse. Cerebrale microdialyse is een neuromonitoring techniek gebaseerd op diffusie van stoffen in de extracellulaire vloeistof (ECF) over een semi-permeabele membraan in een perfusie vloeistof.

In **hoofdstuk 2** hebben we de extractie-efficiëntie van IL-1 β en IL-6 bepaald via een *in vitro* microdialysis-perfusie-systeem en een polyether sulfon (PES) microdialyse katheter. Een PES microdialyse katheter is speciaal geschikt voor onderzoek naar macromoleculen zoals cytokinen. Uit dit onderzoek bleek dat het mogelijk was om cytokinen *in vitro* te extraheren met behulp van microdialyse na het toevoegen van een drager eiwit. Om een indruk te krijgen van het profiel in de tijd van IL-1 β en IL-6 in de ECF, werden ratten blootgesteld aan focaal traumatisch hoofd-hersenletsel of schijn procedure. Hieruit bleek dat zowel IL-1 β als IL-6 in de ECF aantoonbaar was met behulp van cerebrale microdialyse *in vivo*. Onze bevindingen waren dat het vrijkomen van IL-1 β voorafgegaan wordt door een geleidelijke toename in expressie van IL-6.

In **hoofdstuk 3** onderzochten we de posttraumatische microglia activering in de tijd gerelateerd aan het vrijkomen van glutamaat, een belangrijke stimulerende neurotransmitter. Ratten ondergingen drie opeenvolgende dynamische (*R*)-[^{11}C]PK11195 PET scans. De eerste (uitgangs)scan werd gemaakt voor het hoofd-hersenletsel. De tweede en derde scan werden gemaakt op de eerste en tiende dag na het onderzoek. Glutamaat in de ECF werd gemeten met behulp van cerebrale microdialyse in de acute posttraumatische fase. De hersenen werden verwerkt voor histopathologisch onderzoek en (immuno)-histochemie. We vonden dat tien dagen na traumatisch hoofd-hersenletsel de (*R*)-[^{11}C]PK11195 binding significant verhoogd was in ratten welke traumatisch hoofd-hersenletsel hadden ondergaan in vergelijking met zowel de waarden van de uitgangsscan en de controle groep. Deze verhoogde cerebrale opname van (*R*)-[^{11}C]PK11195 volgde op een significant acute posttraumatische toename ECF glutamaat. Postmortaal vonden we significante verschillen tussen de ratten die traumatisch hoofd-hersenletsel hadden ondergaan en de controle

ratten in representatief hersenmateriaal voor ED-1 (positieve cellen zijn geactiveerde microglia en/of macrofagen), OX-6 (marker van geactiveerde microglia), GFAP (komt vrij uit astocyten), Perl's (indicatief voor bloeding) en Fluoro-Jade B (indicatief voor neuronale degeneratie).

In de meeste studies wordt (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 binding gekwantificeerd met behulp van een *reference tissue model*. Het doel van het onderzoek zoals beschreven in **hoofdstuk 4** was het de validatie van een *simplified reference tissue model* (SRTM) voor het analyseren van (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 PET studies naar traumatisch hoofd-hersenletsel, waar verstoringen van de bloed-hersenbarrière (BBB) plausibel zijn. Dynamische (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 scans werden verricht op drie tijdstippen na traumatisch hoofd-hersenletsel. *Plasma input* (PI) *binding potential* ($\text{BP}_{\text{ND}}^{\text{PI}}$), *volume of distribution* (V_T), K_1/k_2 , en $\text{BP}_{\text{ND}}^{\text{SRTM}}$ werden bepaald. Simulaties werden uitgevoerd om de effecten van verschillende K_1/k_2 na te bootsen. We concluderen dat vroeg na traumatisch hoofd-hersenletsel (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 studies moeten worden geanalyseerd met behulp van PI modellen.

Het doel van het onderzoek zoals beschreven in **hoofdstuk 5** was het onderzoeken van de mate van (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 binding als een indirecte marker voor neuronale schade na traumatisch hoofd-hersenletsel. Dynamische (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 PET scans werden verricht van patiënten die een traumatisch hoofd-hersenletsel hadden ondergaan, zes maanden na het ongeval. *Supervised cluster analysis* (SVCA4) werd gebruikt voor het genereren van een referentie waarde. We vonden een toegenomen totale (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 binding in de hersenen bij patiënten met traumatisch hoofd-hersenletsel vergeleken met gezonde controles. Regionale analyse wijst uit dat dat een verhoogde (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 binding indicatief is voor diffuus neuronale schade.

In **hoofdstuk 6** bestuderen we de longitudinale veranderingen in microglia activatie in de traumatische laesies als ook de zone rondom deze laesies. Hiervoor hebben we volledig kwantitatieve (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 PET-scans uitgevoerd van patiënten na traumatisch hoofd-hersenletsel op drie verschillende tijdstippen: 7-10 dagen, één en zes maanden na het hoofd-hersenletsel. (R) - $[^{11}\text{C}]$ PK11195 BP_{ND} , K_1/k_2 en V_T van de traumatische

laesies en het omliggende weefsel werden gemeten met behulp van een gevalideerde tracer kinetisch model met metaboliet-gecorrigeerd PI functie. Traumatische laesies werden gedefinieerd op magnetic resonance imaging van de hersenen. In de acute fase (7-10 dagen) zagen we in traumatische laesies en zes maanden na het trauma in het omliggende weefsel, significant hogere waarden (*R*)-[¹¹C]PK11195 in vergelijking met gezonde controles. Verhoogde (*R*)-[¹¹C]PK11195 in het omliggende weefsel na traumatisch hersenletsel duidt op microglia activering en/of macrofagen toestroom in deze regio's. De lange termijn verhoogde (*R*)-[¹¹C]PK11195 binding in het omliggende weefsel duidt op lange termijn posttraumatische activering van microglia welke in de toekomst wellicht een therapeutisch doel voor toekomstige neuroprotectieve studies zou kunnen zijn.

Tot slot worden de resultaten van dit proefschrift bediscussieerd in **hoofdstuk 7**. Hoewel (*R*)-[¹¹C]PK11195 PET imaging in patiënten met traumatisch hoofd-hersenletsel enkele beperkingen kent wat betreft logistiek, patiëntveiligheid en enkele methodologische valkuilen, biedt deze neuroimaging techniek een unieke gelegenheid om de inflammatoire reactie in de hersenen *in vivo* en in de tijd te kunnen onderzoeken. Veelbelovende nieuwe TSPO radioliganden in TSPO onderzoek zijn geschikt als nieuwe biomarkers bij de evaluatie van microglia activering na traumatisch hoofd-hersenletsel in de zeer nabije toekomst. Toekomstig onderzoek op het gebied van traumatisch hoofd-hersenletsel zal zich moeten richten op de tweeledige en tegenovergestelde rol van geactiveerde microglia om een beter inzicht te verkrijgen van de complexe neuroinflammatoire cascades van deze in vele opzichten verwoestende ziekte.