

Guoli Zheng

Dr. med

Effects of treadmill training on the survival and differentiation of transplanted neuronal precursor cells with implications for functional recovery after cervical spinal cord injury in rats

Fach/Einrichtung: Neurochirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Klaus Zweckberger

Hintergrund:

Eine traumatische Rückenmarksverletzung (SCI) ist für den betroffenen Patienten ein katastrophales Ereignis mit oft irreversiblen Folgen, einschließlich motorischer Funktionsstörungen, autonomer Funktionsstörungen und sensorischer Defizite. Die Transplantation von Stammzellen wie Neural Precursor Cells (NPCs) ist ein potenzieller therapeutischer Ansatz, mit dem die Neuroregeneration nach SCI verbessert werden soll. Durch den Zusatz von körperlichem Training zu einer solchen NPC-Transplantation könnten die Erholung verstärkt werden. In dieser Studie untersuchten wir deshalb die Kombination aus NPC-Transplantation und Laufbandtraining in einem Rattenmodell der zervikalen, traumatischen Rückenmarksverletzung, um den Einfluss des Trainings auf das Überleben und die Differenzierung der transplantierten NPCs sowie den Effekt der Kombinationsbehandlung auf sekundäre Verletzungsprozesse und die funktionelle Erholung zu evaluieren.

Methoden

In einem *in vitro* Teil der Studie wurde dafür aber zunächst die Proliferation und Differenzierung von NPCs unter Zusatz von verschiedenen Wachstumsfaktoren, welche für das spätere Überleben der Zellen im posttraumatischen Milieu essentiell sind, untersucht. Dazu wurden NPCs in Passage drei in folgende vier

Behandlungsgruppen unterteilt: Keine Wachstumsfaktoren (Gruppe 1); 10 ng / ml EGF + 10 ng / ml bFGF (Gruppe 2); 20 ng / ml EGF + 20 ng / ml bFGF (Gruppe 3); 20 ng / ml EGF + 20 ng / ml bFGF + 6 ng / ml PDGF-AA (Gruppe 4). Nach einer siebentägigen Kultivierung mit den Wachstumsfaktoren wurden die Zellen fixiert und ihre Proliferation und Differenzierung mittels immunhistochemischer (IHC) Färbungen analysiert, um so die bestmögliche Kombination und Konzentration von Wachstumsfaktoren für den *in vivo* Teil der Studie zu identifizieren. Für diesen Teil wurden dann insgesamt 70 weibliche Wistar-Ratten per Zufall in folgende vier Behandlungsgruppen eingeteilt: SCI + NPC-Transplantation + Laufbandtraining (Gruppe 1, n=20); SCI + NPC-Transplantation ohne Laufbandtraining (Gruppe 2, n=20); SCI + Vehikel-Transplantation ohne Laufbandtraining (Gruppe 3, n=20); Scheinoperation + Vehikel-Transplantation ohne Training (Gruppe 4, n=10). Dann wurde eine kompressions-/Kontusions Trauma mit einem 28g Aneurysma-Clip durchgeführt, welcher für eine Minute auf das freigelegte Rückenmark in Höhe C6 appliziert wurde. 10 Tage nach SCI wurde eine Suspension mit $4 \cdot 10^5$ NPCs oder Vehikel an vier Stellen, 2 mm sowohl rostral als auch kaudal der Läsion bilateral stereotaktisch in das Rückenmark injiziert. Während der gleichen Operation wurde eine osmotische Mikropumpe mit einem subdural gelegenen Katheter zur kontinuierlichen, intrathekalen Applikation von Wachstumsfaktoren, welche im *in vitro* Teil der Studie bestimmt worden waren, bei allen Tieren implantiert. 48 Stunden nach Transplantation der NPCs wurde das Laufbandtraining begonnen und zweimal täglich für 20 min bis zum Versuchsende fortgesetzt. Um die funktionelle Erholung zu beurteilen, wurden zudem wöchentlich der BBB Test, die Catwalk Ganganalyse sowie der Gridwalk Test als Neurotests durchgeführt. Eine Woche vor der Tötung wurde eine retrograde Fasermarkierung mit Fluorogold (FG) durchgeführt und das In-vivo-Experiment endete acht Wochen nach der NPC-Transplantation mit Perfusion der Tiere. Alle Tiere wurden acht Wochen nach SCI getötet und perfundiert, die Rückenmäcker wurden entnommen und fixiert. Es wurden dann 30 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und damit verschiedene immunohistochemische (IHC) Färbungen durchgeführt. Diese waren primär auf das Überleben und die

Differenzierung der transplantierten NPCs, Zystenbildung, Astrogliose, Fibrose und Myelinisierung fokussiert. Abschließend erfolgte eine statistische Analyse der ICH-Färbungen sowie der Ergebnisse der wöchentlichen Neurotests.

Ergebnisse:

Die Analyse des Zellkulturexperimente aus dem *in vitro* Teil der Studie ergab, dass eine Kombination und Konzentration von 20 ng / ml EGF + 20 ng / ml bFGF + 6 ng / ml PDGF-AA (Gruppe 4) die beste kombinierte Wirkung sowohl auf die NPC-Differenzierung als auch auf die Proliferation hatte. Daher wurde diese Kombination von Wachstumsfaktoren für den *in vivo* Teil der Studie verwendet. Die zervikale Kompressions-/Kontusions-SCI erforderte hierbei eine intensive Tierpflege und war mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden, was einerseits den Schweregrad der Verletzung widerspiegelte und andererseits zeigte, dass das Traumamodell für die Darstellung der klinischen Realität geeignet war. Die Analyse der wöchentlichen Neurotests bei den überlebenden Tieren zeigte folgende Ergebnisse: Durch den Zusatz von Laufbandtraining zur NPC-Transplantation zeigten Tiere in Gruppe 1 signifikant höhere BBB-Werte im Vergleich zu Tieren aus der Vehikel-Gruppe (Gruppe 3) sowie signifikant höhere BBB-Werte im Vergleich zu Tieren aus der NPC-Gruppe (Gruppe 2). Darüber hinaus zeigte die NPC + Training Gruppe acht Wochen nach SCI eine deutlich bessere Erholung der Catwalk-Ganganalyseparameter „regularity index“, „average speed“, „swing speed“, „base of support“ und „stride length“. Im Gridwalk-Test zeigten die Tiere der NPC + Training Gruppe acht Wochen nach SCI ebenfalls eine deutlich bessere Leistung in Form von weniger Trittfehlern im Vergleich zu nur mit Vehikel oder nur mit NPC behandelten Tieren. In der Analyse der verschiedenen IHC-Färbungen zeigte die NPC + Training Gruppe eine höhere Überlebensrate von transplantierten NPCs. Darüber hinaus zeigten Tiere in der NPC + Training Gruppe eine signifikant höhere NPC-Differenzierungsrate in reife und unreife Neuronen sowie reife Oligodendrozyten. Darüber hinaus zeigten Tiere in der NPC + Training Gruppe weniger Astrogliose und Fibrose des verletzten Rückenmarks. Durch den Zusatz von Laufbandtraining

verringerte sich zudem auch die Bildung einer zystischen Höhle im Läsionsepizentrum, was bei den entsprechenden Tieren zu einer höheren Rate von noch intaktem Nervengewebe im verletzten Bereich des Rückenmarks führte. Eine retrograde Fasermarkierung zeigte, dass in der NPC + -Trainingsgruppe deutlich mehr Rubrospinal-, Retikular- und Gesamtraktate erhalten oder regeneriert wurden. Schließlich wiesen die Tiere dieser Gruppe im verletzten Rückenmark auch deutlich mehr Myelinisierung oder Remyelinisierung auf.

Fazit:

Wir schließen daher, dass der Zusatz des Laufbandtrainings zur NPC-Transplantation eine nützliche Strategie bei der Behandlung von der zervikalen SCI ist. Der kombinierte Ansatz zeigt vorteilhafte Wirkungen auf die Erholung der allgemeinen motorischen Funktion, der sensorischen Funktion, der Belastung und der Koordination, während die NPC-Transplantation allein nur eine Tendenz der motorischen Funktion und der Erholung des Gewichts zeigt. Auf histologischer Ebene ist der Zusatz von Laufbandtraining acht Wochen nach SCI mit signifikant höheren RPC-Überlebensraten und Differenzierung in reife Nervenzellen verbunden. Nichtsdestotrotz verringert die Kombination aus NPC-Transplantation und Laufbandtraining die Bildung einer Zystenöhle im Läsionsepizentrum, wodurch nach einer Verletzung mehr Nervengewebe erhalten bleibt. Darüber hinaus reduziert die kombinierte Behandlung auch Astrogliose und Fibrose im verletzten Rückenmark. Diese und andere Änderungen können dazu führen, dass Motoneurone und Nervenbahnen, die bei den Tieren der NPC + Trainingsgruppe beobachtet werden, mehr verschont bleiben. Schließlich werden die Myelinisierungs- und Remyelinisierungsraten im verletzten Rückenmark durch die kombinierte Behandlung mit NPC-Transplantation und Laufbandtraining erhöht.

Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass ein solcher kombinierter Therapieansatz der NPC-Transplantation allein überlegen ist und unterstreichen die Bedeutung synergistischer Therapien bei der Behandlung der zervikalen SCI.