

Zusammenfassung

Hao Zhang

Dr.med.

Effects of sonic hedgehog on the survival and differentiation of transplanted neural precursor cells with implications for functional recovery after thoracic spinal cord injury in rats

Fach/Einrichtung: Neurochirurgie

Doktorvater: Prof. Dr.med. Klaus Zweckberger

Die traumatische Rückenmarksverletzung (SCI) ist ein schwerwiegendes Ereignis, welches durch seine verheerenden Folgen wie Lähmungen, sensorische Defizite und andere neurologische Störungen das Leben von betroffenen Patienten massiv beeinflusst. Leider existieren bislang kaum etablierte Behandlungsoptionen, um die schwerwiegenden Schäden im verletzten Rückenmark und damit die Funktion und Lebensqualität der Patienten zu verbessern. In den letzten Jahrzehnten wurden in präklinischen und sogar klinischen Studien deshalb verschiedene therapeutische Ansätze zur Behandlung der traumatischen Rückenmarksverletzung untersucht. Dabei wurde die Transplantation von neuronalen Stammzellen (NPCs) als ein potenziell vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Neuroregeneration im verletzten Rückenmark identifiziert, welcher jedoch bislang durch die geringe Überlebensrate und Differenzierung des Zelltransplantats begrenzt blieb. Aufgrund der Rolle des Neuropeptids Sonic Hedgehog (Shh) als "Hauptregulator" in der Embryogenese des ZNS stellten wir die Hypothese auf, dass eine zusätzliche Verabreichung von Shh die Transplantation von NPCs unterstützen und sowohl die histologische als auch die funktionelle Neuroregeneration nach SCI optimieren könnte.

In dieser Studie verteilten wir daher 37 weibliche Wistar-Ratten nach dem Zufallsprinzip auf fünf Behandlungsgruppen (Gruppe 1: SCI + Vehikelverabreichung

und Vehikeltransplantation (n=8); Gruppe 2: SCI + Shh-Verabreichung und Vehikeltransplantation (n=8); Gruppe 3: SCI + Vehikelverabreichung und NPC-Transplantation (n=8); Gruppe 4: SCI + Shh-Verabreichung und NPC-Transplantation (n=8); und Gruppe 5: Scheinoperation + Scheinverabreichung und Scheintransplantation (n=5)). Für SCI wurde ein realitätsnahes Kompressions-/Kontusionsmodell mit einem 29 g Aneurysmenclip im thorakalen Rückenmark auf der Höhe Th9/Th10 verwendet. Die intramedulläre Transplantation von 4×10^5 NPCs, generiert aus mit GFP-transfizierten Ratten-Embryos (E14), oder einer Vehikellösung (Zellkulturmedium) wurde sieben Tage nach SCI mit einem stereotaktischen System durchgeführt. Während des gleichen Eingriffs wurde eine osmotische Medikamentenpumpe implantiert und darüber die 7-tägige Verabreichung von Shh oder Vehikel (NaCl) in den intrathekalen Raum direkt über dem Läsionsepizentrum begonnen. In den folgenden Wochen wurden die CatWalk-Ganganalyse, der BBB Offenfeld Test und der Gridwalk-Test durchgeführt, um die funktionelle Erholung zu evaluieren. Sechs Wochen nach SCI wurden schließlich alle Tiere geopfert und perfundiert, die Rückenmäcker wurden entfernt, fixiert und es wurden Gefrierschnitte ($30\mu\text{m}$) angefertigt. Zur Beurteilung von Überleben- und Differenzierung der transplantierten NPCs sowie der sekundären Verletzungsprozesse im Rückenmark wurden verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen, gefolgte von konfokalmikroskopischen Bildanalysen durchgeführt. Die histologischen und funktionellen Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und zwischen den Versuchsgruppen verglichen ($p > 0.05$ wurde als signifikant gewertet).

Wir konnten eine signifikant höhere Überlebensrate transplantiertes NPCs in Kombination mit einer signifikant erhöhten Rate undifferenziert überlebender NPCs in der Shh+NPC-Gruppe im Vergleich zur NPC-Gruppe nachweisen. Darüber hinaus war die Differenzierung sowohl in adulte Neuronen als auch in adulte Oligodendrozyten ebenfalls signifikant erhöht, wenn die Shh-Gabe zur NPC-Transplantation hinzugefügt wurde. Des weiteren zeigten die Tiere in der Shh+NPC-

Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Vehikeltieren eine signifikante Reduktion der Invasion von Makrophagen und von T-Lymphozyten in das Rückenmark. Auch die proinflammatorische M1-Makrophagenaktivierung war signifikant reduziert, während die antiinflammatorische M2-Makrophagenaktivierung signifikant erhöht war. Ferner konnten bei Tieren mit der kombinierten Behandlung sechs Wochen nach SCI signifikant weniger apoptotische Zellen, signifikant weniger reaktive Astroglie und kleinere posttraumatische Zysten im verletzten Rückenmark beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die intramedulläre Myelinisierung in der Shh+NPC-Gruppe im Vergleich zur Vehikelgruppe signifikant erhöht. Vor allem aber zeigte sich die funktionelle Erholung nach SCI, gemessen am BBB Offenfeld Test und am Gridwalk-Test mit signifikant mehr Punkten bzw. signifikant weniger Trittfehlern in den Tieren mit der Kombinationsbehandlung deutlich verbessert. Eine signifikant verbesserte lokomotorische Funktion nach der Therapie mit Shh+NPCs ließ sich auch in der objektiven CatWalk-Ganganalyse in mehreren Parametern, einschließlich Schwunggeschwindigkeit, Schrittlänge und mittlere Intensität der Hinterpfoten, sechs Wochen nach SCI bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die zusätzliche Verabreichung von Shh in den intrathekalen Raum in unmittelbarer Nähe der transplantierten NPCs ihre Überlebensrate in unserer Studie drastisch verbesserte und ihre Differenzierung in Neurone und Oligodendrozyten deutlich erhöhte. Darüber hinaus konnten mit diesem kombinierten Behandlungsansatz fast alle sekundären Verletzungsprozesse, die in dieser Studie untersucht wurden, einschließlich der Entzündungsreaktion, der reaktiven Astroglie oder der Myelinisierung signifikant verbessert werden. Am wichtigsten ist jedoch, dass auch die funktionelle Erholung sechs Wochen nach der thorakalen SCI eine Verbesserung zeigte. Unsere Studie unterstreicht daher die Bedeutung von synergistischen Therapien bei der Behandlung der SCI und deutet darauf hin, dass die Verabreichung von Shh als Ergänzung zur Stammzelltransplantation eine wichtige Rolle spielen könnte.