

Aus dem Department für Experimentelle und  
Klinische Pharmakologie und Toxikologie der  
Universität Tübingen  
Abteilung Klinische Pharmakologie

Proliferation, Überleben und Einfluss auf die dopaminerge  
Aktivität von intranasal applizierten mesenchymalen  
Stammzellen in einem 6-Hydroxydopamin-Rattenmodell der  
Parkinson-Krankheit

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Schaumann, Felix Tobias

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Kahle

Tag der Disputation: 06.04.2018

## Widmung

Für meine Familie. Für die Unterstützung und die Geduld.

# Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1 Parkinson-Krankheit.....	8
1.2 Stammzellen .....	14
1.3 ZNS-Stammzellapplikation.....	19
1.3.1 Chirurgische Stammzellentransplantation.....	19
1.3.2 Systemische Stammzellapplikation über das Gefäßsystem.....	19
1.3.3 Die intranasale Applikation .....	20
1.3.4 Die transnasale Migrationsroute .....	22
1.4 Zielsetzung der Studie.....	25
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1 Chemikalien und Geräte .....	26
2.2 Stammzellengewinnung.....	28
2.2.1 EGFP-Agouti-Ratten-Anzucht zur EGFP-MSK Gewinnung.....	28
2.2.2 Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.....	29
2.3 Versuchstiere .....	30
2.4 Das 6-Hydroxydopamin-induzierte Morbus Parkinson Modell .....	30
2.4.1 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) .....	30
2.4.2 6-Hydroxydopamin Läsion (Läsion der dopaminergen Neuronen).....	32
2.5 Intranasale Zellapplikation.....	33
2.6 Radioaktive Markierung der MSC.....	33
2.7 Verteilung der INA-MSK im ZNS.....	34
2.8 Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	35
2.8.1 Zellzahlbestimmung .....	35
2.8.2 TH-, Beta-Tubulin III-, PCNA- und SMAA-Anfärbung .....	35
2.8.3 TUNEL-Anfärbung .....	36
2.9 Statistische Auswertung.....	37
<b>3 Ergebnisteil</b> .....	<b>38</b>
3.1 MSK-Biodistribution nach intranasaler Applikation.....	38
3.1.1 Organverteilung .....	38
3.1.2 Biodistribution der INA-MSK innerhalb des ZNS.....	39
3.2 Läsionsgerichte Anreicherung der INA-MSK im Gehirn .....	41
3.2.1 Läsionsgerichte Anreicherung im Empfängergewebe .....	41
3.2.2 Lokalisation von MSK in der Nähe von Nervenfasern und Gefäßen .....	42
3.3 Differenzierung und Proliferation der INA-MSK.....	45
3.3.1 Differenzierung der INA-MSK.....	45
3.3.2 Bildung von Ausläufern als Zeichen der Integration und Differenzierung.....	45

3.3.2.1	Seitenvergleich der “Ausläufer-bildenden” MSC in ausgewählten Hirnstrukturen .....	46
3.3.2.2	Verteilung der Ausläufer-bildenden MSC in der lädierten Hirnseite.....	48
3.3.3	Proliferation der intranasal applizierten mesenchymalen Stammzellen im Empfängergewebe .....	49
3.4	Therapeutischer Einfluss auf die dopaminerge Aktivität.....	51
3.4.1	Tyrosinhydroxylase-Expression nach intranasaler Applikation von mesenchymalen Stammzellen.....	51
3.4.2	Vergleich der Tyrosinhydroxylase positiven MSC .....	53
3.4.3	Dopaminerge Aktivität im Empfängergewebe .....	55
3.4.4	Apoptose der Empfängergewebezellen .....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1	Migrationsrouten und Biodistribution der INA-MSC .....	59
4.2	Läsionsgerichtete Anreicherung der INA-MSC.....	61
4.3	Differenzierung, Proliferation der INA-MSC im Empfängergewebe.....	62
4.4	Therapeutischer Einfluss der INA-MSC auf das 6-OHDA lädierte Empfängergewebe .....	63
4.5	Weitere Effekte der INA-MSC im 6 OHDA-Rattenmodell.....	65
4.5.1	Anti-inflammatorische Wirkung der INA-MSC .....	65
4.5.2	Klinischer Effekt der INA-MSC.....	65
4.6	INA-MSC bei neurodegenerativen Erkrankungen .....	69
4.6.1	Vorteile der intranasalen Applikation .....	69
4.6.2	Vorteile der mesenchymalen Stammzellen.....	69
4.6.3	Sicherheit der intranasalen Applikation.....	69
4.7	Kontroverse Ergebnisse zu INA-MSC im Parkinsonmodell.....	70
4.8	Dopaminerges Zellersatz beim Menschen.....	71
4.9	Intranasale Applikation in weiteren Studienmodellen.....	72
4.10	Fazit .....	74
5	Zusammenfassung (Abstract).....	75
6	Literaturverzeichnis .....	76
7	Eidesstattliche Versicherung .....	87
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	88
9	Danksagung .....	89

## I Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AK	Antikörper
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonucleic acid
dUTP	2-Desoxyuridin-5`-triphospat
ESC	embryonale Stammzellen
FCS	fötales Kälberserum
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
IGF	Insulin-like growth factor
INA-MSC	intranasal applizierte MSC
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin
MSC	mesenchymale Stammzellen
NSC	neurale Stammzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
SMAA	Smooth muscle alpha actin
TDT	Terminale desoxynukleotidyl Transferase
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrose-Faktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP biotin nick end labeling
ZNS	Zentrales Nervensystem

## II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Therapeutische Ansätze zur Hemmung enzymatischer Ab- und Umbauprozesse mit dem Ziel der Erhöhung des synaptisch verfügbaren Dopamins
- Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Rattenschädels mit den Verteilungsrouten der MSC nach intranasaler Applikation.
- Abbildung 3: Potentielle Zellroute für intranasal applizierte Stammzellen beim Menschen
- Abbildung 4: Organverteilung der mit 3H-Thymidin markierten mesenchymalen Stammzellen
- Abbildung 5: Verteilung der mit 3H-Thymidin markierten mesenchymalen Stammzellen im ZNS
- Abbildung 6: Verteilung der EGFP-MSK in den seitengetrenten Hirnarealen
- Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-Ratte, 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von MSC mit beta tubulin III Anfärbung
- Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-Ratte, 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von MSC mit SMAA Anfärbung
- Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-Ratte, 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von MSC TH und Tubulin beta III
- Abbildung 10: Verteilung der Ausläufer-zeigenden („process-bearing“) MSC
- Abbildung 11: Verteilung der Ausläufer-zeigenden („process-bearing“) in der lädierten Hirnseite
- Abbildung 12: Expression von Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in INA-MSK
- Abbildung 13: Verteilung der für PCNA und EGFP doppelt positiven Zellen
- Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Striatums
- Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Substantia nigra
- Abbildung 16: Anzahl der TH positiven (TH+) und TH negativen (TH-) EGFP-MSK pro mm<sup>2</sup> 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von 3 x 10<sup>5</sup> MSC in der ipsilateralen, lädierten Substantia nigra (SN) und in der kontralateralen SN
- Abbildung 17: Vergleich der TH-positiven Fläche (mm<sup>2</sup>) im ipsi- sowie kontralateralen Striatum der MSC-Gruppe (weiße Balken) und der Kontrollgruppe (graue Balken)
- Abbildung 18: Vergleich der TH-positiven Zellen (pro mm<sup>2</sup>) im ipsi- sowie kontralateralen Striatum der MSC-Gruppe (weiße Balken) und der Kontrollgruppe (graue Balken)
- Abbildung 19: Vergleich der TUNEL-positiven Zellen (pro mm<sup>2</sup>) im ipsi- sowie kontralateralen Striatum (graue Balken) und in der Substantia nigra (graue Balken) in der MSC- (Zell) und Kontrollgruppe (KtrII)

# **1 Einleitung**

## **1.1 Parkinson-Krankheit**

### **Relevanz der Parkinson-Krankheit für die Forschung**

Die Parkinson-Krankheit ist neben dem Morbus Alzheimer die wohl bekannteste neurodegenerative Erkrankung weltweit. Neurodegenerative Erkrankungen sind durch eine progrediente Degeneration von Neuronen im zentralen Nervensystem (ZNS) gekennzeichnet. Je nach Art und Funktion der betroffenen Areale führt dies zu unterschiedlichen neurologischen und funktionellen Defiziten.

In Deutschland geht man aktuell von 250.000 bis 400.000 Parkinsonpatienten aus (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Die Prävalenz steigt mit dem Alter und beträgt in Deutschland ab 65 Jahren 1,8 % (Mollenhauer et al., 2010) und ab 85 Jahren 2,2 % (Mutch et al., 1986) der Allgemeinbevölkerung.

Aufgrund der steigenden Lebenserwartung und des demographischen Wandels wird mit einer Verdopplung der Inzidenz in Deutschland bis 2050 gerechnet (Bickel, 2001).

### **Parkinson-Definition**

Die Parkinson-Krankheit wird in die primäre Form, das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), sowie die sekundäre Form unterteilt (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Das Durchschnittsalter bei Beginn der symptomatischen Phase liegt zwischen 50 und 60 Jahren (s. Übersichtsartikel Tanner and Goldman, 1996).

Es gibt vier kennzeichnende Kardinalsymptome des IPS:

- Bei der „Bradykinese“ handelt es sich um die Verlangsamung der Willkürbewegung mit einer progressiven Abnahme der Geschwindigkeit bei repetitiven Aktionen. Dazu zählen auch Frühsymptome wie die Hypomimie und die Mikrographie (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

- Als „Rigor“ wird die Muskelstarre durch eine generalisierte Erhöhung des Muskeltonus definiert. Er tritt meist in Form des Zahnradphänomens auf (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).
- Der „Tremor“ zeigt sich in der Regel als Ruhetremor mit unilateralem Beginn, niedriger Frequenz und kleiner Amplitude. Es folgt eine Ausbreitung auf weitere Extremitäten und ein zusätzlicher Haltetremor, der im Verlauf zur „posturalen Instabilität“, einer unzureichenden Stabilität beim aufrechten Stand führt (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).
- Des Weiteren kann es zu Riechstörungen, zu einer Sialorrhoe (Pseudohypersalivation) durch vermindertes Schlucken sowie zu kognitiven (Demenz) und psychischen Störungen (Depression) kommen (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Als klinisch gesichert gilt die Diagnose des IPS nach Ausschluss einer symptomatischen Genese, bei dem Auftreten einer Bradykinese mit drei weiteren parkinsontypischen Kriterien, einem progressiven klinischen Verlauf oder bei klinischem Ansprechen auf die Gabe von L-3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin (L-DOPA) (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

### **Das dopaminerge System und die neurochemischen Vorgänge bei der Parkinson-Krankheit**

Die Basalganglien setzen sich anatomisch aus dem Striatum, der Substantia nigra und dem Globus pallidus (Globus pallidus externus und dem Globus pallidus internus) zusammen. Das Striatum ist dabei nach seinem embryologischen Ursprung in das Putamen, den Nucleus caudatus und das ventrale Striatum, inklusive des Nucleus accumbens (im Rattenmodell: Caudate putamen unit, kurz CPU), untergliedert. Die Substantia nigra setzt sich aus der Substantia nigra pars compacta, der Substantia nigra pars reticulata und dem Nucleus subthalamicus zusammen (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Die Basalganglien haben neben feinmotorischen Funktionen auch eine zentrale Bedeutung für Kognition, Emotionen und Affekt (Schmidt, 2000).

In den Kernkomplexen modulieren Neurotransmitter, vor allem Dopamin und Acetylcholin, die Intensität der durch  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ausgelösten Hemmung auf die motorische Exzitation (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Die Synthese des Neurotransmitters Dopamin erfolgt dabei aus der Aminosäure Tyrosin über mehrere Schritte. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktionskette ist die Umwandlung von Tyrosin in Levodopa mit Hilfe des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Im Wesentlichen gibt es drei dopaminerge Systeme, welche grundlegende zerebrale Funktionen steuern (s. Übersichtsartikel Girault and Greengard, 2004).

- Das nigro-striatale System, mit Projektion der dopaminergen Neuronen von der Substantia nigra pars compacta zum Striatum, ist vor allem an der Kontrolle willkürlicher Bewegung beteiligt. Dieses System ist bei der Parkinson-Krankheit am stärksten betroffen (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).
- Beim mesolimbischen System innervieren dopaminerge Neuronen von der Area tegmentalis ventralis die mesolimbischen Regionen (Nucleus accumbens, Corpus amygdaloideum und Nucleus septi lateralis) oder die mesokortikalen Regionen (Gyrus cinguli, frontaler und entorhinaler Cortex). Dieses System spielt bei der Kontrolle motivationsbedingter Verhaltens-, Lern- und Gedächtnisfunktionen eine entscheidende Rolle (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).
- Im tubero-infundibulären System projizieren Neurone vom Nucleus arcuatus in den Hypothalamus und regulieren dort die Freisetzung von hypophysären Hormonen (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Die Parkinson-Krankheit ist durch eine fortschreitende Degeneration der nigro-striatalen, dopaminergen Neuronen charakterisiert. Mit einer massiven Regression des Dopamin-Gehalts im Striatum kommt es auch zu einer

einhergehenden Senkung der Aktivität der TH und der DOPA-Decarboxylase (Riederer et al., 1978).

Dabei treten die typischen klinischen Symptome erst bei einer Reduktion der ursprünglichen Dopamin-Konzentration um 50–70 % auf (Bernheimer et al., 1973). Kompensiert werden die symptomatischen Defizite bis zu einer Degeneration von zwei Dritteln der Neuronen (Plastizität). Dies geschieht durch eine erhöhte Dopamin-Synthese der verbleibenden Neuronen (Rausch et al., 1988) sowie durch eine erhöhte postsynaptische Dopamin-(D1-)Rezeptordichte der verbliebenen Neuronen im Striatum (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Auch noradrenerge Neurone, vor allem im Locus coeruleus, degenerieren bei der Parkinson-Krankheit (Jellinger et al., 1991). Dieser Verlust ist für die dementielle und depressive Symptomatik verantwortlich (Gerlach et al., 1994).

### **Hypothesen zur Pathogenese der Parkinson-Krankheit**

Die exakte Pathogenese der Parkinson-Krankheit ist bisher nicht abschließend geklärt. Derzeit existieren verschiedene Hypothesen dazu (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Danach kann die Schädigung der dopaminergen Neuronen durch die Veränderung des Ionen-Milieus im Rahmen des zellulären Alterungsprozesses verursacht werden (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Aber auch oxidative Effekte durch reaktive Sauerstoffspezies, freie Radikale oder Redox-Gleichgewichtsveränderungen können zur dopaminergen Neuronendegeneration und damit zur Krankheitsausprägung beitragen (s. Übersichtsartikel Fearnley and Lees, 1991) (s. Übersichtsartikel Sies, 1991) (Saporito et al., 1999).

Bisher kennt man auch verschiedene Genloci, die mit der Erkrankung korrelieren, und es werden immer weitere entdeckt. So tritt beispielsweise bei der familiären Parkinson-Krankheit Typ 1 (PARK1) eine Mutation im  $\alpha$ -Synuclein-Gen auf, welche zur Ausprägung der Erkrankung führt (Polymeropoulos et al., 1997). Außerdem zeigen Verwandte von IPS-Patienten

ein doppelt so hohes Erkrankungsrisiko wie die Allgemeinbevölkerung (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Wie auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen kommt es bei der Parkinson-Erkrankung zu einer abnormalen Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen. Die Überforderung des Ubiquitin-Proteasom-Wegs, welcher die fehlgefalteten Proteine abbaut, führt zur Entstehung von  $\alpha$ -Synuclein-enthaltenden Einschluss-Körperchen, die selektiv Neuronen schädigen (Kruger et al., 2002).

### **Medikamentöse Therapieansätze des IPS**

Der aktuelle medikamentöse Goldstandard in der IPS-Therapie ist die Gabe der natürlichen Aminosäure L-DOPA. Dies ist ein Vorläufermetabolit der Dopamin-Biosynthese. Im Gegensatz zu Dopamin ist es L-DOPA möglich die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und damit in das ZNS zu gelangen. Durch die DOPA-Decarboxylase wird L-DOPA sowohl im ZNS als auch in der Peripherie zu Dopamin decarboxyliert. Zur Vermeidung von unerwünschten peripheren Nebenwirkungen wird oral appliziertes L-DOPA daher zumeist mit einem peripher wirksamen DOPA-Decarboxylase-Hemmer wie Benserazid oder Carbidopa kombiniert (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Unter der Langzeittherapie mit L-DOPA kann es zu Nebenwirkungen wie Dyskinesien, motorischen Fluktuationen („on-off“ Phänomene) sowie psychischen Nebenwirkungen wie Halluzinationen und Verwirrheitszuständen kommen (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). In einer Studie entwickelten 45 % der Patienten innerhalb der ersten fünf Therapiejahre Dyskinesien, nach 15 Jahren waren es bereits 88 % (Cedarbaum and Olanow, 1991).

Bei therapieresistentem Tremor und bei Fluktuationen werden auch zusätzlich Anticholinergika eingesetzt (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Man geht davon aus, dass sie einer funktionellen Dominanz cholinergischer Interneuronen im Striatum, welche sich aufgrund des Verlustes dopaminerger Neuronen entwickelt, entgegenwirken (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

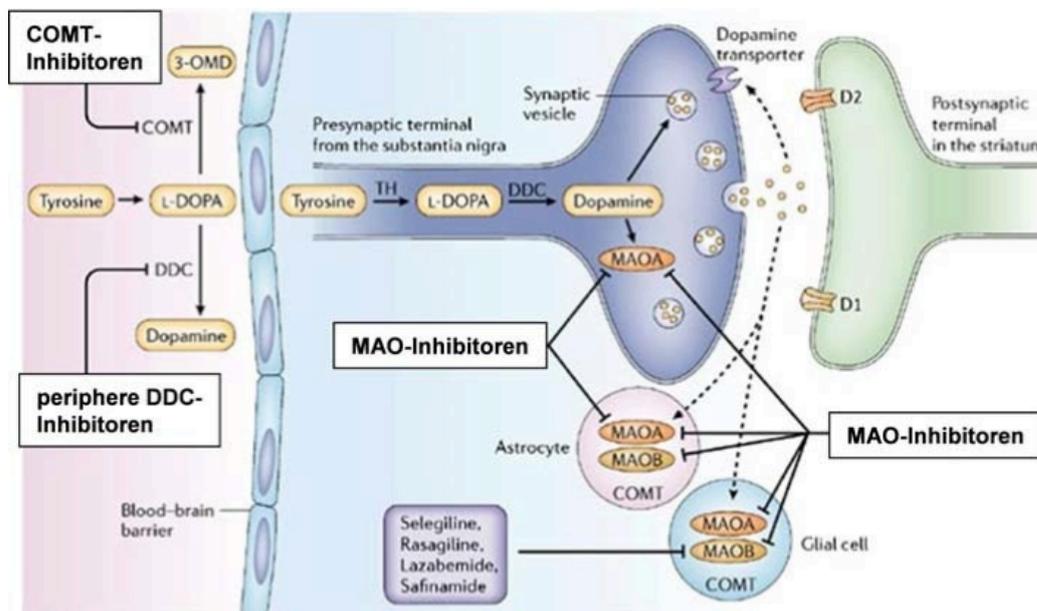
Unterstützend zur L-DOPA-Therapie kommen Catechol-O-Methyltransferase-(COMT-)Hemmer zum Einsatz, welche das periphere (Entacapon) oder

zusätzlich das zentrale (Tolacapon) Enzym hemmen. Dadurch wird die Akkumulation von schädlichen Metaboliten verringert und die Effektivität von oral appliziertem L-DOPA erhöht (Gerlach et al., 2004).

Die Dopamin-Rezeptor-Agonisten wirken an den D1- und D2-Rezeptoren im Striatum und werden bereits in der Frühphase der Erkrankung eingesetzt (Gerlach et al., 2003).

Durch die hauptsächlich spät im Krankheitsverlauf und in Kombination mit L-DOPA verwendeten Monoaminoxidase-B-Hemmer wird der Abbau von Dopamin im synaptischen Spalt verzögert (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007).

Die anti-glutaminerg wirkenden N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-)Rezeptor-Antagonisten reduzieren das bei der Parkinson-Krankheit auftretende Ungleichgewicht zwischen Glutamat und Dopamin. Die Hemmstoffe werden vor allem im Anfangsstadium und später in Kombination mit L-DOPA appliziert (s. Übersichtsartikel Muller, 2012). In Abbildung 1 sind die Wirkprinzipien der aktuellen medikamentösen Therapie schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Therapeutische Ansätze zur Hemmung enzymatischer Ab- und Umbauprozesse mit dem Ziel der Erhöhung des synaptisch verfügbaren Dopamins (Youdim et al. 2006). COMT = Catechol-O-Methyltransferase, DDC = DOPA-Decarboxylase, MAO = Monoaminoxidase, TH = Tyrosinhydroxylase**

Bei dem Versagen konservativer Therapien kommen als Ultima Ratio chirurgische Verfahren wie Thermokoagulation, Pallidotomie oder Thalamotomie zum Einsatz. Der Wirkmechanismus dieser Methoden basiert auf der Inaktivierung der erhöhten neuronalen Evozierbarkeit der betroffenen Areale (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Neben diesen destruktiven Methoden gibt es die Neurostimulation, bei der über eine Hochfrequenzstimulation eine neurophysiologische Depolarisation und damit die Inhibierung eines Kerngebietes erzielt wird (Benabid et al., 1996).

Die aktuelle Parkinson-Therapie wirkt jedoch ausschließlich symptomatisch und versucht den Dopamin-Verlust zu kompensieren oder dessen systemische Auswirkungen zu reduzieren. Die Therapien sind nicht in der Lage die Progression der Erkrankung oder den letalen Verlauf zu verhindern. In vielen Fällen reicht die medikamentöse Therapie nicht aus, um ein beschwerdefreies Leben zu führen, wozu die erheblichen Nebenwirkungen der einzelnen Medikamente beitragen.

## **1.2 Stammzellen**

Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich kontinuierlich selbst zu reproduzieren und je nach Stadium in verschiedene Zellarten zu differenzieren.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen zielt eine Stammzelltherapie mit embryonalen Stammzellen (ESC), induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC), neuralen Stammzellen (NSC) oder mesenchymalen Stammzellen (MSC) unter anderem darauf ab die degenerierten Zellen zu ersetzen (s. Übersichtsartikel Kim et al., 2013). Das Potential solcher Stammzellen, sich in Neuronen und Gliazellen zu differenzieren (s. Übersichtsartikel Kim et al., 2013), bildet die Basis vielversprechender neuer Therapieansätze und wird im Folgenden auszugsweise vorgestellt.

## **Embryonale Stammzellen (ESC)**

Pluripotente embryonale Stammzellen (ESC) werden aus embryonalem Zellgewebe gewonnen. Die Verwendung von humanen ESC ist daher ethisch sehr umstritten. ESC können sich in nahezu alle Zellreihen differenzieren, besitzen im Vergleich zu weiter ausdifferenzierten Stammzellen aber auch eine höhere Entartungstendenz (Thomson and Marshall, 1998).

ESC wurden schon mehrfach in experimentellen Modellen der Parkinson-Krankheit eingesetzt. So konnten aus Mäusen gewonnene ESC in vitro nach Behandlung mit Fibroblast growth factor 8 (FGF-8) erfolgreich in NSC und funktionelle dopaminerge Neurone differenzieren (Kim et al., 2002). Auch humane ESC sind nach einer In-vitro-Studie in der Lage sich in dopaminerge Neurone zu differenzieren (Park et al., 2005). Kultivierte ESC und MSC aus Primaten entwickelten sich nach chirurgischer Transplantation in einem Primatenmodell für die Parkinson-Krankheit, zumindest phänotypisch, zu dopaminergen Neuronen und verbesserten klinisch die parkinsontypischen neurologischen Ausfälle (Takagi et al., 2005). In vitro differenzierte NSC aus humanen, fetalen Hirnzellen zeigten, ebenfalls in einem Primatenmodell, nach direkter Implantation in das Striatum einen positiven therapeutischen Effekt auf die krankheitsbedingten, klinischen Defizite (Redmond et al., 2008).

In einem weiteren Parkinsonrattenmodell wurden aus humanen ESC differenzierte, dopaminerge Neuronen chirurgisch in das Striatum transplantiert. Einige Wochen nach der Transplantation zeigte sich eine signifikante klinische Verbesserung der parkinsontypischen Defizite in der Behandlungsgruppe (Kriks et al., 2011).

Neben Tiermodellen wurden ESC auch schon beim Menschen eingesetzt. So wurden in einer Studie aus humanen ESC striatale Neuroblasten differenziert. Diese wurden dann bei fünf Patienten, welche an Morbus Huntington erkrankt sind, in das rechte Striatum implantiert. Ein Jahr nach dem Eingriff verbesserten sich die motorischen und kognitiven Fähigkeiten dieser Patienten. Auch zeigte sich via PET-Scan eine deutlich höhere metabolische Aktivität im Bereich der zuvor metabolisch reduzierten Areale (Bachoud-Levi et al., 2000).

Neben den vielversprechenden Studienergebnissen gibt es auch Bedenken. So werden humane ESC aus menschlichen Embryonen im 8-Zell-Stadium gewonnen. Dies ist in Deutschland gesetzlich verboten und wird auch weltweit immer wieder ethisch in Frage gestellt. Aufgrund der Pluripotenz können sich an der Implantationsstelle vor allem Teratome entwickeln (Erdo et al., 2003, s. Übersichtsartikel Sharpe et al., 2012).

### **Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)**

Die iPS in der Parkinsontherapie werden aus adulten, somatischen Geweben (z. B. Fibroblasten aus Bindegewebe) durch Induktion embryonaler Gene gewonnen (s. Übersichtsartikel Takahashi, 2013). Durch eine induzierte Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren können sich Fibroblasten unter anderem zu Neuronen differenzieren, die in der Lage sind neuronale Aktionspotentiale und neuronenspezifische Proteine zu generieren. Damit stellen diese Zellen funktionelle Neuronen dar (Pang et al., 2011).

In einer Studie konnten Fibroblasten durch die induzierte Expression von fünf verschiedenen Transkriptionsfaktoren in dopaminerge Neurone differenziert werden (Liu et al., 2012). Ein großer Vorteil der iPS besteht in der Möglichkeit autologe und weit ausdifferenzierte Gewebezellen zu ihrer Gewinnung zu verwenden.

Auf dem Gebiet der Parkinson-Therapie konnten bisher aus Fibroblasten induzierte dopaminerge Neurone erfolgreich in ein Rattenmodell transplantiert werden (Wernig et al., 2008). Die transplantierten Tiere zeigten auch hier eine klinische Verbesserung ihrer parkinsontypischen Symptomatik (Wernig et al., 2008).

Eine Herausforderung zur verlässlichen Anwendung scheint jedoch die schwierige, reproduzierbare In-vitro-Umdifferenzierung von ausdifferenzierten Gewebezellen in dopaminerge Neurone zu sein (s. Übersichtsartikel Kim et al., 2013). Außerdem besteht in vivo auch bei iPS ein Risiko zur Entwicklung eines Teratoms (s. Übersichtsartikel Kim et al., 2013).

### **Neurale Stammzellen (NSC)**

NSC finden sich neben der Embryonalphase von Säugetieren auch im Gehirn von ausgewachsenen (adulten) Individuen. Sie besitzen die Fähigkeit sich in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren (Flax et al., 1998). Menschliche NSC können dabei spezifische Neurotransmitter zur Signaltransduktion produzieren. Auch schützen sie durch die Synthese neurotropher Faktoren sich selbst und andere Neurone und unterstützen das neuronale Wachstum (Kim, 2004).

In einem Rattenmodell der Parkinson-Krankheit wurden NSC, welche aus anderen Ratten der gleichen Gattung gewonnen wurden, chirurgisch in das Striatum transplantiert. Nach einiger Zeit zeigte sich bei den operierten Ratten eine funktionale, klinische Verbesserung der krankheitsbedingten motorischen Defizite (Yasuhara et al., 2006).

In einem weiteren Parkinsonrattenmodell wurden NSC aus dem ZNS von Mäusen gewonnen und mit dem TH-Gen (GTPCH-1) transfiziert. Nach intrastriateller Implantation zeigte sich auch hier eine Verbesserung der motorischen Defizite bei den behandelten Ratten (Ryu et al., 2005).

Bei der Suche nach neuen Therapieansätzen für Morbus Huntington wurden NSC in einem Rattenmodell präventiv, d. h. vor Läsion der Rattenhirne, in das Striatum implantiert. Dort bewirkten sie eine Verzögerung und Abschwächung des Krankheitsverlaufes (Ryu et al., 2004).

Auch in einem Rattenmodell der Amyotrophen Lateralsklerose konnten aus fetalem Rückenmark isolierte NSC nach zerebraler Transplantation den Progress der Erkrankung verzögern (Xu et al., 2006).

### **Mesenchymale Stammzellen (MSC)**

MSC zählen zu den adulten Stammzellen und entwickeln sich aus dem Mesoderm (Prockop, 1997). In der Therapie neurodegenerativer Stammzellen werden vor allem MSC aus dem Knochenmark (engl. bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) verwendet. Im Vergleich zu ESC sind MSC in ihrer Differenzierungsfähigkeit eingeschränkter. Sie können jedoch ohne

ethische Bedenken sowohl allogen (vom Knochenmarkspender) als auch autolog (Spender = Empfänger) gewonnen werden.

Im adulten Organismus tragen MSC zur Regeneration des Binde- und Stützgewebes bei. Sie können dabei in verschiedene mesodermale Zelltypen wie Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten differenzieren (Pittenger et al., 1999). Ihr Differenzierungspotential geht aber auch über ihre ursprünglichen Differenzierungsgrenzen hinaus (s. Übersichtsartikel Korbiling and Estrov, 2003). Beispielsweise können sich aus MSC funktionelle Kardiomyozyten entwickeln (Makino et al., 1999), deren kardiomyozytische Funktionsfähigkeit aber kontrovers diskutiert wird (Siegel et al., 2012).

Das Differenzierungspotential der MSC überschreitet sogar Keimblattgrenzen. Sie können sich in ektodermale (z. B. Epithelzellen) oder endodermale Zellen differenzieren (Harris et al., 2004). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass MSC durch spezifische Zytokin-Ausschüttung zur Unterstützung der Gefäßneubildung und -reparatur beitragen sowie bei Entzündungen und Immunreaktion eine Rolle spielen (s. Übersichtsartikel Barry and Murphy, 2004).

Dass sich MSC sogar in funktionelle, neuronartige Zellen differenzieren können, wurde *in vitro* bei MSC von adulten Ratten (Woodbury et al., 2000) (Dezawa et al., 2004) (Liu et al., 2015) sowie bei MSC aus menschlichen periapikalen Zysten (Marrelli et al., 2015) gezeigt. MSC sind auch in der Lage neuroprotektive Faktoren wie Neurotrophin oder den Glia-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) zu produzieren (Sadan et al., 2009). Die weiterführende Rolle von MSC im Rahmen innovativer Therapiestrategien für Parkinson und andere neurodegenerative Erkrankungen wird in der Diskussion genauer dargelegt.

## **1.3 ZNS-Stammzellapplikation**

### **1.3.1 Chirurgische Stammzellentransplantation**

Die chirurgische Transplantation von therapeutisch wirksamen Zellen in das Gehirn ist möglich, birgt jedoch methodisch bedingt ein hohes Potential für Komplikationen (s. Übersichtsartikel Sinden et al., 1992). Durch den chirurgischen Eingriff kommt es zu einer direkten Gewebsschädigung und in Folge möglicherweise zu Entzündungen, zerebralen Ödemen und einer reaktiven Gliose (Finsen et al., 1991) (Perry and Teeling, 2013). Daneben gibt es potentielle weitere Probleme, wie die Abstoßung des transplantierten Spendergewebes aufgrund von immunologischen Abwehrreaktionen (s. Übersichtsartikel Sinden et al., 1992) (Kozłowska et al., 2007) oder eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit des Transplantats durch die methodisch bedingten Traumata (Shindo et al., 2006).

Ein frühes Absterben von chirurgisch transplantierten therapeutischen Zellen wurde sowohl bei an Morbus Parkinson erkrankten Menschen (Helt et al., 2001) als auch bei gesunden Ratten belegt (Coyne et al., 2007). Das Verfahren scheint daher zur repetitiven Applikation von therapeutischen Stammzellen bei neurogenerativen Erkrankungen, wie die Parkinson-Krankheit, nicht ideal zu sein.

### **1.3.2 Systemische Stammzellapplikation über das Gefäßsystem**

Eine Alternative zu der chirurgischen Applikation ist die systemische Applikation über das Blutgefäßsystem. Um in das ZNS zu gelangen, müssen Therapeutika nach Applikation in den Blutkreislauf, dazu jedoch die natürliche Barriere der Blut-Hirn-Schranke überwinden. Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Blutbahnverengung durch mit Tight Junctions eng verbundenen Endothelzellen der Hirnkapillaren sowie der Basalmembran, Astrozyten und Perizyten (s. Übersichtsartikel Zlokovic, 2008). Sie bildet damit eine mechanische Barriere für große Moleküle zwischen dem ZNS und dem peripheren Blutkreislauf. Viele

potentiell im ZNS therapeutisch wirksame Zellen sind zu groß, um diese natürliche Barriere (Blut-Hirn-Schranke) zu passieren. Ob ein Durchtritt dieser Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke dennoch möglich ist, wird kontrovers diskutiert (Meyerrose et al., 2007) (s. Übersichtsartikel Jiang et al., 2011).

In einem In-vitro-Modell zeigten MSC ähnliche molekulare Mechanismen zur Transmigration, wie beispielsweise Leukozyten, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Liu et al., 2013). Allerdings spiegeln die bisher bekannten In-vitro-Blut-Hirn-Schranken-Modelle nicht die realen In-vivo-Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke wider (Liu et al., 2013).

Neben der anzunehmenden geringen Migrationsrate in das ZNS kommt es bei der intravenösen Gabe zu einer systemischen Verbreitung der applizierten Zellen. Dies kann zu einer nicht erwünschten Akkumulation in peripheren Organen wie Lunge, Leber und Milz führen (Kraitchman et al., 2005, Hauger et al., 2006).

In einem Modell zur Transischämischen Attacke (TIA) migrierte, nach intraarterieller Applikation der therapeutischen Zellen, ein geringer Teil in das betroffene Hirnareal (Walczak et al., 2008). Jedoch kann es bei intraarterieller Applikation zu mikrovaskulären Gerinnseln kommen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer den ohnehin schon beeinträchtigten zerebralen Blutfluss weiter einschränken können (Olsen, 1986, Kikuchi et al., 2001).

### **1.3.3 Die intranasale Applikation**

Die intranasale Applikation bietet einen vielversprechenden, nicht invasiven Ansatz, um therapeutische Substanzen (Moleküle, Zellen) an der Blut-Hirn-Schranke vorbei in das ZNS zu transportieren. Bisher konnten Wissenschaftler im Tiermodell belegen, dass über diese Route eine Vielzahl von Substanzen (Peptide, Medikamente, Metalle, Viren, Plasmide, Bakteriophagen und Zellen) in das ZNS migrieren kann (s. Übersichtsartikel Jiang et al., 2011).

## **Intranasale Applikation von Therapeutika**

Die Existenz der transnasalen Route zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke wurde erstmals von Dr. William H. Frey II 1989 belegt (Frey, 1991b). Ihm gelang der Nachweis, dass neurotrophe Zytokine, wie Nerve growth factor (NGF) oder Fibroblast growth factor (FGF-2), nach intranasaler Applikation das ZNS und Hirnparenchym erreichen (Frey WH 2nd, 1997, Frey WH 2nd, 1995). Diese Route wurde im Folgenden durch weitere Untersuchung erfolgreich für den Transport von Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Thorne et al., 2004), aber auch Neuropeptide, weitere Zytokine und Polynukleotide in das ZNS belegt (Hanson and Frey, 2008).

In einem Mäusemodell von Morbus Alzheimer verzögerte die Behandlung mit Zytokine wie NGF die Neurodegeneration und verbesserte die kognitive Funktion (Capsoni et al., 2002). In einem anderen Rattenmodell für Schlaganfall reduzierte die intranasale Gabe von IGF-1 den Hirnschaden durch Verbesserung der neurologischen Defizite (Liu et al., 2004).

Auch beim Menschen konnte der erfolgreiche Transport von Peptiden wie Norcortin, Vasopressin oder Insulin in das ZNS nach intranasaler Applikation nachgewiesen werden (s. Übersichtsartikel Born et al., 2002). Intranasal appliziertes Insulin verbesserte in einem Alzheimer-Modell die Merkfähigkeit der betroffenen Patienten (Benedict et al., 2004). Dies geschah schon nach einmaliger Gabe einer geringen Dosierung, welche sich dabei nicht auf den systemischen Insulinhaushalt auswirkte (Reger et al., 2006).

Der Vorteil der intranasalen Applikation von therapeutisch wirksamen Substanzen in das ZNS besteht vor allem in der nicht invasiven Methodik und der, im Vergleich zu anderen Methoden, reduzierten systemischen Exposition und damit deren Nebenwirkungen (Hanson and Frey, 2008).

Die genauen Vorgänge des Transports von Substanzen nach intranasaler Applikation sind noch Gegenstand aktueller Forschung. Das ZNS wird nach intranasaler Gabe von Therapeutika, aber hauptsächlich entlang einer Route des Nervus olfactorius und Nervus trigeminus erreicht. Welcher Transportweg genutzt wird, hängt auch von den chemischen und physikalischen

Eigenschaften der Medikamente ab (s. Übersichtsartikel Jiang et al., 2011). Eine weiterführende Erläuterung folgt in Kapitel 1.3.4.

### **Intranasale Applikation von mesenchymalen Stammzellen**

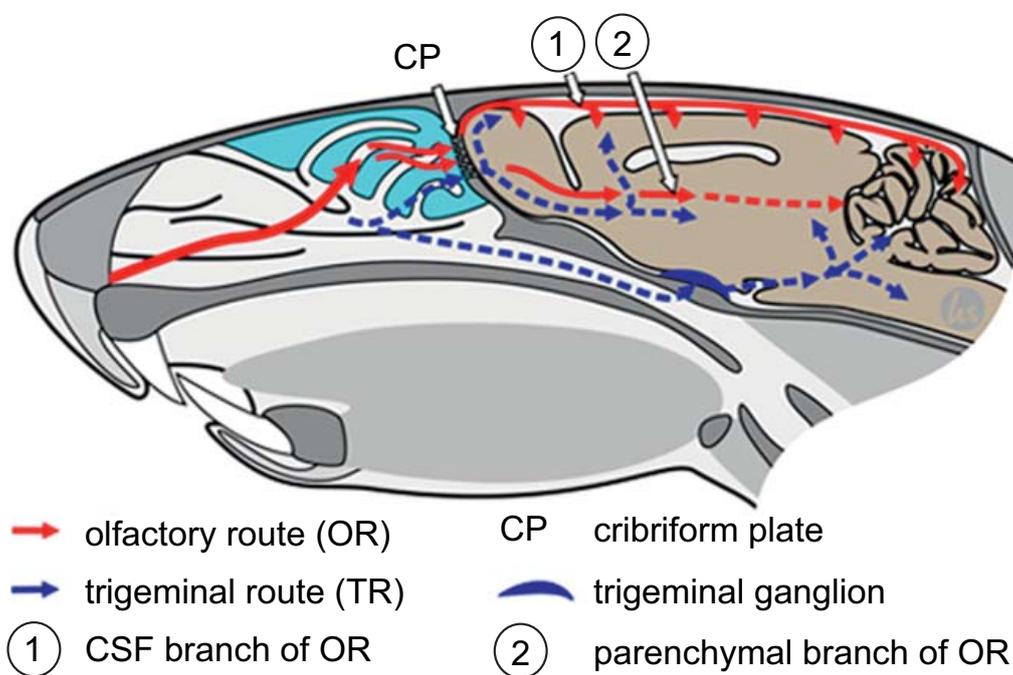
Auch mesenchymale Stammzellen können über die transnasale Route die Blut-Hirn-Schranke umgehen und zielgerichtet in das ZNS migrieren (Danielyan et al., 2009). Dabei gelangen die Zellen durch die nasale Mukosa entlang der in Kapitel 1.3.4 beschriebenen Migrationsrouten in das ZNS. Der initiale Mukosa-Durchtritt der Zellen kann dabei durch die Verabreichung von Hyaluronidase erleichtert werden (Zwijnenburg et al., 2001, Danielyan et al., 2009). Die 10–30 µm großen Zellen sind in der Lage die Lamina cribrosa zu durchdringen und anschließend entweder über den Bulbus olfactorius in andere Teile des Hirnparenchyms zu migrieren oder über den Liquor entlang der Cortex-Oberfläche in das Interstitium zu gelangen (Danielyan et al., 2009). MSC konnten bei naiven Mäusen nach der intranasalen Applikation im Subarachnoidalraum, Bulbus olfactorius, Thalamus, Hippocampus, Kleinhirn und Cortex nachgewiesen werden (Danielyan et al., 2009).

#### **1.3.4 Die transnasale Migrationsroute**

Intranasal applizierte Therapeutika erreichen das ZNS über den olfaktorischen und trigeminalen Migrationsweg (Hanson and Frey, 2008). Dabei wird die direkte Verbindung der Nervi olfactorii et trigemini von der Nasenhöhle bis zum ZNS genutzt (Hanson and Frey, 2008). In den Anfängen der Erforschung dieser Migrationsroute ist man hauptsächlich von der olfaktorischen Route (OR; siehe Abbildung 3), welche über den Nervus olfactorius und den Bulbus olfactorius in das ZNS führt, ausgegangen (Frey, 1991a, Jansson and Bjork, 2002).

Bisher ist diese Route auch der einzig komplett belegte Weg, über den intranasal applizierte MSC (INA-MS) in das Gehirn gelangen (Abbildung 2). Nach intranasaler Applikation und Durchtritt durch die Mukosa und Lamina cribrosa (CP) teilt sich die olfaktorische Route in den Liquor- (1 in Abb. 2) und Parenchym-Zweig (2 in Abb.2). Beim Liquorzweig (1) verteilen sich die Zellen

mit dem Fluss des Liquor cerebrospinalis an lateralen Anteilen des Cortex, Cerebellums und Hirnstamms. Neben der nachgewiesenen Route existieren weitere als wahrscheinlich geltende Migrationsrouten (Danielyan et al., 2009). Beim hypothetischen Parenchymzweig (2, Abb.2) migrieren die Zellen direkt durch das Parenchym. Dieser Zweig könnte laut Danielyan et al. (2009) auch mit dem rostralen Migrationsstrom (RMS), der bei der Migration von neuronalen Progenitorzellen eine wichtige Rolle spielt, zusammenhängen (Luskin, 1993, Lois and Alvarez-Buylla, 1994).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Rattenschädels mit den Verteilungsrouten der MSC nach intranasaler Applikation.**

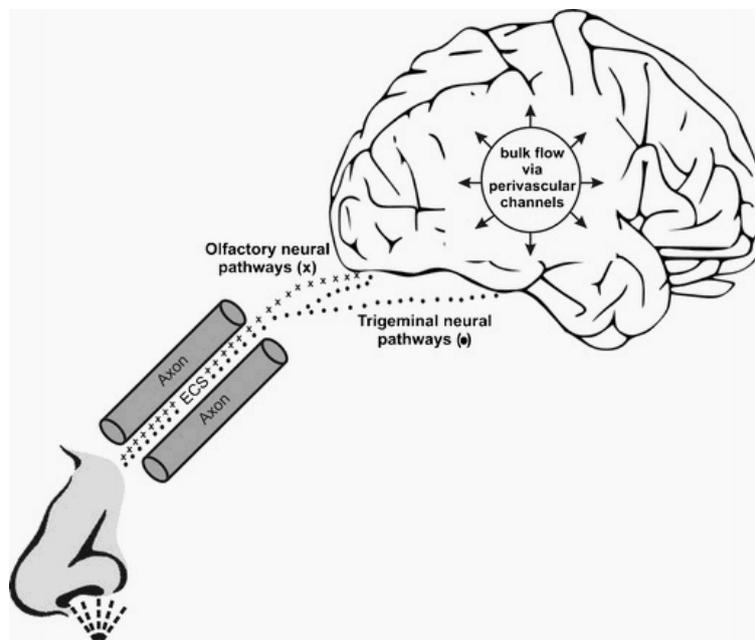
Olfaktorische Route (OR), Trigeminale Route (TR), Liquorzweig (1), Parenchymzweig (2). Durchgehende Linien entsprechen nachgewiesenen Routen, gestrichelte Linien den hypothetischen Routen. Lamina cribrosa (CP) (Danielyan et al. 2009)

Die trigeminale Route entlang des Nervus trigeminus besteht aus mindestens zwei Zweigen, wovon einer die Lamina cribrosa durchtritt und sich im kaudalen und rostralen Parenchym verteilt. Der andere Zweig führt von der nasalen Mukosa in das Ganglion trigeminale. Von dort verteilen sich die Zellen in das Vorderhirn, den Riechkolben (OB) und in kaudale Hirnbereiche wie Hirnstamm

und Cerebellum (Danielyan et al., 2009). In einem Tierversuch wurde nach intranasaler Gabe die höchste IGF-1-Konzentration in der Ursprungsregion des Nervus trigeminus gefunden (Thorne et al., 2004).

Der schnelle Transport (nach 1 Stunde) der intranasal applizierten Zellen in das ZNS (Danielyan et al., 2009) lässt vermuten, dass der für Moleküle beschriebene paravaskuläre Transportweg (Rennels et al., 1985, Hadaczek et al., 2006) auch für INA-MSCs durchgängig ist (siehe Abbildung 4).

Die treibende Kraft für den Transport der Stoffe zwischen Blutgefäßen und Basalmembran des Umgebungsgewebes sind wahrscheinlich Massenströmeffekte und arterielle Pulsationen (perivaskuläre Pumpe) (Skipor et al., 2003, Hadaczek et al., 2006). Makromoleküle wie Albumin oder Liposomen, die in das Striatum von Ratten injiziert wurden, fand man beispielsweise schon 30 min später im Globus pallidum (Hadaczek et al., 2006). Auch für Progesteron zeigte sich über diesen Weg eine schnelle Verteilung im Gehirn (Skipor et al., 2003).



**Abbildung 3: Potentielle Zellroute für intranasal applizierte Stammzellen beim Menschen (s. Übersichtsartikel Chapman et al. 2013)**

Eine durch die arterielle Pulsation angetriebene, perivaskuläre Pumpe würde die ubiquitäre und schnelle Verteilung der Zellen im Parenchym und in den Basalganglien erklären (Danielyan et al., 2009). Eine weitere Studie unterstützt diese Hypothese. Danach benutzen Neuroblasten die Blutgefäße als eine Art Gerüst, um in den Bulbus olfactorius zu migrieren (Bovetti et al., 2007).

Ein weiterer Migrationsweg könnte, zumindest für kleinere Moleküle, entlang der Lymphbahnen verlaufen. Dies zeigte eine Studie, in der nach intranasaler Gabe von IGF-1 die Konzentration von IGF-1 in den untersuchten zervikalen Lymphknoten 18-mal höher war als im Blut (Thorne et al., 2004).

#### **1.4 Zielsetzung der Studie**

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Analyse der Biodistribution, des Überlebens, der Proliferation sowie des therapeutischen Einflusses von intranasal applizierten mesenchymalen Stammzellen in einem 6-OHDA-Rattenmodell der Parkinson-Krankheit.

Folgende vier Teilaspekte wurden dabei behandelt:

- Teilaspekt 1: Es zeigt sich eine schnelle und zielgerichtete Biodistribution von INA-MSC in die Strukturen des ZNS.
- Teilaspekt 2: Es zeigt sich eine läsionsgerichtete Anreicherung und Überleben der INA-MSC im Zielgewebe (Striatum, Substantia nigra), 6,7 Monate nach der Applikation.
- Teilaspekt 3: Es zeigen sich Zeichen der Proliferation und Differenzierung der INA-MSC im ZNS als Zeichen der Integration.
- Teilaspekt 4: Es zeigt sich ein therapeutischer Einfluss der INA-MSC auf das 6-OHDA-lädierte Zielgewebe.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Geräte

#### Chemikalienliste (alphabetisch)

<sup>3</sup> H-Thymidin (TRK418)	GE Healthcare, München, Deutschland
6-OHDA-Hydrobromid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Alpha MEM (minimal essential medium)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Ascorbinsäure 0,01 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Atropin-Sulfat	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Beta-Tubulin III	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Carprofen Rimady	Pfizer, Deutschland
Cy3-assoziertes Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Desipramin -Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Hyaluronidase	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Jonosteril	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Ketavet	Pfizer, Deutschland
Penicillin	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Phycoerythrin-konjugierte AK	BD Bioscience, Santa Cruz, CA, USA
Phenobarbital (Narcoren)	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Smooth muscle alpha actin-(SMAA)-AK	Progen, Heidelberg, Deutschland
Streptomycin	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
TMRred In Situ Cell Death Detection kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Triton 0,1 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tyrosinhydroxylase-Antikörper- (TH-AK)	Chemicon Schwalbach, Deutschland
Ultima Gold Scintillations- flüssigkeit	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Vectashield mounting medium	Vector Laboratories Burlingame, CA, USA

### **Materialien- und Geräteliste**

AnalySIS Software	Soft Imaging System GmbH, Deutschland
BD CellQuestPro Software	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
FACScan	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Mikrokanülen-SGE syringes	Kiln Farm Milton Keynes, United Kingdom
Olympus BX51	Olympus, Hamburg, Deutschland
Stereotaxierahmen	Stoelting, Wood Dale, IL, USA
Kulturschalen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Software AnalySIS	Soft Imaging System GmbH, Deutschland

## **2.2 Stammzellengewinnung**

### **2.2.1 EGFP-Agouti-Ratten-Anzucht zur EGFP-MSC-Gewinnung**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSC wurden von Herrn Prof. Robert Weissert (Institut für Neurologie, Universität Regensburg) isoliert. Die transgenen Ratten wurden von Herrn Dr. Jens van den Brandt (Universität Greifswald) und Herrn Prof. Reichardt (Institut für Immunologie, Universität Göttingen) generiert.

Um eine Generation von Ratten zu züchten, deren MSC das EGFP (enhanced green fluorescent protein) exprimieren, wurden die Muttertiere mit EGFP-Gen-tragenden Lentivirus-Vektoren transfiziert (van den Brandt et al., 2004).

Zur Gewinnung der Lentivirus-Partikel wurde FUGW-Vektor-DNA mit Hilfe der Plasmide pMDL-RRE, pRSV-REV und pVSV-g in HEK293T-Zellen transferiert. Das Virus wurde dann mittels Ultrazentrifugation konzentriert, in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert und auf Hela-Zellen titriert. Das daraus gewonnene Viruskonzentrat wurde dann in den Raum zwischen Zona pellucida und Oolemma (Perivitellin-Raum) bei befruchteten einzelligen Embryonen injiziert. Die Embryonen stammten von weiblichen Dark-Agouti-Ratten (DA/OlaHsd) der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland), deren Eisprung durch Hormongabe gefördert wurde.

Im Zweizell-Stadium wurden die Embryonen in den Eileiter von pseudoschwangeren „CrI:CD(SD)“-Ratten der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) implantiert. Die Zellen der Nachkommen dieser Ratten wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie auf die EGFP-Expression untersucht. Vermittelt durch einen Ubiquitin-C-Promotor im transfizierten Lentivirus-Vektor wurde das EGFP dann in allen Zellreihen exprimiert.

Alle Maßnahmen entsprachen dabei den gesetzlichen Regulierungen des Staates Bayern und wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt.

### **2.2.2 Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark**

Aus dem gemischten Knochenmark von zehn weiblichen, ein Monat alten Dark-Agouti-Ratten wurden die EGFP-MSC nach dem Kunststoffadhärenz-Prinzip isoliert. Danach wurden die Zellen in Alpha-MEM (Minimum Essential Medium) bei 37 °C und unter feuchter Luft mit 5 % Kohlenstoffdioxid kultiviert. Das Kulturmedium enthielt Desoxyribonukleotide (10 mg/L, 11 mg/L 2´Desoxycytosin HCl), Ribonukleotide (10 mg/L), Ultraglutamin (434 mg/L), 100 IU/mL Penicillin, 100 µl/mL Streptomycin und 10 % fetales Kälberserum (fetal calf serum = FCS).

Die Stammzellcharakterisierung und das Differenzierungspotential wurden von Herrn PD Dr. R. Schäfer (Frankfurt am Main) evaluiert. Hierfür wurde eine In-vitro-Differenzierung in drei Zelllinien durchgeführt. Die erfolgreiche Differenzierung in die jeweilige Zelllinie wurde dann durch die spezifische Anfärbung mit Oil Red O (Adipogenese), Alkalischer Phosphatase (Osteogenese) und Safranin O (Chondrogenese) nachgewiesen.

Die Stammzellen wurden durch Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) mit Hilfe einer FACScan-Analyse (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) isoliert. Zur Analyse wurde die Software CellQuestPro (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) verwendet. Die untersuchten Zellen wurden davor mit verschiedenen Phycoerythrin-(PE-)konjugierten AK inkubiert (anti-rat-CD9, -CD11b/c, -CD29, -CD31, -CD34, -CD39, -CD44, -CD45, -CD73, -CD90, -CD106, -CD133, -CD143, -CD166, -CD200, -SSEA-1 der Firmen BD Bioscience (San Jose, CA, USA); Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Serotec (Raleigh, NC, USA); Biolegend(San Diego, CA, USA)).

Damit konnte sichergestellt werden, dass die isolierten Zellen positiv für die Zelloberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD73, CD90, CD166, CD200 und SSEA-1 und negativ für CD11b/c, CD31, CD34, CD39, CD45, CD106, CD133 und CD143 waren.

## **2.3 Versuchstiere**

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River WIGA GmbH, Sulzheim, Deutschland) mit einem Körpergewicht zwischen 240 und 300 g. Während der Studiendauer wurden sie artgerecht in Gruppen von drei bis vier Tieren in Standard-Macrolon-Käfigen gehalten. Der Raum, in dem sich die Käfige befanden, war temperatur- und klimareguliert. Die Tiere waren einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt, mit Tagesbeginn um 7:00 Uhr morgens. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und zu einer standardisierten Nahrung von täglich bis zu 15 g pro Tier. Alle Maßnahmen geschahen unter Einhaltung der ethischen Richtlinien und wurden von der lokalen Regierungsbehörde bewilligt (Regierungspräsidium Tübingen, Genehmigungsnummer ZP1-08).

## **2.4 Das 6-Hydroxydopamin-induzierte Morbus-Parkinson-Modell**

### **2.4.1 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)**

Das Neurotoxin 6-OHDA wurde ursprünglich entwickelt, um sympathische (vor allem noradrenerge) Nervenfasern zu schädigen. 6-OHDA führt primär zu einer Noradrenalin-Verarmung (Porter et al., 1963) durch die selektive Zerstörung adrenerger Nervenendigungen. Es führt auch zu einer Reduktion der TH- und Dopamin-Beta-Hydroxylase-Aktivität (Thoenen and Tranzer, 1968). Schließlich kommt es zu einer Degeneration der gesamten katecholaminergen (inklusive dopaminergen) Neuronen und damit zu einer verringerten Konzentration an Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, ihrer Metaboliten und dem TH-Kofaktor Tetrahydrobiopterin im betroffenen Hirngewebe (Zigmond and Stricker, 1989). Die toxische Wirkung des 6-OHDA beruht auf der Hemmung der Atmungskette und damit auf der konsekutiven Ansammlung reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. Dies führt zur Schwächung der

Glutathion- und Superoxiddismutase-Aktivität und schlussendlich zum Zelltod (Glinka et al., 1997).

Nach Exposition von 6-OHDA im Hirngewebe wird es durch sogenannte Monoamin-Transporter, die hauptsächlich Noradrenalin und Dopamin transportieren, präsynaptisch in die Neuronen aufgenommen. Um eine Degeneration der noradrinergen Neuronen zu verhindern, kann der für 6-OHDA hochaffine Noradrenalin-Transporter mit Gabe von Desipramin blockiert werden. Damit kommt es zu einer vorwiegend dopaminergen Neurodegeneration (Breese and Traylor, 1970).

Durch direkte, stereotaktische Injektion von 6-OHDA in die Substantia nigra, in das Striatum oder in den lateralen Ventrikel kann bei Nagern oder Primaten eine selektive Läsion des nigrostriatalen Systems erreicht werden. Durch diese Applikationsmethode kann 6-OHDA gezielt in das ZNS appliziert werden. Bei systemischer Applikation über das Blutssystem würde es andernfalls nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (s. Übersichtsartikel Deumens et al., 2002).

Eine Injektion in das mediale Vorderhirnbündel bei Ratten führt zu einer fast vollständigen Degeneration der dopaminergen Neuronen des nigrostriatalen und zusätzlich des mesolimbischen System (s. Übersichtsartikel Deumens et al., 2002).

Wird nur eine Hirnhälfte durch die 6-OHDA Injektion lädiert, besteht der Vorteil, dass immer eine gesunde Seite zum Vergleich zur Verfügung steht. Auch beim Menschen beginnt die Parkinson-Erkrankung meist in einer Hirnhälfte (s. Übersichtsartikel Gerlach et al., 2007). Allerdings treten aufgrund von Querverbindungen zwischen den dopaminergen Neuronen zu der gesunden Seite Kompensationsmechanismen auf. So wird z. B. die Dopamin-Synthese der nicht lädierten dopaminergen Neuronen durch Adaption (Hochregulation) der postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren erhöht (s. Übersichtsartikel Schwarting and Huston, 1996).

#### **2.4.2 6-OHDA-Läsion (Läsion der dopaminergen Neurone)**

Die 6-OHDA-Läsion der Untersuchungstiere wurde von Herrn Dr. Andreas von Ameln-Mayerhofer, Abteilung Neuropharmakologie, Universität Tübingen durchgeführt. Die Degeneration der dopaminergen Neuronen geschah dabei mittels einer unilateralen Injektion von 6-OHDA in das mediale Vorderhirnbündel (Fasciculus medialis telencephali). Dafür wurden die Tiere tief narkotisiert. Jedes Tier erhielt zuerst eine Kurzanästhesie mit Isofluran oder Fentanyl. Danach wurde Phenobarbital in der Dosierung 64 mg pro Kilogramm Körpergewicht (mg/kgKG) intraperitoneal appliziert. Um die Atmung während der Narkose zu erleichtern, wurde zusätzlich niedrig dosiertes Atropin-Sulfat intravenös injiziert (0,5 mg/ml, gelöst in 0,1 ml Salzlösung).

Zum Schutz der noradrenergen Neuronen wurden die Tiere 30 min vor der Applikation von 6-OHDA mit 20 mg/kgKG intraperitoneal appliziertem Desipramin-Hydrochlorid behandelt.

Pro Tier wurden 12 µg 6-OHDA, als freie Base gelöst, in 1 µl 0,01 % (wt/vol) Ascorbinsäure verabreicht. Die Injektion dieser Emulsion erfolgte unilateral in das linke, mediale Vorderhirnbündel mit einer Geschwindigkeit von 1,0 µl/min. Dies geschah, zur exakten Applikation, unter Verwendung eines Stereotaxierahmens und 1-µl-Mikrokanülen.

Für die Injektion im Stereotaxierahmen wurden nach Paxinos et al. (1980) folgende Koordinaten verwendet: anterior-posterior (AP) = -4,0 mm, lateral (L) = +1,6 mm und dorsal-ventral (DV) = -8,8 mm, von der Oberfläche bis zum Schädel gemessen (Paxinos et al., 1980). Um eine ausreichende Diffusion des 6-OHDA in das Hirngewebe zu gewährleisten, blieb die Injektionskanüle noch für 7 min nach der Applikation an ihrem Platz.

Nach der Operation wurden die Tiere dann zur Erholung für einen Tag isoliert. Zum Schutz vor einer Dehydrierung bekamen die Tiere in dieser Zeit, für maximal zwei Tage postoperativ, zusätzlich eine intraperitoneale Infusion mit der Minerallösung Jonosteril. Die Dosis betrug drei Milliliter pro Tier und Tag. Zusätzlich wurden die Tiere mit 5 mg/kgKG Carprofen (Rimadyl®) sofort nach der Operation und bis zu zwei Tage postoperativ analgesiert.

## 2.5 Intranasale Zellapplikation

Vor der intranasalen Zellapplikation erhielten die Tiere eine Kurzanästhesie mit intraperitoneal appliziertem Ketamin (Ketavet) in der Dosierung von 75 bis 100 mg/kg KG.

Die Tiere der Zellgruppe erhielten zusätzlich intranasal 100 Einheiten Hyaluronidase, gelöst in 24 µl steriler PBS. Die Hyaluronidaselösung wurde dabei in zwei Gaben von je 6 µl pro Nasenloch verabreicht. Dafür erfolgte erst die Gabe von links nach rechts und zwei Minuten darauf die Gabe von rechts nach links. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten isotone Salzlösung der gleichen Menge und Applikationsart.

Eine Stunde nach der Vorbehandlung mit Hyaluronidase wurde nach der gleichen Vorgehensweise entweder die MSC-Lösung (Zellgruppe) oder isotone Salzlösung (Kontrollgruppe) appliziert.

Die EGFP-MSC-Suspension enthielt entweder  $3 \times 10^5$  oder  $1 \times 10^6$  Zellen, gelöst in 24 µL steriler, isotoner Salzlösung. Für die meisten Versuchsmodelle erhielten die Tiere  $3 \times 10^5$  Zellen am dritten Tag nach der Operation. Die Tiere mit der Applikation von insgesamt  $1 \times 10^6$  Zellen erhielten diese in zwei Einzelgaben ( $5 \times 10^5$  Zellen) am siebten und neunten Tag postoperativ.

## 2.6 Radioaktive Markierung der MSC

Die radioaktive Markierung der MSC wurde von Herrn PD Dr. Verleysdonk, Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen, durchgeführt. Dazu sind die Zellen bei etwa 20%iger Konfluenz in 75-cm<sup>2</sup>-Kulturschalen für eine Woche mit 1 µM <sup>3</sup>H-Thymidin (370 kBq) pro ml Medium inkubiert worden.

Nach dreimaligem Waschen mit isotoner PBS-Lösung wurde das radioaktive Medium durch ein nicht radioaktives Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann, bei täglichem Wechsel des Mediums, für eine weitere Woche kultiviert.

Um nachzuweisen, dass der verbliebene Medienüberstand frei von Radioaktivität war, wurden die Proben für 10 min mit einer Flüssigkeits-

Scintillationsmessung (LKB Rackbeta 1219, Wellesley, MA, USA) in Ultima Gold (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA; 5 ml in 20 ml Ampullen) analysiert.

Nach der Isolation der Zellen aus dem Restmedium wurde eine Teilprobe für die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer verwendet.

## **2.7 Verteilung der INA-MSK im ZNS**

Die radioaktiv markierten MSC wurden insgesamt sechs Ratten ( $n = 6$ ), in einer Dosis von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Tier, intranasal verabreicht. Nach vier Stunden sind die Tiere unter Ketamin-Narkose (100 mg/kgKG) eingeschlüpfert worden. Das Herz, die Nieren, die Lunge, die Leber, der Magen, die Milz, das Rückenmark und das Gehirn wurden entnommen und gewogen.

Das Gehirn wurde sofort auf einem eisgekühlten Block seziiert und in Riechkolben (OB), Cortex, Striatum, Hippocampus (HC), Cerebellum (Cer) und Hirnstamm unterteilt (Heffner et al., 1980, Mayerhofer et al., 2001). Das verbleibende Hirngewebe wurde gesammelt und konserviert.

Die Proben sind zuerst mit Scheren zerkleinert worden. Dann wurden sie mit deionisiertem Wasser gemischt und in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator bei einer Umdrehung von 4.000 rpm homogenisiert. Anschließend wurde die Probensuspension mit Ultima-Gold-Szintillationsflüssigkeit gemischt und per Flüssigkeits-Szintillationszählung (10 min pro Probe) auf Radioaktivität überprüft.

Aus der gemessenen Radioaktivität der Probe, dem Anteil der Probe an dem gesamten Organ und der Radioaktivität pro MSC (0,074 Bq) ließ sich die Anzahl der MSC in den untersuchten Organen bestimmen.

## **2.8 Fluoreszenzmikroskopische Analysen**

### **2.8.1 Zellzahlbestimmung**

Mittels Kryosektion sind horizontale Schnitte mit einer Dicke von 20 µm aus den Gehirnen der Ratten angefertigt worden. Für die fluoreszenz-mikroskopische Analyse der EGFP-MSCs wurden die Schnitte mit dem zellkernspezifischen Farbstoff 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) inkubiert.

Für die Analyse wurden dann horizontale Schnitte aus dem Bereich von -2 mm bis -8 mm (gemessen von der Oberfläche des Hirns) angefertigt.

Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Bilder ist mit dem Mikroskop Olympus BX51 der Firma Olympus (Hamburg, Deutschland) und der Software AnalySIS der Firma Soft Imaging System GmbH (Münster, Deutschland) erfolgt. Zur Bestimmung der Anzahl an EGFP-positiven MSCs in den einzelnen Bereichen des Gehirns wurden die Volumina der untersuchten Schnitte pro Hirn (n = 300) auf das Volumen von 1 mm<sup>3</sup> extrapoliert.

### **2.8.2 TH-, Beta-Tubulin-III-, PCNA- und SMAA-Anfärbung**

Für die Markierung mit den unten beschriebenen Antikörpern wurden horizontale Schnitte aus den Rattenhirnen der Zellgruppe verwendet.

Die Schnitte wurden mit Methanol bei -20 °C fixiert, gewaschen und anschließend, je nach Versuchsanordnung, mit folgenden monoklonalen Antikörpern (AK) inkubiert:

- TH-AK (Chemicon, Schwalbach, Deutschland) in der Verdünnung von 1:100. TH ist das Schlüsselenzym der Dopaminsynthese und wird zum Nachweis der dopaminergen Aktivität markiert.
- SMAA-AK (Progen, Heidelberg, Deutschland) in der Verdünnung von 1:30. SMAA wird zum Nachweis von glatten Muskelzellen, wie sie z. B. in Blutgefäßen des ZNS vorkommen, markiert.

- PCNA-AK (Chemicon, Schwalbach, Deutschland) in der Verdünnung von 1:25. PCNA ist ein charakteristisches Protein der eukaryotischen Proliferation.
- Beta-tubulin III-AK in der Klonvariante TUJ1 (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) in der Verdünnung von 1:250. Beta-tubulin-III kommt als spezifisches Protein bei der Bildung neuronaler Mikrotubuli vor und ist damit ein Hinweis auf die Neurogenese und Axonbildung von Zellen.

Alle Proben sind für zwei Stunden mit dem entsprechenden AK bei Zimmertemperatur inkubiert worden. Die Proben mit AK gegen PCNA, TH und SMAA wurden nachträglich ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie mit Cy3-assoziiertem Anti-Maus-Immunglobulin G (IgG) im Verdünnungsverhältnis von 1:500 (Dianova, Hamburg, Deutschland) für eine weitere Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.

Die daraus entstandenen Proben wurden mit 0,1 % Triton in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) inkubiert, welches DAPI enthält.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung der TH-positiven Zellen in der Substantia nigra wurden Hirnschnitte verwendet, die den gesamten Querschnitt der Substantia nigra abbildeten. Insgesamt wurde jeder zweite Hirnschnitt der Substantia nigra ( $n = 15$  pro Tier) und des Striatums ( $n = 25$  pro Tier) analysiert. Die Anzahl der TH-positiven Zellen in den untersuchten Hirnschnitten wurde abschließend auf die Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  extrapoliert.

### **2.8.3 TUNEL-Anfärbung**

Zur Bestimmung der Apoptose wurde die TUNEL-Methode (Terminale desoxynukleotidyl Transferase (tdT) mediated 2-Desoxyuridin-5'-triphosphat (dUTP) biotin nick end labeling) verwendet. Dabei wurden in ausgewählten Hirnschnitten ( $n = 10$ ), von jeweils vier Gehirnen der Zell- und Kontrollgruppe, die TUNEL-positiven Zellen im Striatum und in der Substantia nigra ausgezählt.

Die Schnitte wurden zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mithilfe des TMRred InSitu Cell Death Detection kit nach dem Protokoll des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) angefärbt. Zum Schluss wurden die Proben mit Vectashield mounting medium (DAPI) inkubiert.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Für die statistische Analyse der Auszählungsergebnisse wurden die abhängigen Variablen der EGFP-MSC, (<sup>3</sup>H-Thy-)MSC-, TUNEL- und TH-positiven Zellen der Student-t-Verteilung (Vergleich von zwei Gruppen) und der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance, Analyse von  $\geq 3$  Gruppen) unterzogen. Bei multiplen Vergleichen ( $> 2$ ) wurde zusätzlich der Bonferroni-Test angewendet. Bei allen Ergebnissen wurde  $p < 0,05$  als statistisch signifikant definiert.

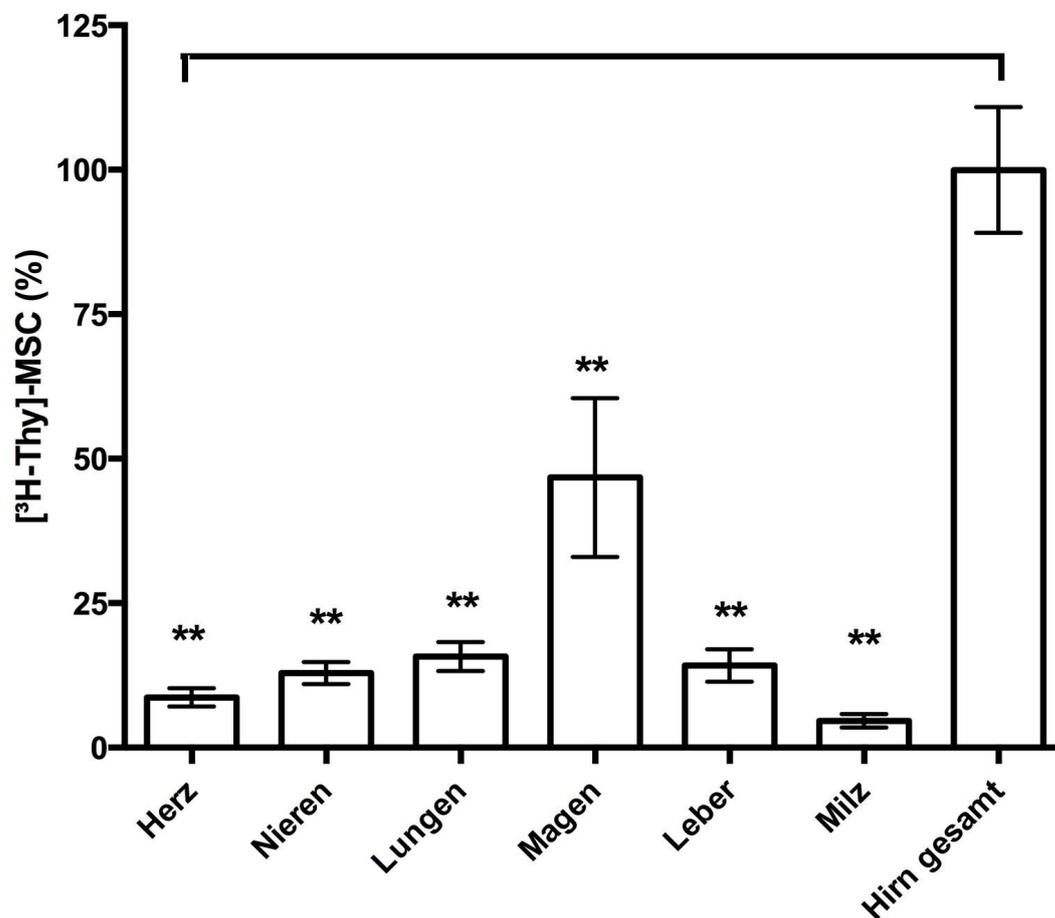
In den Abbildungen sind die signifikanten Werte mit  $p < 0,05$  mit einem (\*) Stern markiert, Unterschiede mit  $p < 0,01$  mit zwei (\*\*) Sternen und Unterschiede mit  $p < 0,001$  mit drei (\*\*\*) Sternen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean = SEM) dargestellt.

### 3 Ergebnisteil

#### 3.1 MSC-Biodistribution nach intranasaler Applikation

##### 3.1.1 Organverteilung der INA-MSC

In Abbildung 4 ist die Verteilung der mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markierten MSC in verschiedenen Organen, vier Stunden nach intranasaler Applikation von  $3 \times 10^5$  Zellen, im unilateralen 6-OHDA-Rattenmodell dargestellt (n = 6).



**Abbildung 4: Organverteilung der mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markierten mesenchymalen Stammzellen.** Die Messung erfolgte vier Stunden nach der intranasalen Applikation von  $3 \times 10^5$  MSC in einem unilateralen 6-OHDA-Rattenmodell. Die Daten wurden auf den Mittelwert der Zellzahlen im Gehirn (100%-Wert) normalisiert. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , (n = 6).

Unter allen untersuchten Organen ist die mit Abstand höchste MSC-Anzahl im Gehirn zu finden. Ein Vergleich der einzelnen Organe ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen der höheren MSC-Anzahl im Gehirn zu allen anderen analysierten Organen (Herz ( $p < 0,01$ ), Nieren ( $p < 0,01$ ), Lunge ( $p < 0,01$ ), Magen ( $p < 0,01$ ), Leber ( $p < 0,01$ ) Milz ( $p < 0,01$ ). Diese Befunde weisen auf ein gezieltes Einwandern der INA-MSZ in das Gehirn hin.

Von den Organen außerhalb des ZNS sind am meisten MSC im Magen zu finden. In den Magen sind sie vermutlich, nach Applikation in die Nasenhöhle, über den Nasopharynx und den Schluckakt gelangt. Die einzelnen Untersuchungstiere zeigen dabei eine große interindividuelle Streuung, was am ehesten auf eine unterschiedliche Menge an geschluckter Zellsuspension während der intranasalen Gabe zurückzuführen ist.

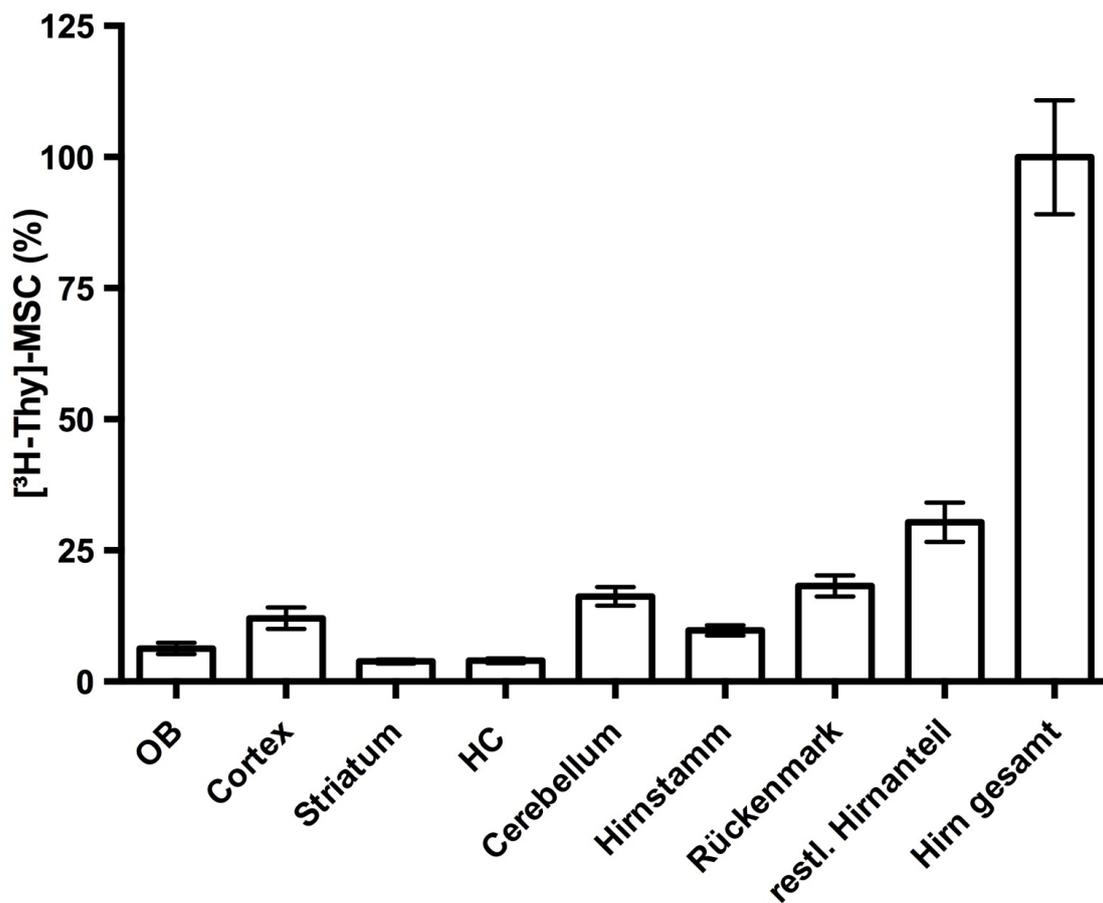
Die übrigen Organe imponieren mit einem MSC-Anteil auf vergleichbarem Niveau (maximal 20 % der im Hirn gemessenen MSC). Diese Daten deuten darauf hin, dass ein gewisser Teil der INA-MSZ in den Blutkreislauf gelangt und sich von dort aus in den untersuchten Organen anreichert.

### **3.1.2 Biodistribution der INA-MSZ innerhalb des ZNS**

In Abbildung 5 ist die Verteilung der INA-MSZ zwischen den verschiedenen Bereichen des Gehirns vier Stunden nach der Applikation von  $3 \times 10^5$  MSC bei insgesamt sechs Versuchstieren dargestellt ( $n = 6$ ).

Die Ergebnisse zeigen eine recht ausgeglichene Verteilung der INA-MSZ in den Bereichen des Gehirns, die von Liquor cerebrospinalis umgeben sind. Dies belegen die Zellzahlen von Rückenmark, Groß-, Klein- und Stammhirn (siehe Abb. 5).

Nicht von Liquor umgebene, weiter innen liegende Strukturen, wie das Striatum oder der Hippocampus, zeigen im Vergleich zu den von Liquor cerebrospinalis umgebenen Strukturen eine signifikant geringere Anzahl an Zellen (jeweils signifikant auf  $p < 0,05$ ).



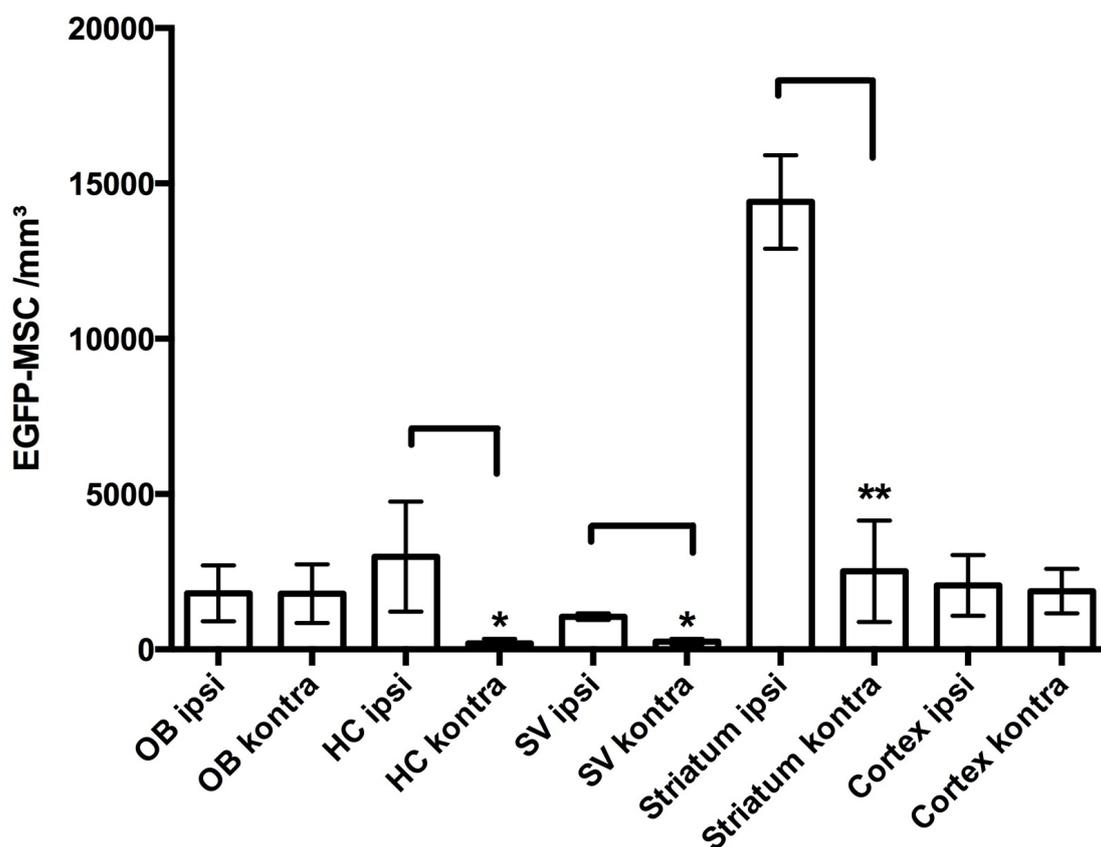
**Abbildung 5: Verteilung der mit <sup>3</sup>H-Thymin markierten mesenchymalen Stammzellen im Gehirn.** Bulbus olfactorius (OB), Hirnrinde (Cortex), Striatum, Hippocampus (HC), Kleinhirn (Cerebellum), Hirnstamm, Rückenmark und restliches Hirn. Die Gesamtzahl aller detektierten INA-MSC (Hirn) wurde als 100 % festgelegt. Die Daten wurden vier Stunden nach intranasaler Applikation von  $3 \times 10^5$  MSC im unilateralen 6-OHDA-Rattenmodell erhoben (n = 6).

Auch der Bulbus olfactorius, als nervale Verbindung zur Nasenhöhle (Applikationsstelle), beinhaltet auf den ersten Blick eine größere Menge radioaktiv markierter MSC. Allerdings zeigt sich hier statistisch kein signifikanter Unterschied zu dem Rückenmark ( $p > 0,05$ ), dem Großhirn ( $p > 0,05$ ), dem Kleinhirn ( $p > 0,05$ ) und dem Stammhirn ( $p > 0,05$ ).

## 3.2 Läsionsgerichtete Anreicherung und Überleben der INA- MSC im Gehirn

### 3.2.1 Läsionsgerichtete Anreicherung und Überleben der INA-MSC im Empfängergewebe

In Abbildung 6 wurde die läsionsgerichtete Anreicherung der INA-MSC in den durch 6-OHDA geschädigten Arealen des Gehirns via Fluoreszenz-mikroskopie analysiert. Die Abbildung zeigt die Verteilung der EGFP-MSC in ausgewählten Hirnregionen der mit 6-OHDA behandelten Ratten. Die Daten wurden aus Hirnschnitten, 6,7 Monate nach der intranasalen Applikation von  $3 \times 10^5$  MSC je Untersuchungstier, erhoben.



**Abbildung 6: Verteilung der EGFP-MSC in den seitengetrenten Hirnarealen**

Dargestellt sind die Zellzahlen pro  $\text{mm}^3$ , in der ipsi- sowie kontralateralen Seite, des Bulbus olfactorius (OB), Hippocampus (HC), der Seitenventrikel (SV), des Striatums und des Cortex. Die Messung erfolgte 6,7 Monate nach Applikation von  $3 \times 10^5$  Zellen ( $n = 4$ ). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Die Daten aus Abbildung 6 sind seitengetreunt dargestellt (ipsilateral = mit 6-OHDA-Behandlung; kontralateral = ohne 6-OHDA-Behandlung) und stammen aus der Analyse von insgesamt vier Untersuchungstieren (n = 4).

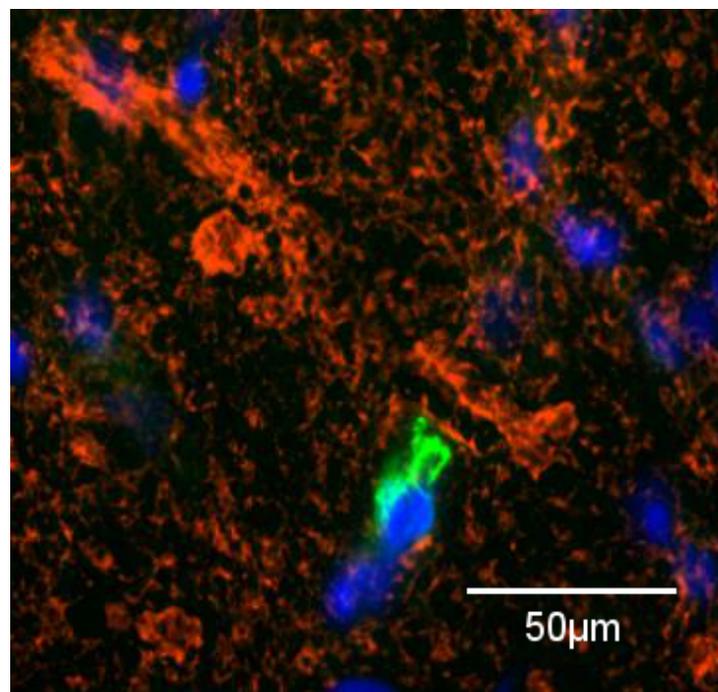
Die größte MSC-Anzahl findet sich im Striatum und dort vor allem auf der ipsilateralen, 6-OHDA-lädierten Seite (signifikant mit min.  $p < 0,05$ , zu jeder anderen analysierten Struktur). Bei den restlichen untersuchten Strukturen zeigt sich eine recht ausgeglichene Verteilung auf niedrigem Niveau.

Im Bulbus olfactorius und dem Cortex findet sich kein Unterschied zwischen der ipsilateralen, lädierten Seite und der kontralateralen, gesunden Seite ( $p > 0,05$ ). Vor allem im Striatum als einseitig 6-OHDA-behandelte Struktur sind signifikant mehr MSC auf der geschädigten, ipsilateralen Seite zu finden ( $p < 0,01$ ). Ebenso sind mehr MSC auf der ipsilateralen, geschädigten Hirnseite im Vergleich zur kontralateralen Seite im Seitenventrikel ( $p < 0,05$ ) und dem Hippocampus ( $p < 0,05$ ) zu finden. Beide Strukturen haben dabei eine anatomische Nähe zum Striatum gemeinsam. Diese Befunde sprechen für eine läsionsgerichtete Anreicherung der INA-MSC um die und vor allem in den lädierten Strukturen im 6-OHDA-Rattenmodell.

### **3.2.2 Lokalisation von MSC in der Nähe von Nervenfasern und Gefäßen**

Abbildung 7 und 8 zeigen die spezifische Anreicherung der INA-MSC an bestimmten Gewebsstrukturen, wie Nervenfasern und Gefäße. Die Bilder sind jeweils fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-behandelten Ratte, 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von  $3 \times 10^5$  MSC.

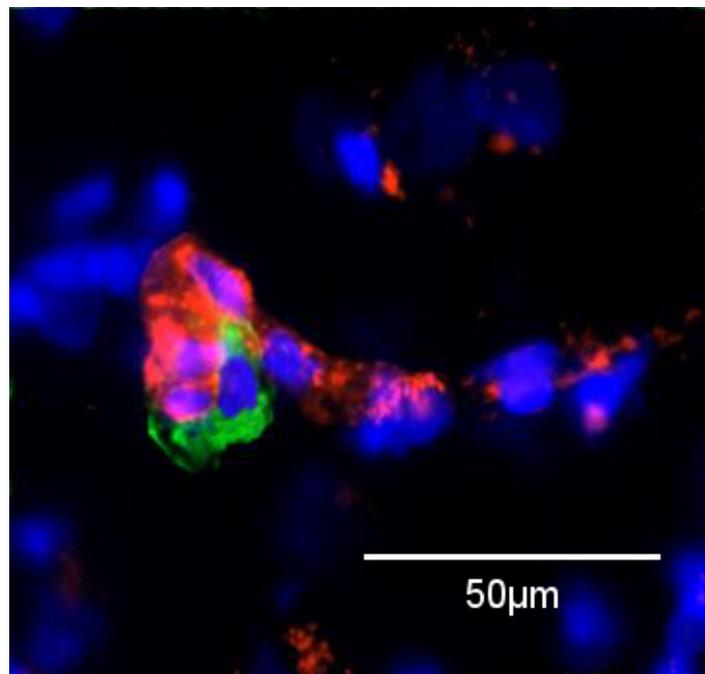
In Abbildung 7 wurden die Nervenfasern mit  $\beta$ -Tubulin III-AK (rot) markiert. Die MSC, welche sich in unmittelbarer Nähe zu der schräg gerichteten Nervenfaser befindet, ist an ihrer grünen Färbung (EGFP-markiert) zu erkennen. Diese Darstellung steht exemplarisch für die häufig beobachtete räumliche Nähe der MSC zu Nervenfasern in vielen Hirnschnitten.



**Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-Ratte, 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von MSC.**

Dargestellt sind die EGFP-MS (grün), das Tubulin beta III (rot) und die Zellkerne (blau).

In Abbildung 8 wurden die glatten Muskelzellen, wie sie im Gehirn vor allem als Bestandteil von arteriellen Blutgefäßen vorkommen, mit Hilfe von SMAA-AK (rot) markiert. Auch hier zeigt sich in der exemplarischen Abbildung eine eindeutige räumliche Nähe einer MSC (grün) zu dem mit SMAA-AK markierten Gefäß. Die Zellkerne der umgebenden Zellen sind mit DAPI (blau) markiert.



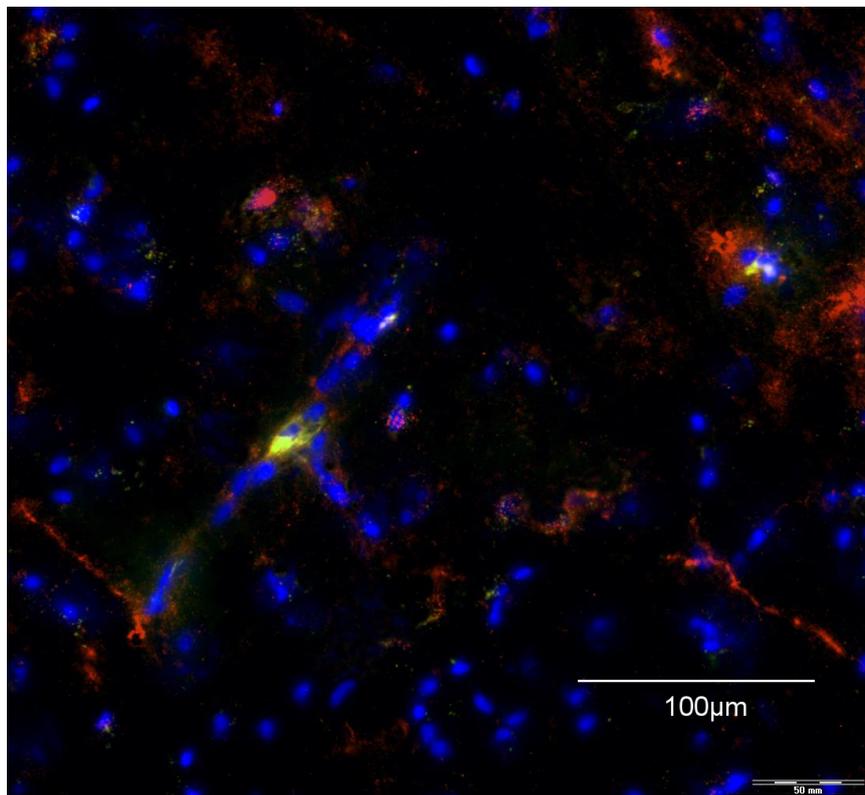
**Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-Ratte, 6,7 Monate nach intranasaler Applikation der MSC.**

Dargestellt sind die EGFP-MSC (grün), das Smooth muscle alpha actin (SMAA) (rot) und die Zellkerne (blau).

### 3.3 Differenzierung und Proliferation der INA-MSC im Empfängergewebe

#### 3.3.1 Die Differenzierung der INA-MSC

Dass die MSC in der Lage sind sich in funktionelle neuronartige Zellen zu differenzieren, wurde bereits in der Einleitung erwähnt. Ein Hinweis, dass auch die INA-MSC im 6-OHDA-Modell diese Differenzierungsfähigkeit besitzen, ist exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt. Es handelt sich um eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-Ratte.



**Abbildung 9:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-behandelten Ratte, 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von  $3 \times 10^5$  MSC. Der Balken im unteren, rechten Bildrand entspricht 100 Mikrometern. Dargestellt sind die EGFP-positive MSC (grün), das TH (rot) und die Zellkerne (blau),

Der Hirnschnitt wurde 6,7 Monate nach intranasaler Applikation von  $3 \times 10^5$  MSC erstellt. Markiert sind auf der Abbildung die EGFP-positive MSC (grün), die mit DAPI-gefärbten Zellkerne (blau) und das mit AK-markierte TH (rot). Wie an der MSC im linken, mittleren Bildabschnitt zu erkennen ist, zeigt sich der Nachweis von TH direkt an der EGFP-markierten Zelle. Dies steht für einen exemplarischen, bildlichen Hinweis auf die Differenzierung der INA-MSC in eine TH-exprimierende, neuronartige Zelle.

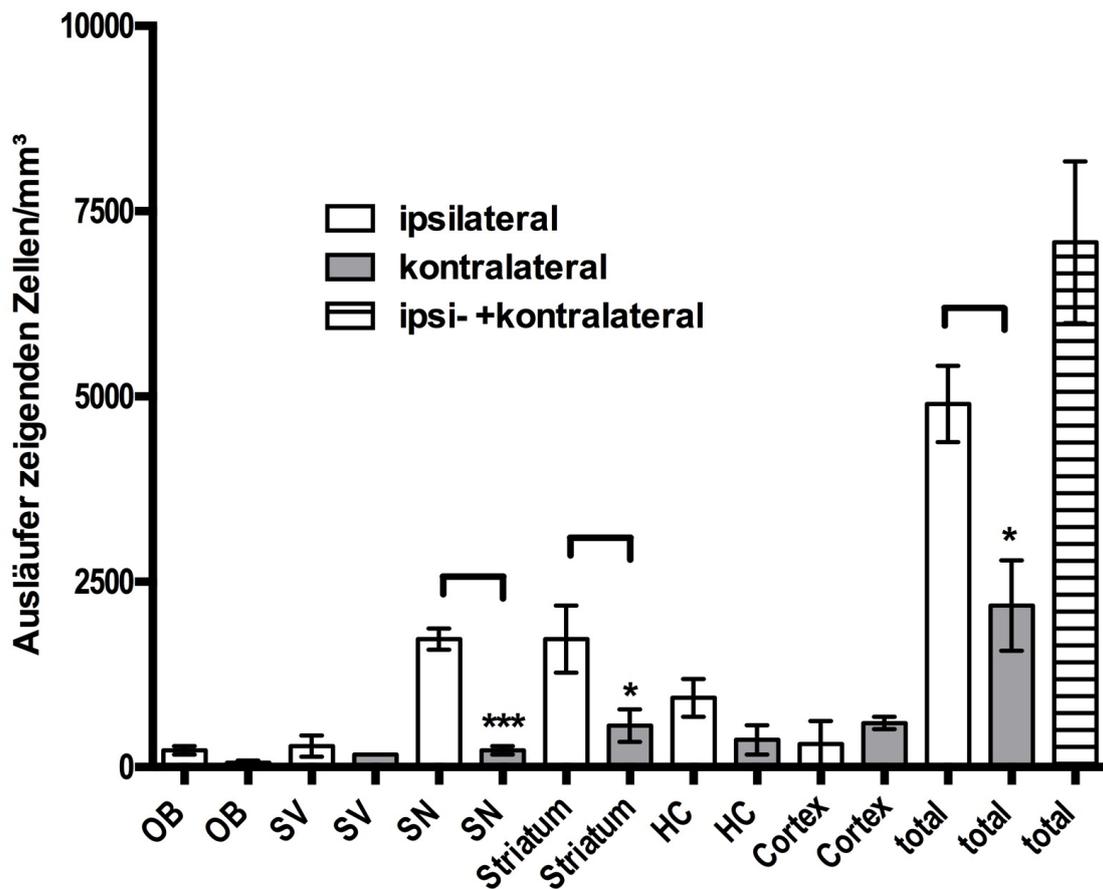
### **3.3.2 Die Bildung von Ausläufern als Zeichen der Integration und Differenzierung**

Die Integration und Differenzierung der INA-MSC im zerebralen Empfängergewebe zeigt sich auch durch die Bildung von Zellausläufern. Diese Differenzierungszeichen wurden, 4,5 Monate nach der intranasalen Applikation von je  $1 \times 10^6$  MSC, an drei Ratten untersucht.

#### **3.3.2.1 Der Seitenvergleich der „ausläuferbildenden“ MSC in ausgewählten Hirnstrukturen**

Die Anzahl und die Verteilung der ausläuferbildenden MSC (pro  $\text{mm}^3$ ) in verschiedenen, ausgewählten Hirnregionen ist in Abbildung 13 dargestellt. Untersucht wurden der Bulbus olfactorius (OB), das Seitenventrikel (SV), die Substantia nigra (SN), das Striatum (striatum), der Hippocampus (HC), der Cortex (Cortex) sowie die Gesamtanzahl, jeweils ipsi- und kontralateral betrachtet.

Das Ergebnis zeigt, dass die ausläuferbildenden MSC überwiegend auf der ipsilateralen Hirnseite auftreten, im Speziellen in den lädierten Strukturen, dem Striatum und der Substantia nigra (siehe Kapitel 3.7.2). Die Gesamtzahl aller ausgezählten ausläuferbildenden MSC der lädierten, ipsilateralen Seite ist im Vergleich zur kontralateralen Seite signifikant größer ( $p < 0,01$ ). Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der ipsi- und kontralateralen Seite für das Striatum ( $p < 0,001$ ) und die Substantia nigra ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 10: Verteilung der ausläuferbildenden („process-bearing“) MSC**

Die Angaben sind pro  $\text{mm}^3$ , 4,5 Monate nach der intranasalen Applikation von  $1 \times 10^6$  MSC, auf der ipsilateralen, lädierten Seite (weiße Balken) und auf der kontralateralen Seite (graue Balken): Bulbus olfactorius (OB), Seitenventrikel (SV), Substantia nigra (SN), Striatum, Hippocampus (HC), Cortex sowie die Gesamtanzahlen (total). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . (n = 3).

Im Vergleich zum ipsilateralen Striatum und zur ipsilateralen Substantia nigra zeigt sich in allen anderen untersuchten Strukturen eine deutlich geringere Anzahl an ausläuferbildenden MSC ( $p < 0,01$ ). Daneben ist auch im ipsilateralen Hippocampus eine signifikant größere Anzahl MSC, im Vergleich zur kontralateralen Seite, festzustellen ( $p < 0,05$ ). Im Bulbus olfactorius findet sich zwar die geringste Anzahl an MSC, doch auch hier ergibt sich statistisch eine größere Menge auf Seiten der ipsilateralen, lädierten Hirnseite ( $p < 0,01$ ). Die Seitenverteilung beim Cortex und Seitenventrikel zeigte keine signifikanten Unterschiede.

### 3.3.2.2 Die Verteilung der ausläuferbildenden MSC in der lädierten Hirnseite

Bei isolierter Betrachtung der ausläuferbildenden MSC in den Hirnarealen der ipsilateralen Seite (Abb. 11) bestätigt sich eine deutliche Ansammlung der INA-MSC in der Substantia nigra und dem Striatum.

Die Anzahl der ausläuferbildenden MSC im Striatum ist im Vergleich zur Anzahl der ausläuferbildenden MSC im Bulbus olfactorius ( $p < 0,01$ ), Seitenventrikel ( $p < 0,01$ ) und Cortex ( $p < 0,01$ ) signifikant höher.

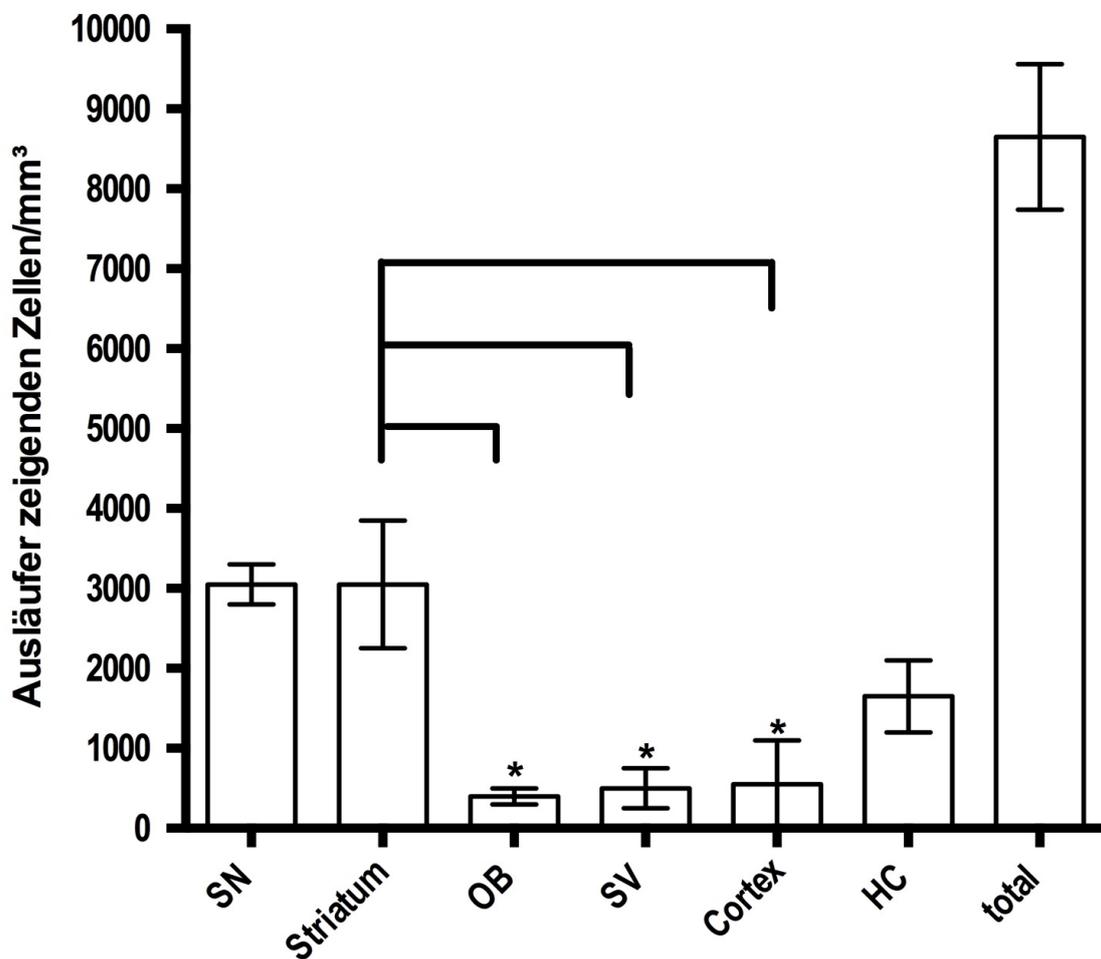


Abbildung 11: Verteilung der ausläuferzeigenden („process-bearing“) Zellen in der lädierten Hirnseite

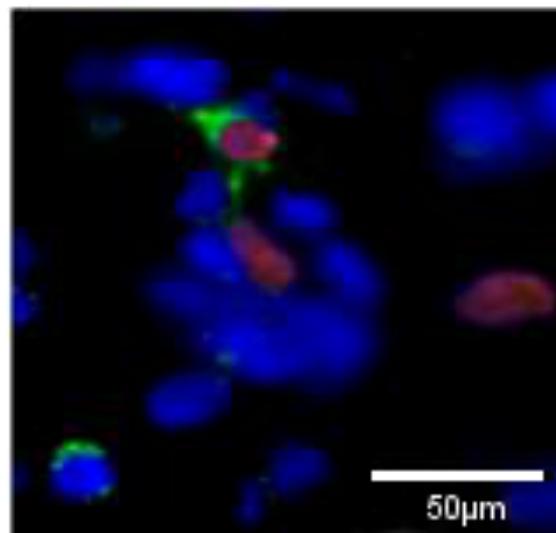
Die Angaben sind pro  $\text{mm}^3$ , 4,5 Monate nach der intranasalen Applikation von  $1 \times 10^6$  EGFP-MSC: Bulbus olfactorius (OB), Seitenventrikel (LV), Substantia nigra (SN), Striatum, Hippocampus (HC), Cortex sowie die Gesamtanzahlen (total). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ( $n = 3$ ).

Auch in der Substantia nigra finden sich signifikant mehr ausläuferbildende MSC im Vergleich zum Cortex ( $p < 0,01$ ), zu den Seitenventrikeln ( $p < 0,01$ ) und zum Bulbus olfactorius ( $p < 0,001$ ).

Die drittgrößte Anzahl an ausläuferbildenden MSC zeigt sich im Hippocampus. Hier ist zugleich aber auch eine vergleichsweise hohe Streuung der Zellzahlen zwischen den einzelnen Untersuchungstieren festzustellen. Wegen dieser hohen Streuung ergibt sich im Vergleich zwischen Hippocampus, Striatum und Substantia nigra kein statistisch signifikanter Unterschied.

Allgemein treten außerhalb der Substantia nigra, des Striatums und des Hippocampus nur geringe Mengen ausläuferbildender MSC auf, was als Hinweis auf eine läsionsgerichtete Differenzierung gewertet werden kann.

### 3.3.3 Die Proliferation der intranasal applizierten mesenchymalen Stammzellen im Empfängergewebe

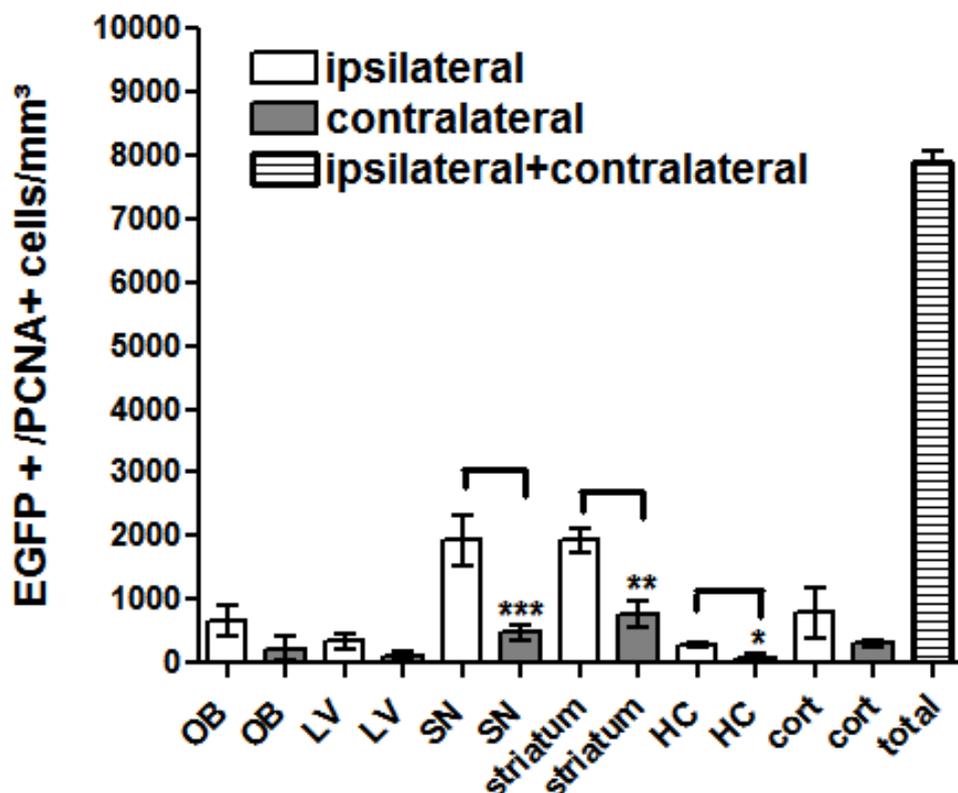


**Abbildung 12: Expression von Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in INA-MSC**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-Ratte, 4,5 Monate nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  MSC. Der Balken im unteren, rechten Bildrand entspricht 50  $\mu\text{m}$ . Markiert sind die EGFP-MSC (grün), das PCNA (rot, rosa) und die Zellkerne (blau).

Um die Proliferationsfähigkeit der INA-MSK im Empfängergewebe nachzuweisen, wurde das Vorkommen an PCNA-AK in den INA-MSK untersucht. PCNA ist ein Protein, das bei der Mitose während der S-Phase die DNA umgibt, und eignet sich somit ideal zum aktiven Proliferationsnachweis.

Abbildung 12 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus dem ipsilateralen Striatum einer 6-OHDA-lädierten Ratte. Die Aufnahme wurde aus einem Hirnschnitt, 4,5 Monate nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  MSC, angefertigt. Es handelt sich um ein exemplarisches Bild, auf dem das rötlich markierte PCNA in einer grünlich (EGFP) markierten MSC zu sehen ist. Blau (DAPI) sind dabei wieder die Zellkerne markiert. Der Nachweis von PCNA in der MSC belegt die aktive Zellteilung dieser EGFP-markierten INA-MSK, 4,5 Monate nach der Applikation.



**Abbildung 13: Verteilung der für PCNA positiven MSC**

Analyse, 4,5 Monate nach der intranasalen Applikation von  $1 \times 10^6$  EGFP-MSK: Bulbus olfactorius (OB), Seitenventrikel (LV), Substantia nigra (SN), Striatum (striatum), Hippocampus (HC), Cortex (cort), Gesamtanzahl (total). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (n = 3).

Die für PCNA positiven, EGFP-markierten INA-MSC wurden, getrennt nach Seiten (ipsi- und kontralateral) und Hirnarealen, unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die Hirnschnitte wurden 4,5 Monate nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  MSC bei insgesamt 3 Untersuchungstieren angefertigt. Die Ergebnisse sind, extrapoliert auf  $1 \text{ mm}^3$ , in Abbildung 13 dargestellt.

Die größte Anzahl an PCNA-positiven MSC pro  $1 \text{ mm}^3$  zeigt sich im Striatum und Substantia nigra. Im Vergleich der ipsi- zur kontralateralen Seite zeigt sich eine signifikant größere Menge an proliferierenden MSC auf der ipsilateralen, lädierten Seite (Substantia nigra  $p < 0,001$ ; Striatum  $p < 0,01$ ).

Im Vergleich zwischen ipsilateraler und kontralateraler Seite der verbliebenen untersuchten Hirnareale zeigt sich statistisch nur beim Hippocampus ein signifikanter Unterschied von mehr PCNA-positiven MSC auf der ipsilateralen, lädierten Seite ( $p < 0,05$ ). Für die anderen Hirnstrukturen (Bulbus olfactorius, Cortex, Seitenventrikel) sind aufgrund der hohen Streuung keine statistisch signifikanten Verteilungsunterschiede feststellbar.

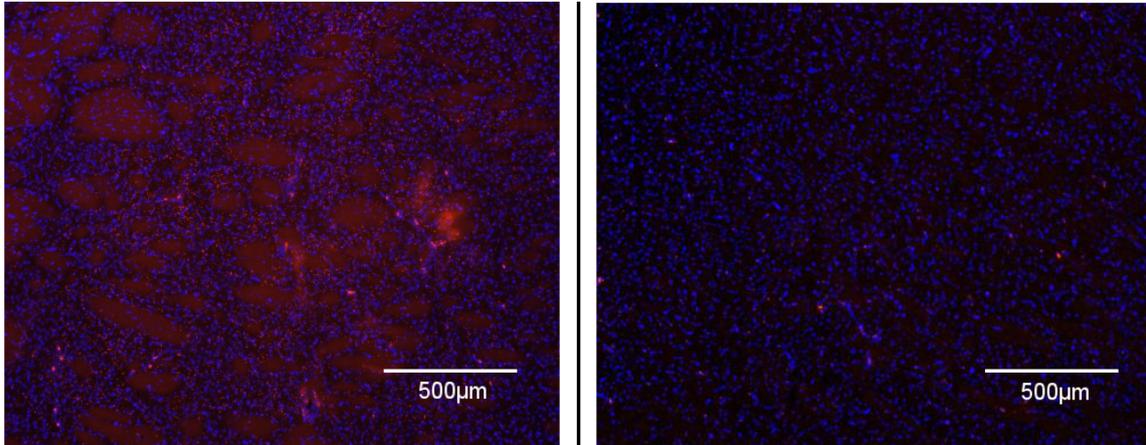
### **3.4 Therapeutischer Einfluss auf die dopaminerge Aktivität**

#### **3.4.1 Das Tyrosinhydroxylase-Vorkommen nach intranasaler Applikation von mesenchymalen Stammzellen**

Der Nachweis des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH), als Schlüsselenzym der Dopaminsynthese, dient der Beurteilung der dopaminergen Aktivität im Bereich der dopaminergen Neuronen (Striatum und Substantia nigra).

Die Auswirkung der INA-MSC auf die dopaminerge Aktivität im Bereich der 6-OHDA-lädierten Hirnstrukturen lässt sich am Vorkommen und der Menge an TH quantifizieren. Dazu wurde exemplarisch ein fluoreszenzmikroskopisches Bild des Striatums (Abbildung 14) und der Substantia nigra (Abbildung 15) ausgewählt. Bei allen Abbildungen handelt es sich um einen Ausschnitt der ipsilateralen Hirnhälfte, 4,5 Monate nach der Behandlung mit 6-OHDA. Der jeweils linke Ausschnitt, sowohl in Abbildung 14 als auch in Abbildung 15, ist eine Aufnahme aus der Zellgruppe nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$

EGFP-MSC. Der jeweils rechte Ausschnitt stammt von der Kontrollgruppe ohne INA-MSC, die ebenfalls 4,5 Monate nach der 6-OHDA-Behandlung untersucht wurde.

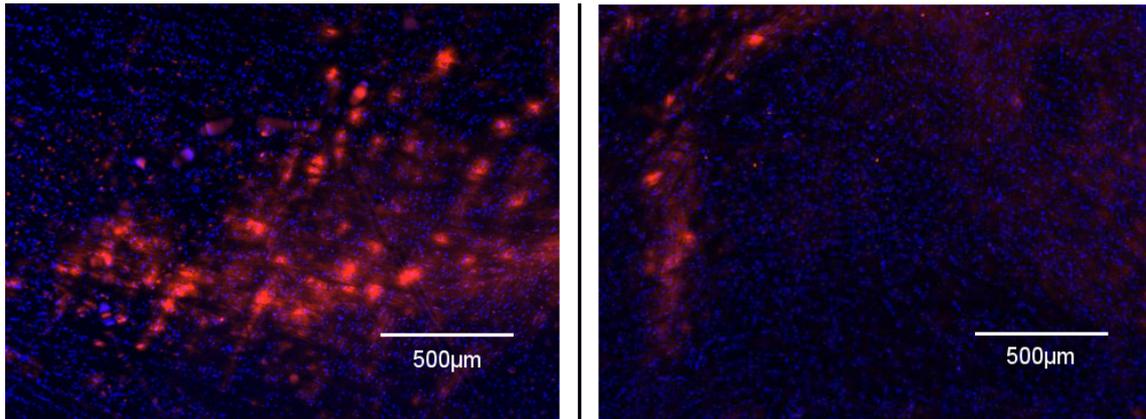


**Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Striatums**

Das Bild zeigt das Striatum von mit 6-OHDA behandelten Ratten (ipsilaterale Seite), 4,5 Monate nach (links), oder ohne (rechts) intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  EGFP-MSC. Die rote Färbung entspricht der Tyrosinhydroxylase. Die blauen Punkte sind die mit DAPI angefärbten Zellkerne.

Im linken Ausschnitt von Abbildung 14 ist, 4,5 Monate nach Behandlung mit INA-MSC, eine deutliche disseminierte, teils konfluierende rote Fläche zu sehen. Diese rötliche Färbung wird durch den rotfluoreszierenden TH-AK hervorgerufen und zeigt ein flächig verteiltes Vorkommen an TH im gesamten Bildausschnitt des Striatums der Zellgruppe. An Stellen, wo es zu einem deutlich konzentrierten TH-Vorkommen kommt, wie am rechten Teil des linken Ausschnittes, ist die Anfärbung hellrot.

Im Vergleich dazu ist die rötliche Fluoreszenz im rechten Ausschnitt von Abbildung 14, jene der Kontrollgruppe ohne INA-MSC, deutlich geringer ausgeprägt. Teilweise ist auch keine rötliche Fluoreszenz zu erkennen. Dieser Unterschied zeigt exemplarisch, dass 4,5 Monate nach Behandlung mit  $1 \times 10^6$  INA-MSC im 6-OHDA-Rattenmodell ein sichtbar höheres TH-Vorkommen im Striatum der Zellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen ist.



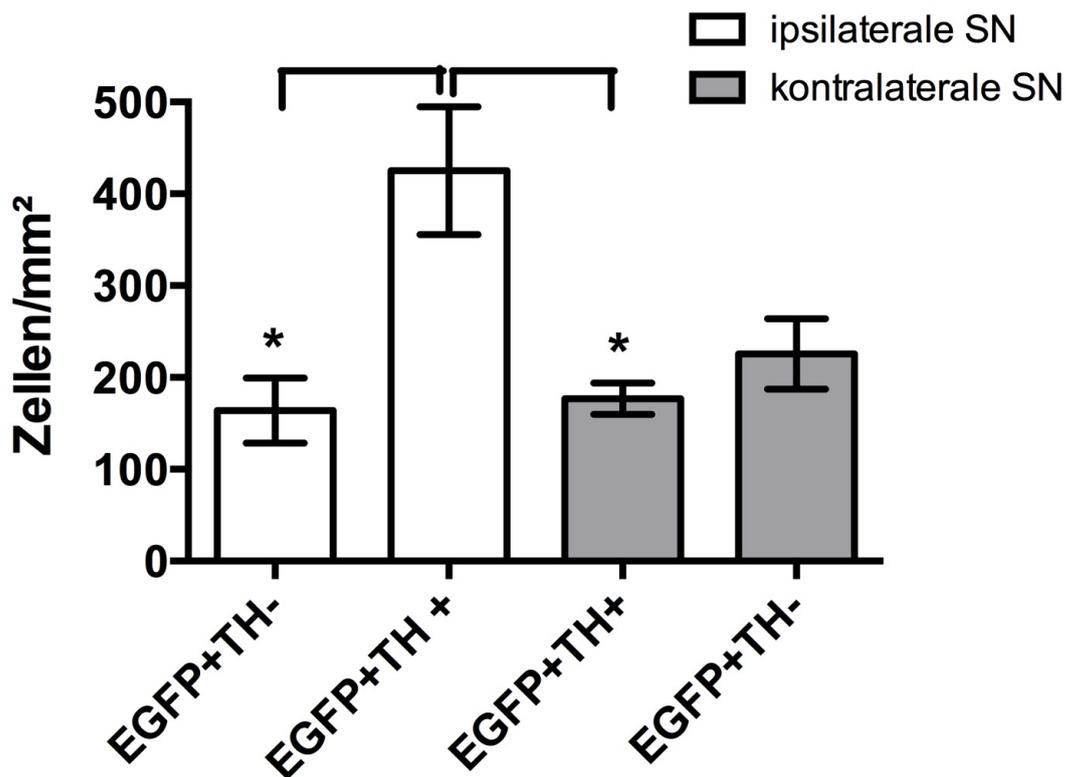
**Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Substantia nigra**

Das Bild zeigt die Substantia nigra von 6-OHDA behandelten Ratte (ipsilaterale Seite), 4,5 Monate nach (links), oder ohne (rechts) intranasale Applikation von  $1 \times 10^6$  EGFP-MSC. Die rote Färbung entspricht der Tyrosinhydroxylase. Die blauen Punkte sind die mit DAPI angefärbten Zellkerne.

Auch in der Abbildung der Substantia nigra (Abbildung 15) ist im linken Ausschnitt der Zellgruppe eine deutliche konfluierende, rote Fläche mit intensiven roten Stellen zu erkennen. Im Vergleich dazu ist im rechten Ausschnitt der Kontrollgruppe eine vergleichsweise geringe Menge an rötlicher Fluoreszenz zu sehen. Auch hier lässt sich also exemplarisch festhalten, dass 4,5 Monate nach Behandlung mit  $1 \times 10^6$  INA-MSC eine visuell deutlich größere Menge an TH in der Substantia nigra der Zellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen ist.

**3.4.2 Der Vergleich der Tyrosinhydroxylase exprimierenden MSC**

Dass INA-MSC in der Lage sind TH zu exprimieren, zeigt der Nachweis von TH-AK in unmittelbarer Nähe des EGFP-Signals einer INA-MSC. In Abbildung 16 ist die Verteilung dieser TH-exprimierenden INA-MSC zu sehen. Die Abbildung zeigt das Vorkommen in ipsi- und kontralateralen Substantia nigra in EGFP-MSC pro  $\text{mm}^2$ . Die verwendeten Hirnschnitte stammen von drei 6-OHDA-lädierten Ratten, 4,5 Monate nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  MSC.



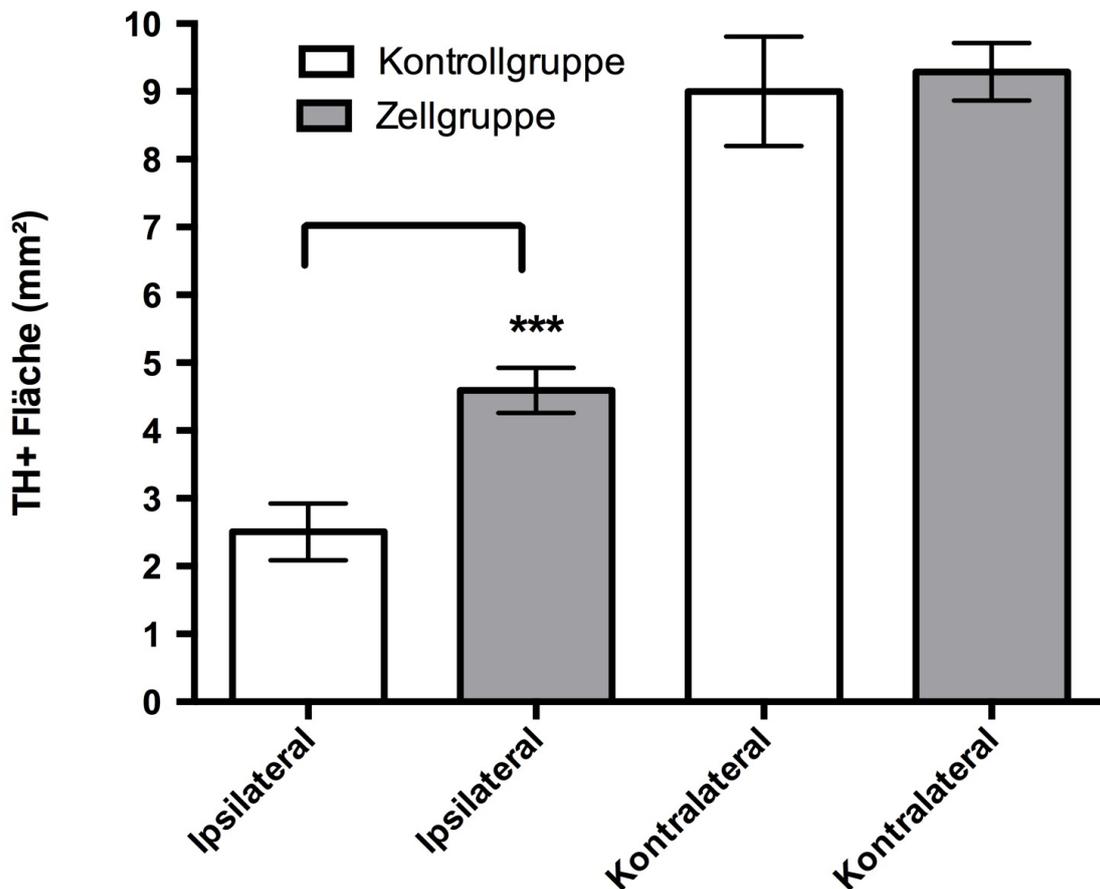
**Abbildung 16:** Anzahl der TH positiven (TH+) und TH negativen (TH-) EGFP-MSC pro mm<sup>2</sup> 4,5 Monate nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  MSC in der ipsilateralen, lädierten Substantia nigra (SN) und in der kontralateralen SN. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (n = 3).

Im Vergleich der TH-positiven MSC zeigt sich bei der lädierten, ipsilateralen Seite der Substantia nigra eine deutlich höhere Anzahl an TH-positiver MSC im Vergleich zur kontralateralen Seite (p < 0,05). In isolierter Betrachtung der ipsilateralen Seite sind auch hier deutlich mehr TH-positiv als TH-negative MSC (p < 0,05) zu finden. Während es auf der kontralateralen Seite keinen signifikanten Unterschied zwischen TH-positiven und TH-negativen MSC gibt.

Die Ergebnisse belegen damit, dass 6,7 Monaten nach INA-MSC, läsionsgerichtet in der Substantia nigra, signifikant mehr TH-exprimierende MSC existieren.

### 3.4.3 Die dopaminerge Aktivität im Empfängergewebe

Der Einfluss von INA-MSC auf das dopaminerge System im Empfängergewebe kann anhand der Messung der TH-positiven Flächen gezeigt werden. In Abbildung 17 ist dafür die gesamte, auf TH positive Fläche des ipsi- und kontralateralen Striatums von sechs 6-OHDA-lädierten Ratten dargestellt (n = 6). Die Resultate der Zellgruppen stammen von Ratten 4,5 Monate nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  Zellen. Als Kontrollgruppe dienten 6-OHDA-lädierte Ratten ohne MSC-Behandlung.



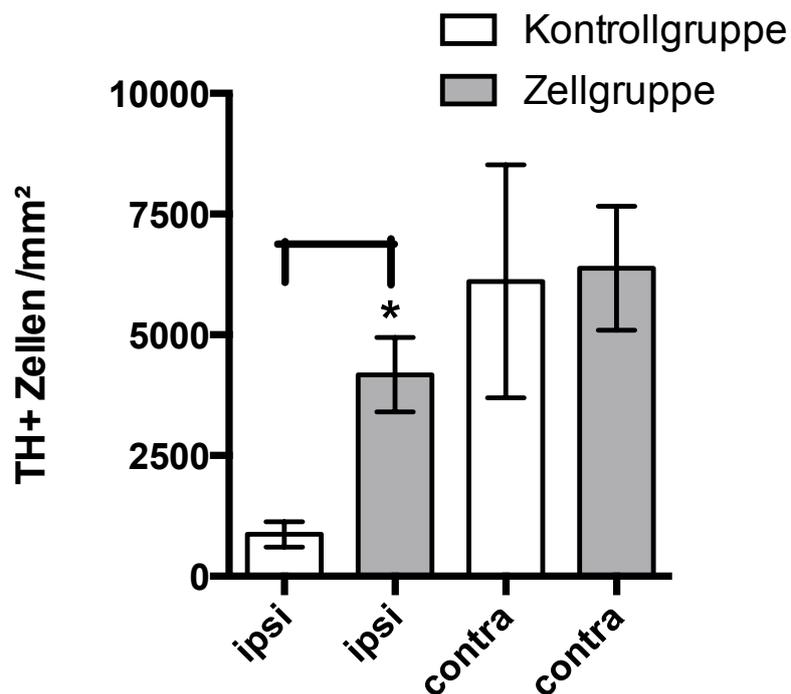
**Abbildung 17: Vergleich der TH-positiven Fläche (mm<sup>2</sup>) im ipsi- sowie kontralateralen Striatum der MSC-Gruppe (weiße Balken) und der Kontrollgruppe (graue Balken)**  
Die Tiere der MSC-Gruppe erhielten eine intranasale Applikation von  $1 \times 10^6$  EGFP-MSC. Die Auswertung erfolgte 4,5 Monate nach INA-MSC oder PBS Gabe, nach unilateraler Läsion mit 6-OHDA. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, (n = 6).

Die Ergebnisse zeigen, dass die TH-positive Fläche auf der ipsilateralen Seite der INA-MSC-Gruppe signifikant größer ist im Vergleich zur ipsilateralen Seite

der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Dieser Befund belegt eine erhöhte TH-Aktivität, gemessen an der größeren Fläche auf der lädierten Seite nach Behandlung mit INA-MSC im Vergleich zur Kontrollgruppe. Demgegenüber ist bei den nicht lädierten, kontralateralen Seiten der Zell- und Kontrollgruppe eine nahezu identische TH-positive Fläche ohne statistischen Unterschied festzustellen.

Sowohl in der Zell- als auch in der Kontrollgruppe ist die TH-positive Fläche auf der ipsilateralen, lädierten Seite im Vergleich zur kontralateralen Seite jeweils signifikant kleiner ( $p < 0,001$ ).

Neben der TH-positiven Fläche ist zur Analyse des therapeutischen Einflusses der INA-MSC auch die Anzahl aller TH-positiven Zellen pro Fläche beweiskräftig. Hierfür ist in Abbildung 18 die Anzahl der TH-positiven Zellen pro  $\text{mm}^2$  dargestellt.



**Abbildung 18: Vergleich der TH-positiven Zellen (pro  $\text{mm}^2$ ) im ipsi- sowie kontralateralen Striatum der MSC-Gruppe (weiße Balken) und der Kontrollgruppe (graue Balken)**  
 Die Tiere der MSC-Gruppe erhielten eine intranasale Applikation von  $1 \times 10^6$  EGFP-MSC. Die Auswertung erfolgte 4,5 Monate nach der unilateralen Läsion mit 6-OHDA. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ( $n = 6$ ).

Es zeigt sich, 4,5 Monate nach intranasaler Applikation von  $1 \times 10^6$  MSC, eine signifikant höhere Anzahl an TH-positiven Zellen in der ipsilateralen, lädierten Seite der Zellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,015$ ). Auf der kontralateralen Seite ist kein Unterschied zwischen Zell- und Kontrollgruppe festzustellen.

Zusammenfassend sind sowohl die TH-positiven Zellen als auch die TH-positive Fläche auf der ipsilateralen Seite der Zellgruppe, 4,5 Monate nach INA von  $1 \times 10^6$  MSC, signifikant größer im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### **3.4.4 Die Apoptose der Empfängergewebezellen**

Neben dem Einfluss der INA-MSC auf die Thyrosinhydroxylase und damit auf die dopaminerge Aktivität ist auch ein möglicher protektiver Effekt der MSC auf die Empfängergewebszellen wahrscheinlich. Durch die Analyse des Einflusses der INA-MSC auf die Apoptose kann dies genauer betrachtet werden. Zur Quantifizierung wurden DNA-Bruchstücke in den apoptotischen Zellen der Zell- und Kontrollgruppe mittels TUNEL markiert. Abbildung 20 zeigt die TUNEL-positiven Empfängergewebszellen im Striatum und der Substantia nigra, 4,5 Monate nach unilateraler 6-OHDA-Läsion der Zell- und der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der Kontrollgruppe jeweils auf der ipsilateralen, lädierten Seite im Striatum und der Substantia nigra eine deutlich erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur gesunden, kontralateralen Seite besteht (je  $p < 0,001$ ). Nach Behandlung mit INA-MSC zeigt sich eine signifikante Reduktion der Apoptose-Raten auf der ipsilateralen Seite im Vergleich zur Kontrollgruppe (Striatum:  $p < 0,01$ , Substantia nigra:  $p < 0,01$ ).

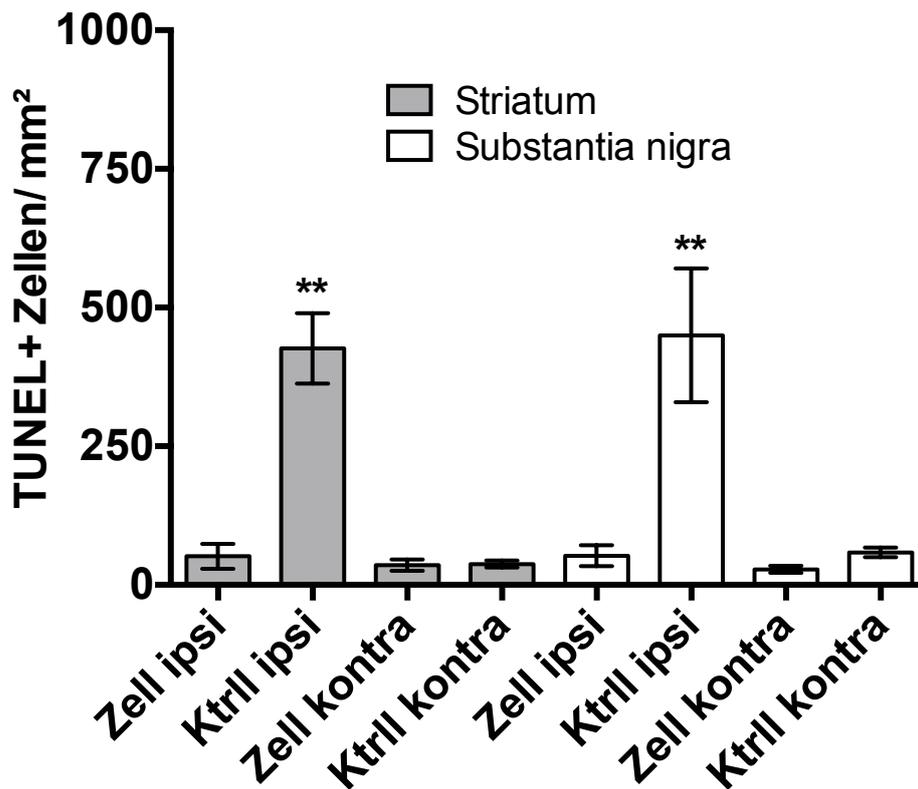


Abbildung 19: Vergleich der TUNEL-positiven Zellen (pro mm<sup>2</sup>) im ipsi- sowie kontralateralen Striatum (graue Balken) und in der Substantia nigra (graue Balken) in der MSC- (Zell) und Kontrollgruppe (Ktrll)

Die Tiere der MSC-Gruppe erhielten eine intranasale Applikation von  $1 \times 10^6$  EGFP-MSC. Die Auswertung erfolgte 4,5 Monate nach der unilateralen Läsion mit 6-OHDA. \*p < 0,05, p\*\* < 0,01, \*\*\*p < 0,001 (n = 6).

Auf der kontralateralen Seite bewegt sich die Apoptose-Rate in beiden Arealen auf einem niedrigen Niveau und war zwischen Zell- und Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden. Nach der Behandlung mit INA-MSC zeigt sich damit eine niedrigere Anzahl an TUNEL-positiven Zellen im Striatum und in der Substantia nigra, ohne signifikanten Unterschied zu der Apoptose-Rate der nicht lädierten, kontralateralen Seite.

## 4 Diskussion

### 4.1 Biodistribution und Migrationsrouten der INA-MSK

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 zeigen eine schnelle und zielgerichtete Biodistribution der intranasal applizierten MSC in das Gehirn der 6-OHDA-behandelten Ratten.

Die überwiegende Anzahl der intranasal applizierten MSC gelangte über die transnasale Route in das Gehirn. Ein Teil der Zellen wurde auch im Magen wiedergefunden, was am ehesten durch das Verschlucken der Zellsuspension zu erklären ist. Die in der Lunge nachgewiesenen MSC könnten jedoch ebenfalls über die Aspiration der Zellsuspension in das Lungengewebe gelangt sein. Auch eine Verteilung über die Blutbahn in verschiedene Organe erscheint möglich. Dafür wäre die Einwanderung der MSC durch die nasale Schleimhaut in die Blutgefäße eine Erklärung. Für einen möglichen Weg des Zelltransports über die Blutbahn spricht auch die relativ gleichmäßige Verteilung der MSC über die anderen untersuchten Organe hinweg.

Bei der Analyse der Verteilung der INA-MSK im Gehirn zeigten sich vier Stunden nach der Applikation die größten Zellmengen in dem Cerebellum, dem Cortex, dem Hirnstamm und dem Rückenmark. Diese Befunde scheinen zunächst den Ergebnissen einer anderen Studie aus 2009 (Danielyan et al., 2009) zur Biodistribution von INA-MSK, bei denen die meisten Zellen im Bulbus olfactorius gefunden wurden, zu widersprechen. In Danielyan et al. (2009) wurden jedoch die Hirnschnitte bereits eine Stunde nach intranasaler Applikation der MSC angefertigt und nicht erst nach vier Stunden. Daher ist in der hier vorgestellten Analyse, vier Stunden nach INA-MSK, von einer weiter vorangeschrittenen Migration auszugehen.

Zusammenfassend weisen die vorgestellten Resultate zur Biodistribution der INA-MSK zusammen mit den Ergebnissen aus Danielyan et al. 2009 auf eine

schnelle, zielgerichtete Verteilung der INA-MSC über die transnasale Route in das Gehirn hin.

Wie bereits ausführlich in Kapitel 1.3.4. vorgestellt ist der wahrscheinlichste Migrationsweg der MSC, um in das Gehirn zu gelangen, der perineurale Weg über den Nervus olfactorius und Nervus trigeminus. Dieser perineurale Weg bietet eine schnelle und sichere Möglichkeit, Moleküle über die Blut-Hirn-Schranke hinweg in das ZNS zu transportieren (s. Übersichtsartikel Jiang et al., 2011, Pardeshi and Belgamwar, 2013). Er eignet sich nachgewiesenerweise aber auch für MSC, um in das ZNS zu gelangen und von dort in verschiedene Strukturen des Großhirns und des Hirnstamms zu migrieren (Danielyan et al., 2009). Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit unterstützen diese Annahme von Danielyan et al., 2009.

Im ZNS angekommen verteilen sich die MSC dann hauptsächlich entlang der Routen des Liquor cerebrospinalis (Danielyan et al., 2009). Ein weiterer Grund für die recht rasche Verteilung der INA-MSC könnte auch an der in Kapitel 1.3.4 erläuterten „perivaskulären Pumpe“ liegen. Entlang des Raumes zwischen dem Endothel der Gefäße und der Basalmembran des umgebenden Gewebes verhält sich die „perivaskuläre Pumpe“ durch die arterielle Pulsation wie ein lymphatisches System. Dadurch können Moleküle parallel zum arteriellen Fluss, passiv und vor allem schnell, in das Parenchym des Gehirns transportiert werden (Danielyan et al., 2009). Dieser Mechanismus trug wahrscheinlich zusätzlich zu der schnellen Distribution der INA-MSC in der hier vorliegenden Arbeit bei.

Da die INA-MSC, vier Stunden nach der Applikation, vor allem Bereiche wie den Hirnstamm und das Rückenmark erreicht haben, scheint die intranasale Applikation besonders geeignet für Erkrankungen, die mit diesen Bereichen assoziiert sind (Danielyan et al., 2011). Dazu gehören neben dem Morbus Parkinson auch Erkrankungen wie Hirnstamminfarkte, Amyotrophe Lateralsklerose, Multiple Sklerose oder traumatische Verletzungen (Danielyan et al., 2011).

Bei dem Versuchsaufbau in der vorliegenden Arbeit wurde den Tieren vor der INA-MS-C-Gabe das Enzym Hyaluronidase intranasal appliziert. Dies sollte dazu beitragen die Membranbarriere der Schleimhaut in der Nasenhöhle zu schwächen und so den MSC den Zugang zur transnasalen Route zu erleichtern. Dieser Effekt der Hyaluronidase wurde bereits für Bakterien (Zwijnenburg et al., 2001) und für INA-MS-C in einer Pilotstudie (Danielyan et al., 2009) belegt. Die Hyaluronidase-Behandlung ist daher wahrscheinlich auch an der schnellen und zielgerichteten Migration in das ZNS beteiligt.

#### **4.2 Läsionsgerichtete Anreicherung und Überleben der INA-MS-C**

Die läsionsgerichtete Anreicherung und auch das Überleben der INA-MS-C im 6-OHDA-Rattenmodell, 6,7 Monate nach ihrer Applikation, konnte mit den Ergebnissen in Kapitel 3.2 gezeigt werden.

Diese fluoreszenzmikroskopisch quantifizierte, läsionsgerichtete Migration in 6-OHDA-lädierte Hirnstrukturen, wie Substantia nigra und Striatum, wurde durch zusätzliche Untersuchungen von Danielyan et al. 2011 bestätigt. Dort zeigte sich in einer molekularchemischen Messung der Nachweis von lokal erhöhten Mengen an Migration beeinflussenden Proteinen in der ipsilateralen Substantia nigra und dem Striatum. Unter anderem konnte das Protein Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) nachgewiesen werden. Dieses Protein scheint einen migrationsstimulierenden Einfluss zu haben (Danielyan et al., 2011). BDNF spielt möglicherweise auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle. Bei Untersuchungen zu Morbus Alzheimer wurden sowohl beim Menschen als auch bei Ratten eine deutlich erhöhte BDNF-Konzentration im betroffenen Hirngewebe gemessen (s. Übersichtsartikel Nagatsu et al., 2000, s. Übersichtsartikel Tayebati et al., 2013).

Einzelne Beobachtungen aus Kapitel 3.2.2. zeigen eine auffällige Nähe von INA-MS-C zu besonders vulnerablen Strukturen wie kleinen Gefäßen oder

Nervenfasern. Auch dies kann ein Hinweis auf die läsionsgerichtete Anreicherung sein.

### **4.3 Differenzierung und Proliferation der INA-MSC im Empfänger-gewebe**

Die Fähigkeit der INA-MSC zur Proliferation im 6-OHDA-Rattenmodell konnte mit den Ergebnissen in Kapitel 3.3. durch den Nachweis der PCNA-Expression gezeigt werden. Die PCNA-Expression war dabei 4,5 Monate nach der Applikation der MSC hauptsächlich in den lädierten Strukturen, der Substantia nigra und dem Striatum zu beobachten.

Ergänzend zu den im Ergebnisteil aufgeführten Daten bestätigten Danielyan et al. (2011), auf der Basis der gleichen Proben, dass insgesamt 3,2 % der INA-MSC nach 4,5 Monaten PCNA exprimierten.

Da die proliferierenden Zellen mehrheitlich in der lädierten Hirnseite auftraten, ist davon auszugehen, dass die INA-MSC hauptsächlich dort zur Proliferation stimuliert werden. Ein möglicher molekularchemischer Stimulus der Proliferation ist dabei das erwähnte BDNF (Danielyan et al., 2011). Die proliferationsfördernde Wirkung von BDNF auf MSC wurde in einer In-vitro-Studie belegt (He et al., 2015).

In der nicht lädierten Hemisphäre war die Anzahl der proliferierenden MSC sehr gering. Dieser Befund lässt auf einen geringen Einfluss der INA-MSC auf das intakte Empfängergewebe schließen, während durch Proliferation ein anhaltender Einfluss im Bereich der lädierten Strukturen zu erwarten ist. Diese Befunde unterstützen somit die Annahme einer Proliferation von MSC im lädierten Gewebe.

Dass die INA-MSC im 6-OHDA-Rattenmodell die Fähigkeit besitzen sich in funktionelle, neuronartige Zellen zu differenzieren, belegen die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.

4,5 Monate nach der Applikation der MSC zeigte sie eine signifikante Anhäufung von zellausläuferbildenden MSC in der Substantia nigra und dem Striatum der Zellgruppe. Neben der Ausläuferbildung als

Differenzierungszeichen konnte auch die TH-Expression in den INA-MSC im Bereich der lädierten Strukturen nachgewiesen werden. Beides ist als Beleg für die Differenzierung der MSC in funktionelle, neuronartige Zellen zu werten. Dabei zeigt sich wieder eine Differenzierung der INA-MSC in den lädierten Strukturen im 6-OHDA-Rattenmodell.

Es konnte in vorherigen Studien nachgewiesen werden, dass MSC in der Lage sind sich in neuronartige Zellen vom cholinergen Phänotyp zu differenzieren (Woodbury et al., 2000). Sie zeigen dabei nicht nur einen ähnlichen Phänotyp wie Neuronen, sondern produzieren auch in über 80 % der Fälle neuronentypische Enzyme und Proteine, wie neuronenspezifische Enolase (NSE) oder Neurofilament-M (NF-M) (Woodbury et al., 2000). Nach der Differenzierung in neuronartige Zellen können INA-MSC dann auch selbst TH exprimieren (Danielyan et al., 2011 und Kapitel 3.4.1-2), womit sich ein Teil des therapeutischen Effekts der INA-MSC erklären lässt.

#### **4.4 Therapeutischer Einfluss der INA-MSC auf das 6-OHDA-lädierte Empfängergewebe**

Neben der TH-Expression der neuronartig differenzierten MSC ist zur Beurteilung des therapeutischen Effekts der INA-MSC vor allem der Einfluss auf das absolute TH-Vorkommen im Bereich der lädierten Strukturen von Bedeutung.

Da der TH-Gehalt als Maß für die Dopamin-Synthese von großer Wichtigkeit ist, wurden in Kapitel 3.4. die gesamte TH-positive Fläche sowie sämtliche TH-positiven Zellen in den Hirnschnitten analysiert. Die Ergebnisse belegen, 4,5 Monate nach INA-MSC, eine eindeutige und signifikant vergrößerte TH-positive Fläche sowie eine signifikant erhöhte Anzahl an TH-positiven Zellen in den lädierten Bereichen der Substantia nigra und des Striatums.

Die hier gezeigten Resultate mit den signifikant vermehrten TH-positiven Zellen und der vergrößerten TH-positiven Fläche in der ipsilateralen Substantia nigra und Striatum wurde in Danielyan et al. (2011) mittels Western-Blot-Analyse

bestätigt. Es zeigte sich, dass das gemessene TH-Vorkommen in der ipsilateralen Seite der INA-MSK Zellgruppe signifikant größer war als jenes in der ipsilateralen Seite der nicht mit INA-MSK behandelten Kontrollgruppe.

Die im Ergebnisteil aufgeführten Resultate zeigen eine deutlich größere TH-positive Fläche in der Zellgruppe, als es mit dem im Verhältnis zur TH-positiven Fläche geringeren Anstieg der TH-positiven MSK zu erklären ist. Daher ist davon auszugehen, dass die INA-MSK auch über eine Neuroprotektion der noch intakten dopaminergen Neuronen (siehe Kapitel 4.5.1) des dopaminergen Systems im lädierten Empfängergewebe wirken (Danielyan et al., 2011).

Diese These wird mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.4. unterstützt. Hier konnte gezeigt werden, dass es 4,5 Monate nach INA-MSK zu einer Reduktion des natürlichen Zelltods (Apoptose) im Bereich der lädierten Strukturen kommt. Anhand der TUNEL-Quantifizierung zeigte sich eine deutliche und signifikante Reduktion der Apoptoseaktivität im Bereich der lädierten Struktur nach INA-MSK. Durch diese neuroprotektive Eigenschaft der INA-MSK kann angenommen werden, dass der Zelluntergang der noch nicht degenerierten dopaminergen Neuronen verzögert bzw. reduziert wird (siehe Kapitel 3.4.4). In der Gesamtbetrachtung scheint der neuroprotektive Effekt der INA-MSK auf das Empfängergewebe sogar einen höheren therapeutischen Einfluss zu haben als die funktionelle Differenzierung der MSK (Danielyan et al., 2011).

Da der Nachweis von TH letztendlich nur das Vorkommen des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Dopaminsynthese, aber nicht die Veränderung des Dopamingehalts direkt wiedergibt, haben Danielyan et al. 2011 ergänzend zu den hier vorgestellten Ergebnissen die direkte Bestimmung der Dopaminkonzentration (ng/mg Gewebe) pro Hirnhemisphäre in Zell- und Kontrollgruppe durchgeführt. Dort zeigte sich, 4,5 Monate nach INA von  $1 \times 10^6$  MSK, in der ipsilateralen Seite ein ähnlicher Dopamingehalt wie in der nicht lädierten kontralateralen Hemisphäre der Zellgruppe. Es war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. Als Gegenprobe zeigte sich in der

Kontrollgruppe ein deutlich erniedrigtes Dopaminniveau in der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre (Danielyan et al., 2011). Es zeigte sich damit ein deutlicher Anstieg der Dopaminkonzentration nach der Behandlung mit INA-MSC im 6-OHDA-Rattenmodell.

## **4.5 Weitere Effekte der INA-MSC im 6-OHDA-Rattenmodell**

### **4.5.1 Anti-inflammatorische Wirkung der INA-MSC**

In einer weiterführenden Untersuchung im gleichen 6-OHDA-Rattenmodell führten Danielyan et al. 2011 Messungen zur anti-inflammatorischen Wirkung von INA-MSC durch. So zeigte sich, 4,5 Monate nach der Gabe von Salzlösung, in der 6-OHDA-lädierten Hirnhemisphäre von Ratten der Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine Interleukin-(IL)-1 beta, IL-2, IL-6, IL-12, Tumornekrose-Faktor-(TNF- $\alpha$ ), Interferon-(IFN- $\gamma$ ) und Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating factor (GM-CSF) (Danielyan et al., 2011). In der Zellgruppe kam es 4,5 Monate nach INA-MSC zu einer signifikanten Reduktion dieser inflammatorischen Zytokine in den lädierten Hirnstrukturen (Danielyan et al., 2011).

Eine vermehrte Expression inflammatorischer Zytokine wurde bereits in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungsmodellen (Morbus Parkinson (s. Übersichtsartikel Hirsch and Hunot, 2009) und bei Morbus Alzheimer (Patel et al., 2005; Danielyan et al., 2010)) gefunden.

Ein weiterer Beleg für die anti-inflammatorische Wirkung der MSC ist ihr Potential die Aktivierung von natürlichen Killerzellen und T-Zellen zu unterdrücken (Krampera et al., 2003, Sotiropoulou et al., 2006).

Dies zeigt die Fähigkeit der INA-MSC zu einem anti-inflammatorischen Einfluss im Bereich neurodegenerativer Erkrankungen. In dem hier vorgestellten 6-OHDA-Parkinsonmodell beruhen die anti-inflammatorischen, therapeutischen Effekte der INA-MSC neben der Reduktion der Apoptose auch auf einer Reduktion der erwähnten inflammatorischen Zytokine (Danielyan et al., 2011).

#### **4.5.2 Klinischer Effekt der INA-MSC im 6-OHDA-Rattenmodell**

Bisher wurden metabolische Veränderungen als Beleg für den therapeutischen Effekt der INA-MSC im 6-OHDA-Rattenmodell aufgezeigt. Daneben kann bei den INA-MSC-behandelten Tieren aber auch eine verbesserte klinisch-motorische Funktion belegt werden (Danielyan et al., 2011). Hierfür wurde das „stepping ratio“ der Vorderpfoten zur Bestimmung der sensomotorischen Dysfunktion durch Danielyan et al. (2011) angewandt. Die sensomotorische Funktion ist auch bei menschlichen Parkinson-Patienten beeinträchtigt (Mukhida et al., 2001). Durch den klinischen Test des „stepping ratio“ wird das Verhältnis zwischen einer motorischen Lafeinheit der rechten und der linken Vorderpfote gemessen. Dies entspricht dem Verhältnis zwischen der motorischen Einheit der lädierten und der gesunden Hirnhälfte (Danielyan et al., 2011). Ab dem 50. Tag nach INA der MSC zeigte sich eine signifikante Laufverbesserung in der Zellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Danielyan et al., 2011). Auch die motorische Kontrolle der Vorderpfoten konnte durch die INA-MSC deutlich verbessert werden (Danielyan et al., 2011).

Dagegen zeigte sich bei der läsionsbedingten Dysbalance zwischen beiden Hemisphären nur eine geringfügige Verbesserung (Danielyan et al., 2011). Danielyan et al. (2011) vermuteten, dass diese klinischen Beobachtungen ein Indiz für eine ausgeprägtere Regeneration der dopaminergen Aktivität in der Substantia nigra als im Striatum ist.

#### **4.6 INA-MSC bei neurodegenerativen Erkrankungen**

Auch in anderen Studienmodellen zu degenerativen ZNS-Erkrankungen erwies sich die intranasale Applikation von mesenchymalen Stammzellen als vielversprechende Therapiealternative. Nachfolgend werden einige dieser Erkrankungsmodelle kurz vorgestellt.

## Zerebrale Ischämie

In einem Erkrankungsmodell mit neonatalen Mäusen wurde eine zerebrale, hypoxische Ischämie induziert. Nach intranasaler Applikation von MSC kam es zu einer signifikanten Verbesserung der sensomotorischen Funktion sowie zur Reduktion des grauen und weißen Substanzverlustes um mehr als ein Drittel im Vergleich zur Kontrollgruppe (van Velthoven et al., 2010).

In einem anderen Mäusemodell, ebenfalls zur zerebralen Ischämie, kam es nach der intranasalen Gabe von MSC zu ähnlichen, positiven Resultaten. Es zeigte sich eine signifikante Regeneration der degenerierten Hirnrinde und des Hippocampus sowie eine Verringerung der reaktiven Gliose im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne INA-MSC-Therapie (Donega et al., 2014).

Bei einem Rattenmodell des neonatalen, hypoxischen Hirnschadens zeigten die INA-MSC, nach Aussage der Autoren, eine Neuroprotektion der noch intakten, nativen Neuronen. Es konnte auch eine Verbesserung der neurovaskulären Regeneration und der funktionellen Regeneration festgestellt werden (Wei et al., 2015).

In einem Rattenmodell zur spinalen Läsion führte die INA von MSC zu einer signifikanten Verbesserung der motorischen Funktion der Hinterläufe und zu einer Verringerung der Läsionsgröße (Ninomiya et al., 2015). Allerdings erwiesen sich die in diesem Modell chirurgisch, intrathekal applizierten MSC, im Vergleich zu den intranasal applizierten MSC, als geringfügig effektiver (Ninomiya et al., 2015). Bei dieser methodisch postulierten Überlegenheit des chirurgischen Verfahrens gegenüber der intranasalen Gabe wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass bei der nicht invasiven, intranasalen Applikation durch wiederholte Gabe der therapeutische Effekt gesteigert werden kann. Ein chirurgischer Eingriff ist weitaus komplikationsreicher und aufwendiger als die intranasale Applikation.

In einer anderen Studie mit Mäusen wurde ein ischämischer Schlaganfall artifiziell induziert. Einen Tag darauf wurden „Hypoxia pre-conditioned bone marrow MSC“ (HP-BMSC) intranasal appliziert. In der Folge zeigte sich eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens und der infarktbedingten

neurologischen Defizite sowie eine Verbesserung des Blutflusses in der ischämischen Region (Wei et al., 2012).

### Morbus Alzheimer

Die intranasale Applikation von nicht zellulären Neurotherapeutika scheint laut zahlreicher Studien eine vielversprechende Therapieoption für Morbus Alzheimer zu sein (s. Übersichtsartikel Sood et al., 2014). Versuche mit intranasal applizierten Zellen stehen noch am Anfang. Bisher wurde in einer Studie die erfolgreiche Migration von EGFP-Makrophagen, nach intranasaler Applikation in das ZNS im transgenen Mäusemodell (APP/PS1) gezeigt (Danielyan et al., 2014). Untersuchungen zur intranasalen Applikation von MSC und/oder deren therapeutischen Effekten stehen zum aktuellen Zeitpunkt noch aus.

### Autoimmune Enzephalomyelitis

In einem Mausmodell zur Autoimmunen Enzephalomyelitis sind INA-MSC, die einen Myelin-Oligodendrozyten-spezifischen Rezeptor exprimierten, in das ZNS migriert. Nach der Behandlung von INA-MSC konnte die Ausprägung der Krankheitssymptome im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert werden (Fransson et al., 2014).

Auch bei nicht neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel Tumorerkrankungen, scheinen INA-MSC eine vielversprechende Therapieoption zu sein. So konnte in einem Mäusemodell für Glioblastoma multiforme die Überlebensrate der Mäuse nach intranasaler Applikation von TNF-related Apoptosis-inducing ligand exprimierenden-MSC signifikant erhöht werden (Balyasnikova et al., 2014).

#### **4.6.1 Vorteile der intranasalen Applikation**

Bei der intranasalen Applikation handelt es sich um eine schonende, nicht invasive und kosteneffiziente Methode. Sie stellt eine Möglichkeit dar, um Stoffe und Zellen wie MSC, welche nach systemischer Applikation die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden würden, zielgerichtet in das ZNS zu transportieren. Nach dem aktuellen Kenntnisstand sind ungewollte, periphere Nebenwirkungen gering, da sich die intranasal applizierten Stoffe nur in einem geringen Maße extrazerebral verteilen (s. Übersichtsartikel Chapman et al., 2013).

Die intranasale Applikation von Zellen wie MSC stellt eine nicht invasive Alternative zur aktuell durchgeführten chirurgischen Transplantation dar und bietet die Möglichkeit der komplikationsarmen, wiederholten Anwendung. Dadurch kann potentiell die Anzahl der therapeutischen Zellen und damit deren therapeutischer Effekt erhöht werden (Danielyan et al., 2011).

#### **4.6.2 Vorteile der mesenchymalen Stammzellen**

Die MSC sind mit einer komplikationsarmen Punktion leicht aus dem Knochenmark zu isolieren. Ethische Bedenken wie bei der Gewinnung von fetalen Stammzellen bestehen nicht. Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen können autologe Zellen, also Zellen aus Organismus des Empfängers, verwendet werden (Dezawa et al., 2005). Eine Isolierung der MSC ist dabei bei erwachsenen Menschen in jedem Alter möglich (Dezawa et al., 2005).

#### **4.6.3 Sicherheit der intranasal applizierten mesenchymalen Stammzellen**

Bisher konnte bei keiner durchgeführten Studie mit INA-MSK eine Tendenz zur Entartung oder zu schwerwiegenden Komplikation festgestellt werden. Die aufgrund ihres ausdifferenzierteren Stadiums anzunehmende geringere Entartungstendenz im Vergleich zu ESC sowie die Sicherheit und Effizienz von

INA-MSK über einen längeren Zeitraum muss jedoch noch weiter erforscht werden.

#### **4.7 Kontroverse Ergebnisse zu INA-MSK im Parkinsonmodell**

Die Gruppe um Bossolasco et al. (2012) analysierte in einem ähnlichen 6-OHDA-Rattenmodell intranasal applizierte humane Stammzellen in vivo mit der „Live-imaging“-Methode. Dabei konnten sie, konträr zu den hier vorgestellten Ergebnissen, die INA-Zellen ausschließlich in der Nasenhöhle und nicht im Gehirn nachweisen (Bossolasco et al., 2012).

Der fehlende Nachweis der Migration in das ZNS ist möglicherweise methodisch bedingt. Zum einen könnten sich menschliche MSC in Ratten anders verhalten als MSC von Ratten. Allerdings wurde eine erfolgreiche Migration in das ZNS von humanen (<sup>111</sup>In-)oxin-markierten MSC nach INA in einem intrakraniellen Maus-Glioblastommodell bereits via Magnetresonanztomographie in vivo und mit Fluoreszenzmikroskopie postmortem nachgewiesen (Balyasnikova et al., 2014).

Wahrscheinlicher ist deswegen, dass die bei Bossolasco et al. (2012) verwendete „Live-imaging“-Methode eine zu geringe Sensitivität besitzt und die Ergebnisse daher falsch-negativ sind. Bislang wurde diese Methode noch in keinem anderen Erkrankungsmodell für die Nachverfolgung von INA-MSK verwendet.

Eine weitere Arbeitsgruppe um Chartoff et al. (2011) untersuchte die Migration von EGFP-MSK nach intranasaler Applikation in Mäusen. Diese Gruppe kam zu dem Schluss, dass die intranasal applizierten MSC, anders als die chirurgisch direkt implantierten Zellen der Vergleichsgruppe, weder in das ZNS migrierten noch dort überlebten. Zwar war in den Ex-vivo-Analysen nach der intranasalen Applikation von MSC eine typische EGFP-Fluoreszenz sichtbar, diese sei jedoch nach Ansicht der Autoren als Autofluoreszenz der umgebenen

Gewebzellen zu werten und nicht als Zeichen für die erfolgreiche Migration der INA-MSCs (Chartoff et al., 2011).

Auch andere Autoren berichteten in der Vergangenheit von den Schwierigkeiten zwischen Artefakten, wie einer möglichen Autofluoreszenz und tatsächlichen EGFP-Signalen, zu unterscheiden (Jackson et al., 2004, Billinton and Knight, 2001, Brazelton and Blau, 2005).

Die dargestellten Kritikpunkte widersprechen damit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation, sind aber aus nachfolgenden Gründen nicht vergleichbar. Im Vergleich zu Chartoff et al. (2011) wurde in dem hier vorgestellten Rattenmodell die sechsfache Menge an applizierten Zellen verwendet. Darüber hinaus wurden die fluoreszenzmikroskopisch gesicherten Daten zusätzlich durch eine nachträgliche DNA-Quantifizierung in der Menge und im Vorkommen zweifelsfrei bestätigt (Danielyan et al., 2011). Dadurch konnte eindeutig belegt werden, dass es sich bei den positiven EGFP-Signalen, die zur fluoreszenzmikroskopischen Auszählung herangezogen wurden, nicht um eine Autofluoreszenz der umgebenden Gewebzellen handelte.

Eine mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis von INA-MSCs bei Chartoff et al. (2011) könnte die verwendete mechanische und nicht medikamentöse (wie z. B. durch 6-OHDA) Läsion des Striatums sein. Eine chirurgische Läsion des Striatums kann nachweislich zu einer Gewebsreaktion und damit zur Abstoßung der MSCs führen (Coyne et al., 2007).

#### **4.8 Dopaminerges Zellersatz im Menschen**

Die meisten Ansätze zur Substitution degenerierter, dopaminerges Neuronen bei Morbus Parkinson am Menschen konzentrierten sich bisher auf die Transplantation von fetalem dopaminerges Gewebe oder daraus isolierten dopaminerges Zellen (s. Übersichtsartikel Gerlach et al. 2007).

Freed et al. (2001) führten bei einer Gruppe von 40 Patienten mit schwerem Morbus Parkinson entweder eine Scheinoperation oder die Transplantation von humanen, embryonalen dopaminerges Neuronen in das bilaterale Putamen durch. Die transplantierten Neurone überlebten zwar nach einem Jahr, zeigten

aber nur bei Patienten unter 60 Jahren einen klinischen Effekt im Sinne einer milden Reduktion der Parkinsonsymptome (Freed et al., 2001). Nach einer initialen Verbesserung kam es bei 15 % der Patienten zur Ausbildung von Dystonien und Dyskinesien. Die Obduktion verstorbener Patienten belegte jedoch eine gute Reinnervation des Transplantats mit Aussprossung in das gesamte Putamen (Freed et al., 2001). Bei diesem Therapieansatz müssen die möglichen Komplikationen und Einschränkungen aufgrund der Operation sowie der Einsatz von Neuronen embryonalen Ursprungs als kritisch angesehen werden.

#### **4.9 Intranasale Applikation in weiteren Erkrankungsmodellen**

Die bei ZNS-Erkrankungen angewendeten therapeutischen Medikamente können nur sehr eingeschränkt (< 1 %) nach systemischer Gabe (intravenös oder per os) die Blut-Hirn-Schranke überwinden (s. Übersichtsartikel Stockwell et al., 2013). Die Möglichkeit die Blut-Hirn-Schranke mittels INA via der transnasalen Route zu umgehen wurde in präklinischen und klinischen (Medikamente) Studien gezeigt. Metanalysen belegen die Sicherheit der Methode für Medikamente wie Oxytocin, Steroide, Insulin und Midazolam (s. Übersichtsartikel MacDonald et al., 2011, s. Übersichtsartikel Wolfe and Macfarlane, 2006, s. Übersichtsartikel Nathan, 2011, s. Übersichtsartikel Shemesh et al., 2012).

Bei der Behandlung von Krampfanfällen (Epilepsien) konnte mit intranasal applizierten Benzodiazepinen (z. B. Midazolam) ein schnelleres Durchbrechen des Krampfereignisses bei geringer Dosierung erreicht werden (Zwijnenburg et al., 2001).

Intranasal appliziertes Midazolam erwies sich bei Kindern mit anhaltender oder symptomatischer Epilepsie im Vergleich zu rektal appliziertem Midazolam als deutlich effektiver (Lahat et al., 1998). Die Überlegenheit dieser Applikationsform und die einfache Anwendung während des Anfallereignisses

brachte die Diskussion auf, die intranasale Methode als neuen Goldstandard zu etablieren (s. Übersichtsartikel Wolfe and Macfarlane, 2006).

Die intranasale Applikation von Insulin verbessert bei Alzheimer-Patienten die deklarative Denkfähigkeit (Benedict et al., 2004), die Gedächtnisfunktion und metabolische Integrität des Gehirns (Craft et al., 2012) sowie die Funktion des verbalen Gedächtnisses (Reger et al., 2008) und stellt damit eine vielversprechende Therapie- und Präventionsoption dieser Erkrankung dar (s. Übersichtsartikel Freiherr et al., 2013).

Durch die intranasale Applikation von Glutathion könnten die bei oxidativem Stress gebildeten freien Radikale, wie sie bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson vorkommen, reduziert werden (Owen et al., 1996). Die Sicherheit von intranasal applizierten Glutathion wurde bereits belegt (Mischley et al., 2013). Ergebnisse zur Wirksamkeit stehen noch aus.

Aktuell (2017) werden verschiedene Studien am Menschen zur intranasalen Applikation von therapeutischen Substanzen durchgeführt. Unter anderem gibt es eine Studie zur INA von Fentanyl bei der Behandlung chronischer Schmerzen bei Krebspatienten (Stein et al., o. D.). Eine andere Studie zu INA von Oxytocin untersucht den Effekt auf das Verhalten von Adoleszenten (Vulliez-Coady et al. o.D.). In einer weiteren Studie wird die Wirkung von INA Insulin auf die Verbesserung kognitiver Funktionen bei Morbus Alzheimer untersucht (Burns et al., o. D.). Auch gibt es eine Studie zur INA von Glutathion mit der Frage zur Verbesserung der Symptomatik bei Morbus Parkinson (Mischley et al. o.D.). Die jeweiligen Studienergebnisse sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht.

#### 4.10 Fazit

Zusammengefasst belegen die Daten der vorliegenden Dissertation, ergänzt durch die zusätzlichen Ergebnisse von Danielyan et al. (2011), die schnelle (vier Stunden) Migration von INA-MSC in das ZNS im 6-OHDA-Rattenmodell und eine zielgerichtete Anreicherung der Zellen in den lädierten Strukturen (Striatum, Substantia nigra). Die INA-MSC überleben im Empfängergewebe über mehrere Monate und zeigen nach dieser Zeit die Proliferation und Differenzierung in neuronartigen Zellen. Eine deutlich erhöhte TH-Aktivität (TH-Fläche, TH-positive Zellen) korreliert dabei mit der Anwesenheit der INA-MSC in den lädierten Arealen, was für einen positiven therapeutischen Effekt spricht. Auch scheinen die funktionell, neuronartig differenzierten INA-MSC selbst in der Lage zu sein, TH zu exprimieren. Die INA-MSC können klinisch läSIONSbedingte Defizite verbessern, was möglicherweise neben der Differenzierung zu funktionellen, neuronartigen Zellen auf einer neuroprotektiven und anti-inflammatorischen Wirkungen der INA-MSC im 6-OHDA-Rattenmodell beruht (Danielyan et. al 2011). Es zeigt sich sowohl das Potential der INA-MSC die Apoptose und inflammatorische Zytokine im Empfängergewebe zu reduzieren als auch die TH- und Dopamin-Dysbalance zwischen lädiertes und nicht lädiertes Hirnhälfte auszugleichen (Danielyan et. al 2011). Bis zum therapeutischen Einsatz dieser Methode bei Parkinson-Patienten bedarf es jedoch noch zahlreicher präklinischer und klinischer Untersuchungen zur Durchführbarkeit, Therapiedauer und zu den Langzeitauswirkungen.

## 5 Zusammenfassung (Abstract)

Die Parkinson-Krankheit ist eine der am häufigsten auftretenden, letal verlaufenden, neurodegenerativen Erkrankungen weltweit. Multipotente mesenchymale Stammzellen (MSC) stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen dar. Bei der Entwicklung MSC-basierter Therapiekonzepte sind die Erforschung geeigneter Applikationswege und die Sicherstellung des Überlebens der MSC die größten Herausforderungen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Biodistribution sowie den Effekt auf dopaminerge Neurone von intranasal applizierten MSC (INA-MSC) in dem unilateral lädierten 6-Hydroxydopamin-(6-OHDA)-Rattenmodell der Parkinson-Krankheit.

Nach der intranasalen Applikation von MSC zeigte sich eine schnelle Biodistribution der Zellen in das ZNS (nach vier Stunden). Nach 4,5–6,7 Monaten konnten das Überleben der INA-MSC und eine läsionsgerichtete Anreicherung in der Substantia nigra (SN) sowie dem Striatum belegt werden. Von den im Gehirn überlebenden MSC zeigten 3,2 % nach 4,5 Monaten eine Proliferation im Läsionsbereich. Die INA-MSC differenzierten sich teilweise, vor allem im Bereich des lädierten Gewebes, in funktionelle, neuronartige Zellen, welche Tyrosin-Hydroxylase (TH) (Maß für die dopaminerge Aktivität) exprimierten. Parallel dazu zeigte sich eine signifikant größere Menge an TH-positiver Fläche und TH-positiven Zellen in den lädierten SN und im Striatum der mit INA-MSC behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der zusätzliche neuroprotektive Effekt der INA-MSC wurde durch eine reduzierte Apoptose (TUNEL-Protein) im Bereich der betroffenen Strukturen nach 6-OHDA bestätigt. Die Ergebnisse zeigen, dass die intranasale Route eine vielversprechende Applikationsart von MSC bei Morbus Parkinson darstellt. Anders als die chirurgische Transplantation ist die intranasale Gabe eine nicht invasive und komplikationsarme Therapiemöglichkeit. Aufgrund dieser Eigenschaften ist auch eine repetitive Gabe zur Erhöhung der therapeutisch wirksamen Zellkonzentrationen im ZNS möglich.

## 6 Literaturverzeichnis

- BACHOUD-LEVI, A. C., REMY, P., NGUYEN, J. P., BRUGIERES, P., LEFAUCHEUR, J. P., BOURDET, C., BAUDIC, S., GAURA, V., MAISON, P., HADDAD, B., BOISSE, M. F., GRANDMOUGIN, T., JENY, R., BARTOLOMEO, P., DALLA BARBA, G., DEGOS, J. D., LISOVOSKI, F., ERGIS, A. M., PAILHOUS, E., CESARO, P., HANTRAYE, P. & PESCHANSKI, M. 2000. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet*, 356, 1975-9.
- BALYASNIKOVA, I. V., PRASOL, M. S., FERGUSON, S. D., HAN, Y., AHMED, A. U., GUTOVA, M., TOBIAS, A. L., MUSTAFI, D., RINCON, E., ZHANG, L., ABOODY, K. S. & LESNIAK, M. S. 2014. Intranasal delivery of mesenchymal stem cells significantly extends survival of irradiated mice with experimental brain tumors. *Mol Ther*; 22, 140-8.
- BARRY, F. P. & MURPHY, J. M. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 568-84.
- BENABID, A. L., POLLAK, P., GAO, D., HOFFMANN, D., LIMOUSIN, P., GAY, E., PAYEN, I. & BENAZZOUZ, A. 1996. Chronic electrical stimulation of the ventralis intermedius nucleus of the thalamus as a treatment of movement disorders. *J Neurosurg*, 84, 203-14.
- BENEDICT, C., HALLSCHMID, M., HATKE, A., SCHULTES, B., FEHM, H. L., BORN, J. & KERN, W. 2004. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 1326-34.
- BERNHEIMER, H., BIRKMAYER, W., HORNYKIEWICZ, O., JELLINGER, K. & SEITELBERGER, F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, 20, 415-55.
- BICKEL, H. 2001. [Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. *Z Gerontol Geriatr*, 34, 108-15.
- BILLINTON, N. & KNIGHT, A. W. 2001. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem*, 291, 175-97.
- BORN, J., LANGE, T., KERN, W., MCGREGOR, G. P., BICKEL, U. & FEHM, H. L. 2002. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci*, 5, 514-6.
- BOSSOLASCO, P., COVA, L., LEVANDIS, G., DIANA, V., CERRI, S., LAMBERTENGI DELILIERI, G., POLLI, E., SILANI, V., BLANDINI, F. & ARMENTERO, M. T. 2012. Noninvasive near-infrared live imaging of human adult mesenchymal stem cells transplanted in a rodent model of Parkinson's disease. *Int J Nanomedicine*, 7, 435-47.
- BOVETTI, S., HSIEH, Y. C., BOVOLIN, P., PERROTEAU, I., KAZUNORI, T. & PUCHE, A. C. 2007. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci*, 27, 5976-80.
- BRAZELTON, T. R. & BLAU, H. M. 2005. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells*, 23, 1251-65.

- BREESE, G. R. & TRAYLOR, T. D. 1970. Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 174, 413-20.
- BURNS, J. "Memory and Insulin in Early Alzheimer's Disease"  
www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00581867
- CAPSONI, S., GIANNOTTA, S. & CATTANEO, A. 2002. Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12432-7.
- CEDARBAUM, J. M. & OLANOW, C. W. 1991. Dopamine sulfate in ventricular cerebrospinal fluid and motor function in Parkinson's disease. *Neurology*, 41, 1567-70.
- CHAPMAN, C. D., FREY, W. H., 2ND, CRAFT, S., DANIELYAN, L., HALLSCHMID, M., SCHIOTH, H. B. & BENEDICT, C. 2013. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res*, 30, 2475-84.
- CHARTOFF, E. H., DAMEZ-WERNO, D., SONNTAG, K. C., HASSINGER, L., KAUFMANN, D. E., PETERSON, J., MCPHIE, D., CATALDO, A. M. & COHEN, B. M. 2011. Detection of intranasally delivered bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the lesioned mouse brain: a cautionary report. *Stem Cells Int*, 2011, 586586.
- COYNE, T. M., MARCUS, A. J., REYNOLDS, K., BLACK, I. B. & WOODBURY, D. 2007. Disparate host response and donor survival after the transplantation of mesenchymal or neuroectodermal cells to the intact rodent brain. *Transplantation*, 84, 1507-16.
- CRAFT, S., BAKER, L. D., MONTINE, T. J., MINOSHIMA, S., WATSON, G. S., CLAXTON, A., ARBUCKLE, M., CALLAGHAN, M., TSAI, E., PLYMATE, S. R., GREEN, P. S., LEVERENZ, J., CROSS, D. & GERTON, B. 2012. Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial. *Arch Neurol*, 69, 29-38.
- DANIELYAN, L., BEER-HAMMER, S., STOLZING, A., SCHAFER, R., SIEGEL, G., FABIAN, C., KAHLE, P., BIEDERMANN, T., LOURHMATI, A., BUADZE, M., NOVAKOVIC, A., PROKSCH, B., GLEITER, C. H., FREY, W. H. & SCHWAB, M. 2014. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Cell Transplant*, 23 Suppl 1, S123-39.
- DANIELYAN, L., KLEIN, R., HANSON, L. R., BUADZE, M., SCHWAB, M., GLEITER, C. H. & FREY, W. H. 2010. Protective effects of intranasal losartan in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Rejuvenation Res*, 13, 195-201.
- DANIELYAN, L., SCHAFER, R., VON AMELN-MAYERHOFER, A., BERNHARD, F., VERLEYSDONK, S., BUADZE, M., LOURHMATI, A., KLOPFER, T., SCHAUMANN, F., SCHMID, B., KOEHLE, C., PROKSCH, B., WEISSERT, R., REICHARDT, H. M., VAN DEN BRANDT, J., BUNIATIAN, G. H., SCHWAB, M., GLEITER, C. H. & FREY, W. H., 2ND 2011. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. *Rejuvenation Res*, 14, 3-16.
- DANIELYAN, L., SCHAFER, R., VON AMELN-MAYERHOFER, A., BUADZE, M., GEISLER, J., KLOPFER, T., BURKHARDT, U., PROKSCH, B.,

- VERLEYSDONK, S., AYTURAN, M., BUNIATIAN, G. H., GLEITER, C. H. & FREY, W. H., 2ND 2009. Intranasal delivery of cells to the brain. *Eur J Cell Biol*, 88, 315-24.
- DEUMENS, R., BLOKLAND, A. & PRICKAERTS, J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, 175, 303-17.
- DEZAWA, M., ISHIKAWA, H., HOSHINO, M., ITOKAZU, Y. & NABESHIMA, Y. 2005. Potential of bone marrow stromal cells in applications for neurodegenerative, neuro-traumatic and muscle degenerative diseases. *Curr Neuropharmacol*, 3, 257-66.
- DEZAWA, M., KANNO, H., HOSHINO, M., CHO, H., MATSUMOTO, N., ITOKAZU, Y., TAJIMA, N., YAMADA, H., SAWADA, H., ISHIKAWA, H., MIMURA, T., KITADA, M., SUZUKI, Y. & IDE, C. 2004. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*, 113, 1701-10.
- DONEGA, V., NIJBOER, C. H., VAN TILBORG, G., DIJKHUIZEN, R. M., KAVELAARS, A. & HEIJNEN, C. J. 2014. Intranasally administered mesenchymal stem cells promote a regenerative niche for repair of neonatal ischemic brain injury. *Exp Neurol*, 261, 53-64.
- ERDO, F., BUHRLE, C., BLUNK, J., HOEHN, M., XIA, Y., FLEISCHMANN, B., FOCKING, M., KUSTERMANN, E., KOLOSSOV, E., HESCHELER, J., HOSSMANN, K. A. & TRAPP, T. 2003. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 780-5.
- FEARNLEY, J. M. & LEES, A. J. 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114 ( Pt 5), 2283-301.
- FINSEN, B. R., SORENSEN, T., CASTELLANO, B., PEDERSEN, E. B. & ZIMMER, J. 1991. Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol*, 32, 159-83.
- FLAX, J. D., AURORA, S., YANG, C., SIMONIN, C., WILLS, A. M., BILLINGHURST, L. L., JENDOUBI, M., SIDMAN, R. L., WOLFE, J. H., KIM, S. U. & SNYDER, E. Y. 1998. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol*, 16, 1033-9.
- FRANSSON, M., PIRAS, E., WANG, H., BURMAN, J., DUPREZ, I., HARRIS, R. A., LEBLANC, K., MAGNUSSON, P. U., BRITTEBO, E. & LOSKOG, A. S. 2014. Intranasal delivery of central nervous system-retargeted human mesenchymal stromal cells prolongs treatment efficacy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, 142, 431-41.
- FREED, C. R., GREENE, P. E., BREEZE, R. E., TSAI, W. Y., DUMOUCHEL, W., KAO, R., DILLON, S., WINFIELD, H., CULVER, S., TROJANOWSKI, J. Q., EIDELBERG, D. & FAHN, S. 2001. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 344, 710-9.
- FREIHERR, J., HALLSCHMID, M., FREY, W. H., 2ND, BRUNNER, Y. F., CHAPMAN, C. D., HOLSCHER, C., CRAFT, S., DE FELICE, F. G. & BENEDICT, C. 2013. Intranasal insulin as a treatment for Alzheimer's disease: a review of basic research and clinical evidence. *CNS Drugs*, 27, 505-14.

- FREY WH 2ND, L. J., CHEN X, THORNE RG, FAWCETT JR, ALA TA, RAHMAN Y-E 1997. Delivery of 125I-NGF to the brain via the olfactory route. *Drug Deliv*, 4:87-92.
- FREY WH 2ND, L. J., THOME RG 1995. Intranasal delivery of 125I-labeled nerve growth factor to the brain via the olfactory route. In: *Iqbal K, Mortimer JA, Winblad B, et al., editors. Research advances in Alzheimer's disease and related disorders. Chichester: John Wiley & Sons Ltd*, 329–35.
- FREY, W. H. N. 1991a. Neurologic Agents for Nasal Administration to the Brain (priority date 5.12.89). (WO/1991/007947), Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- FREY, W. N. 1991b. Neurologic Agents for Nasal Administration to the Brain (priority date 5.12.89). (WO/1991/007947), Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- GERLACH, M., BEN-SHACHAR, D., RIEDERER, P. & YODIM, M. B. 1994. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem*, 63, 793-807.
- GERLACH, M., DOUBLE, K., ARZBERGER, T., LEBLHUBER, F., TATSCHNER, T. & RIEDERER, P. 2003. Dopamine receptor agonists in current clinical use: comparative dopamine receptor binding profiles defined in the human striatum. *J Neural Transm*, 110, 1119-27.
- GERLACH, M., REICHMANN, H. & RIEDERER, P. 2007. *Die Parkinson-Krankheit*, Springer-Verlag Wien New York.
- GERLACH, M., VAN DEN BUUSE, M., BLAHA, C., BREMEN, D. & RIEDERER, P. 2004. Entacapone increases and prolongs the central effects of l-DOPA in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 370, 388-94.
- GIRAULT, J. A. & GREENGARD, P. 2004. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol*, 61, 641-4.
- GLINKA, Y., GASSEN, M. & YODIM, M. B. 1997. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl*, 50, 55-66.
- HADACZEK, P., YAMASHITA, Y., MIREK, H., TAMAS, L., BOHN, M. C., NOBLE, C., PARK, J. W. & BANKIEWICZ, K. 2006. The "perivascular pump" driven by arterial pulsation is a powerful mechanism for the distribution of therapeutic molecules within the brain. *Mol Ther*, 14, 69-78.
- HANSON, L. R. & FREY, W. H., 2ND 2008. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci*, 9 Suppl 3, S5.
- HARRIS, R. G., HERZOG, E. L., BRUSCIA, E. M., GROVE, J. E., VAN ARNAM, J. S. & KRAUSE, D. S. 2004. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, 305, 90-3.
- HAUGER, O., FROST, E. E., VAN HEESWIJK, R., DEMINIERE, C., XUE, R., DELMAS, Y., COMBE, C., MOONEN, C. T., GRENIER, N. & BULTE, J. W. 2006. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology*, 238, 200-10.
- HE, S., SHEN, L., WU, Y., LI, L., CHEN, W., HOU, C., YANG, M., ZENG, W. & ZHU, C. 2015. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mesenchymal stem cell-seeded electrospinning biomaterial for treating ischemic diabetic ulcers via milieu-dependent differentiation mechanism. *Tissue Eng Part A*, 21, 928-38.

- HEFFNER, T. G., HARTMAN, J. A. & SEIDEN, L. S. 1980. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*, 13, 453-6.
- HELT, C. E., HOERNIG, G. R., ALBECK, D. S., GERHARDT, G. A., ICKES, B., REYLAND, M. E., QUISSELL, D. O., STROMBERG, I. & GRANHOLM, A. C. 2001. Neuroprotection of grafted neurons with a GDNF/caspase inhibitor cocktail. *Exp Neurol*, 170, 258-69.
- HIRSCH, E. C. & HUNOT, S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 8, 382-97.
- JACKSON, K. A., SNYDER, D. S. & GOODELL, M. A. 2004. Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells*, 22, 180-7.
- JANSSON, B. & BJORK, E. 2002. Visualization of in vivo olfactory uptake and transfer using fluorescein dextran. *J Drug Target*, 10, 379-86.
- JELLINGER, K., BRAAK, H., BRAAK, E. & FISCHER, P. 1991. Alzheimer lesions in the entorhinal region and isocortex in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 640, 203-9.
- JIANG, Y., ZHU, J., XU, G. & LIU, X. 2011. Intranasal delivery of stem cells to the brain. *Expert Opin Drug Deliv*, 8, 623-32.
- KIKUCHI, A., TAKEDA, A., KIMPARA, T., NAKAGAWA, M., KAWASHIMA, R., SUGIURA, M., KINOMURA, S., FUKUDA, H., CHIDA, K., OKITA, N., TAKASE, S. & ITOYAMA, Y. 2001. Hypoperfusion in the supplementary motor area, dorsolateral prefrontal cortex and insular cortex in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 193, 29-36.
- KIM, J. H., AUERBACH, J. M., RODRIGUEZ-GOMEZ, J. A., VELASCO, I., GAVIN, D., LUMELSKY, N., LEE, S. H., NGUYEN, J., SANCHEZ-PERNAUTE, R., BANKIEWICZ, K. & MCKAY, R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418, 50-6.
- KIM, S. U. 2004. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology*, 24, 159-71.
- KIM, S. U., LEE, H. J. & KIM, Y. B. 2013. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, 33, 491-504.
- KORBLING, M. & ESTROV, Z. 2003. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*, 349, 570-82.
- KOZLOWSKA, H., JABLONKA, J., JANOWSKI, M., JURGA, M., KOSSUT, M. & DOMANSKA-JANIK, K. 2007. Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat model of cortical infarct. *Stem Cells Dev*, 16, 481-8.
- KRAITCHMAN, D. L., TATSUMI, M., GILSON, W. D., ISHIMORI, T., KEDZIOREK, D., WALCZAK, P., SEGARS, W. P., CHEN, H. H., FRITZGES, D., IZBUDAK, I., YOUNG, R. G., MARCELINO, M., PITTENGER, M. F., SOLAIYAPPAN, M., BOSTON, R. C., TSUI, B. M., WAHL, R. L. & BULTE, J. W. 2005. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation*, 112, 1451-61.
- KRAMPERA, M., GLENNIE, S., DYSON, J., SCOTT, D., LAYLOR, R., SIMPSON, E. & DAZZI, F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101, 3722-9.

- KRIKS, S., SHIM, J. W., PIAO, J., GANAT, Y. M., WAKEMAN, D. R., XIE, Z., CARRILLO-REID, L., AUYEUNG, G., ANTONACCI, C., BUCH, A., YANG, L., BEAL, M. F., SURMEIER, D. J., KORDOWER, J. H., TABAR, V. & STUDER, L. 2011. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480, 547-51.
- KRUGER, R., EBERHARDT, O., RIESS, O. & SCHULZ, J. B. 2002. Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes? *Trends Mol Med*, 8, 236-40.
- LAHAT, E., GOLDMAN, M., BARR, J., ESHEL, G. & BERKOVITCH, M. 1998. Intranasal midazolam for childhood seizures. *Lancet*, 352, 620.
- LIU, H., SCHWARZ, E. M. & XIE, C. 2013. Dual differentiation-exogenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic spinal cord injury repair in a murine hemisection model. *Stem Cells Int*, 2013, 928982.
- LIU, Q., CHENG, G., WANG, Z., ZHAN, S., XIONG, B. & ZHAO, X. 2015. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into nerve-like cells in vitro after transfection with brain-derived neurotrophic factor gene. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51, 319-27.
- LIU, X., LI, F., STUBBLEFIELD, E. A., BLANCHARD, B., RICHARDS, T. L., LARSON, G. A., HE, Y., HUANG, Q., TAN, A. C., ZHANG, D., BENKE, T. A., SLADEK, J. R., ZAHNISER, N. R. & LI, C. Y. 2012. Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. *Cell Res*, 22, 321-32.
- LIU, X. F., FAWCETT, J. R., HANSON, L. R. & FREY, W. H., 2ND 2004. The window of opportunity for treatment of focal cerebral ischemic damage with noninvasive intranasal insulin-like growth factor-I in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 13, 16-23.
- LOIS, C. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264, 1145-8.
- LUSKIN, M. B. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11, 173-89.
- MACDONALD, E., DADDS, M. R., BRENNAN, J. L., WILLIAMS, K., LEVY, F. & CAUCHI, A. J. 2011. A review of safety, side-effects and subjective reactions to intranasal oxytocin in human research. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 1114-26.
- MAKINO, S., FUKUDA, K., MIYOSHI, S., KONISHI, F., KODAMA, H., PAN, J., SANO, M., TAKAHASHI, T., HORI, S., ABE, H., HATA, J., UMEZAWA, A. & OGAWA, S. 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103, 697-705.
- MARRELLI, M., PADUANO, F. & TATULLO, M. 2015. Human Periapical Cyst-Mesenchymal Stem Cells Differentiate Into Neuronal Cells. *J Dent Res*.
- MAYERHOFER, A., KOVAR, K. A. & SCHMIDT, W. J. 2001. Changes in serotonin, dopamine and noradrenaline levels in striatum and nucleus accumbens after repeated administration of the abused drug MDMA in rats. *Neurosci Lett*, 308, 99-102.
- MEYERROSE, T. E., DE UGARTE, D. A., HOFLING, A. A., HERRBRICH, P. E., CORDONNIER, T. D., SHULTZ, L. D., EAGON, J. C., WIRTHLIN, L., SANDS, M. S., HEDRICK, M. A. & NOLTA, J. A. 2007. In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. *Stem Cells*, 25, 220-7.
- MISCHLEY, L. K., VESPIGNANI, M. F. & FINNELL, J. S. 2013. Safety survey of intranasal glutathione. *J Altern Complement Med*, 19, 459-63.

- MISCHLEY, L.K. "Intranasal Glutathione in Parkinson's Disease"  
[www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02424708](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02424708)
- MOLLENHAUER, B., FÖRSTL, H., DEUSCHL, G., STORCH, A., OERTEL, W. & TRENKWALDER, C. 2010. Lewy Body and Parkinsonian Dementia: Common, but Often Misdiagnosed Conditions. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 684-91.
- MUKHIDA, K., BAKER, K. A., SADI, D. & MENDEZ, I. 2001. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci*, 21, 3521-30.
- MULLER, T. 2012. Drug therapy in patients with Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*, 1, 10.
- MUTCH, W. J., DINGWALL-FORDYCE, I., DOWNIE, A. W., PATERSON, J. G. & ROY, S. K. 1986. Parkinson's disease in a Scottish city. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 292, 534-6.
- NAGATSU, T., MOGI, M., ICHINOSE, H. & TOGARI, A. 2000. Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 143-51.
- NATHAN, R. A. 2011. Intranasal steroids in the treatment of allergy-induced rhinorrhea. *Clin Rev Allergy Immunol*, 41, 89-101.
- NINOMIYA, K., IWATSUKI, K., OHNISHI, Y. I., OHKAWA, T. & YOSHIMINE, T. 2015. Intranasal delivery of bone marrow stromal cells to spinal cord lesions. *J Neurosurg Spine*, 1-9.
- OLSEN, T. S. 1986. Regional cerebral blood flow after occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Neurol Scand*, 73, 321-37.
- OWEN, A. D., SCHAPIRA, A. H., JENNER, P. & MARSDEN, C. D. 1996. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 786, 217-23.
- PANG, Z. P., YANG, N., VIERBUCHEN, T., OSTERMEIER, A., FUENTES, D. R., YANG, T. Q., CITRI, A., SEBASTIANO, V., MARRO, S., SUDHOF, T. C. & WERNIG, M. 2011. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 476, 220-3.
- PARDESHI, C. V. & BELGAMWAR, V. S. 2013. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv*, 10, 957-72.
- PARK, C. H., MINN, Y. K., LEE, J. Y., CHOI, D. H., CHANG, M. Y., SHIM, J. W., KO, J. Y., KOH, H. C., KANG, M. J., KANG, J. S., RHIE, D. J., LEE, Y. S., SON, H., MOON, S. Y., KIM, K. S. & LEE, S. H. 2005. In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J Neurochem*, 92, 1265-76.
- PATEL, N. S., PARIS, D., MATHURA, V., QUADROS, A. N., CRAWFORD, F. C. & MULLAN, M. J. 2005. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 2, 9.
- PAXINOS, G., WATSON, C. R. & EMSON, P. C. 1980. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*, 3, 129-49.
- PERRY, V. H. & TEELING, J. 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol*, 35, 601-12.

- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- POLYMEROPOULOS, M. H., LAVEDAN, C., LEROY, E., IDE, S. E., DEHEJIA, A., DUTRA, A., PIKE, B., ROOT, H., RUBENSTEIN, J., BOYER, R., STENROOS, E. S., CHANDRASEKHARAPPA, S., ATHANASSIADOU, A., PAPAPETROPOULOS, T., JOHNSON, W. G., LAZZARINI, A. M., DUVOISIN, R. C., DI IORIO, G., GOLBE, L. I. & NUSSBAUM, R. L. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, 2045-7.
- PORTER, C. C., TOTARO, J. A. & STONE, C. A. 1963. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 140, 308-16.
- PROCKOP, D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-4.
- RAUSCH, W. D., HIRATA, Y., NAGATSU, T., RIEDERER, P. & JELLINGER, K. 1988. Tyrosine hydroxylase activity in caudate nucleus from Parkinson's disease: effects of iron and phosphorylating agents. *J Neurochem*, 50, 202-8.
- REDMOND, D. E., JR., VINUELA, A., KORDOWER, J. H. & ISACSON, O. 2008. Influence of cell preparation and target location on the behavioral recovery after striatal transplantation of fetal dopaminergic neurons in a primate model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 29, 103-16.
- REGER, M. A., WATSON, G. S., FREY, W. H., 2ND, BAKER, L. D., CHOLERTON, B., KEELING, M. L., BELONGIA, D. A., FISHEL, M. A., PLYMATE, S. R., SCHELLENBERG, G. D., CHERRIER, M. M. & CRAFT, S. 2006. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging*, 27, 451-8.
- REGER, M. A., WATSON, G. S., GREEN, P. S., WILKINSON, C. W., BAKER, L. D., CHOLERTON, B., FISHEL, M. A., PLYMATE, S. R., BREITNER, J. C., DEGROODT, W., MEHTA, P. & CRAFT, S. 2008. Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology*, 70, 440-8.
- RENNELS, M. L., GREGORY, T. F., BLAUMANIS, O. R., FUJIMOTO, K. & GRADY, P. A. 1985. Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Res*, 326, 47-63.
- RIEDERER, P., RAUSCH, W. D., BIRKMAYER, W., JELLINGER, K. & DANIELCZYK, W. 1978. Dopamine-sensitive adenylate cyclase activity in the caudate nucleus and adrenal medulla in Parkinson's disease and in liver cirrhosis. *J Neural Transm Suppl*, 153-61.
- RYU, J. K., KIM, J., CHO, S. J., HATORI, K., NAGAI, A., CHOI, H. B., LEE, M. C., MCLARNON, J. G. & KIM, S. U. 2004. Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*, 16, 68-77.
- RYU, M. Y., LEE, M. A., AHN, Y. H., KIM, K. S., YOON, S. H., SNYDER, E. Y., CHO, K. G. & KIM, S. U. 2005. Brain transplantation of neural stem cells

- cotransduced with tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase 1 in Parkinsonian rats. *Cell Transplant*, 14, 193-202.
- SADAN, O., BAHAT-STROMZA, M., BARHUM, Y., LEVY, Y. S., PISNEVSKY, A., PERETZ, H., ILAN, A. B., BULVIK, S., SHEMESH, N., KREPEL, D., COHEN, Y., MELAMED, E. & OFFEN, D. 2009. Protective effects of neurotrophic factor-secreting cells in a 6-OHDA rat model of Parkinson disease. *Stem Cells Dev*, 18, 1179-90.
- SAPORITO, M. S., BROWN, E. M., MILLER, M. S. & CARSWELL, S. 1999. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons In vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 288, 421-7.
- SCHMIDT, W. J. 2000. Neurobiology of the ventral basal ganglia loop. *Amino Acids*, 19, 181-2.
- SCHWARTING, R. K. & HUSTON, J. P. 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*, 50, 275-331.
- SHARPE, M. E., MORTON, D. & ROSSI, A. 2012. Nonclinical safety strategies for stem cell therapies. *Toxicol Appl Pharmacol*, 262, 223-31.
- SHEMESH, E., RUDICH, A., HARMAN-BOEHM, I. & CUKIERMAN-YAFFE, T. 2012. Effect of intranasal insulin on cognitive function: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, 366-76.
- SHINDO, T., MATSUMOTO, Y., WANG, Q., KAWAI, N., TAMIYA, T. & NAGAO, S. 2006. Differences in the neuronal stem cells survival, neuronal differentiation and neurological improvement after transplantation of neural stem cells between mild and severe experimental traumatic brain injury. *J Med Invest*, 53, 42-51.
- SIEGEL, G., KRAUSE, P., WOHRLE, S., NOWAK, P., AYTURAN, M., KLUBA, T., BREHM, B. R., NEUMEISTER, B., KOHLER, D., ROSENBERGER, P., JUST, L., NORTHOFF, H. & SCHAFFER, R. 2012. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev*, 21, 2457-70.
- SIES, H. 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*, 69, 965-8.
- SINDEN, J. D., PATEL, S. N. & HODGES, H. 1992. Neural transplantation: problems and prospects for therapeutic application. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, 5, 902-8.
- SKIPOR, J., GRZEGORZEWSKI, W., EINER-JENSEN, N. & WASOWSKA, B. 2003. Local vascular pathway for progesterone transfer to the brain after nasal administration in gilts. *Reprod Biol*, 3, 143-59.
- SOOD, S., JAIN, K. & GOWTHAMARAJAN, K. 2014. Intranasal therapeutic strategies for management of Alzheimer's disease. *J Drug Target*, 22, 279-94.
- SOTIROPOULOU, P. A., PEREZ, S. A., GRITZAPIS, A. D., BAXEVANIS, C. N. & PAPAMICHAIL, M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24, 74-85.
- STEIN, K. "Nasal Fentanyl for chronic cancer pain"  
[www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01906073](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01906073)

- STOCKWELL, J., ABDI, N., LU, X., MAHESHWARI, O. & TAGHIBIGLOU, C. 2013. Novel Central Nervous System Drug Delivery Systems. *Chem Biol Drug Des*.
- TAKAGI, Y., NISHIMURA, M., MORIZANE, A., TAKAHASHI, J., NOZAKI, K., HAYASHI, J. & HASHIMOTO, N. 2005. Survival and differentiation of neural progenitor cells derived from embryonic stem cells and transplanted into ischemic brain. *J Neurosurg*, 103, 304-10.
- TAKAHASHI, J. 2013. [Cell replacement therapy for Parkinson's disease using iPS cells]. *Rinsho Shinkeigaku*, 53, 1009-12.
- TANNER, C. M. & GOLDMAN, S. M. 1996. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, 14, 317-35.
- TAYEBATI, S. K., NWANKWO, I. E. & AMENTA, F. 2013. Intranasal drug delivery to the central nervous system: present status and future outlook. *Curr Pharm Des*, 19, 510-26.
- THOENEN, H. & TRANZER, J. P. 1968. [On the possibility of chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine (6-OH-DA)]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol*, 260, 212-3.
- THOMSON, J. A. & MARSHALL, V. S. 1998. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol*, 38, 133-65.
- THORNE, R. G., PRONK, G. J., PADMANABHAN, V. & FREY, W. H., 2ND 2004. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, 127, 481-96.
- VAN DEN BRANDT, J., WANG, D., KWON, S. H., HEINKELEIN, M. & REICHARDT, H. M. 2004. Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo. *Genesis*, 39, 94-9.
- VAN VELTHOVEN, C. T., KAVELAARS, A., VAN BEL, F. & HEIJNEN, C. J. 2010. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun*, 24, 387-93.
- VULLIEZ-COADY, L. "Effects of Intranasal Oxytocin on Emotion Regulation in Adolescents"  
[www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02301715](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02301715)
- WALCZAK, P., ZHANG, J., GILAD, A. A., KEDZIOREK, D. A., RUIZ-CABELLO, J., YOUNG, R. G., PITTENGER, M. F., VAN ZIJL, P. C., HUANG, J. & BULTE, J. W. 2008. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*, 39, 1569-74.
- WEI, N., YU, S. P., GU, X., TAYLOR, T. M., SONG, D., LIU, X. F. & WEI, L. 2012. Delayed Intranasal Delivery of Hypoxic-preconditioned Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Enhanced Cell Homing and Therapeutic Benefits after Ischemic Stroke in Mice. *Cell Transplant*.
- WEI, Z. Z., GU, X., FERDINAND, A., LEE, J. H., JI, X., JI, X. M., YU, S. P. & WEI, L. 2015. Intranasal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells improved neurovascular regeneration and rescued neuropsychiatric deficits after neonatal stroke in rats. *Cell Transplant*, 24, 391-402.
- WERNIG, M., ZHAO, J. P., PRUSZAK, J., HEDLUND, E., FU, D., SOLDNER, F., BROCCOLI, V., CONSTANTINE-PATON, M., ISACSON, O. & JAENISCH,

- R. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5856-61.
- WOLFE, T. R. & MACFARLANE, T. C. 2006. Intranasal midazolam therapy for pediatric status epilepticus. *Am J Emerg Med*, 24, 343-6.
- WOODBURY, D., SCHWARZ, E. J., PROCKOP, D. J. & BLACK, I. B. 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 61, 364-70.
- XU, L., YAN, J., CHEN, D., WELSH, A. M., HAZEL, T., JOHE, K., HATFIELD, G. & KOLIATSOS, V. E. 2006. Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation*, 82, 865-75.
- YASUHARA, T., MATSUKAWA, N., HARA, K., YU, G., XU, L., MAKI, M., KIM, S. U. & BORLONGAN, C. V. 2006. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 26, 12497-511.
- ZIGMOND, M. J. & STRICKER, E. M. 1989. Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *Int Rev Neurobiol*, 31, 1-79.
- ZLOKOVIC, B. V. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 178-201.
- ZWIJNENBURG, P. J., VAN DER POLL, T., FLORQUIN, S., VAN DEVENTER, S. J., ROORD, J. J. & VAN FURTH, A. M. 2001. Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *J Infect Dis*, 183, 1143-6.

## 7 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich vorliegende Dissertation mit dem Thema „Proliferation, Überleben und Einfluss auf die dopaminerge Aktivität von intranasal applizierten mesenchymalen Stammzellen in einem 6-Hydroxydopamin Rattenmodell der Parkinson-Krankheit“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Freiburg, den 06.04.2018

---

Felix T. Schaumann

## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Danielyan, L., R. Schafer, A. von Ameln-Mayerhofer, F. Bernhard, S. Verleysdonk, M. Buadze, A. Lourhmati, T. Klopfer, F. Schaumann, B. Schmid, C. Koehle, B. Proksch, R. Weissert, H. M. Reichardt, J. van den Brandt, G. H. Buniatian, M. Schwab, C. H. Gleiter and W. H. Frey, 2nd (2011). "Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease." Rejuvenation Res **14**(1): 3-16. Final publication is available from Mary Ann Liebert, Inc., publishers  
<http://dx.doi.org/DOI:10.1089/rej.2010.1130>

Die Studie wurde konzipiert, durchgeführt und verfasst durch Frau Dr. Lusine Danielyan. Herr PD Dr. Richard Schäfer führte die Gewinnung, Charakterisierung und Bereitstellung der MSC durch. Herr Dr. Andreas von Ameln-Mayerhofer stellte das verwendete 6-OHDA Rattenmodell bereit. Herr PD Dr. Stephan Verleysdonk führte das Radiolabeling der MSC durch. Dr. Marine Buadze und Dr. Ali Lourhmati waren für die Einführung und meine Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbetechniken und Vorbereitung von Gefrierschnitten verantwortlich. Der ausschließlich von mir durchgeführte Teil der experimentellen Arbeiten umfasst die fluoreszenzmikroskopische und statistische Auswertung der Daten und das Erstellen der im Kapitel 3 aufgeführten Ergebnisse und Abbildungen.

## 9 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Dr. Lusine Danielyan für die Betreuung bei der Datenerhebung und bei der Erstellung dieser Dissertation danken. Weiter danke ich Herrn PD Dr. Richard Schäfer für die Gewinnung, Charakterisierung und Bereitstellung der MSC, Herrn Dr. A. von Ameln-Mayerhofer für das 6-OHDA-Rattenmodell sowie Herrn PD Dr. Stephan Verleysdonk für das Radiolabeling von MSC. Auch Dr. Marine Buadze und Dr. Ali Lourhmati gilt mein Dank für die Einführung und Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbetechniken und Vorbereitung von Gefrierschnitten. Frau Heike Schooltink danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit. Sowie Prof. Dr. Gleiter als meinem Doktorvater. Schließlich danke ich noch dem Verlag Mary Ann Liebert für die Erlaubnis zur Veröffentlichung der Dissertation.

Reprinted with permission from REJUVENATION RESEARCH, February 2011, published by Marx Ann Liebert, Inc., New Rochelle, NY