

Zusammenfassung

Thomas Grochow

Etablierung und Validierung eines Meerschweinchenmodells für die (humane) kongenitale Toxoplasmose.

Veterinär-Anatomisches Institut und Institut für Parasitologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im April 2023

97 Seiten, 1 Publikation, 2 eingereichte Manuskripte, 20 Abbildungen, 8 Tabellen, 346 Literaturangaben

Schlüsselwörter: kongenitale Toxoplasmose, Meerschweinchen, Tiermodell, Zelltropismus im fötalen Gehirn, Hirnläsion, neurale Stammzellen, neurologische Untersuchung

Einleitung: Die Toxoplasmose ist eine weltweit häufig auftretende Zoonose. Die Krankheit wird durch den einzelligen Parasiten *Toxoplasma (T.) gondii* ausgelöst. Bei einer primären Infektion während der Schwangerschaft ist *T. gondii* in der Lage, die Plazenta zu überwinden und den Fötus zu infizieren. Dies kann zu schweren und fortschreitenden Symptomen im Fötus führen, die u. a. das zentrale Nervensystem, insbesondere das Gehirn, betreffen. Bislang steht kein geeignetes Tiermodell für die Erforschung der (humanen) kongenitalen Toxoplasmose zur Verfügung. Zudem fehlen detaillierte Daten über den Verlauf der Infektion und die spezifischen Wirtszellen im sich entwickelnden Gehirn.

Ziele der Untersuchungen: Ziel dieses Projekts war es, das Meerschweinchen als Tiermodell für die kongenitale Toxoplasmose zu etablieren. Des Weiteren sollte ein neurologischer Untersuchungsgang für das Meerschweinchen entwickelt werden. Darüber hinaus stand die Charakterisierung der befallenen Wirtszellpopulationen und die Veränderungen im fötalen und neonatalen Gehirn des Meerschweinchens nach vertikaler Übertragung von *T. gondii* im Mittelpunkt.

Tiere, Material und Methoden: Terminiert verpaarte Meerschweinchen (n=27) wurden am 15., 30., oder 48. Trächtigkeitstag oral mit 10, 100 oder 500 *T. gondii*-Oozysten (Stamm ME49) infiziert. 3 Tiere blieben als Kontrollgruppe uninfiziert. Die Nachkommen wurden unmittelbar *post partum* euthanasiert und sezirt. Die Parasitenbelastung in den neonatalen Organen, einschließlich des Gehirns, wurde mittels qPCR bestimmt. Qualitative und quantitative Veränderungen im neonatalen Gehirn wurden durch eine pathohistologische Untersuchung beurteilt.

Im Folgeversuch wurden terminiert verpaarte Meerschweinchen (n=18) am Trächtigkeitstag 33, 40 oder 48 euthanasiert und deren Föten entnommen. Die Hälfte der Tiere wurde zuvor am Trächtigkeitstag 23 mit 100 *T. gondii*-Oozysten infiziert. Die Parasitenbelastung in den Organen der Nachkommen wurde mittels qPCR bestimmt. Neurale Stammzellen und Neurone wurden im Gehirn der Föten durch immunhistologische Färbungen unter Verwendung spezifischer Antikörper (Pax6, Tbr2, Hu C/D) und der konfokalen Laserscanningmikroskopie visualisiert. Anschließend wurde ihre Anzahl mittels Imaris Software und Graphpad Prism in den Föten infizierter und nicht-infizierter Muttertiere quantifiziert und verglichen. Daten zum Zelltropismus wurden durch immunhistologische Färbungen mittels Antikörper

gegen Toxoplasmen (SAG1) und verschiedene Gehirnzellen (Nestin, Neurofilament, Hu C/D, GFAP, Iba1) und darauffolgende konfokaler Laserscanningmikroskopie gewonnen.

Für die Etablierung und Validierung eines neurologischen Untersuchungsganges wurden die Meerschweinchen (n=25) auf Basis des neurologischen Untersuchungsganges für Hunde von 2 erfahrenen Neurologen untersucht.

Die statistische Analyse wurde mit der Software Graphpad Prism 9.0.0 und 9.4.1 durchgeführt (Test auf Normalverteilung: Anderson-Darling Test und D'Agostino&Pearson Test; für den Vergleich von zwei Gruppen: normalverteilt: einseitiger T-Test, nicht normalverteilt: Mann-Whitney Test; für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen: normalverteilt: einfache Varianzanalyse gefolgt von Tukey's *post hoc*-Test, nicht normalverteilt: Kruskal-Wallis test gefolgt von Dunn's *post hoc*-Test).

Ergebnisse: Insbesondere die mit 500 Oozysten infizierten Muttertiere zeigten verkürzte Überlebenszeiten und erzeugten keinen einzigen lebenden Nachkommen. Bei den mit 10 und 100 Oozysten infizierten Tieren wurden Lebendgeburten, Totgeburten, Aborte und Fruchtresorptionen (jeweils 11 – 49%) beobachtet. Auffallend war, dass insbesondere die im ersten Trimester der Trächtigkeit infizierten Tiere hohe Raten (75%) von Fruchtresorptionen hatten, was dem Krankheitsbild des Menschen ähnelt.

Im fötalen Gehirn konnte ein Zelltropismus von *T. gondii* in neuronalen Stammzellen, Neuronen und Astroglia nachgewiesen werden. Zudem führte die *T. gondii*-Infektion zu einer signifikant reduzierten Anzahl neuronaler Stammzellen ($P < 0,05$) und Neurone ($P < 0,05$), bei nicht vermehrter Anzahl von Nekrosen und Apoptosen ($P > 0,05$).

Bei der neurologischen Untersuchung hatten insbesondere die Hands-Off-Untersuchungen die beste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Hingegen zeigten die propriozeptiven Tests an den Beckengliedmaßen, die Drohungsreaktion, der vertikale okulozephaler Reflex und die Unterkiefersensibilität keine konsistente Reaktion (Kooperationsraten 0% – 100%).

Schlussfolgerungen: Es konnte ein neurologischer Untersuchungsgang für das Meerschweinchen etabliert werden. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass *T. gondii* bei Meerschweinchen vertikal übertragen wird und das Gehirn der Nachkommen infiziert, was die Eignung zur Untersuchung der kongenitalen Toxoplasmose belegt. Damit steht nun ein geeignetes Nagermodeill zur Untersuchung der humanen kongenitalen Toxoplasmose zur Verfügung. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für experimentelle Studien zur Pathogenese der Toxoplasmose im sich entwickelnden Gehirn bei Mensch und Tier. Es konnte ein klarer Zelltropismus von *T. gondii* gezeigt werden. Die beobachtete Verringerung der Neuronenanzahl konnte auf eine verminderten Bildung durch den Befall von neuronalen Stammzellen zurückgeführt werden. Darüber hinaus tragen unsere Ergebnisse wesentlich zum Verständnis der kortikalen Fehlbildungen bei, die bei kongenital mit *T. gondii* infizierten Personen beobachtet werden und helfen dabei, neue Behandlungen und Lösungen für kongenitale Toxoplasmose zu entwickeln.