

AUS DEM

MEDIZINISCHEN ZENTRUM FÜR NERVENHEILKUNDE
DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR : PROF. DR. J. C. KRIEG

KLINIK FÜR NEUROLOGIE

DIREKTOR: PROF. DR. W. H. OERTEL

***UNTERSUCHUNG EINES MÖGLICHEN
NEUROPROTEKTIVEN EFFEKTES DER KAINsäURE- UND
CHINOLINSäURELäSION DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS
AUF DOPAMINERGE NEURONE DER SUBSTANTIA NIGRA
IM 6-HYDROXYDOPAMIN- UND IM 3-NITROPROPIONSäURE-
PARKINSON-TIERMODELL DER RATTE***

INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER GESAMTEN MEDIZIN

DEM FACHBEREICH HUMANMEDIZIN
DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

VORGELEGT VON

SEBASTIAN J. SCHIEL
AUS REGENSBURG

MARBURG 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 28. April 2005,
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

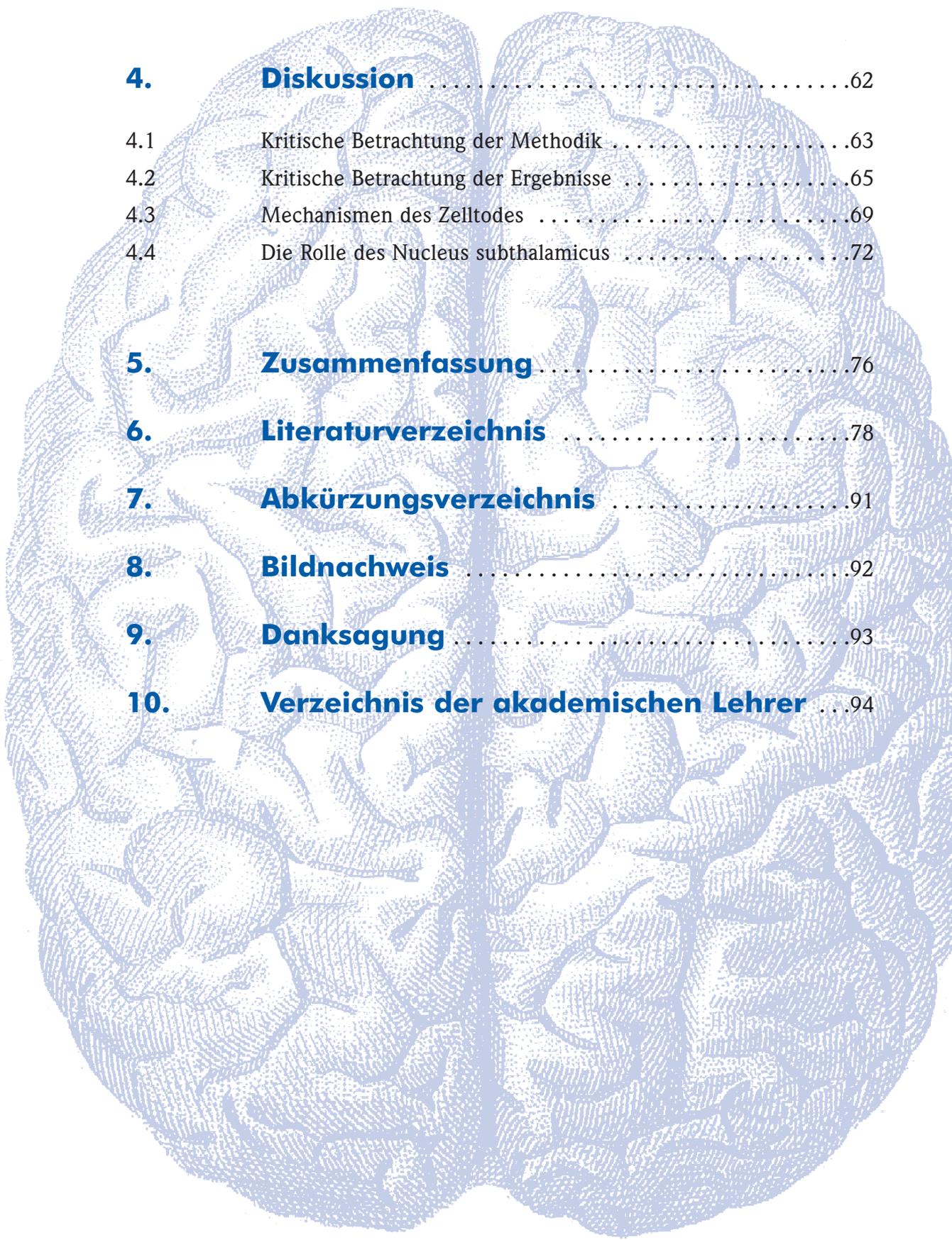
Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent : Prof. Dr. W. H. Oertel
Coreferent: Prof. Dr. D. Hellwig

Meinem Vater
29.04.1940 - 21.10.2003

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	7
1.1	Morbus Parkinson	8
1.1.1	Funktionelle Anatomie der Basalganglien	9
1.1.2	Funktionelle Anatomie des nigrostriatalen dopaminergen Systems	11
1.1.3	Pathophysiologische Grundlagen des Morbus Parkinson	12
1.1.4	Grundzüge und Probleme der heutigen Therapie	13
1.1.4.1	Medikamentöse Therapie	13
1.1.4.2	Operative Therapie, Tiefenhirnstimulation	14
1.2	Neuroprotektiver Effekt der Läsion des Nucleus subthalamicus auf dopaminerge Neuronen der Substantia nigra pars compacta	16
1.2.1	Bisherige Publikationen zur Untersuchung eines möglichen neuroprotektiven Effektes einer Läsion des Nucleus subthalamicus auf dopaminerge Neuronen der Substantia nigra	17
1.2.1.1	NST-Läsionsversuche der Arbeitsgruppe um Pierrat	17
1.2.1.2	NST-Läsionsversuche der Arbeitsgruppe um Nakao	19
1.3	Das 6-OHDA-Modell	21
1.4	Fluorogold	21
1.5	3-Nitropropionsäure	22
1.6	Ziele der Arbeit	22
2.	Methodik	23
2.1	Tiere und Tierhaltung	23
2.2	Versuchsordnung	23
2.3	Anästhesie	24
2.4	OP-Vor- und -Nachbereitung, Schaffung der Zugangswege	24
2.5	Stereotaxie	24
2.6	6-OHDA und 3-NP	25
2.7	Kainsäure und Chinolinsäure	25

2.8	Fluorogold (FG)	26
2.9	Verwendete Substanzen bei Kontrollgruppen	26
2.10	Gewinnung und Verarbeitung des Gewebes	27
2.11	Elektrochemischer Nachweis von Katecholaminen durch HPLC	27
2.12	Cytochromoxydase-Färbung	28
2.13	Tyrosinhydroxylase-Färbung	29
2.14	Kresylviolett-Färbung	30
2.15	Histologische Auswertung	30
2.16	Statistische Methoden	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Allgemeines	32
3.2	Histologische Bewertung des Nucleus subthalamicus	33
3.3	Ausmaß des neuronalen Untergangs in der SNc bei Kainatläsion des NST 7 Tage nach FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und 7 Tage vor 6-OHDA-Applikation	35
3.4	Neuronaler Untergang der SNc bei Kainatläsion des NST 7 Tage vor FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und 14 Tage vor striataler 6-OHDA-Applikation.	40
3.5	Neuronaler Untergang von SNc-Neuronen bei Kainatläsion des NST ohne FG-Markierung und 7 Tage vor 6-OHDA-Applikation.	45
3.6	Chinolinatläsion des NST bei zeitgleicher FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und striataler 3-NP-Applikation 14 Tage später.	49
3.7	Neuronenuntergang der SNc bei Chinolinatläsion des NST, 3-NP-Applikation 14 Tage nach FG-Markierung und NST-Läsion 3 Tage nach striataler 3-NP-Applikation.	53
3.8	Umfang des Untergangs von SNc-Neuronen bei Kainatläsion des NST, zeitgleicher FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und 3-NP-Applikation 7 Tage später.	58



4.	Diskussion	62
4.1	Kritische Betrachtung der Methodik	63
4.2	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	65
4.3	Mechanismen des Zelltodes	69
4.4	Die Rolle des Nucleus subthalamicus	72
5.	Zusammenfassung	76
6.	Literaturverzeichnis	78
7.	Abkürzungsverzeichnis	91
8.	Bildnachweis	92
9.	Danksagung	93
10.	Verzeichnis der akademischen Lehrer ...	94

Der Morbus Parkinson zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Er tritt weltweit und bei allen Rassen auf, wenn auch in unterschiedlicher Häufigkeit. Die Sterblichkeit von unbehandelten Parkinsonkranken ist etwa um Faktor drei gegenüber der gesunden Vergleichsbevölkerung erhöht (Hoehn u. Yahr, 1967), die Krankheitsdauer beträgt im Mittel zwischen 12 und 13 Jahren (Rajput, 1992). Ab einer Erkrankungsdauer von etwa 10 Jahren kann das Gros der Patienten mit den zur Verfügung stehenden medikamentösen Mitteln nicht mehr suffizient therapiert werden. Die Ätiopathogenese der Erkrankung ist noch nicht hinreichend geklärt.

Pierrat et al. postulierten 1996 einen neuroprotektiven Effekt einer Kainsäureläsion des Nucleus subthalamicus (NST) auf dopaminerge Neurone der Substantia nigra im 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Parkinson-Tiermodell, was durch Nakao et al. 1999 nicht gestützt werden konnte. Dieser jedoch fand den beschriebenen neuroprotektiven Effekt bei einer Chinolinatläsion im 3-Nitropropionsäure (3-NP)-Modell der Ratte.

Die vorliegende Arbeit untersucht einen möglichen neuroprotektiven Effekt von NST-Kainsäure- sowie Chinolinsäureläsionen auf dopaminerge Neurone der Substantia nigra im subakuten 6-OHDA- sowie im 3-NP-Parkinson-Tiermodell der Ratte.

Intrastriale Injektionen des Katecholamin-Neurotoxins 6-OHDA sowie des Mitochondrientoxins 3-NP führen über Wochen zur Degeneration dopaminergere Neurone der Pars compacta der Substantia nigra (SNc).

Beobachtet wurde der Einfluß der unilateralen NST-Läsionen auf den Umfang der SNc-Degeneration sowohl bei Läsion vor als auch nach intrastrialer Toxininjektion, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der die Injektionen des NST mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) bzw. phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) durchgeführt wurden.

1.1 Morbus Parkinson

James Parkinson beschrieb 1817 in seiner Monographie "An Essay on the Shaking Palsy" erstmals die Paralysis agitans oder auch Schüttellähmung als ein klinisch definiertes Krankheitsbild. Schon weit über 3000 Jahre zuvor wurde in ayurvedischen Schriften eine Krankheit beschrieben, die durch ein Zittern der Hände, einen Verlust der Beweglichkeit sowie eine körperliche Steifheit gekennzeichnet ist. Ruhetremor, Rigor und Brady- bzw. Akinese sind die Kardinalsymptome eines Parkinson-Syndroms (PS). Ist das PS, wie in ca. 70 Prozent der Fälle, idiopathisch bedingt, spricht man vom Morbus Parkinson (MP), bei dem ein progressiver Verlust dopaminerger nigrostriataler Neurone in der SNC und der daraus resultierende Dopaminmangel im Striatum das pathophysiologische Korrelat darstellen. Die übrigen 30 Prozent des PS verteilen sich auf symptomatische PS (postenzephalitisch, traumatisch, neoplastisch, medikamenten-induziert z.B. durch Neuroleptika oder Reserpin, exogen-toxisch z.B. durch Mangan, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), Kohlenmonoxid (CO), endogen-toxisch z.B. bei M. Wilson, oder Pseudo-PS im Rahmen eines Normaldruck-Hydrozephalus oder arteriosklerotisch bedingt), sowie auf PS im Rahmen neuronaler Systemdegenerationen (Multisystematrophien wie die striatonigrale Degeneration oder die olivopontozerebelläre Atrophie, progressive supranukleäre Lähmung (Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom), Morbus Hallervorden-Spatz, kortikobasale Degeneration, spinozerebelläre Ataxien).



Abb. 1: James Parkinson

Das Parkinson-Syndrom zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Frauen und Männer scheinen gleich häufig betroffen (Rajput et al., 1984), die Prävalenz für die Bundesrepublik Deutschland wird zwischen 160 Krankheitsfälle pro 100.000 Einwohner (Marttila, 1992) und 183 pro 100.000 angegeben (Vieregge et al., 1991), die Inzidenz ist abhängig von geografischen Faktoren sowie dem Alter der Patienten. In China erkrankten 1,5 pro 100.000 im Jahr (Wang, 1991), in den USA 20,5 pro 100.000 (Rajput, 1984; Rajput, 1992), wobei neuere Studien nahelegen, daß die regionalen Unterschiede möglicherweise geringer sind als bisher vermutet und eher strukturelle Unterschiede des Patientengutes wie Lebenserwartung und Krankheitsdauer, aber auch metho-

dische Unterschiede zu solch abweichenden Ergebnissen führen (Zhang u. Roman, 1993; Wang et al., 1996). Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 75 und 84 Jahren (Rajput et al., 1984), ca. 0,7 Prozent der über 65-jährigen ist erkrankt (Trenkwalder et al., 1995), in Altenpflegeheimen trifft man auf über 12 Prozent erkrankte Patienten (Evers u. Obladen, 1994). Nur ein geringer Anteil erkrankt vor dem 40. Lebensjahr, aber zunehmend sind aus bisher unklarer Ursache auch jüngere Menschen betroffen. Legt man neben einer durchschnittlichen Inzidenz von 16 pro 100.000 Einwohnern (Marttila, 1992) o.a. Daten zugrunde, so ergibt sich für die Bundesrepublik Deutschland bei 80 Mio. Einwohnern im Schnitt eine Neuerkrankungshäufigkeit von 12.800 pro Jahr, die Gesamtzahl der Parkinsonkranken läge zwischen 120.000 und 150.000, jenseits des 65. Lebensjahres wären 713 pro 100.000 Einwohner erkrankt (Trenkwalder et al., 1995).

1.1.1 Funktionelle Anatomie der Basalganglien

Als Basalganglien wird eine Gruppe subkortikal gelegener, funktionell zusammengehöriger Kerngebiete bezeichnet, denen ihre zentrale Rolle bei der zentralnervösen Regulation der Motorik gemein ist.

Beim Menschen gehört zu den Basalganglien das Striatum, das aus zwei Teilen besteht: Der erste Teil, der Nucleus caudatus (NC), legt sich wie ein Schweif um das Putamen (Pu), dem zweiten Teil. Die Form des NC, der er auch seinen Namen verdankt, erklärt sich durch die Drehung der Hemisphären während der Embryogenese. Der Globus Pallidus, medial des Pu gelegen, unterteilt sich in eine Pars interna (GPi) und eine Pars externa (GPe) und verjüngt sich nach medial. Ventromedial des Pallidums liegt der Nucleus subthalamicus

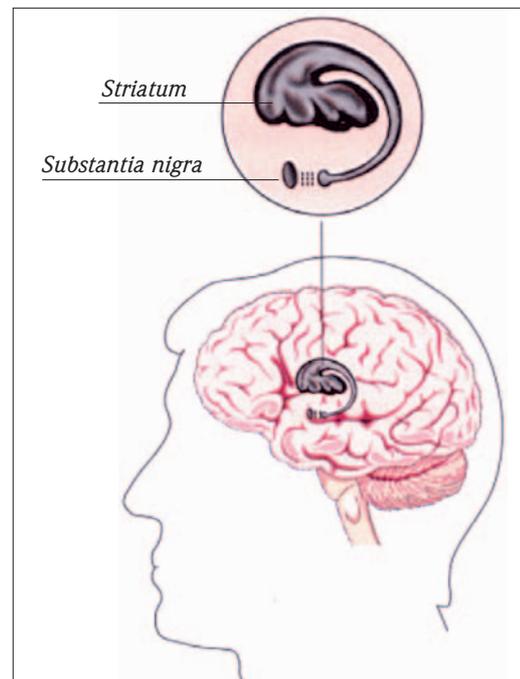


Abb. 2: Striatum mit Ncl. caudatus und Substantia nigra

(NST). In der funktionellen Betrachtung gehört die an der Grenze des mesencephalen Tegmentum gelegene Substantia nigra mit Pars compacta (SNc) und Pars reticularis (SNr) zum Verschaltungsschema der Basalganglien.

Bei der Ratte sind die beiden Strukturen des Striatums, NC und Pu, nicht voneinander abgrenzbar, man bezeichnet das Analogon als Caudatus-Putamen, oder einfach als Striatum. Das Analogon zum GPi ist in die Fasern des kortikofugalen Traktes eingebettet und wird als Nucleus entopeduncularis (NEP) bezeichnet. GPe beim Menschen entspricht GP bei der Ratte (Albin et al., 1995).

Die genannten Strukturen haben Verbindungen sowohl untereinander als auch mit anderen Hirnarealen, beim Menschen und bei der Ratte sind diese in vergleichbarer Weise ausgeprägt und somit funktionell vergleichbar.

Ein im limbischen System entstandener Bewegungsantrieb gibt seine entsprechenden Impulse an den Assoziationskortex weiter, von wo aus sowohl eine Weiterleitung in das Kleinhirn als auch in die Basalganglien erfolgt. Im Kleinhirn werden Bewegungsentwürfe moduliert, korrigiert und fein abgestimmt, in den Basalganglien können Impulse unterdrückt oder gebahnt werden. Beide

Anteile konvergieren schließlich im Thalamus, von wo aus sie an den Motokortex weitergeleitet werden können. Bei der zentralen Funktion des Bahnens oder Unterdrückens von motorischen Impulsen spielen ein direktes und ein indirektes striatales Projektionssystem, welche sich physiologisch und histochemisch unterscheiden, die entscheidende Rolle.

Das Striatum erhält exzitatorische Afferenzen aus dem Neokortex, was Glutamat (Glu)- und Aspartat (Asp)-vermittelt erfolgt. Dies stellt die Input-Region der Basalganglien dar. Das inhibitorische System des Striatums wird durch die "Medium-Spiny-Neuronen" (MSN), die etwa 95 Prozent der striatalen Neurone ausmachen, dargestellt, wobei GABA den Transmitter darstellt. Ihnen stehen ca. 2 Prozent relativ große cholinerge, hemmende Interneurone gegenüber. Unter

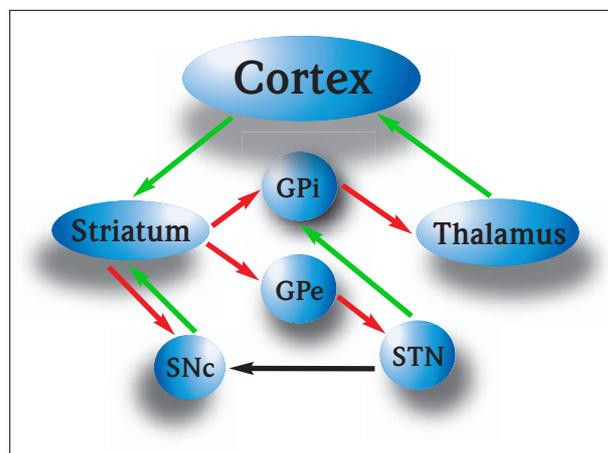


Abb 3.: Physiologisches Verschaltungsschema der Basalganglien (grüne Pfeile: aktivierende Innervation, rote Pfeile: hemmende Innervation, schwarzer Pfeil: postulierte Innervation)

den MSN kann man zwei weitere Subpopulationen unterscheiden. Die erste stellt den Anfang des direkten Projektionssystems dar, sie exprimiert neben GABA die Neuropeptide Substanz P (SuP) und Dynorphin (Dyn). Diese Neurone des direkten striatalen Projektionssystems ziehen monosynaptisch zum GPi und zur SNr. Der Ausgang des indirekten striatalen Projektionssystems wird von der anderen Subpopulation der MSN gebildet, sie kolokalisiert neben GABA Enkephalin (Enk) und projiziert in den GPe, dessen GABAerge Neurone in den NST projizieren. Die glutamatergen Neurone des NST innervieren ihrerseits die GABAergen Neurone des GPi/SNr. Der NST projiziert retrograd glutamaterg in den GPe, was damit die Funktion einer Autoregulation, eines negativen Feedbacks, hat. Das direkte Projektionssystem wirkt somit direkt inhibitorisch auf GPi/SNr. Das indirekte Projektionssystem wirkt im Endeffekt über den NST glutamaterg exzitatorisch auf GPi/SNr, was durch die Zwischenschaltung des GPe reguliert werden kann (Garett et al., 1990). GPi und SNr stellen die Output-Region der Basalganglien dar, sie besitzen eine tonische Daueraktivität, die über o.a. Mechanismen durch das direkte Projektionssystem herabgesetzt und durch das indirekte gesteigert wird. Die Output-Region GPi/SNr projiziert GABAerg in intralaminäre Thalamuskern, pedunkulopontine Kerne und den Colliculus superior, insbesondere aber in ventrolaterale Thalamuskern (VL). Von den VL aus erfolgt die glutamaterge und somit exzitatorische Projektion in den Motokortex. Zusammenfassend fördert das direkte Projektionssystem also motorische Funktionen, das indirekte hemmt sie.

1.1.2 Funktionelle Anatomie des nigrostriatalen dopaminergen Systems

Aus der SNc projizieren dopaminerge Neurone über das mediale Vorderhirnbündel (MVB) in das Striatum. Sie enden hier an Neuronen und Axonen der MSN. Am direkten striatalen Projektionssystem wird die dopaminerge Transmission über D₁-Rezeptoren vermittelt, am indirekten über D₂-Rezeptoren. Die SNc erhält GABAerge Afferenzen aus den Striatosomen oder Patches, Acetylcholinesterase-armen Gebieten des Striatum.

Eine Herabsetzung der dopaminergen Zuflüsse führt im direkten striatalen Projektionssystem zu einer Abnahme an Substanz-P-mRNA und Dyn-mRNA, im indirekten Projektionssystem zur Zunahme der Enkephalin-mRNA (Hong et al., 1985; Young et al., 1986; Bouras et al., 1986), was zur Enthemmung, also Aktivitätserhöhung in der Output-Region GPi/SNr führt (Miller et al., 1987).

Die Rolle der dopaminergen nigrostriatalen Projektionen scheint also darin zu bestehen, durch gegensätzlichen Einfluß auf direktes und indirektes Projektionssystem ein Gleichgewicht zwischen diesen herzustellen. Dopamindefizit im Striatum führt zu Tonuserhöhung der Outputregion und somit zur Hemmung motorischer Abläufe.

1.1.3 Pathophysiologische Grundlagen des Morbus Parkinson

Nach der heutigen Kenntnis der Organisation der Basalganglien kommt es zu einer enthemmten Aktivität des NST und nachfolgend zur Hyperaktivität inhibitorischer GABAerger Neuronen des medialen GPi auf die Thalamuskerngebiete. Somit sinkt die exzitatorische Funktion der Thalamuskerngebiete auf die motorischen Kortexareale, woraus insbesondere die Minussymptome Bradykinese oder Akinese resultieren. Extranigrale Veränderungen sind geeignet, mentale, autonome und endokrine Funktionsstörungen zu erklären (Whitehouse, 1986; Braak, 1990; Braak u. Braak, 1995).

Man vermutet, daß erst eine Degeneration von etwa 60 bis 80 Prozent des funktionellen neuronalen Gewebes in der SNc sowie ein Verlust von nahezu 70 Prozent des striatalen Dopamingehaltes zum Auftreten klinischer Symptome beim MP führt (Bernheimer et al., 1973; Hornykiewicz, 1982).

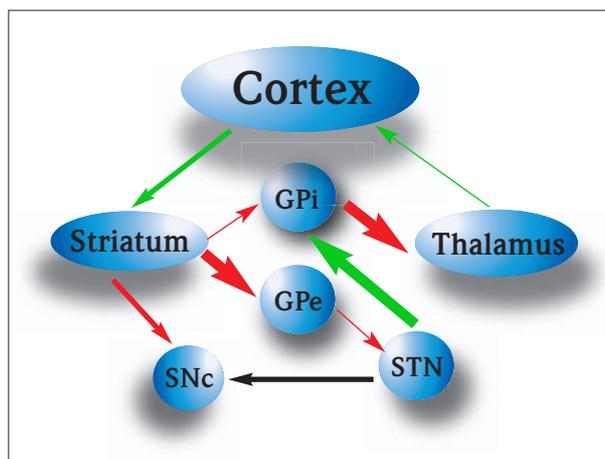


Abb 4: Pathophysiologisches Verschaltungsschema der Basalganglien (grüne Pfeile: aktivierende Innervation, rote Pfeile: hemmende Innervation, schwarzer Pfeil: postulierte Innervation) – Morbus Parkinson

1.1.4 Grundzüge und Probleme der heutigen Therapie

Beim MP handelt es sich um eine chronisch-progrediente Erkrankung meist multimorbider Patienten. Es existiert keine kurative Therapie, bei der medikamentösen Therapie treten charakteristische motorische Komplikationen auf. Die Behandlung ist daher ein komplexes Netzwerk aus medikamentöser Therapie, operativer Therapie, Physiotherapie, Logopäde, Ergotherapie und psychosozialer Betreuung.

1.1.4.1 Medikamentöse Therapie

Für die medikamentöse Therapie besteht kein einheitliches Therapieschema (Oertel, 1999). Diskutiert wird hierbei insbesondere der Einsatz potentiell neuroprotektiver Substanzen wie der NMDA-Rezeptorantagonisten Budipin und Amantadin, welche die exzitatorische glutamaterge Wirkung hemmen. Basis der Therapie des MP ist nach wie vor die Gabe von L-Dopa, der Vorstufe des Dopamins (DA), das selber die Blut-Hirnschranke nicht passieren kann und in dopaminergen Neuronen durch das Enzym Dopa-Decarboxylase in DA umgewandelt wird. Darüber hinaus kommen Dopaminagonisten, die direkt postsynaptisch DA-Rezeptoren stimulieren, zum Einsatz. Die Kombination des L-Dopa mit peripher wirksamen Decarboxylasehemmern, Benserazid oder Carbidopa, die die Umwandlung des L-Dopa in DA außerhalb des ZNS verhindern, ermöglicht eine weitgehend nebenwirkungsfreie Behandlung und zudem eine Dosisreduktion auf ein Viertel bis ein Fünftel der Monotherapie-Äquivalenzdosis. Für die Wirksamkeit der eingesetzten dopaminergen Substanzen ist entscheidend, daß sich die neurodegenerativen Prozesse vor allem präsynaptisch abspielen. Postsynaptisch bleibt die Rezeptordichte und Sensibilität zunächst erhalten, erst im Verlauf der Therapie kommt es dort zu funktionellen Veränderungen, was deren Wirkverlust erklärt (Bravi et al., 1994; Riederer et al., 1989). Ab einer Therapiedauer mit L-Dopa von ca. fünf Jahren zeigen sich Wirkungsfluktuationen (Poewe et al., 1986) wie Peak-of-dose-Dyskinesien, unfreiwillige Bewegungen beim Maximum des L-Dopa-Plasmaspiegels, bzw. End-of-dose-Aki-



Abb. 5

nesien beim Absinken des Plasmaspiegels. Später zeigen sich zunehmend vom Plasmaspiegel unabhängige Schwankungen, sogenannte On- und Off-Phasen (Übersicht: Oertel u. Quinn, 1996).

MAO-B-Hemmer und COMT-Hemmer erhöhen die DA-Konzentration im synaptischen Spalt durch Hemmung des Abbaus von DA und dessen Vorläufermolekülen. Anticholinergika kommen bei gering ausgeprägter Symptomatik zum Einsatz. Sie hemmen die inhibitorischen striatalen cholinergen Interneurone.

1.1.4.2 Operative Therapie, Tiefenhirnstimulation



Abb. 6

Drei invasive Methoden sind momentan denkbar. Die erste Methode ist die stereotaktische Thermokoagulation verschiedener Kerngebiete des Thalamus, im Globus pallidus oder NST, wobei die Hauptindikationen hierfür der medikamentös nicht beherrschbare Tremor, Dyskinesien (Nitter, 1978) und Wirkungsfluktuationen (Iacorno et al., 1995) sind. Die zweite Möglichkeit stellt die Transplantationschirurgie von DA-produzierendem Gewebe entweder autolog aus dem Nebennierenmark oder heterolog mit embryonalem Mittelhirngewebe dar. Für die autologe Transplantation konnten Langzeitverbesserungen nicht gesichert werden (Goetz et al., 1991), bei der heterologen Transplantation bestehen bei ermutigenden Ergebnissen (Olanow et al., 1996) neben technischen Problemen ethische Bedenken, man benötigt drei bis vier Embryonen pro Hemisphäre (Hauser et al., 1999).

Zum dritten kommt die Tiefenhirnstimulation in Betracht. In der Therapie des Parkinsontremors und des essentiellen Tremors kommt seit mehreren Jahren die Hochfrequenzstimulation des Thalamus beim Menschen erfolgreich zum Einsatz (Benabid et al., 1991; Blond et al., 1992; Pollak et al., 1993). Es ergeben sich klare Vorteile zur irreversiblen Destruktion (z.B. Thermokoagulation) des Gewebes wie z. B. Reversibilität und bessere Kontrolle der unerwünschten Wirkungen. Die Methode der Hochfrequenzstimulation des NST kam beim Menschen zur Anwendung, nachdem ein positiver Effekt einer Läsion bzw. Stimulation im Tierversuch bei MPTP-induziertem Parkinsonismus auf die Symptome Akinesie und Rigor festgestellt werden konnte (Bergmann et al., 1990; Aziz et al., 1991; Aziz et al., 1992). Indiziert ist das operative Vorgehen insbesondere bei L-Dopa

induzierten Komplikationen (Krack et al., 1997) und gegen die „off“-Symptomatik, des weiteren können Fluktuationen zwischen „on“ und „off“-Phasen abgemildert werden, die Unabhängigkeit des Patienten im Alltag nimmt zu, die Medikation kann reduziert werden, die kognitiven Funktionen bleiben beim nicht vorgeschädigten Gehirn unbeeinflusst (Limousin et al., 1998).

Eine unilaterale Stimulation beim Menschen führt zur Verbesserung kontralateraler, jedoch nicht ipsilateraler Symptome, eine Verbesserung der Aktivität im Alltag erfordert eine bilaterale Stimulation (Limousin et al., 1995). Die Dosierung mit L-Dopa kann drastisch reduziert werden, konsekutiv sinken die L-Dopa-induzierten Dyskinesien. Die Effektivität einer NST-Stimulation hängt von einer optimalen Elektrodenplatzierung ab, was innerhalb eines Toleranzbereiches von 3 mm um die Zielregion erfolgen sollte (Limousin et al., 1995). Somit ist die stereotaktische Eingriff am NST komplizierter als der Eingriff am Thalamus, insbesondere auch dadurch, daß die Stimulation der Zielregion zu keiner charakteristischen Reizantwort führt. Der Vorzug einer Stimulation des NST gegenüber dem GPI scheint ein ausgeprägter antikinetiescher Effekt zu sein (Krack et al., 1997).

Der Mechanismus der chronischen Elektrostimulation des NST ist unbekannt. Die Tatsache, daß die Tiefenhirnstimulation des NST zum Hemiballismus führen kann, wie er bei spontanen Läsionen des NST auftritt, und die Tatsache, daß der Effekt der Stimulation der einer irreversiblen beabsichtigten Läsion entspricht, führen zu der Vermutung, daß dem Effekt ein inhibitorischer Mechanismus, quasi eine reversible Mikrosubthalamotomie, zugrunde liegt. Hochfrequenzstimulation bewirkt eine Depolarisationsblockade der NST-Neuronen. Dieser Effekt kann optimal in einem Stimulationsfrequenzbereich zwischen 50 und 2000 Hz erreicht werden, wobei zur Verbesserung der Parkinsonsymptomatik eine Frequenz von 30 Hz genügt, was wiederum interessanterweise nahe an der spontanen Impulsfrequenz des NST liegt (Limousin et al., 1995).

Es erfolgt die stereotaktische Implantation einer Sonde nach Bildgebung des Neurokraniums unter Zuhilfenahme der Aufzeichnungen einer Mikroelektrode und die Implantation eines Pulsgenerators in der Regel in eine Pectoralisloge. Die ernsthafteste Komplikation ist das intracerebrale Hämatom, wie es bei allen stereotaktischen Eingriffen auftreten kann. Dies passiert bei 2 bis 8 Prozent der Patienten (Limousin et al., 1998; Obeso et al., 1997). Eine weitere Komplikation könnte in einem Wirkverlust bei chronischer Elektrostimulation bestehen, weshalb bei einer Vielzahl der Patienten die Impulsintensität im Verlauf der Zeit leicht erhöht werden muß (Limousin et al., 1998).

1.2 Neuroprotektiver Effekt der Läsion des Ncl. subthalamicus auf dopaminerge Neuronen der Substantia nigra

Unklar bleibt weiterhin die Rolle des NST bei der Ätiologie des MP. Möglicherweise spielt Glutamat, das über NMDA-Rezeptoren neurotoxisch wirkt, wenn das intrazelluläre Energieniveau gesenkt ist eine entscheidende Rolle (Novelli et al., 1988; Blandini et al., 1996). Es konnte ein Defizit an Mitochondrienkomplex I isoliert in der SNc (Parker et al., 1989; Hattori et al., 1991; Schapira, 1994), Defekte in der Atmungskette der Mitochondrien und signifikant mehr Fehler im Mitochondriengenom des nigrostriatalen Systems von MP-Patienten (Ikebe et al., 1995) nachgewiesen werden. Verschiedene Autoren konnten den Verdacht der Rolle von NMDA-Rezeptoren bei neurotoxischen Mechanismen in vitro wie in vivo erhärten (Sonsalla et al., 1989, 1991; O´Dell et al., 1992; Marshall et al., 1993; Zeevalk et al., 1995), desweiteren konnten NMDA-Rezeptor-vermittelte Afferenzen auf dopaminerge SNc-Neurone nachgewiesen werden (Chergui et al., 1994). Auf der Grundlage, daß die SNc eine Reihe von NMDA-Rezeptoren besitzt und glutamaterge Projektionen vom NST zur SNc existieren (Hammond et al., 1978; Parent u. Hazrati, 1995), untersuchten Piallat et al. 1996, ob die Inaktivierung des NST durch Chemoläsion im Tiermodell dopaminerge Neurone der SNc vor der Toxizität des selektiven Dopamin-Neurotoxins 6-OHDA schützt. Es wurde der Verdacht geäußert, daß eine Läsion des NST die Zellen der nigrostriatalen Projektionen vor der Neurotoxizität des 6-OHDA schützt. Somit wurde postuliert, eine Methode gefunden zu haben, die das Fortschreiten des MP verlangsamen oder gar aufhalten kann.

1999 griffen Nakao et al. diese These wieder auf und untersuchten den Effekt von NST-Läsionen durch Chinolinsäure auf dopaminerge Neurone der Ratte. Zur Zerstörung der terminalen nigrostriatalen, dopaminergen Neurone dienten hier intrastriatale Injektionen von 6-OHDA bzw. von 3-Nitropropionsäure (3-NP) zwei Wochen nach NST-Ablation. In der Gruppe mit 3-NP-Injektionen führte die zuvorige NST-Läsion zu einer signifikanten Protektion der DA-Neurone in der SNc, nicht jedoch bei Injektion von 6-OHDA.

1.2.1 Bisherige Publikationen zur Untersuchung eines möglichen neuroprotektiven Effektes einer Läsion des Nucleus subthalamicus auf dopaminerge Neurone der Substantia nigra

1.2.1.1 NST-Läsionsversuche der Arbeitsgruppe um Piallat (Piallat et al., 1996)

Material und Methoden

Hier findet sich ein Versuchsaufbau mit vier Gruppen à 10 (Gruppen 1-3) bzw. 5 (Gruppe 4) Versuchstieren (männliche Wistar-Ratten, IFFA Credo), wobei die Tiere der Gruppe 1 eine unilaterale striatale Injektion von 6-OHDA erhielten, die Gruppe 2 Kainsäure in den NST, die Gruppe 3 Kainsäure in den NST und eine Woche später eine 6-OHDA-Injektion ins Striatum. Die Gruppe 4 entspricht der Gruppe 3 mit dem Unterschied, daß KA gegen isotonische Kochsalzlösung ersetzt wurde.

20 mg 6-OHDA wurden in 4 ml isotonischer Kochsalzlösung (mit 0,2mg/ml L-Ascorbinsäure als Antioxidans) gelöst und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min in das rechte Striatum injiziert. Als Koordinaten dienten nach dem stereotaktischen Gehirnatlas von Paxinos und Watson (Paxinos et al., 1982) AP +1 mm, ML 3 mm, VD -4,5 mm (jeweils ab Bregma).

Die NST-Läsionen erfolgten durch in 0,5 ml Kochsalzlösung gelöste 2 mg Kainsäure mit den Koordinaten AP + 5,2 mm (interaural), ML 2,5 mm (interaural) und VD +7,5 mm (ab Dura). Injiziert wurde in einer Geschwindigkeit von 0,25 ml/min.

Nach der transkardialen Perfusion in tiefer Chloralhydrat-Anästhesie wurden die Gehirne fixiert und gefroren. Es folgten Serienschnitte von einer Dicke von 40 µm beim Striatum und 25 µm für den NST und die Substantia nigra pars compacta.

Histologisch ausgewertet wurde mittels Tyrosinhydroxylase- und Kresylviolett-färbung, entsprechend den in dieser Arbeit weiter unten angegebenen Verfahren.

Ergebnisse

Zunächst erfolgte eine Verhaltensbeobachtung der Versuchstiere. Mit KA NST-lädierte Tiere (Gruppe 2) zeigten einen kontralateralen Hemiballismus, also die bei einer NST-Läsion zu erwartende Symptomatik, und rotierten nach Apomorphininjektion ipsilateral. 6-OHDA-lädierte Tiere (Gruppe 1) entwickelten neben einer Aphagie, Adypsie und Akinesie ein deutliches kontralaterales Drehen nach subkutaner Apomorphininjektion. Tiere, die eine unilaterale 6-OHDA-Applikation ipsilateral der KA-NST-Läsion erhalten hatten, zeigten bei Apomorphinapplikation dasselbe Verhalten wie die Tiere der Gruppe 2, nämlich ipsilaterale Rotationen. Im Gegensatz dazu waren bei der Kontrollgruppe, bei der KA durch Kochsalzlösung ersetzt wurde, kontralaterale Rotationen zu beobachten.

Die histologische Untersuchung zeigte, daß Tiere, die nur eine 6-OHDA Injektion erhalten hatten (Gruppe 1), einen signifikanten Verlust an TH-positiven Zellen in der SNc (Verlust von $43,5 \pm 12,8\%$) aufwiesen. Suffiziente NST-Läsion wurde mittels Kresylviolett färbung ermittelt, wobei nur solche Tiere, bei denen eine komplette Läsion des Kernareals vorlag, in die Auswertung eingeschlossen wurden. Die Auswertung der TH-gefärbten SNc-Schnitte erbrachte in der Gruppe 3 (NST-KA + 6-OHDA) einen deutlich geringeren neuronalen Verlust an TH-positiven Zellen als in der reinen 6-OHDA-Gruppe (neuronaler Verlust $7,6 \pm 3,3\%$). In der Kontrollgruppe (Gruppe 4, NST-Kochsalzlösung) zeigte sich erneut der deutliche neuronale Verlust.

Somit wurde auf einen neuroprotektiven Effekt einer NST-Läsion auf dopaminerge nigrostriatale Neuronen gegen 6-OHDA-Toxizität geschlossen.

1.2.1.2 NST-Läsionsversuche der Arbeitsgruppe um Nakao (Nakao et al., 1999)

Material und Methoden

Die Arbeitsgruppe um Nakao untersuchte die Rolle der Afferenzen des NST zu den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra durch einen Versuchsaufbau, bei dem männlichen Sprague-Dawley-Ratten eine Läsion der nigrostriatalen dopaminergen Bahnen durch Injektion von entweder 3-NP oder 6-OHDA zugefügt wurde und diese Ratten, je nach Vorgehensweise am NST, in drei Subgruppen unterteilt wurden. Als erste wurde die „nigral lesion alone“-Gruppe definiert, die Gruppe „nigral plus STN lesion“ stellte die zweite dar. Als drittes schließlich gab es die „nigral plus sham lesion“-Gruppe, in der die Injektion an den NST ohne lädierendes Agens erfolgte. Jede der drei Gruppen wurde abhängig von der zur nigrostriatalen Läsion verwendeten Substanz (3-NP oder 6-OHDA) weiter in je zwei Subgruppen unterteilt.

Zur Läsion des NST in der „nigral plus STN lesion“-Gruppe wurde dieser unilateral mit Chinolinsäure (QA) injiziert, in der Kontrollgruppe („nigral plus sham lesion“) wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) injiziert. Am Tag der NST-Läsion erhielten die Tiere bilateral striatale Injektionen mit Fluorogold.

Zwei Wochen nach der NST-Läsion führten intrastriatale Injektionen von 3-NP oder 6-OHDA zur Läsion nigrostriataler Bahnen. Es folgte die Tötung der Tiere nach 1-4 Wochen.

Die unilateralen NST-Läsionen erfolgten mit 12 nmol QA, welches mittels einer 2 ml Hamiltonspritze in einer Lösung mit der Konzentration 120 nmol/ml über 5 Minuten an die Koordinaten 3,8 mm posterior des Bregmas, 2,5 mm lateral, -7,8 mm ab Dura bei einem auf 3,3 mm unter Null gesetzten Zahnbalken injiziert wurde. Nach Ende der Injektion wurde die Kanüle für weitere 5 Minuten am Platz belassen, bevor sie zurückgezogen wurde.

0,2 ml einer 4% Fluorogoldlösung in NaCl wurden mit einer Geschwindigkeit von 0,05 ml/min mit einer 2 ml Hamilton-Mikrospritze bilateral an die Koordinaten 1,0 mm anterior ab Bregma, 3,0 mm lateral und - 4,5 mm ab Dura injiziert. Die Läsion der nigrostriatalen Bahnen erfolgte durch Injektion entweder einer Lösung von 3-NP oder 6-OHDA in unterschiedlichen Konzentrationen in 0,9% physiologischer Kochsalzlösung unter Zugabe von 0,2% Ascorbinsäure. Die Injektion von 2 ml der Lösung wurde bei einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/min an denselben Koordinaten durchgeführt, an denen die FG-Injektion erfolgt war.

Das gewonnene Gewebe wurde nach Tötung der Tiere, Fixierung des Gehirns und Kryostatschnitt je nach geplanter Untersuchung weiterverarbeitet. Schnitte für FG-Fluoreszenz wurden nach der Fixierung nicht weiterverarbeitet, sondern unmittelbar auf Objektträger aufgezogen und überdeckt. Schnitte für die Tyrosinhydroxylase-Färbung wurden „free-floating“, also frei im Medium schwimmend weiterverarbeitet, wie es im Methodikteil dieser Arbeit beschrieben wird. Die Weiterverarbeitung des NST-haltigen Areals mit der Cytochromoxidasefärbung erfolgte ebenfalls wie weiter unten beschrieben.

Die morphologische Analyse der Zellzahlen in der SNc wurde durch Auszählung von Zellsomata in der TH- bzw. FG-Färbung bei 400facher Vergrößerung durchgeführt. Die Quantifikation der c-Fos Expression erfolgte durch ein auf Macintosh basierendes System durch Digitalisierung der Schnitte und letztendlich Auszählung der c-Fos-positiven Zellsomata.

Ergebnisse

Zunächst ist bemerkenswert, daß lediglich ein Tier in der 3-NP (500 mmol) plus NST-Läsionsgruppe und ein Tier in der 6-OHDA (20 mg) plus NST-Läsionsgruppe inkomplette, jedoch nahezu vollständige Läsionen des NST aufwiesen, was zum Ausschluß dieser beiden Tiere führte. Alle übrigen Tiere zeigten einen kompletten Verlust der NST-Neuronen und konnten daher eingeschlossen werden.

Als erstes wurde festgestellt, daß in allen Gruppen die Injektion von entweder 3-NP oder 6-OHDA sowohl zu einem Verlust TH-positiver, als auch FG-markierter Zellen in der SNc führt. Bei der Substantia nigra-Läsion mit 125 mmol oder 250 mmol 3-NP bewirkte eine vorherige NST-Läsion einen signifikanten ($p < 0.01$) Rückgang des Untergangs dopaminerger Neurone der SNc. Bei steigender Konzentration des Striatum-Toxins (z.B. 500 mmol 3-NP) konnte jedoch kein neuroprotektiver Effekt mehr nachgewiesen werden. Der bei Striatum-Läsionen mit 3-NP beobachtete positive Effekt auf das Überleben der dopaminerger Neurone der SNc konnte bei Verwendung der Substanz 6-OHDA allerdings nicht nachgewiesen werden ($p < 0.05$).

Mittels histochemischer Untersuchung des NST wurde versucht, auf dessen neuronale Aktivität rückzuschließen. Um den Einfluß einer SNc-Läsion auf den NST zu untersuchen, wurde mittels CO-Färbung vier Wochen nach striataler Toxininjektion die Intensität der NST-CO-Färbung untersucht, wobei allerdings kein signifikanter Unterschied gefunden werden konnte.

Schließlich wurde die Expression des Proteins c-Fos, dem Produkt des c-fos-Gens, untersucht. Dieses Protein wird vorübergehend in Neuronen mit Glutamatrezeptoren

tor-Überaktivität produziert (Aronin, 1991; MacDonald 1995). Es wurde daher die Expression des c-Fos-Proteins in der SNc nach striataler Toxinapplikation (3-NP) quantifiziert, um den dem Zelltod dopaminerger Neurone in diesem Fall zugrundeliegenden Mechanismus zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß 24 Stunden nach Injektion von 250 mmol 3-NP ins Striatum das c-Fos-Protein auf der der Läsion ipsilateralen Seite in der SNc signifikant exprimiert wurde, auf der unlädierten Gegenseite jedoch nicht. Diese Erhöhung der c-Fos-Protein Expression konnte durch vorherige NST-Läsion signifikant gesenkt werden.

1.3 Das 6-OHDA-Modell

Die einmalige intrastriatale Injektion des Katecholamin-Zell-spezifischen Neurotoxins 6-OHDA führt in vivo zu einem selektiven retrograden, progressiven Verlust der in die Injektionsregion projizierenden dopaminerger nigralen Neurone. Die Degeneration beginnt etwa eine Woche nach Injektion und setzt sich über acht bis 16 Wochen fort (Sauer u. Oertel, 1994). Degenerierende Neurone der SNc verlieren histologisch die Morphologie eines intakten Neurons, so daß durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der durch 6-OHDA induzierte Zelltod quantifiziert werden kann. Es steht somit ein experimentelles Modell des einem MP entsprechenden progredienten Verlusts dopaminerger nigrostriataler Neurone zur Verfügung.

1.4 Fluorogold (FG)

Durch intrastriatale Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorogold (Fluorochrome[®], Englewood, CO, USA) gelingt eine Markierung von vitalen Neuronen der SN durch den retrograd-axonalen Transport über nigrostriatale Fasern. Die FG-Markierung bietet den Vorteil der Markierung einer genau definierten Subpopulation von nigralen DA-Neuronen.

1.5 3-Nitropropionsäure (3-NP)

Als Alternativsubstanz zum 6-OHDA diene das Mitochondrientoxin 3-NP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), $C_7H_5NO_4$, Molekulargewicht 119,1 U. Es hemmt die Succinyldehydrogenase, das Flavoprotein, das die Dehydrierung von Succinat zu Fumarat im Citratzyklus katalysiert und Reduktionsäquivalente direkt auf das Ubichinon der Atmungskette überträgt. Es führt als Exzitotoxin zu quantifizierbaren Läsionen der nigrostriatalen Projektionen (Riepe et al., 1992; Ludolph et al., 1992; Simpson u. Isacson, 1993; Zeevalk et al., 1995).

1.6 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Ergebnisse um Piallat und Nakao zu reproduzieren und die gegensätzlichen Aussagen zu veri- oder falsifizieren. Darüber hinaus wurde der Versuchsaufbau dahingehend ergänzt, daß der Effekt einer Läsion des NST nach intrastriataler Toxininjektion, d.h. nach Beginn der progredienten nigrostriatalen Zelldegeneration, sowie die Kombination beider Ansätze durch Verwendung von 3-NP zur striatalen Injektion bei NST-Läsion mit Kainsäure untersucht wurde, um substanzspezifische Unterschiede auszuloten. Somit beschäftigt sich diese Arbeit mit der Untersuchung des Einflusses einer NST-Läsion auf den Krankheitsverlauf bzw. die Symptomatik beim Morbus Parkinson. Könnte ein neuroprotektiver Effekt der NST-Läsion auf dopaminerge Neurone der SNc nachgewiesen werden, so wäre die neurochirurgische Intervention mit Thermokoagulation bzw. funktioneller Ausschaltung durch Hochfrequenzstimulation mehr als eine symptomatische Therapie, sondern wäre möglicherweise in der Lage, die Progredienz der Erkrankung zu verlangsamen oder gar aufzuhalten.

2.1 Tiere und Tierhaltung

Männliche Sprague-Dawley Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) mit einem Gewicht von 250-275g zu Beginn des Experiments wurden bei einem 12 Stunden Tag-Nacht Zyklus sowie Nahrung und Wasser ad libitum gehalten.



2.2 Versuchsanordnung

Tabelle 1:

GRUPPE	TAG 0	TAG 7	TAG 14	TAG 17	TAG 28	TAG 35	TAG 42	n Tag 0	n verwertet
1	FG	KA	6-OHDA		SAC			8	6
2	KA	FG	6-OHDA		SAC			8	5
3	FG	NaCl	6-OHDA		SAC			8	7
4	NaCl	FG	6-OHDA		SAC			8	6
5	KA	6-OHDA			SAC			8	6
6	NaCl	6-OHDA			SAC			8	8
7	FG+QA		3-NP				SAC	10	4
8	FG+PBS		3-NP				SAC	10	5
9	FG		3-NP	QA			SAC	10	7
10	FG		3-NP	PBS			SAC	10	7
11	FG+KA	3-NP				SAC		15	5
12	FG+NaCl	3-NP				SAC		10	9
								n _{ges} = 113	n _{ges} = 75

FG = Fluorogold, KA = Kainsäure, 6-OHDA = 6-Hydroxydopamin, SAC = Tötung der Tiere, NaCl = Natriumchlorid, QA = Chinolinsäure, 3-NP = 3-Nitropropionsäure, PBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung

2.3 Anästhesie

Die völlige Bewußtlosigkeit, Analgesie und Relaxation der Tiere wurde durch intramuskuläre Injektion von 5 mg/kg einer 2%igen Lösung von Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2 % , BayerVital, Leverkusen) sowie 100 mg/kg des Hypnoanalgetikums Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn) in den Hinterlauf sichergestellt. Die große therapeutische Breite v.a. des Ketamins machte eine Nachinjektion bei unbefriedigender Anästhesie problemlos möglich.



Abb. 7

2.4 OP-Vor- und -Nachbereitung, Schaffung der Zugangswege

Das Versuchstier wurde anästhesiert, bei Eintreten der Bewußtlosigkeit und Analgesie der Körperhülle die Kopfhaut rasiert und im stereotaktischen Operationsrahmen (Kopf, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) fixiert. Nach lokaler Desinfektion erfolgte ein sagittaler Hautschnitt über der Kalotte von ca. 2 cm und über der zuvor berechneten stereotaktischen Injektionsstelle die Trepanation unter Schonung der Dura. Durch die Bohrlöcher erfolgte das Einführen der am Mikromanipulator befestigten Kanüle.

Postoperativ wurde die Wunde mit Nahtklammern verschlossen und mit Betaisodona[®]-Lösung versorgt. Die Tiere erwachten unter Aufsicht in einem mit Zellstoff ausgelegten Käfig.

2.5 Stereotaxie

Die intrakranielle Injektion der jeweiligen Lösung erfolgte mit Hilfe des stereotaktischen Rahmens und 1 µl bzw. 10 µl Hamilton[®] Mikroliterspritzen an die in Tabelle 2 angegebenen Koordinaten:

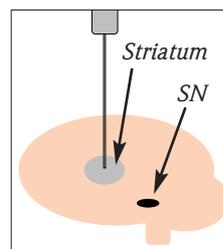


Abb. 8: Striatale Injektion

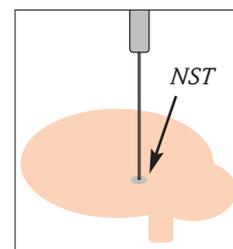


Abb. 9: Injektion an den NST

Tabelle 2: Nach Atlas von Paxinos und Watson, 1982

STRIATUM (Sauer & Oertel, 1994)	AP:	+ 1 mm	(ab Bregma)
	ML:	+/- 3 mm	(ab Bregma)
	VD:	- 4,5 mm	(ab Bregma)
NST (KA) (Piallat et al., 1996)	AP:	+5,2 mm	(interaural)
	ML:	+ 2,5 mm	(interaural)
	VD:	- 7,5 mm	(ab Dura)
NST (QA) (Nakao et al., 1999)	AP:	- 3,8 mm	(ab Bregma)
	ML:	+ 2,5 mm	(ab Bregma)
	VD:	- 7,8 mm	(ab Dura)

KA = Kainsäure, QA = Chinolinsäure, NST = Nucleus subthalamicus,
AP = Anteroposterior, ML = Mediolateral, VD = Ventrodorsal

2.6 6-OHDA und 3-NP

20 µg 6-OHDA werden in 4 µl NaCl angesetzt und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 µl/min injiziert. Nach der Injektion verblieb die Kanüle weitere 5 Minuten am Injektionsort, um die Diffusion ins Gewebe zu verbessern und das Zurückfließen der Substanz zu verhindern. 6-OHDA wurde in einer zweiprozentigen Vitamin C/NaCl-Lösung als Antioxidans gelöst.

7,4 mg 3-NP werden in 500 ml 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4, gelöst. 2 µl, entsprechend 250 nmol 3-NP, werden mit einer Geschwindigkeit von 0,1 µl/min in das Striatum injiziert. Anschließend verbleibt die Kanüle weitere 2 Minuten am Injektionsort, bevor sie langsam zurückgezogen wird.

2.7 Kainsäure (KA) und Chinolinsäure (QA)

Kainat (KA=[2S-(2a,3b,4b)]-2-carboxy-4-(1-methylethenyl)-3-pyrrolidin-acetat; C₁₀H₁₄NO₄) gilt als selektiver Agonist an Kainatrezeptoren und potentes exzitatorisches Neurotoxin. (Watkins, 1978; Watkins u. Evans, 1981)

Die Läsion mit KA erfolgte mit 0,5 µl einer Lösung in isotonem Kochsalz, entsprechend 2 mg KA, bei einer Geschwindigkeit von 0,05 µl / 30 Sekunden und dem Verbleiben der Kanüle am Injektionsort von 3,5 Minuten nach der letzten Injektion.

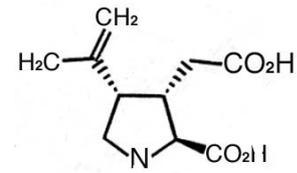


Abb. 10: Kainsäure

Chinolinat (QA=Pyridin-2,3-dicarboxysäure; C₇H₅NO₄), ein Metabolit von Tryptophan, besitzt exzitatorische neurotoxische Eigenschaften als NMDA-Agonist, spezifisch an NMDA R2-Subtypen (Stone u. Perkins, 1981; Schwarcz et al., 1983; Stone u. Burton, 1988; de Carvalho et al., 1996).

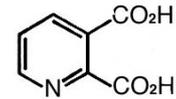


Abb. 11: Chinolinsäure

Beim Verwenden von QA wurden 0,1 µl einer Lösung mit der Konzentration 120 nmol/ml 0,1M PBS, entsprechend 12 nmol, bei 0,02 µl/Minute und dem Verbleiben der Kanüle von weiteren 5 Minuten injiziert.

2.8 Fluorogold (FG)

Hierzu werden jeweils 0,2 µl einer 4%igen Lösung des Farbstoffes in NaCl bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 0,05 µl/min (zuzüglich 8 Minuten Verbleib der Kanüle am Injektionsort um die FG-Diffusion ins Gewebe zu verbessern und ein Rückfließen der Substanz entlang des Stichkanals zu verhindern) stereotaktisch bilateral in das Striatum injiziert.

Objektträger mit Gewebeschnitten zur Fluoreszenzmikroskopie mit FG-markierten Neuronen wurden lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Verwendete Substanzen bei Kontrollgruppen

Als Vehikel bzw. Trägersubstanz in den Kontrollgruppen, wurde in die Region des NST 0,5 ml 0,9 % NaCl über 8 Minuten zum Ersatz von KA und bei QA 0,1 ml 0,1 M PBS (8 g/l NaCl und 0,2 g/l KCl in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) über 9 Minuten injiziert.

Somit wurden bei exakt den gleichen Bedingungen gleiche Volumina injiziert.

2.10 Gewinnung und Verarbeitung des Gewebes

Die Tiere wurden mit einer Guillotine dekapitiert und das Gehirn nach Eröffnung der Kalotte entfernt. Mit je einem Schnitt in frontaler Ebene wurden ventral und dorsal Schnitte von 3-5 mm Dicke mit einer Rasierklinge entfernt und somit die Zielregion eingegrenzt. Hieraus wurden Teile des Striatums für die biochemische Untersuchung präpariert, in Aluminiumfolie verpackt und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Der eingegrenzte Anteil des Gehirns wurde 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd fixiert, danach in 15 % Sucrose bei 4°C dehydriert.

Die Gehirne wurden bei -20°C mit einer Schnittdicke von 35 µm in drei Schnittserien coronar im Kryostat geschnitten und bis zur histologischen/ histochemischen Weiterverarbeitung bei -20°C in Antifreeze (1 l = 1,57 g NaH₂PO₄, 5,18 g Na₂HPO₄, 400 ml H₂O bidest., 300 ml Ethylenglycol, 300 ml Glycerin) aufbewahrt.

2.11 Elektrochemischer Nachweis von Katecholaminen durch HPLC

Das am Ende jedes Experimentes präparierte striatale Gewebe wurde gewogen und in einem mit 2 ml eisgekühlter Perchlorsäure (500 µl; 0,4 M) gefüllten Eppendorf[®]-Tube eine Minute lang bei 20.000 U/Min. mittels Ultra Turrax[®] homogenisiert und anschließend 15 Minuten bei 5.000 U/Min. bei 4°C zentrifugiert.

Nach Filterung mit einem 0,2 µm Filter folgte entweder direkt die Analyse mittels HPLC und elektrochemischem Nachweis, oder die Aufbewahrung bei -70°C bis zur Analyse. Dopamin (DA) und seine Stoffwechselprodukte Dihydroxyphenyllessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) wurden durch Chromatographie in umgekehrter Phase in Kombination mit einem elektrochemischen Zweikanal-Detektor nachgewiesen. Die Einstellung des Detektorpotentials erfolgte auf +750 mV unter Verwendung einer Glas-Kohlenstoff-Elektrode und einer Ag/AgCl Referenzelektrode. Die mobile Phase (0,14 g Oktansulfonsäure-Natrium-Salz, 0,1 g Na₂EDTA, 6 ml Triethylamin, mit H₃PO₄ auf pH 2,8 in 11 "millipore Q" Wasser, enthält 35 ml Acetonitril, eingestellt) wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,4 ml/Min. bei 22°C auf die Säule der umgekehrten Phase

(125 x 3 mm mit 5 x 3 mm Vorsäule; Nucleosil 120-3 C18; Knauer[®], Deutschland) aufgebracht. 20 µl wurden durch einen Autosampler mit Kühlmodul bei 4°C injiziert. Die Daten wurden durch das HPLC-Computersystem Gynkosoft[®] (Gynkotec[®], Deutschland) aufgezeichnet und durch eine externe Standardkalibrierung verrechnet. Die Ergebnisse wurden in ng/mg Feuchtgewebe angegeben.

2.12 Cytochromoxidase-Färbung

Da vor dem Hintergrund der Fragestellung nach möglicher Neuroprotektion auch nach funktioneller Ausschaltung der Neuronen des NST ein Marker für neuronale Aktivität gefunden werden mußte, bedienten wir uns des enzymatisch-histochemischen Nachweises des Komplex IV der mitochondrialen

Atmungskette, der Cytochromoxidase (Ferrocytochrom C, Cytochrom c-Oxidase, CO) als Indikator metabolischer Aktivität (Vila et al., 1996; Wong-Riley 1979), nachdem eine Korrelation zwischen funktioneller neuronaler Aktivität und Sauerstoffmetabolismus beschrieben wurde (Wong-Riley, 1989).

Da es sich bei der beschriebenen Methode um einen Nachweis enzymatischer Aktivität handelt, ist die Verarbeitung möglichst frischen Gewebes entscheidend, in unserem Fall max. 24 Stunden nach Gewebeentnahme.

35 µm Kryostatschnitte der Region des NST wurden auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C anfixiert. Nach Entwässerung in Alkoholreihe und Xylol erfolgte die Färbung bei 25°C auf dem Rüttler, optimale Ergebnisse wurden bei einer Inkubationszeit von 7 Stunden erzielt.

Die zur Färbung verwandte Lösung enthielt folgende Komponenten (für eine Küvette = 10 Objektträger):

90 ml 0,1 M Phosphatpuffer

50 mg 3,3´ Diaminobenzidin

30 mg Cytochrom C aus dem Pferdeherzen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

4 g Sucrose

200 µg/ml Katalase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

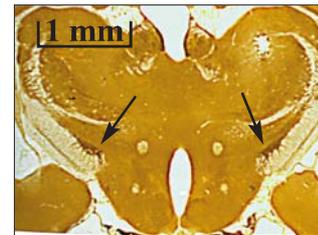


Abb. 12: CO-gefärbter Frontalschnitt mit beidseitig intaktem NST

2.13 Tyrosinhydroxylase-Färbung

Eine Möglichkeit der mikroskopischen Darstellung nigraler Neuronen besteht in der immunohistochemischen Detektion von Tyrosinhydroxylase (TH), dem Enzym, das die Aminosäure Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (Dopa) hydroxyliert, aus dem durch nachfolgende Decarboxylierung Dopamin entsteht.

Das nachfolgend beschriebene Verfahren erfolgt "free-floating", d. h. mit noch nicht auf Objektträger

fixierten, frei in der Flüssigkeit schwimmenden Gewebeschnitten und bei Raumtemperatur: 35 µm Kryostat-Gefrierschnitte werden auf Färbeschalen verteilt und 3 x 10 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen, anschließend erfolgt eine Blockierung der endogenen Peroxidase durch das 15-minütige Spülen in einer Lösung aus 1 ml Methanol, 1 ml 30%igem H₂O₂ und 8 ml 0,1 M Phosphatpuffer (Angaben für 10 ml Lösung).

Wiederum 3 x 10 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer spülen.

Die 60-minütige Präinkubation erfolgt in 10 ml einer Lösung aus 500 µl NHS (Normal Horse Serum, Vector S-2000) zur Bindung unspezifischer Bindungsstellen und 9,5 ml Triton / PB (Triton / PB = 0,1 M Phosphatpuffer + 0,3 % Triton) zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Es folgt die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in der TH-Antikörperlösung ("anti-tyrosine hydroxylase made in mouse", Boehringer Mannheim; 10 µl TH-AK 1:40 mit 20 µl NHS sowie 0,98 ml Triton/PB auf eine Endkonzentration von 1:4000 verdünnen). Nach erneutem Spülen in Phosphatpuffer Überführung der Schnitte in biotinylierte Anti-Maus-IgG-Lösung ("anti-mouse made in horse", biotinyliert von Vektor BA-2000; 5 µl anti-mouse IgG in 1 ml Triton / PB) für 60 Minuten, anschließend in PB spülen, darauf Überführen der Schnitte in eine Lösung aus 50 µl Streptavidin und 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer, hierin verbleiben die Gewebeschnitte wiederum 60 Minuten. Bei der abschließenden Reaktion dient 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma) in 0,1 M Phosphatpuffer unter Zugabe von 2 % H₂O₂ als Chromogen (5 mg DAB in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer, Zugabe von 20 µl 1%iger Peroxidase je ml DAB-Lsg.). Dem Spülen in Phosphatpuffer und Aufziehen auf gelatine-beschichtete Objektträger folgt das Trocknen über Nacht, anschließendes Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol, sowie das Einbetten in Corbit.

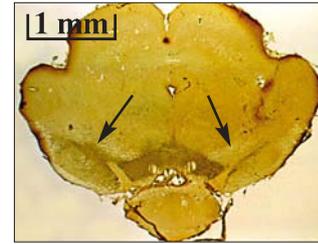


Abb. 13: Substantia nigra in der TH-Darstellung. Zu erkennen ist der Unterschied in der Neuronendichte zwischen linker und rechter SNc (Pfeile), die durch den N.III von der SNr abgrenzbar ist.

2.14 Kresylviolett-Färbung

Hierbei handelt es sich um eine Modifikation der Methylenblaufärbung, die Nissl 1894 zur Grundlage seiner Theorie der Nervenzelläquivalenz machte. Ribonukleoproteine als Bestandteile des Zellkernes und als Nissl-Schollen (Nissl-Substanz, rauhes endoplasmatisches Retikulum, Tigroidsubstanz) im Zytoplasma stellen das Substrat dieser Färbemethode dar.

Sie basiert auf einer Überfärbung des alkoholfixierten Schnittes mit dem basischen Farbstoff und nachfolgendem Auswaschen des Farbstoffüberschusses mit Alkohol. Da sich die Fasermassen schneller entfärben als die zellulären Bestandteile erhält man schließlich intensiv gefärbtes Zellmaterial, das sich vom farblosen Untergrund scharf abhebt. Kresylviolett färbt Kerne violett, Nissl-Schollen und Ergastoplasma blau, Muzin, Mastzellen und Amyloid rot, Zellfortsätze bleiben ungefärbt. (Romeis, 1989) Die Schnitte werden auf Objektträger aufgezogen, an der Luft auf einer 37°C Wärmplatte angetrocknet, in absteigender Alkoholreihe entwässert, 1 Minute in Aqua bidest. nachgespült, ca. 5 Minuten unter Sichtkontrolle im Kresylviolett-Reagenz (0,5 g Kresylviolett in 100 ml Acetatpuffer (20 ml 2,71 % Na-Acetat, 80 ml 1,2201 % Essigsäure, pH 3,8-4,0) inkubiert, in Acetatpuffer entdifferenziert und nach dem Führen durch aufsteigende Alkoholreihe und Xylol eingebettet.



Abb. 14: KV-gefärbter Frontalschnitt in NST-Ebene. Man beachte die durch Chemoläsion entstandene Vakuole im Bereich des NST im Bild rechts.

2.15 Histologische Auswertung

Ein möglicher neuroprotektiver Effekt auf die SNc sollte sich direkt auf die Anzahl intakter nigrostriataler dopaminergener Neurone auswirken. Hierzu wurden bilateral die intakten TH-positiven Neuronen in der TH-Färbung und die intakten FG-markierten Neuronen im Idealfall in drei aufeinanderfolgenden Schnittebenen (Schnitt "a, b, c") mindestens zweifach ausgezählt und anschließend ein Mittelwert errechnet. Der Gewebeschnitt ("b") um den sich definitionsgemäß die anderen beiden auszuzählenden gruppieren ("a, c") wird durch die auf der Schnittebene sichtbaren Faserstränge des dritten Hirnnervs (N. oculomotorius) definiert (→N III, Abb. 33).

Durch seitenvergleichende Bewertung der Kernareale wurde versucht, die Fragestellung, ob die Läsion eines STN suffizient erfolgt war, zu beantworten. Bei den Gruppen 1 bis 6 erfolgte dies qualitativ aufgrund des histomorphologischen Bildes in Kresylviolett-Färbung, in den Gruppen 7 bis 12 aufgrund einer Bewertung der Neuronendichte, des Kernvolumens und der neuronalen Aktivität des NST (→Kap. 3.2).

Hier wurde in den KV-gefärbten Schnitten seitenvergleichend eine Klassifizierung des potentiell lädierten Kerngebietes in drei Kategorien "symmetrisch intakt", "weniger intakte Neuronen" und "keine Neuronen nachweisbar" vorgenommen.

Die relative metabolische Aktivität der Neuronen des NST als Marker für die neuronale Aktivität wurde durch seitenvergleichende Bewertung der Färbeintensität des NST-Kerngebietes in der CO-Färbung unternommen. Es wurde unterteilt in die vier Kategorien "identische Dichte", "mäßig geringere Dichte", "deutlich geringere Dichte" und "transparent" im Sinne von keiner nachweisbaren Anfärbung in CO.

Abschließend wurde die Fläche des NST computergestützt über die gesamte Ausdehnung der vorhandenen CO-Schnitte vermessen und die mittlere Fläche der potentiell lädierten mit der der unbehandelten Seite verglichen und in Prozent der unbehandelten Gegenseite angegeben. KV-Bewertungen "weniger intakte Neuronen" und geringer führten zur Klassifizierung "lädiert", was durch die Betrachtung der Dichte in CO und die relative Fläche verifiziert, bzw. verworfen werden konnte.

2.16 Statistische Methoden

Zur deskriptiven Statistik wurden mit Hilfe des kommerziellen Computerprogrammes Microsoft Excel™ Mittelwert und Standardabweichung (StA) errechnet. Die Varianzanalyse der Daten zueinander erfolgte mit dem post-hoc Scheffé-Testverfahren. Die Testergebnisse wurden mit Microsoft Excel™ grafisch umgesetzt.

3.1 Allgemeines

Während des Experimentes verstarben insgesamt sechs Tiere postoperativ, was wahrscheinlich auf eine intraoperative cerebrale Infektion zurückzuführen ist. Nach Ausschluß aller Präparate, die eine insuffiziente Läsion des NST, bzw. eine ungewünschte massive gliäre Infiltration aufwiesen, standen zur statistischen Auswertung die unten angegebenen Fallzahlen zur Verfügung:

Tabelle 3

Gruppe	n	Gruppe	n
1	6	7	4
2	5	8	5
3	7	9	7
4	6	10	6
5	6	11	5
6	8	12	9
		$n_{\text{ges}} = 74$	

3.2 Histologische Bewertung des Nucleus subthalamicus

Die histologische Bewertung des NST erbrachte jeweils nebenstehende Flächenberechnung und Einteilung in Subklassen sichtbarer NST-Läsion.

Tabelle 4

Gr./Tier	CO	KV	%Fläche		Gr./Tier	CO	KV	%Fläche		Gr./Tier	CO	KV	%Fläche
7/001	2	1	66,6	x	9/001	3	2	27,5		11/001			
7/002	2	2	65,2	x	9/002	4	2	35,2		11/002	1	1	75,5
7/003					9/003	1	1	78,3		11/003	3	1	70,2
7/004	2	1	65,7	x	9/004	3	2	68,2	x	11/004	1	2	69,6
7/005	1	1	91,2	x	9/005	4	2	57,3	x	11/005	3	2	23,1
7/006	2	1	52,8	x	9/006	4	3	0	x	11/006	3	2	22,1
7/007	4	2	38,1	x	9/007	4	2	55,5	x	11/007	1	2	67
7/008	1	2	53,3	x	9/008	2	2	61,5		11/008	2	1	61,2
7/009	1	2	67,6	x	9/009	1	1	68,3	x	11/009	3	2	40,7
7/010	3	1	59,7		9/010	1	1	85,5		11/010	1	1	72,9
Gr./Tier	CO	KV	%Fläche		Gr./Tier	CO	KV	%Fläche		Gr./Tier	CO	KV	%Fläche
8/001	1	1	84,3	x	10/001	1	1	77,1		11/011	2	1	62
8/002	3	2	58,5	x	10/002	1	1	88,1		11/012	2	1	73,3
8/003	2	1	64	x	10/003	2	2	65,7		11/013	2	1	78,1
8/004	3	1	72,9	x	10/004	3	2	73,6		11/014	1	1	83
8/005	3	1	52,3	x	10/005	1	1	85,2		11/015	1	1	78,9
8/006	4	1	51,1	x	10/006	1	1	79,6					
8/007	3	2	57,4		10/007	3	2	44		Gr./Tier	CO	KV	%Fläche
8/008					10/008								
8/009	4	3	58,8	x	10/009	1	1	92,8	x	12/001	1	1	77
8/010	3	2	43,5	x	10/010	1	1	88,4	x	12/002	1	1	81,3
										12/003	2	1	85,5
										12/004	1	1	66,8
										12/005	1	1	43,9
										12/006	2	1	67,2
										12/007	1	1	80,9
										12/008	2	1	78,5
										12/009	1	1	55
										12/010	3	2	64,5

CO = Cytochromoxidasefärbung
 KV = Kresylviolett färbung
 x = Einschluß des Tieres in die Analyse
 Gr./Tier = Gruppe und Tier-Nummer
 %Fläche = Prozent der kontralateralen, unlädierten NST-Fläche im CO-gefärbten Schnitt

Bei CO: 1 = identische Dichte,
 2 = mäßig geringere Dichte,
 3 = deutlich geringere Dichte,
 4 = transparent

Bei KV: 1 = symmetrisch intakt,
 2 = weniger intakte Neuronen,
 3 = keine Neuronen nachweisbar
 Beurteilung jeweils im Vergleich zur unlädierten Gegenseite.

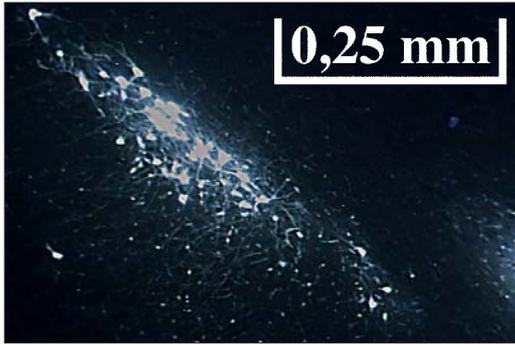


Abb. 15: FG-Darstellung auf unlädierter Seite

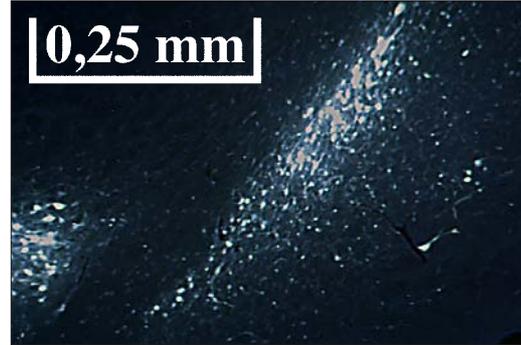


Abb. 16: FG-Darstellung der Gegenseite

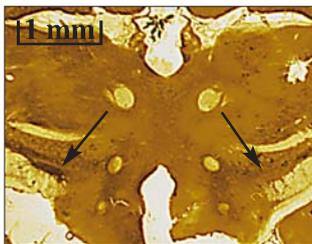


Abb. 17: CO-Färbung in NST-Ebene; im Bild li. unlädierter NST, re. lädiert

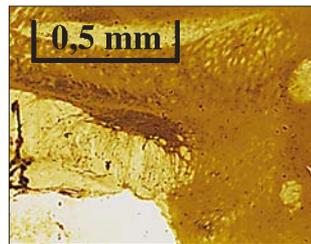


Abb. 18: Obiger Schnitt: unlädierter NST

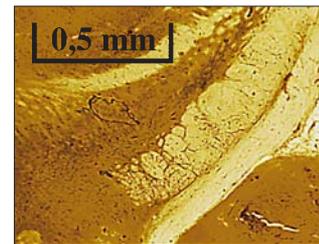


Abb. 19: Läderte Gegenseite („transparent“)

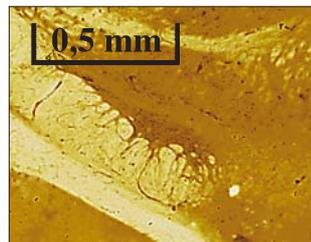


Abb. 20: Ein anderer unlädierter NST

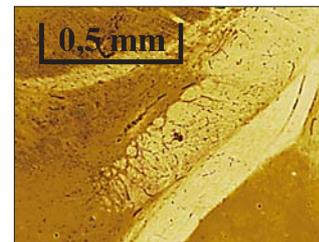


Abb. 21: Läderte Gegenseite („transparent“)



Abb. 22: Beidseitig intakter NST in CO-Färbung („symmetrisch intakt“)

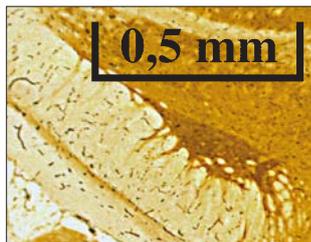


Abb. 23: Ein unlädierter NST in CO

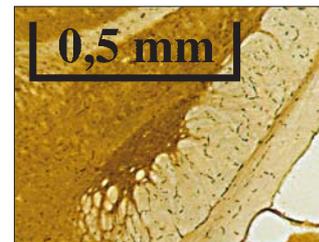


Abb. 24: Ebenfalls unlädierte Gegenseite

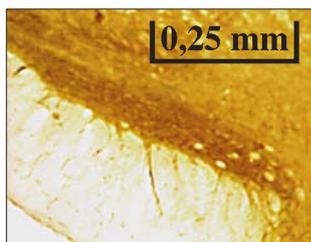


Abb. 25: Ein anderer unlädierter NST in CO

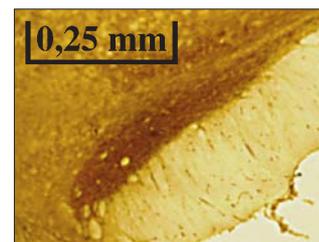


Abb. 26: Gegenseite

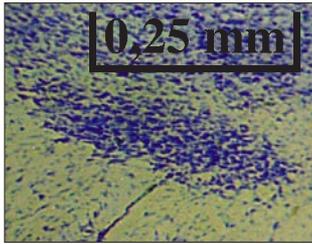


Abb. 27: KV-Färbung eines intakten NST

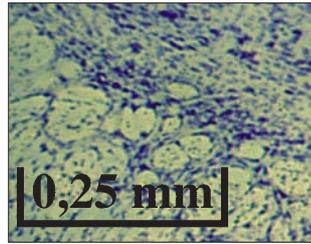


Abb. 29: KV-Färbung eines anderen NST, unlädert

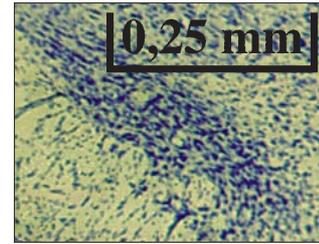


Abb. 31: Unlädierter NST in KV

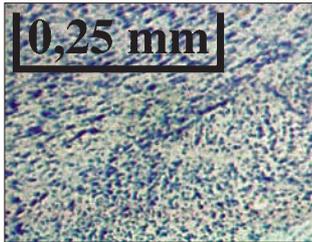


Abb. 28: Die Gegenseite weist bei gleicher Vergrößerung kein nachweisbares Kernareal mehr auf.

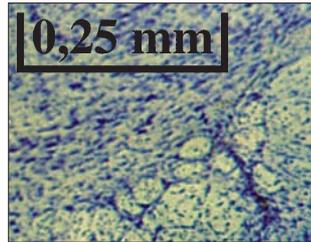


Abb. 30: Auf der Gegenseite ist kein Kernareal mehr nachweisbar, man sieht einen glär markierten Stichkanal.

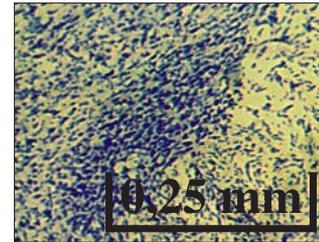


Abb. 32: Die Gegenseite mit ebenfalls unlädertem NST

3.3 Ausmaß des neuronalen Untergangs in der SNc bei KA-Läsion des NST 7 Tage nach FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und 7 Tage vor 6-OHDA-Applikation (Gruppen 1 und 3)



In beiden Gruppen führt die striatale 6-OHDA-Injektion zum deutlichen Verlust TH-positiver und FG-markierter Zellen der SN sowie zur Abnahme des striatalen Gehaltes an DA und Dopaminstoffwechselprodukten DOPAC und HVA.

Die Varianzanalyse ergibt jedoch für keinen der Parameter einen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zwischen NST-läderten Tieren und der Kontrollgruppe. Die Überlebensraten der FG-markierten und TH-positiven Neuronen zeigen hier widersprüchliche Tendenzen, striatales DA, DOPAC und HVA scheinen in der Kontrollgruppe insgesamt in nicht signifikant höherer Konzentration bestehen zu bleiben.

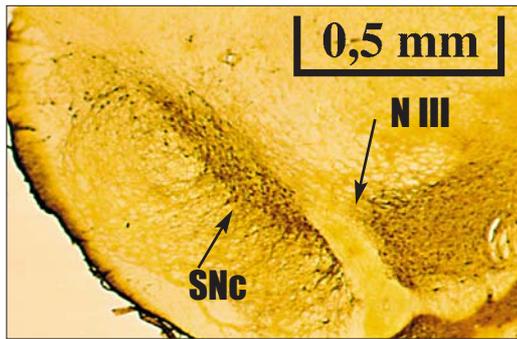


Abb. 33: TH-Darstellung der SNc auf nicht-toxin-injizierter Seite („b-Schnitt“)

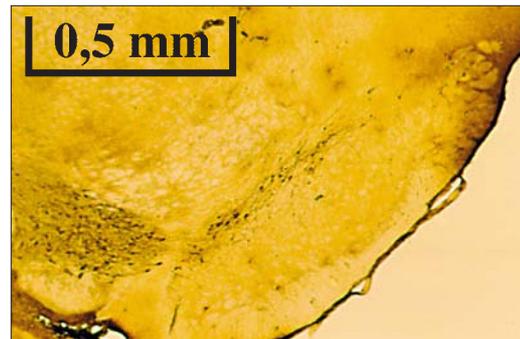


Abb. 34: TH-Darstellung der Gegenseite, auf der eine striatale Toxinapplikation erfolgt war.

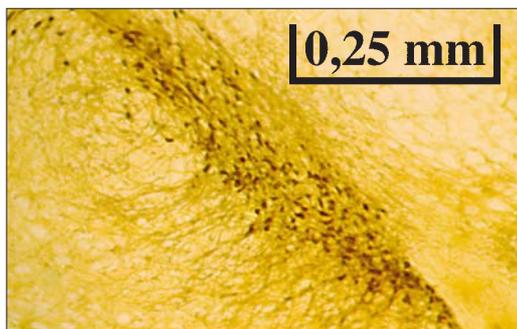


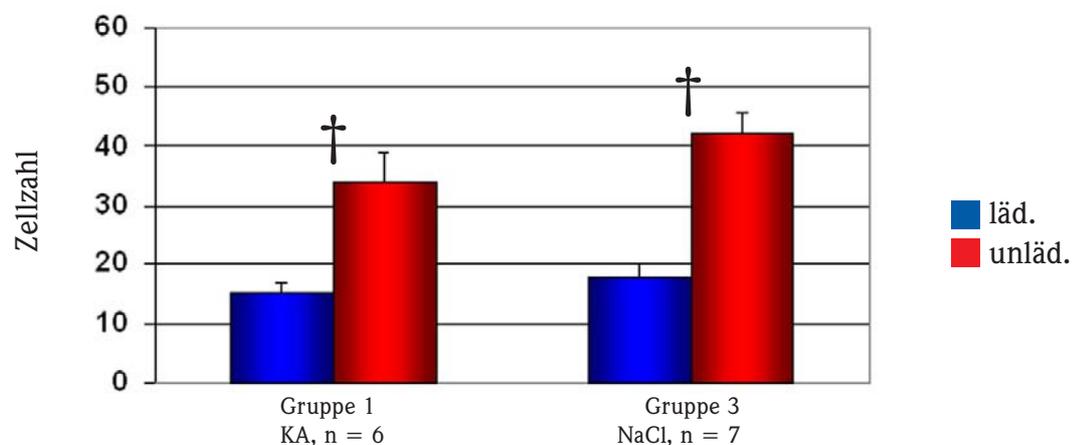
Abb. 35:



Abb. 36: Gegenseite

Die Abbildungen 37 bis 40 zeigen die Anzahl FG-markierter sowie TH-positiver SNc-Neuronen in der 6-OHDA-injizierten Hemisphäre (läd.) und in der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) in den Gruppen 1 und 3. Anschließend in Prozent der kontralateralen, unbehandelten Hemisphäre, also als relatives Überleben von Neuronen. Gruppe 1 erhielt eine NST-Läsion mit KA, Gruppe 3 wurde NaCl in den NST injiziert. Insgesamt zeigt sich auf Zellebene kein Effekt zwischen beiden Behandlungsgruppen.

Abb. 37: Gruppen 1 und 3: Anzahl FG-markierter Zellen +/- StA



† = Signifikanter Zellzahl-Unterschied zwischen lädierter und unlädierter Seite

Abb. 38: Gruppen 1 und 3: FG-markierte Neuronen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

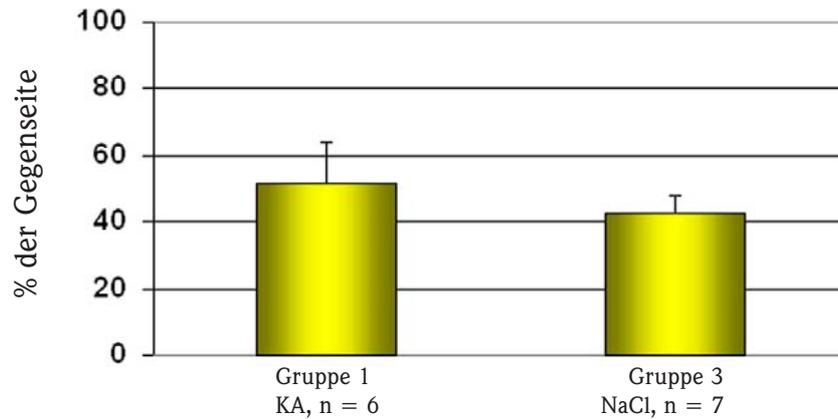


Abb. 39: Gruppen 1 und 3: Anzahl TH-markierter Zellen +/- StA

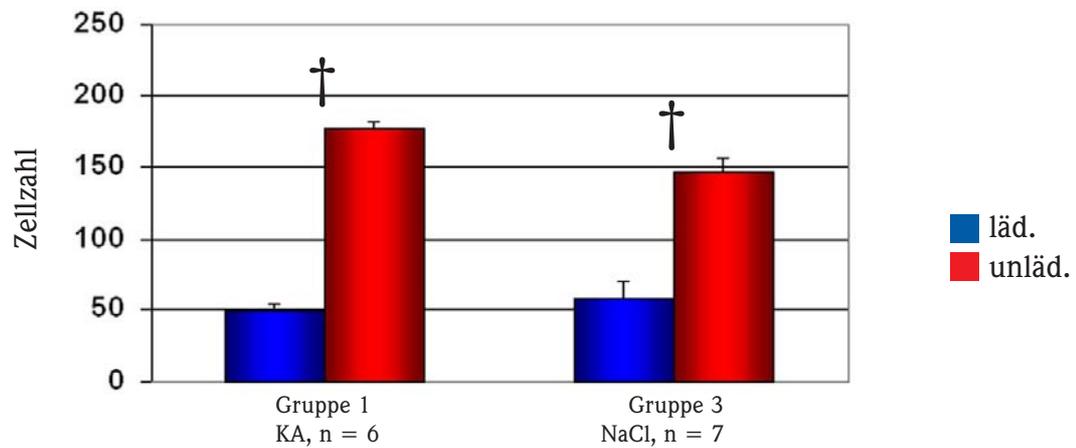
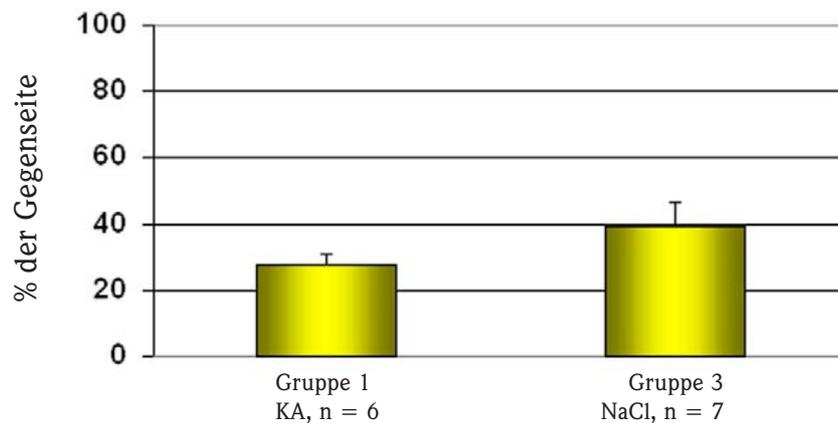


Abb. 40: Gruppen 1 und 3: TH-markierte Neuronen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



In den Abbildungen 41 bis 46 erkennt man in den Gruppen (1 und 3) analog zur Zellzahlbestimmung (dargestellt in Abb. 37-40) die Menge an striatalem DA und an den DA-Stoffwechselprodukten.

Analog zu dem Ergebnis der Zellzahlbestimmung zeigt sich auch hier kein Effekt.

Abb. 41: Gruppen 1 und 3: Striatales Dopamin +/- StA

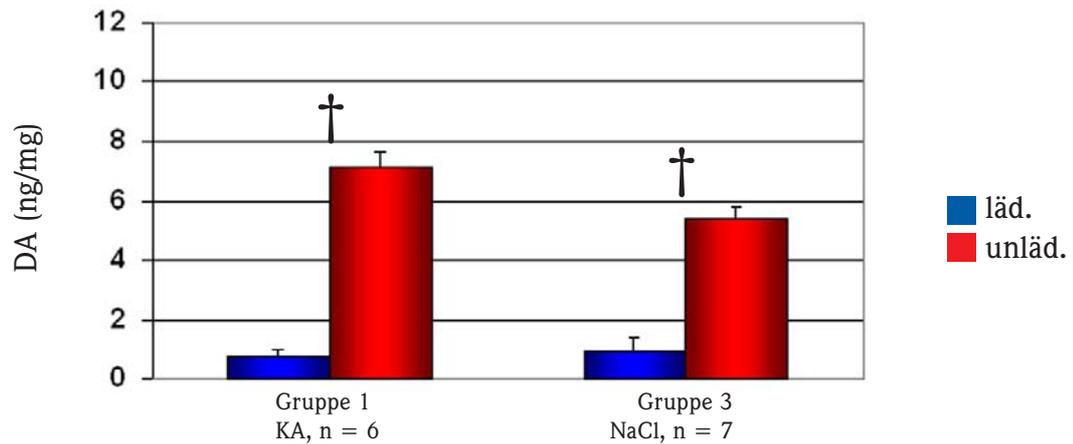


Abb. 42: Gruppen 1 und 3: Striatales Dopamin in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

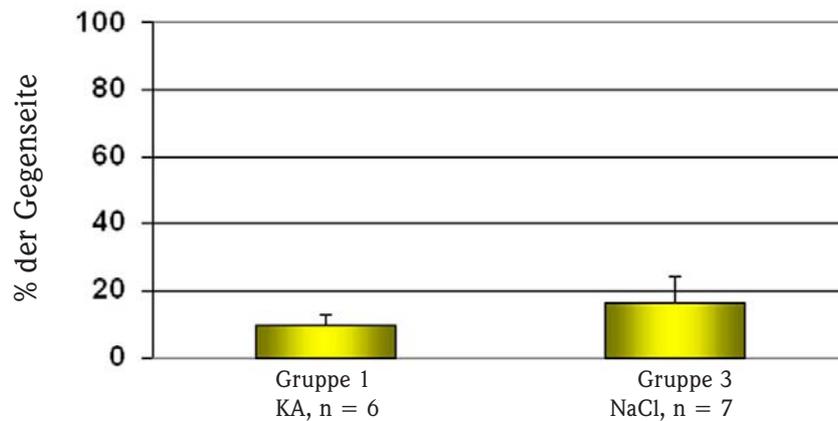


Abb. 43: Gruppen 1 und 3: Striatales DOPAC +/- StA

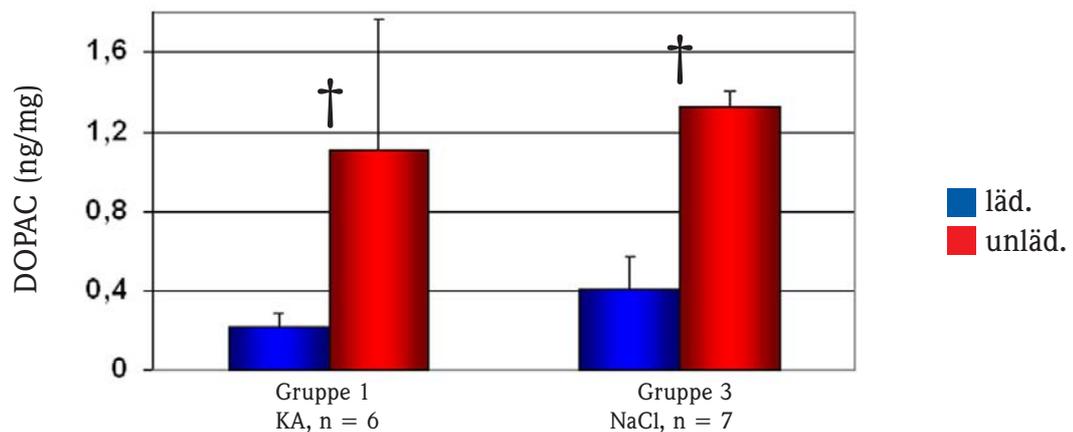


Abb. 44: Gruppen 1 und 3: Striatales DOPAC in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

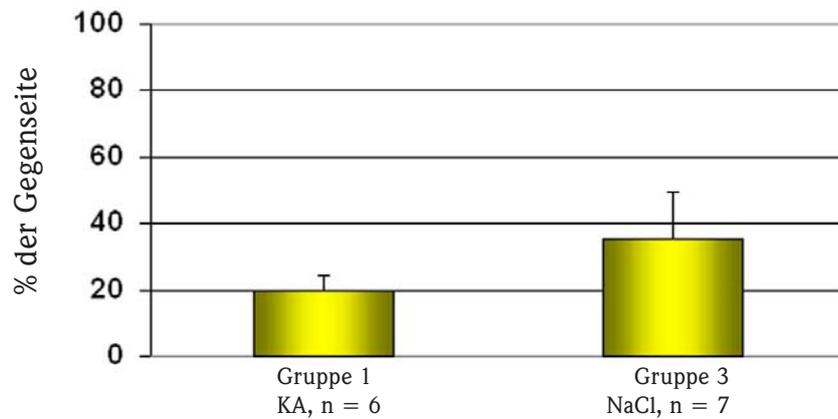


Abb. 45: Gruppen 1 und 3: Striatales HVA +/- StA

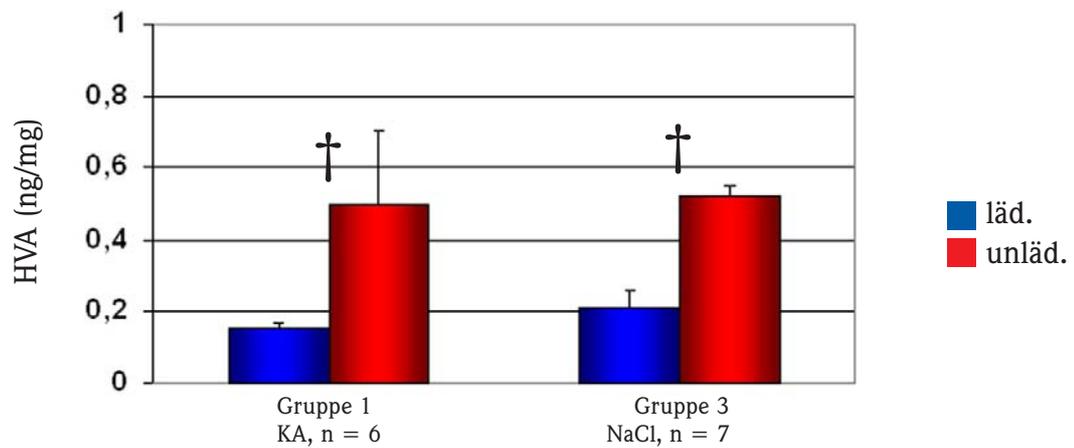
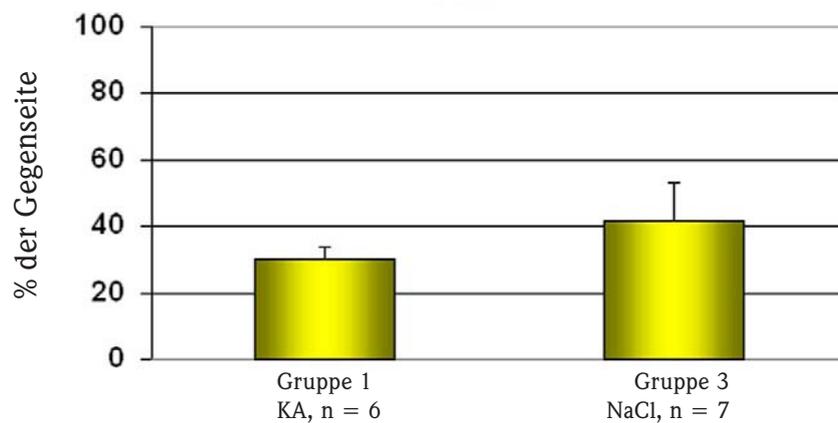
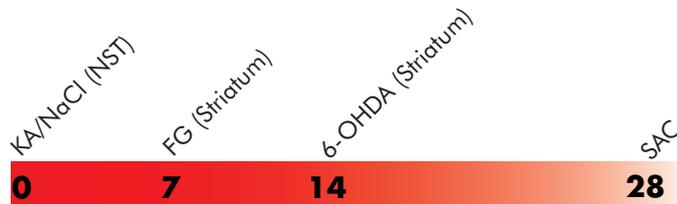


Abb. 46: Gruppen 1 und 3: Striatales HVA in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



3.4 Neuronaler Untergang der SNc bei KA-Läsion des NST 7 Tage vor FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und 14 Tage vor striataler 6-OHDA-Applikation (Gruppen 2 und 4)



Der Unterschied in der Behandlung im Vergleich zu den Gruppen 1 und 3 besteht in einem größeren Abstand zwischen NST-Läsion und 6-OHDA-Injektion. Auch hierbei führt die intrastriatale 6-OHDA-Injektion wie erwartet zum Verlust FG-markierter und TH-positiver Neuronen sowie zum Abfall der DA-, DOPAC- und HVA-Konzentrationen im Striatum.

Die Abbildungen 47 bis 50 zeigen in den Gruppen 2 und 4, Anzahl FG-markierter sowie TH-positiver SNc Neuronen in der 6-OHDA-injizierten Hemisphäre (läd.) und in der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.). Anschließend in Prozent der kontralateralen, unbehandelten Hemisphäre, also als relatives Überleben von Neuronen. Gruppe 2 erhielt eine NST-Läsion mit KA, Gruppe 4 wurde NaCl in den NST injiziert. Ein Effekt zeigte sich auf Zellebene nicht.

Abb. 47: Gruppen 2 und 4: Anzahl FG-markierter Zellen +/- StA

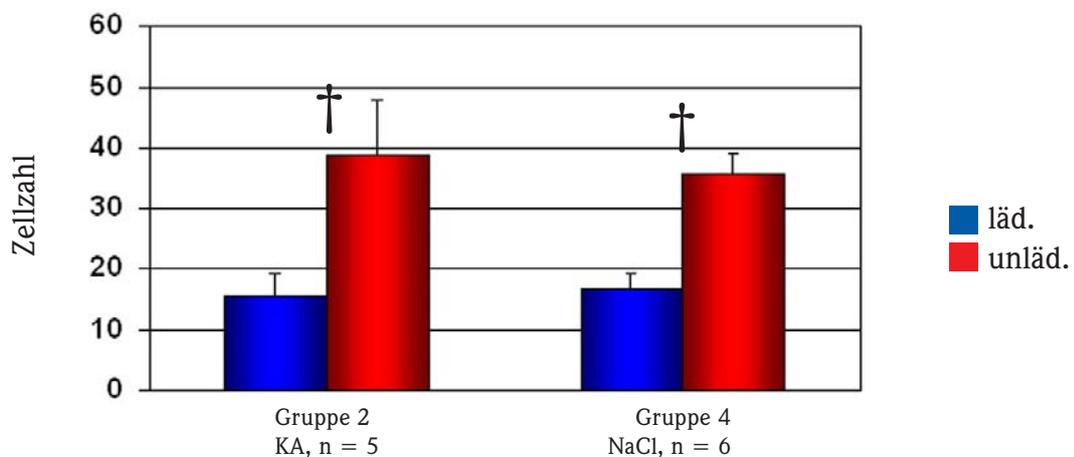


Abb. 48: Gruppen 2 und 4: FG-markierte Neuronen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

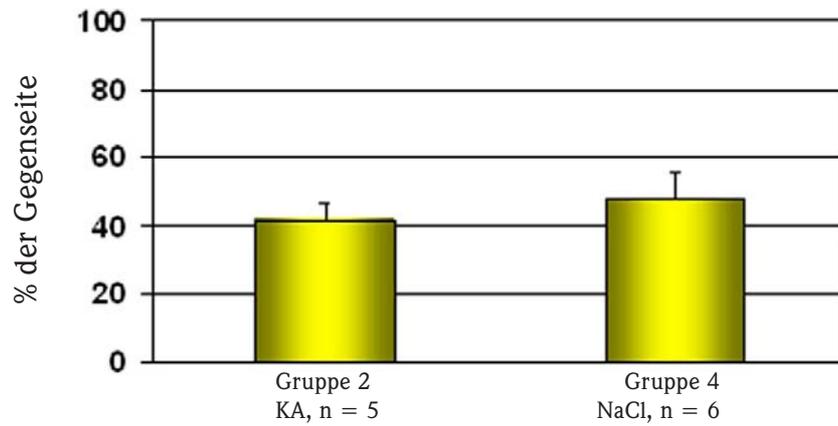


Abb. 49: Gruppen 2 und 4: Anzahl TH-markierter Zellen +/- StA

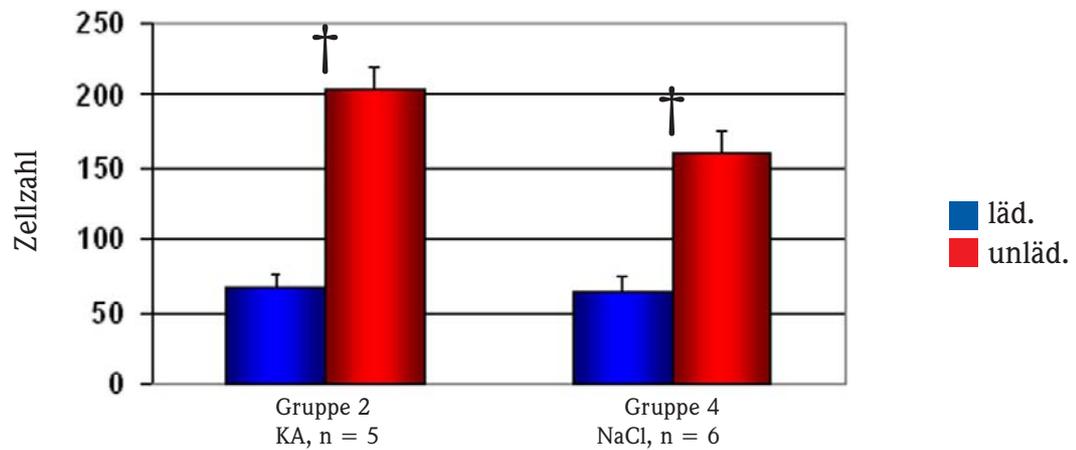
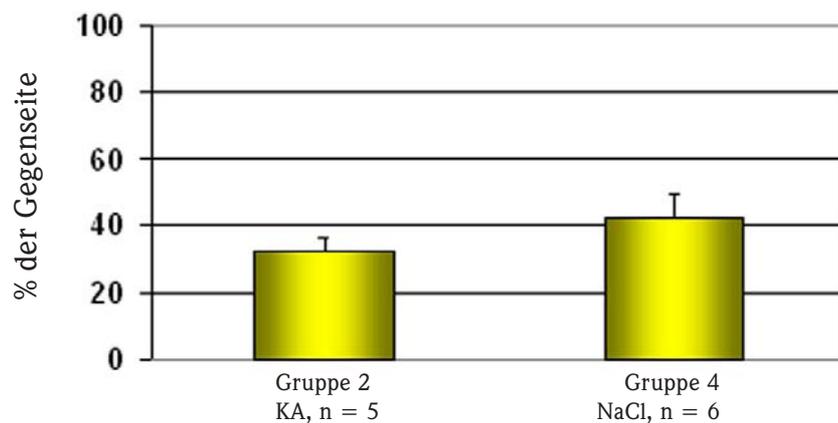


Abb. 50: Gruppen 2 und 4: TH-markierte Zellen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



Die Abbildungen 51 bis 56 stellen analog zu den Abbildungen 47 bis 50 die Menge an striatalem DA und Dopaminstoffwechselprodukten HVA und DOPAC in der 6-OHDA-injizierten Hemisphäre (läd.) und der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) in den Gruppen 2 und 4 dar, auch hier schließlich als relative Menge (%) zum kontralateralen, intakten Striatum. Ein vermeintlicher Unterschied zeigt sich hier in Abb. 51. Allerdings fällt hier bereits ein Unterschied in der unlädierten Seite auf, so daß sich in der Kontrollrechnung (DA lädiert / unlädiert in Prozent) der „Effekt“ als Fehlinterpretation erweist.

Abb. 51: Gruppen 2 und 4: Striatales Dopamin +/- StA

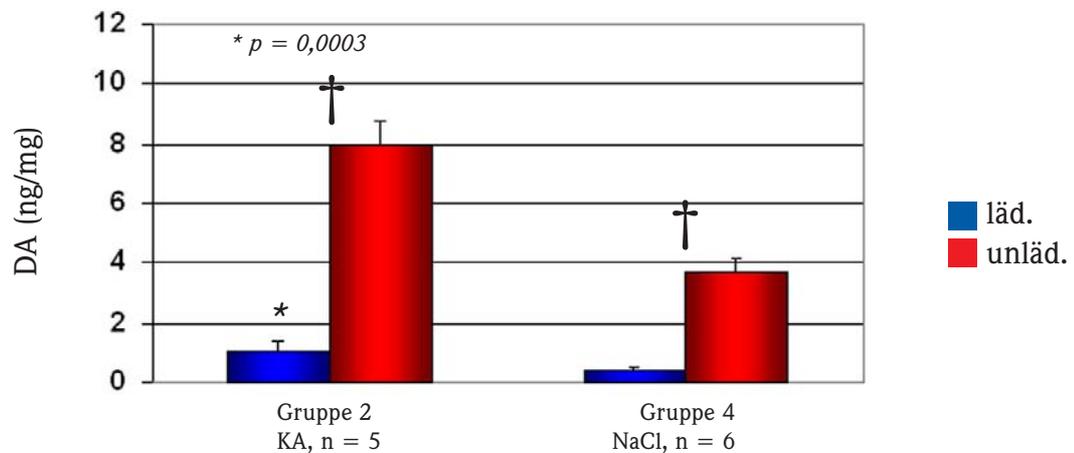


Abb. 52: Gruppen 2 und 4: Striatales Dopamin in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

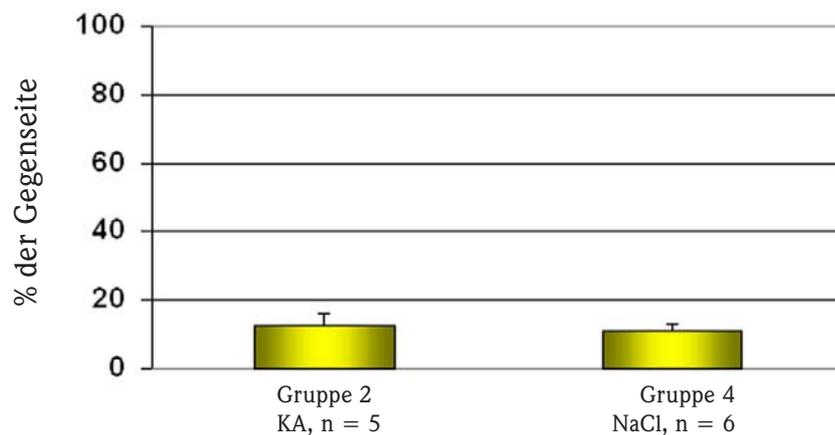


Abb. 53: Gruppen 2 und 4: Striatales DOPAC +/- StA

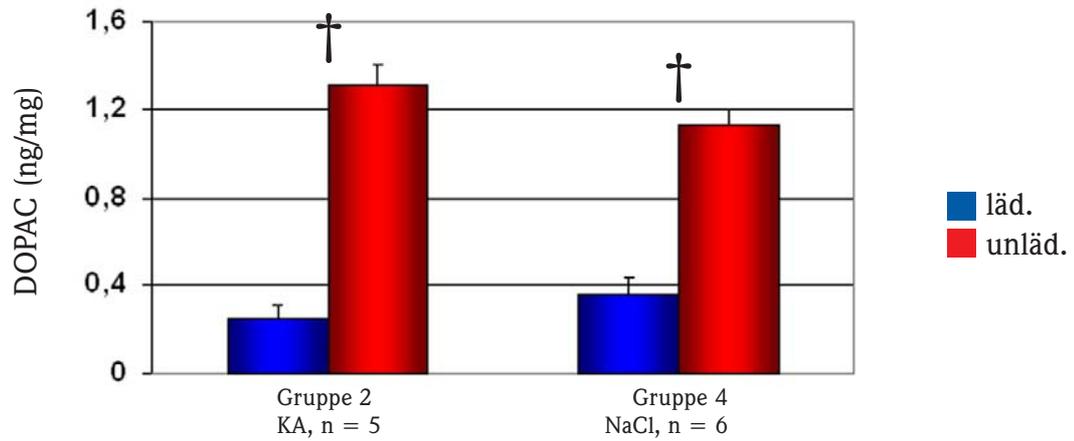


Abb. 54: Gruppen 2 und 4: Striatales DOPAC in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

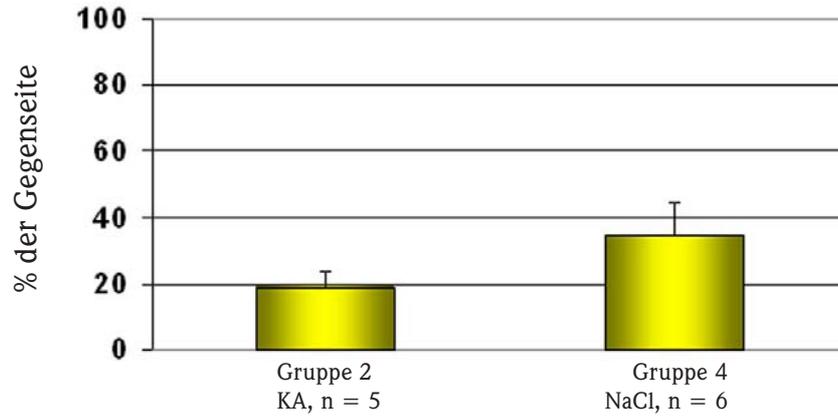
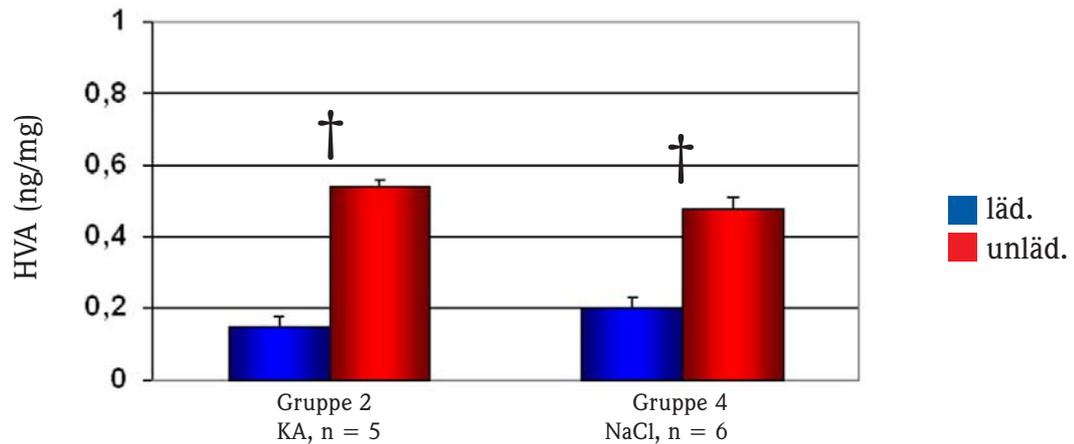
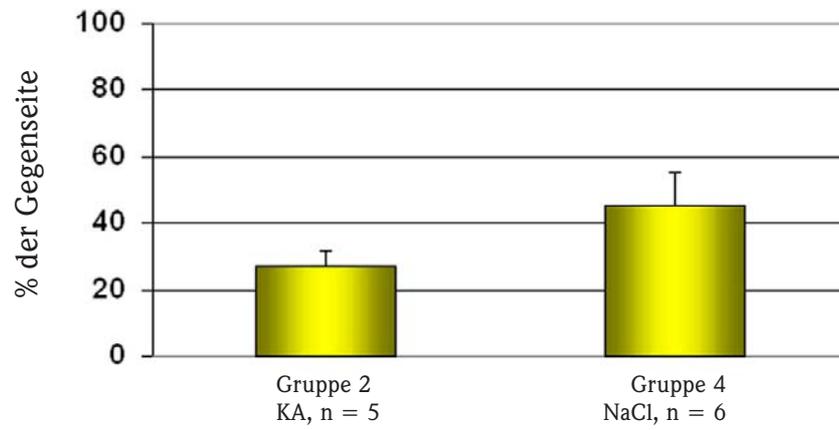


Abb. 55: Gruppen 2 und 4: Striatales HVA +/- StA



**Abb. 56: Gruppen 2 und 4: Striatales HVA
in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA**



3.5 Neuronaler Untergang von SNc-Neuronen bei Kainatläsion des NST ohne FG-Markierung und 7 Tage vor 6-OHDA-Applikation (Gruppen 5 und 6)



Der Unterschied in diesen Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Gruppen 1 und 3 besteht im Weglassen der FG-Färbung, um einen möglichen Einfluß auf die NST-Schädigung, die striatale Läsion oder einen Einfluß auf die Auswirkung der Verbindung NST-SN auszuschließen. TH-positive Neuronenpopulation und DA/DOPAC/HVA-Konzentrationen nehmen in deutlichem Umfang ab, es ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar ($p > 0,05$).

In den Abbildungen 57 und 58 sieht man die Anzahl TH-positiver SNC-Neuronen in der 6-OHDA-injizierten Hemisphäre (läd.) und in der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) in den Gruppen 5 und 6, sowie anschließend in Prozent der kontralateralen, unbehandelten Hemisphäre, also als relatives Überleben von Neuronen. Gruppe 5 erhielt eine NST-Läsion mit KA, Gruppe 6 wurde NaCl in den NST injiziert.

Abb. 57: Gruppen 5 und 6: TH-markierte Zellen +/- StA

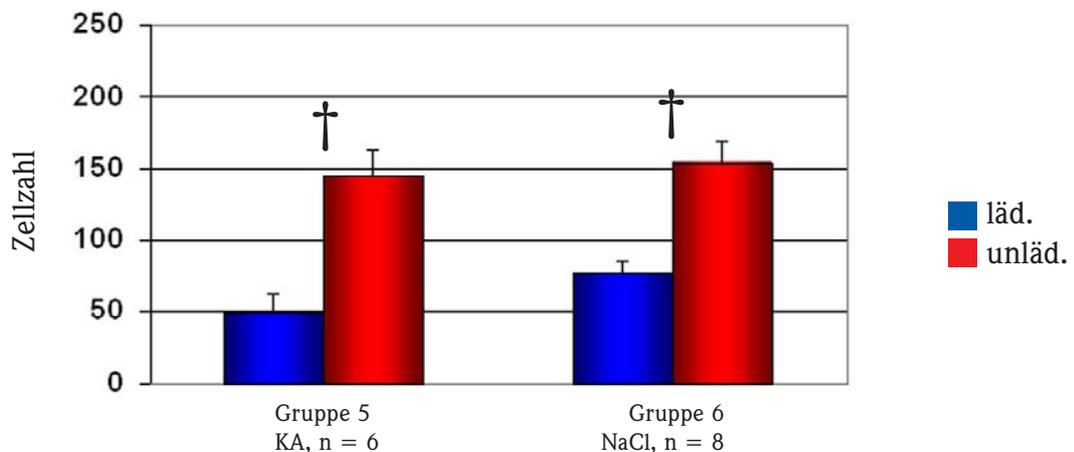
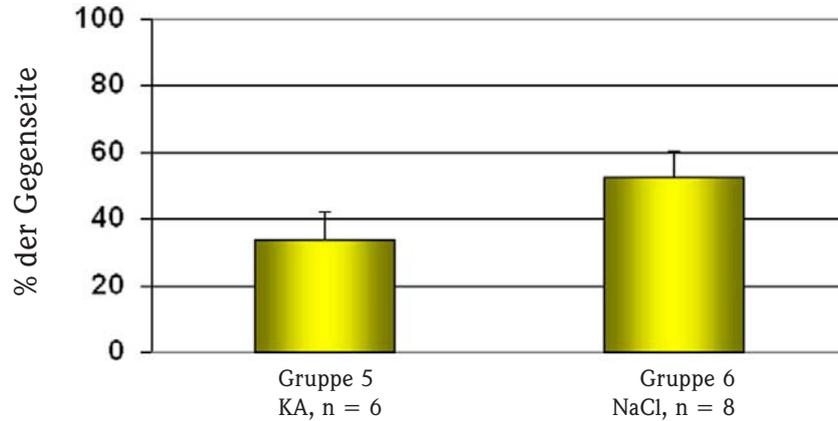


Abb. 58: Gruppen 5 und 6: TH-markierte Zellen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



Die Abbildungen 59 bis 64 zeigen striatales DA und die Dopaminstoffwechselprodukte HVA und DOPAC in der 6-OHDA-injizierten Hemisphäre (läd.) und der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) in den Gruppen 5 und 6. Schließlich als relative Menge (%) zum kontralateralen, intakten Striatum.

Abb. 59: Gruppen 5 und 6: Striatales Dopamin +/- StA

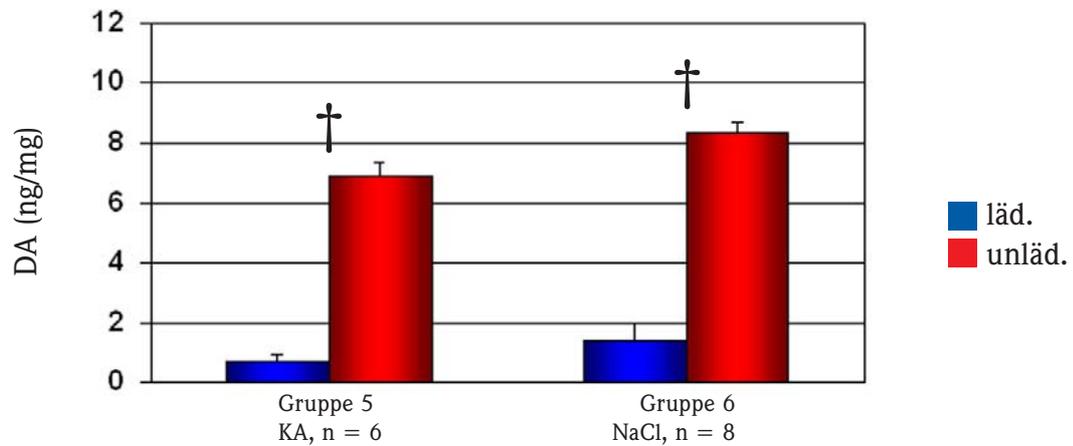


Abb. 60: Gruppen 5 und 6: Striatales Dopamin in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

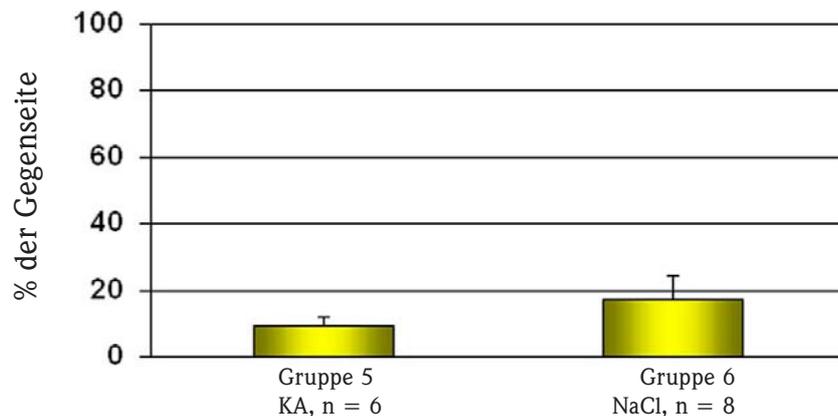


Abb. 61: Gruppen 5 und 6: Striatales DOPAC +/- StA

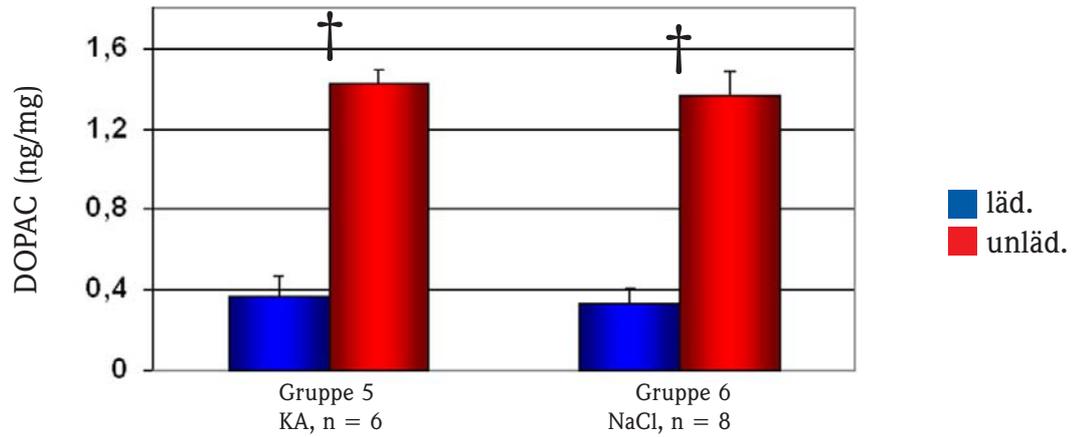


Abb. 62: Gruppen 5 und 6: Striatales DOPAC in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

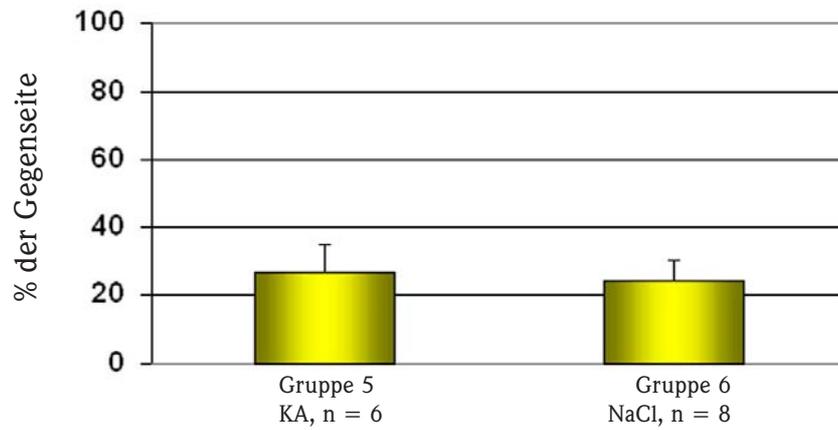


Abb. 63: Gruppen 5 und 6: Striatales HVA +/- StA

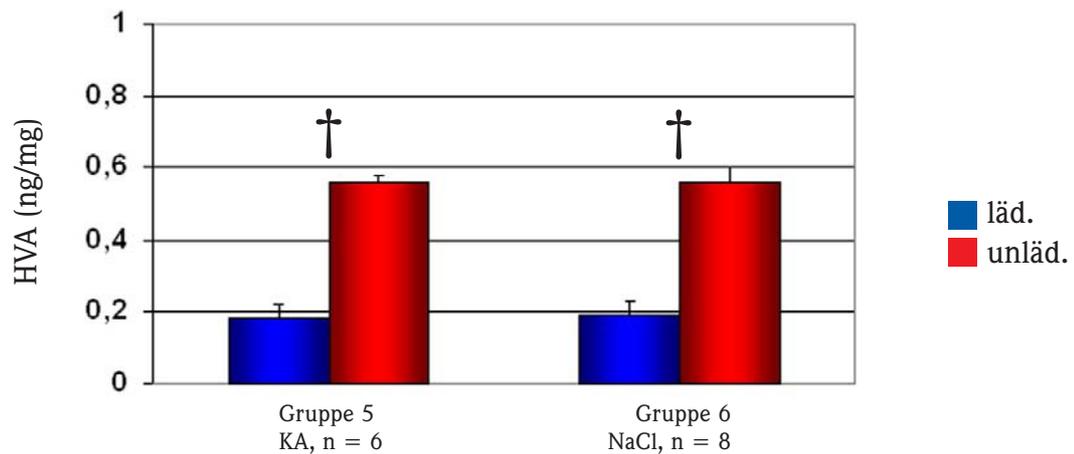
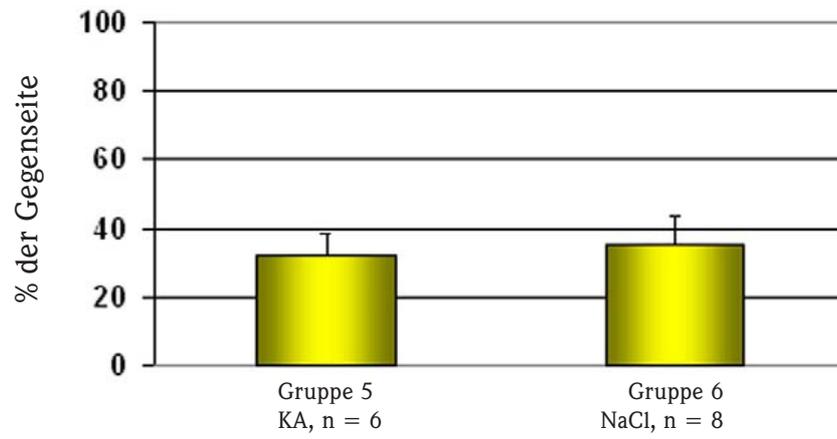


Abb. 64: Gruppen 5 und 6: Striatales HVA
in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



3.6 Chinolinatläsion des NST bei zeitgleicher FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und striataler 3-NP-Applikation 14 Tage später (Gruppen 7 und 8)



In dieser Behandlungsgruppe wurde die striatale Läsion nicht durch 6-OHDA sondern durch 3-NP, die NST-Läsion nicht durch KA, sondern durch QA durchgeführt. Lediglich die DOPAC-Konzentration des nichtlädierten Striatums ist hier in der Kontrollgruppe signifikant höher (Scheffé-Test; $p = 0,008$) als in der NST-lädierten Gruppe. Alle übrigen Parameter zeigen sich in nicht signifikantem Ausmaß zueinander verändert.

Im Vergleich zu den Vorgruppen fällt hierbei aber dennoch auf, daß sowohl die Neuronenpopulationen als auch striatales DA/DOPAC/HVA im Mittel zumindest mit der Kontrollgruppe gleich auf sind.

Die Anzahl FG-markierter sowie TH-positiver SNc-Neuronen in der 3-NP-injizierten Hemisphäre (läd.) und in der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) in den Gruppen 7 und 8 zeigen die Abbildungen 65 bis 68, jeweils einschließlich der Angabe in Prozent der kontralateralen, unbehandelten Hemisphäre, also als relatives Überleben von Neuronen. Gruppe 7 erhielt eine NST-Läsion mit QA, Gruppe 8 wurde PBS in den NST injiziert.

Abb. 65: Gruppen 7 und 8: FG-markierte Zellen +/- StA

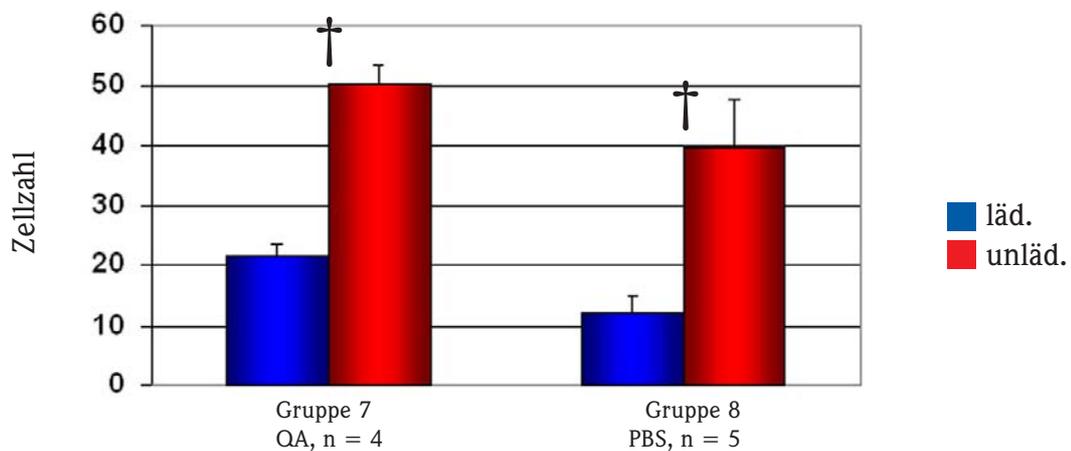


Abb. 66: Gruppen 7 und 8: FG-markierte Zellen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

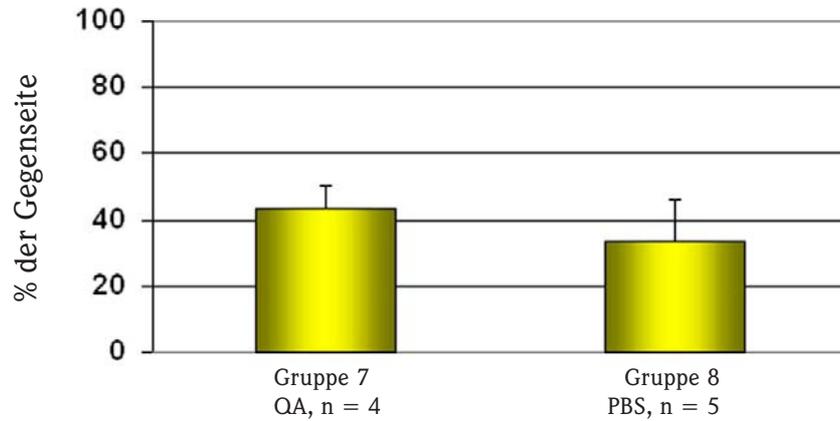


Abb. 67: Gruppen 7 und 8: TH-markierter Zellen +/- StA

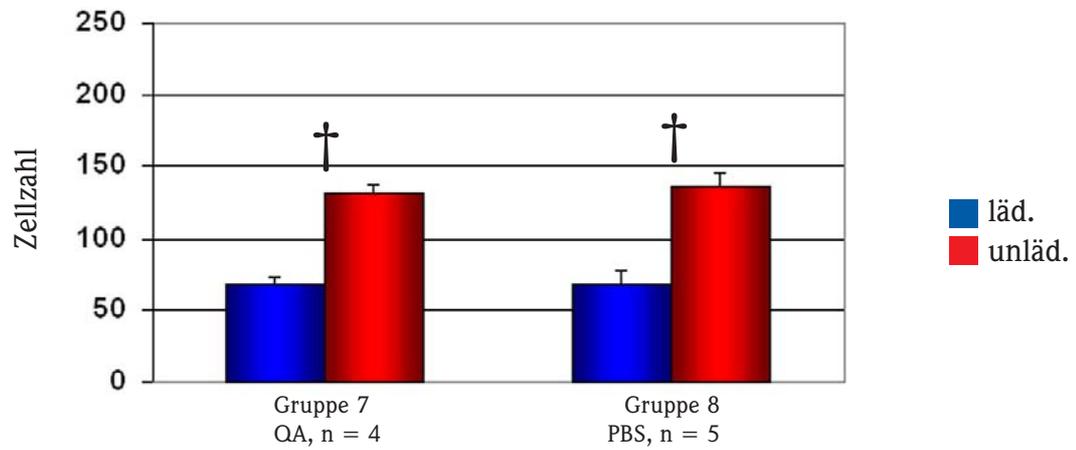
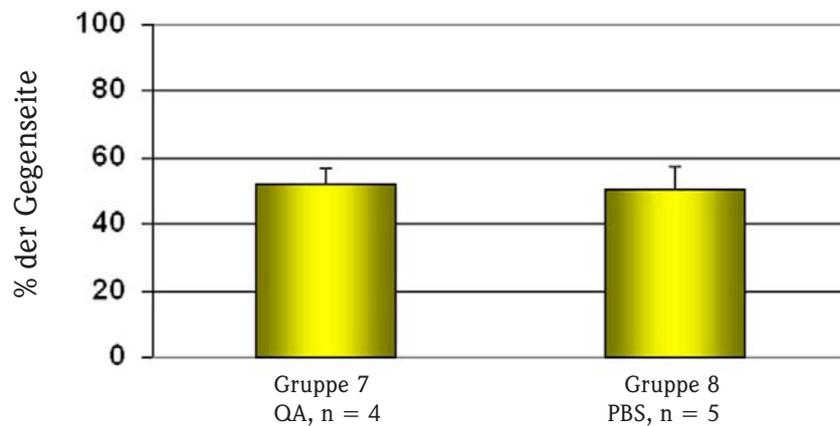


Abb. 68: Gruppen 7 und 8: TH-markierte Zellen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



Die Abbildungen 69 bis 74 stellen striatales DA und die Dopaminstoffwechselprodukte HVA und DOPAC in der 3-NP-injizierten Hemisphäre (läd.) und der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) der Gruppen 7 und 8 dar, jeweils ebenfalls als relative Menge (%) zum kontralateralen, intakten Striatum.

Abb. 69: Gruppen 7 und 8: Striatales Dopamin +/- StA

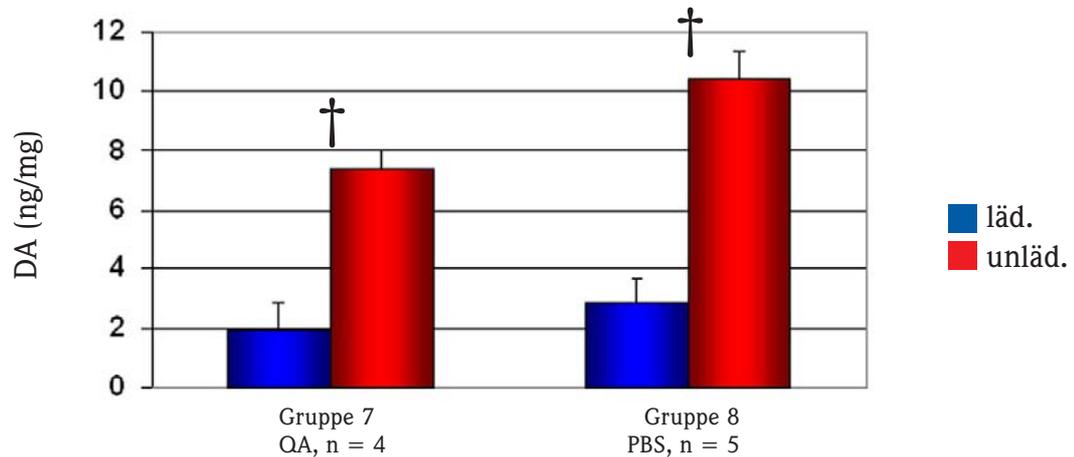


Abb. 70: Gruppen 7 und 8: Striatales Dopamin in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

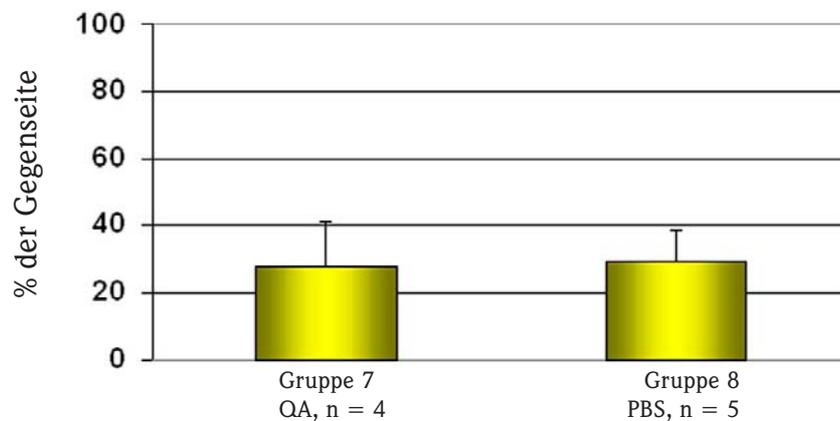


Abb. 71: Gruppen 7 und 8: Striatales DOPAC +/- StA

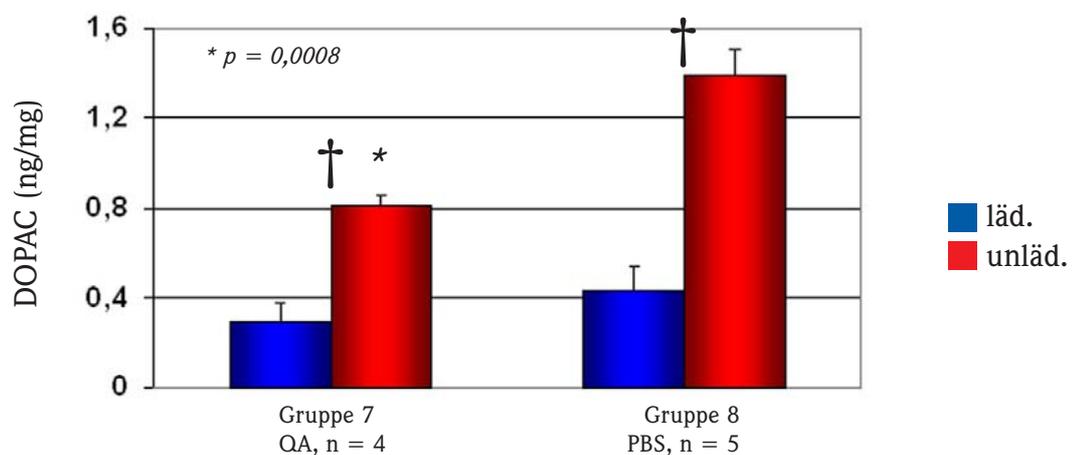


Abb. 72: Gruppen 7 und 8: Striatales DOPAC in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

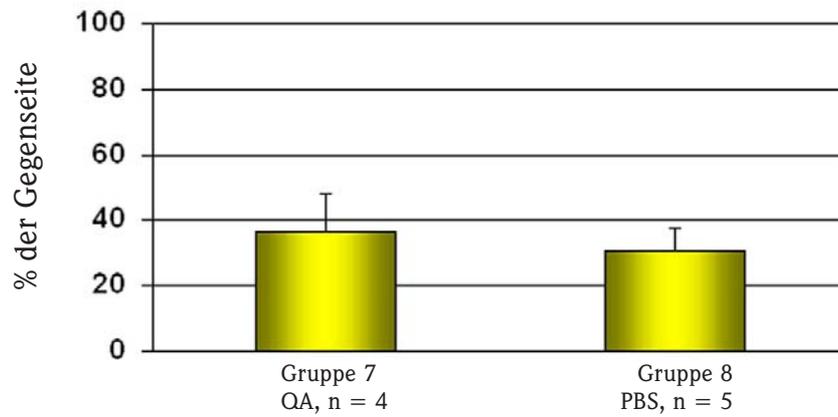


Abb. 73: Gruppen 7 und 8: Striatales HVA +/- StA

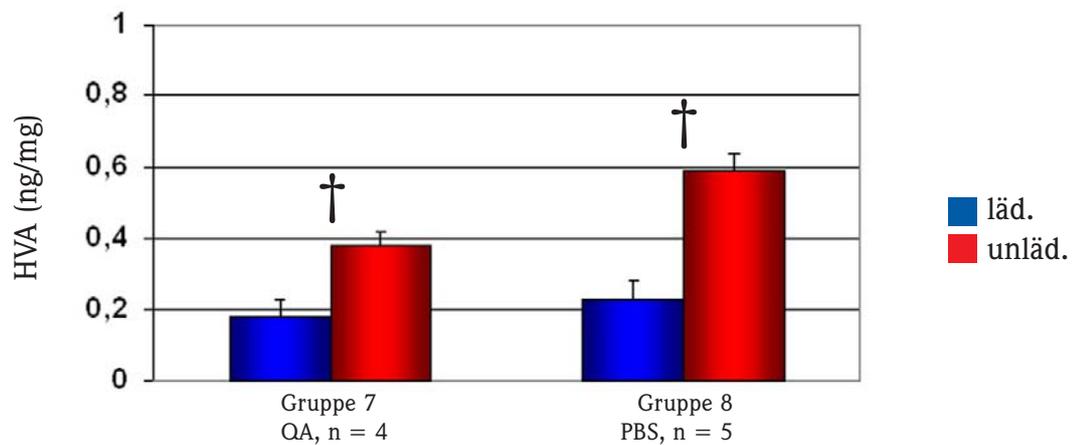
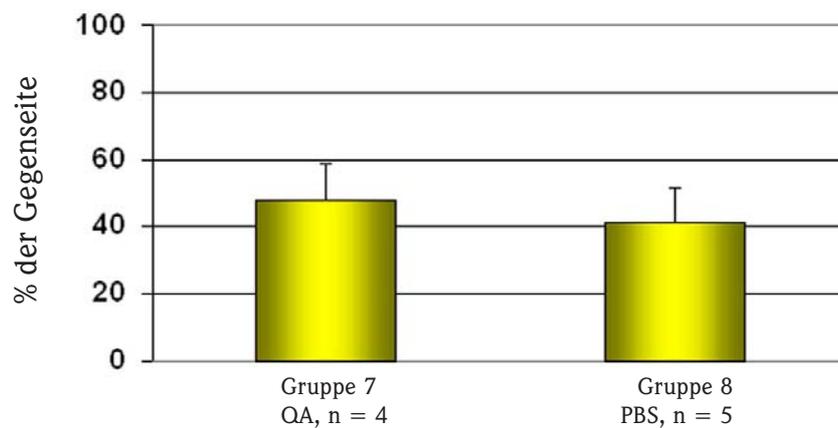


Abb. 74: Gruppen 7 und 8: Striatales HVA in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



3.7 Neuronenuntergang der SNc bei Chinolinatläsion des NST, 3-NP-Applikation 14 Tage nach FG-Markierung und NST-Läsion 3 Tage nach striataler 3-NP-Applikation (Gruppen 9 und 10)

FG (Striatum)	3-NP (Striatum)	QA/PBS (NST)	SAC
0	14	17	42

In diesem Teilversuch ging es darum die Frage zu klären, ob (auch) eine NST-Läsion nach einer begonnenen Degeneration nigrostriataler, dopaminergischer Fasern einen positiven Einfluß hat. Deshalb wurde hier die NST-Läsion – im Gegensatz zu den Gruppen 7 und 8 – 3 Tage nach der 3-NP-Injektion vorgenommen.

Signifikante Unterschiede finden sich hier zwischen den DA-Konzentrationen der 3-NP-lädierten Hemisphären (läd.) der beiden Gruppen ($p = 0,02$) und der relativen DA-Konzentration, wobei bei der NST-lädierten Gruppe deutlich weniger DA im Striatum zu finden war ($p = 0,017$).

Darüber hinaus sind keine Signifikanzen zu finden, prima vista ist auch hier sowohl bei den Neuronenpopulationen als auch bei Dopamin und dessen Produkten wieder eine Tendenz zugunsten der NST-unlädierten Tiere erkennbar.

Die Abbildungen 75 bis 78 zeigen die Anzahl FG-markierter sowie TH-positiver SNc-Neuronen in der 3-NP-injizierten Hemisphäre (läd.) und in der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.). Anschließend jeweils die Angabe in Prozent der kontralateralen, unbehandelten Hemisphäre, also als relatives Überleben von Neuronen. Gruppe 9 erhielt eine NST-Läsion mit QA, Gruppe 10 wurde PBS in den NST injiziert.

Abb. 75: Gruppen 9 und 10: FG-markierte Neuronen +/- StA

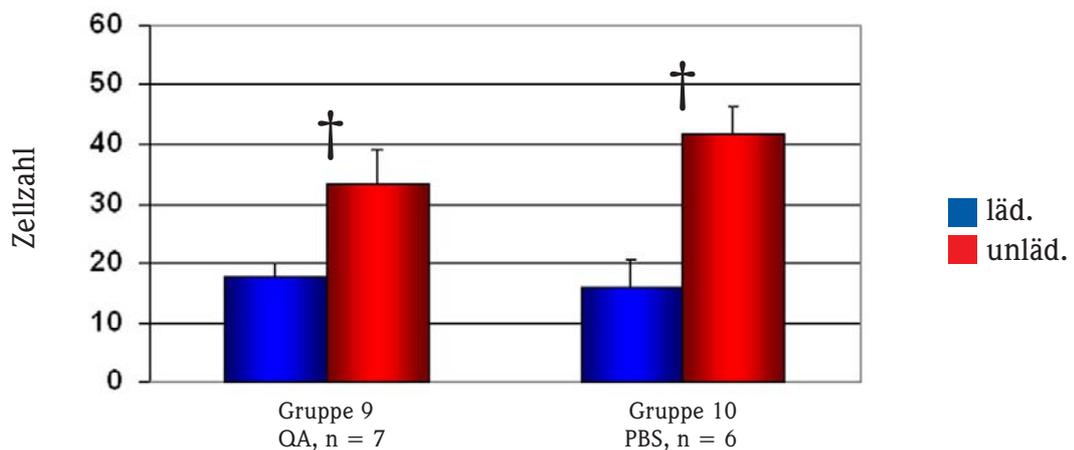


Abb. 76: Gruppen 9 und 10: FG-markierte Neuronen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

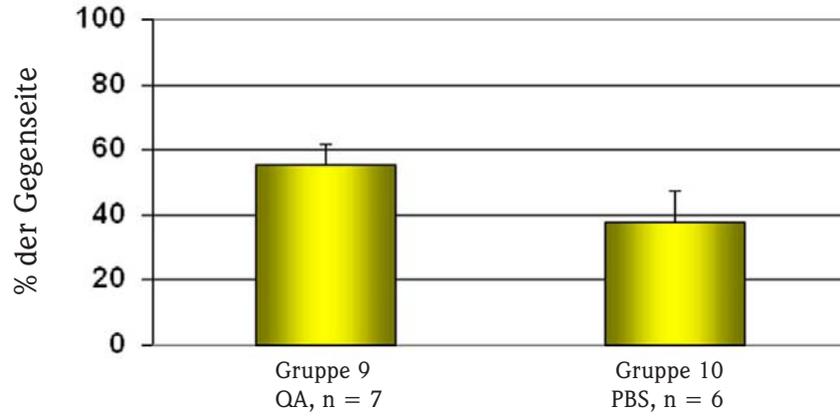


Abb. 77: Gruppen 9 und 10: TH-markierter Neuronen +/- StA

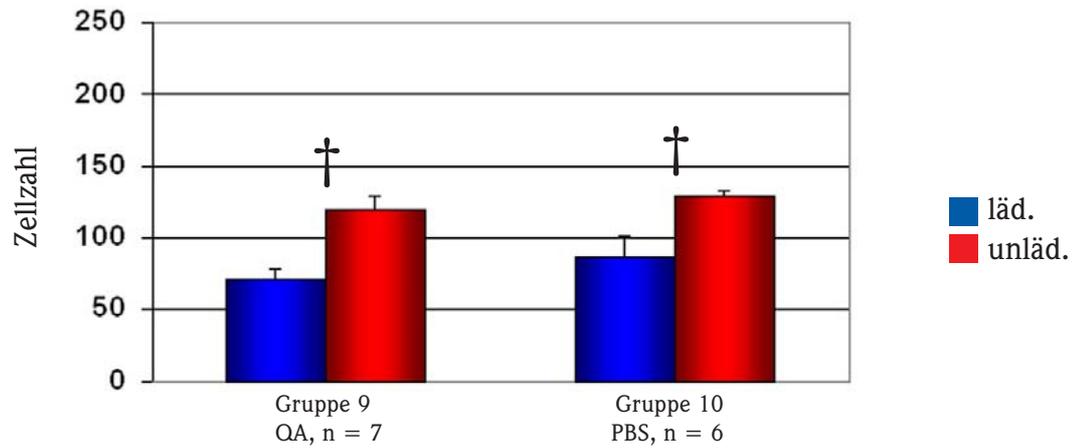
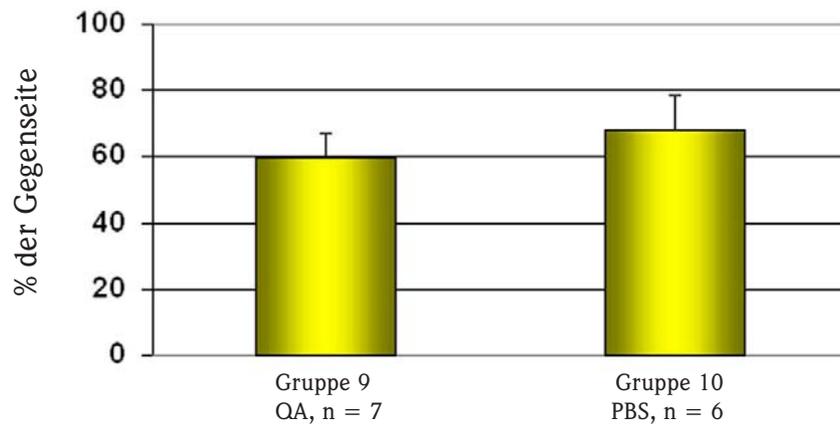


Abb. 78: Gruppen 9 und 10: TH-markierte Neuronen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



Die Abbildungen 79 bis 84 zeigen den Gehalt an striatalem DA und Dopaminstoffwechselprodukten HVA und DOPAC in der 3-NP-injizierten Hemisphäre (läd.) und der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) der Gruppen 9 und 10 analog der Zellzahlbestimmung dargestellt in den Abbildungen 75-78. Hierbei zeigt sich ein Effekt zu Ungunsten der NST-lädierten Gruppe bezogen auf den DA-Gehalt (Abb. 79 und 80). Auch hier mit der Angabe als relative Menge (%) zum kontralateralen, intakten Striatum.

Abb. 79: Gruppen 9 und 10: Striatales Dopamin +/- StA

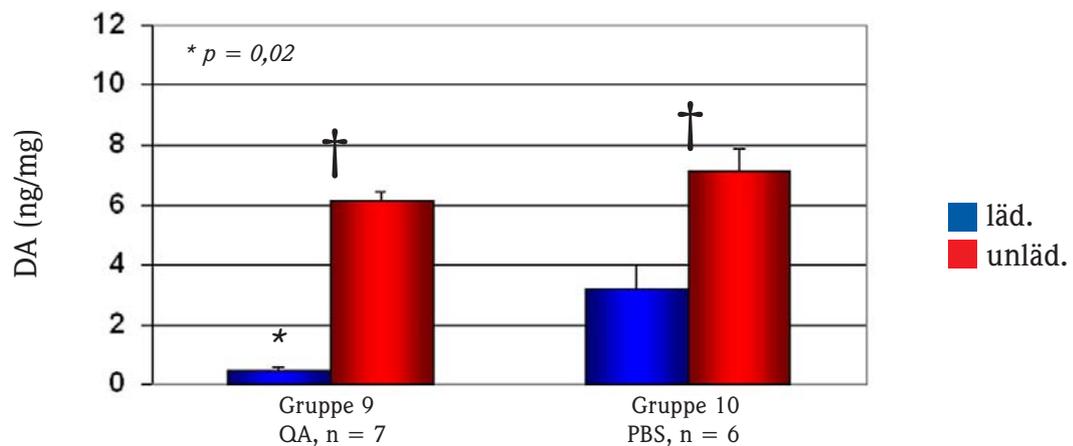


Abb. 80: Gruppen 9 und 10: Striatales Dopamin in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

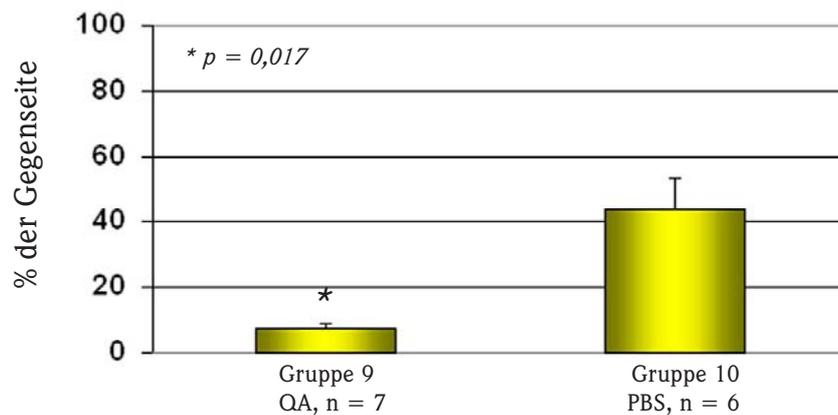


Abb. 81: Gruppen 9 und 10: Striatales DOPAC +/- StA

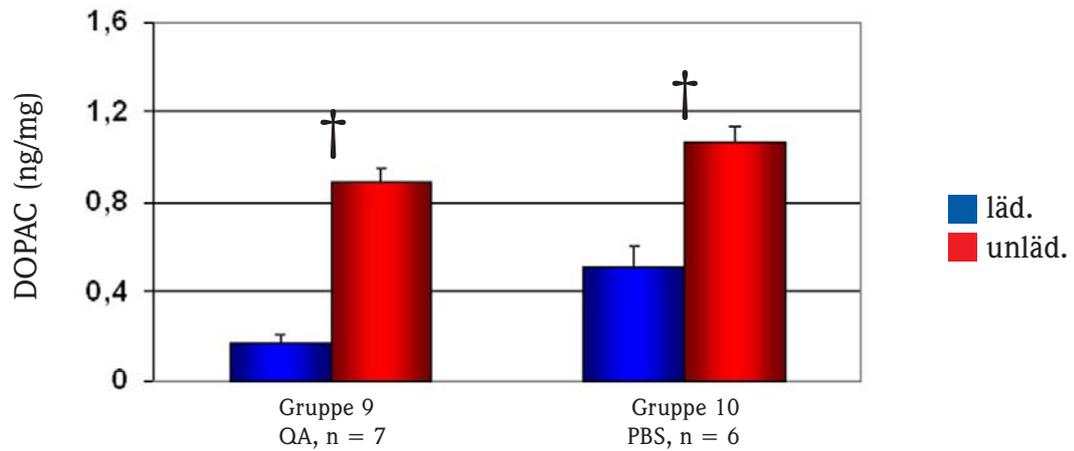


Abb. 82: Gruppen 9 und 10: Striatales DOPAC in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

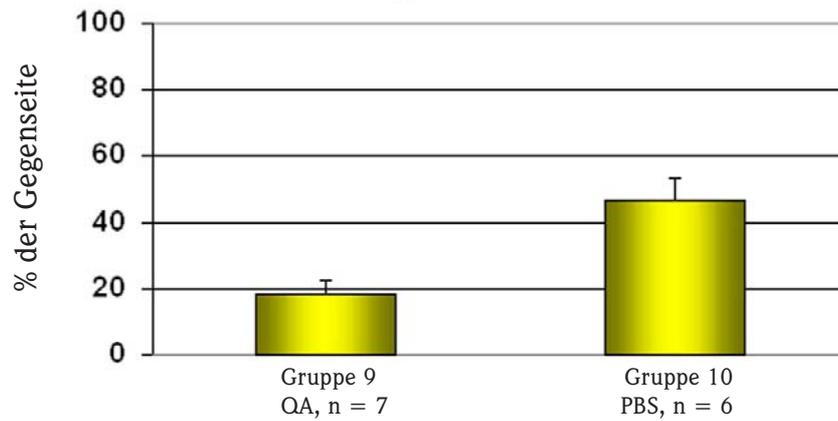
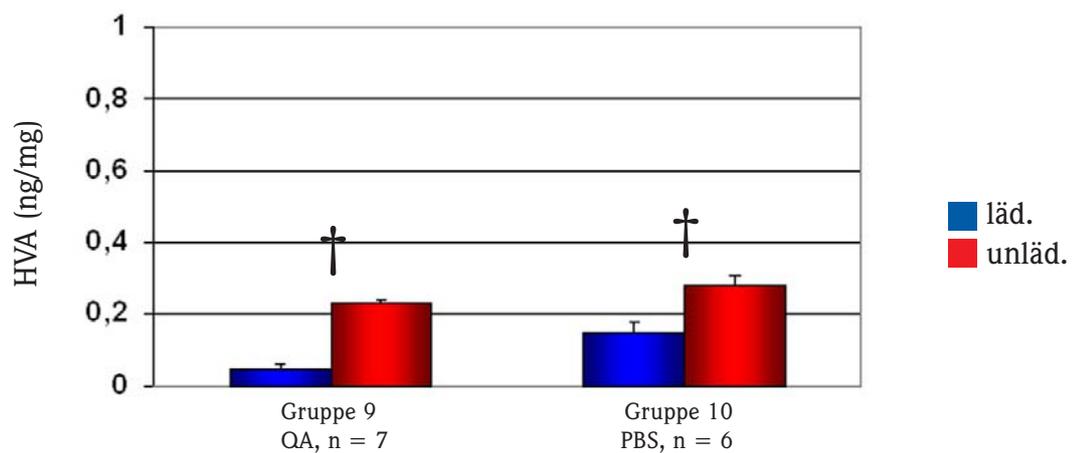
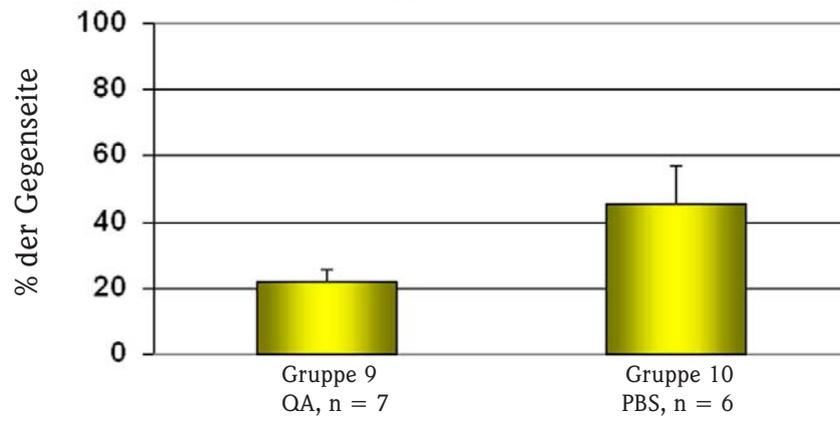


Abb. 83: Gruppen 9 und 10: Striatales HVA +/- StA



**Abb. 84: Gruppen 9 und 10: Striatales HVA
in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA**



3.8 Umfang des Untergangs von SNc-Neuronen bei Kainatläsion des NST, zeitgleicher FG-Markierung nigrostriataler Neuronen und 3-NP-Applikation 7 Tage später (Gruppen 11 und 12)



Im Vergleich zu den Gruppen 7 und 8 ist hier die NST-Läsion nicht durch QA sondern durch KA bei einer striatalen Läsion mit 3-NP (und nicht 6-OHDA wie in den Gruppen 1 und 3) durchgeführt worden.

Der Vergleich der SNc-Neuronenpopulationen und von DA/DOPAC/HVA liefert auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$), erkennbar ist hier, ähnlich wie in den Gruppen 7 und 8, eine Tendenz zugunsten der NST-lädierten Gruppe in der biochemischen Analyse des Striatums.

Die Abbildungen 85 bis 88 zeigen in den Gruppen 11 und 12 die Anzahl FG-markierter sowie TH-positiver SNc-Neuronen in der 3-NP-injizierten Hemisphäre (läd.) und in der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.), sowie jeweils in Prozent der kontralateralen, unbehandelten Hemisphäre, also als relatives Überleben von Neuronen. Gruppe 11 erhielt eine NST-Läsion mit KA, Gruppe 12 wurde NaCl in den NST injiziert.

Abb. 85: Gruppen 11 und 12: FG-markierte Neuronen +/- StA

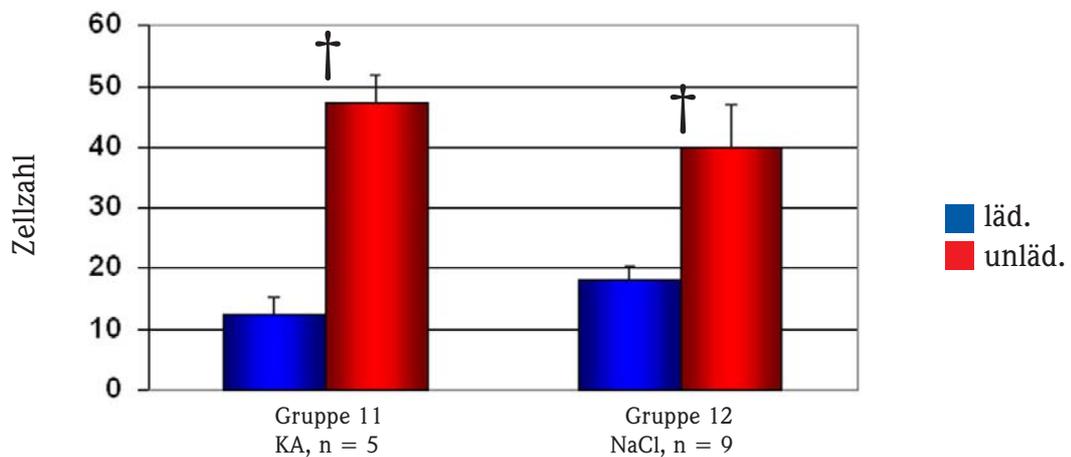


Abb. 86: Gruppen 11 und 12: FG-markierte Neuronen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

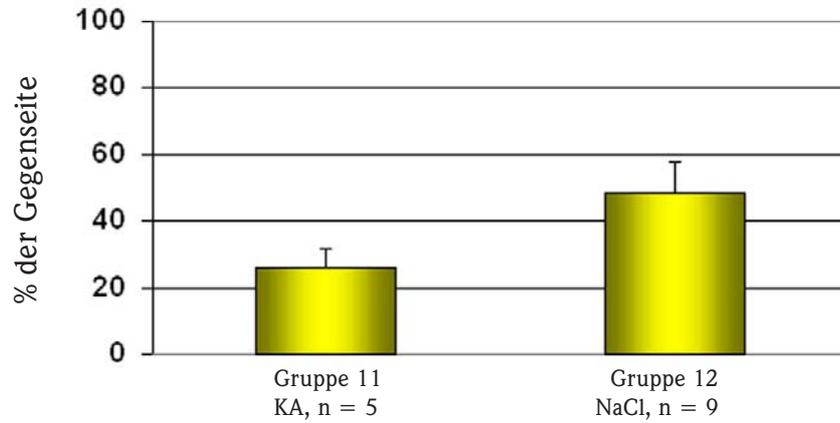


Abb. 87: Gruppen 11 und 12: TH-markierter Neuronen +/- StA

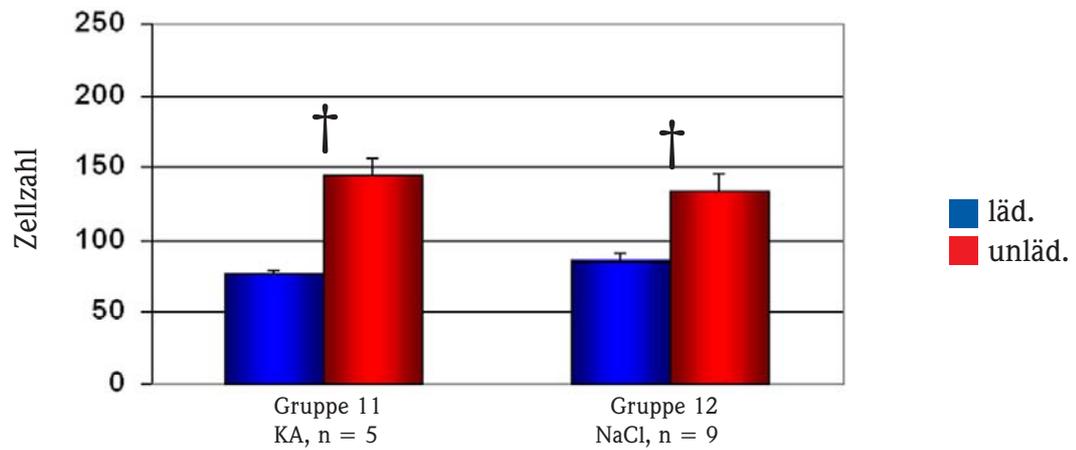
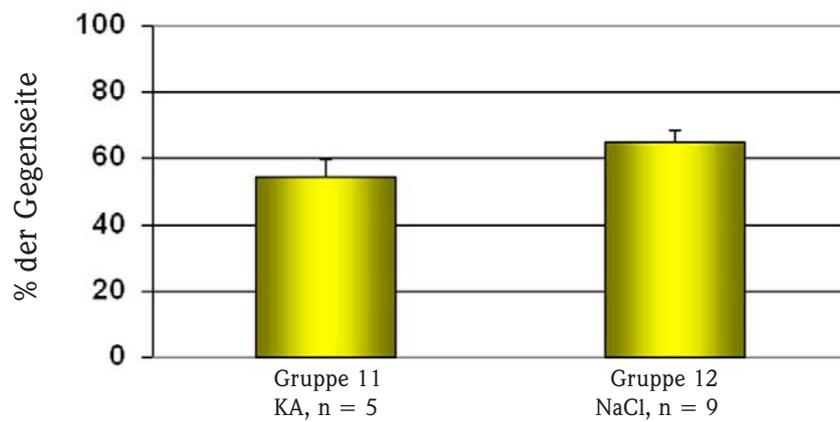


Abb. 88: Gruppen 11 und 12: TH-markierte Neuronen in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



Die folgenden Abbildungen 89 bis 94 stellen striatales DA und die Dopaminstoffwechselprodukte HVA und DOPAC in der 3-NP-injizierten Hemisphäre (läd.) und der unbehandelten kontralateralen Hemisphäre (unläd.) der Gruppen 11 und 12 dar. Schließlich als relative Menge (%) zum kontralateralen, intakten Striatum.

Abb. 89: Gruppen 11 und 12: Striatales Dopamin +/- StA

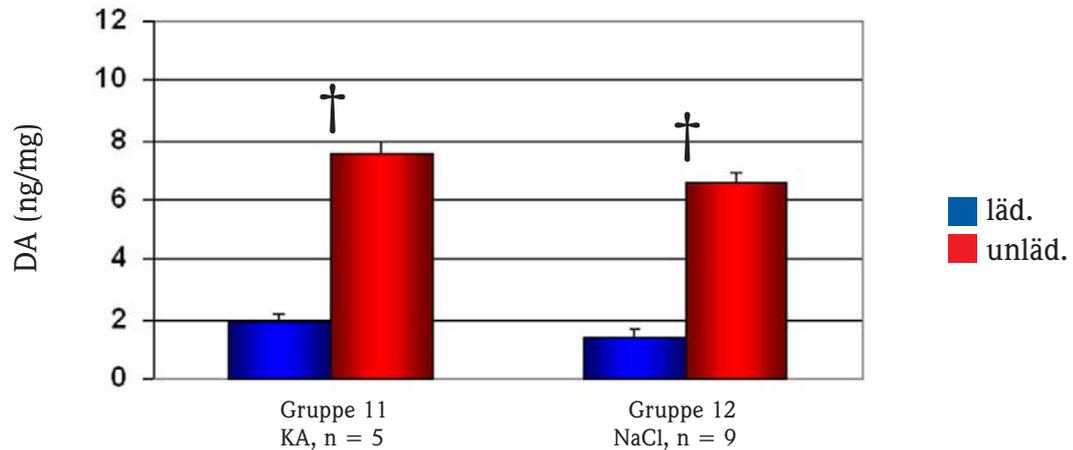


Abb. 90: Gruppen 11 und 12: Striatales Dopamin in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

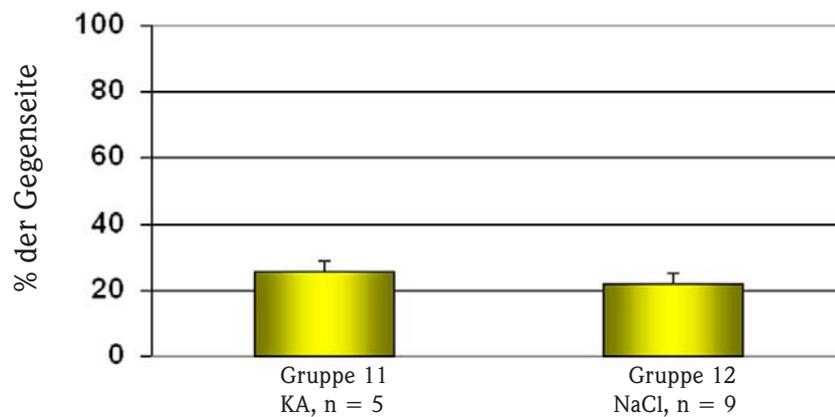


Abb. 91: Gruppen 11 und 12: Striatales DOPAC +/- StA

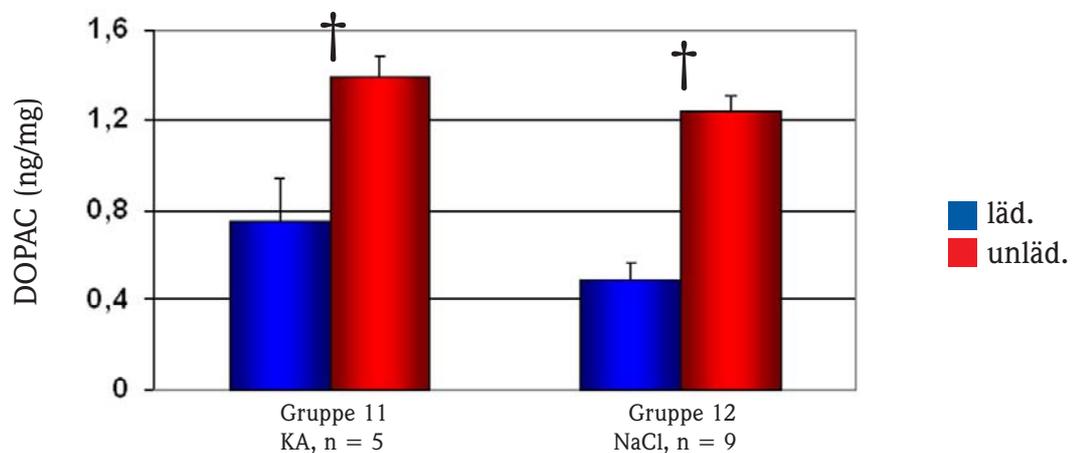


Abb. 92: Gruppen 11 und 12: Striatales DOPAC in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA

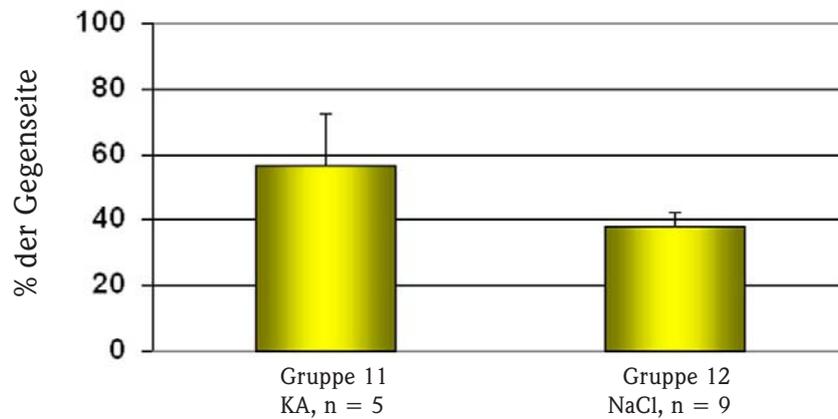


Abb. 93: Gruppen 11 und 12: Striatales HVA +/- StA

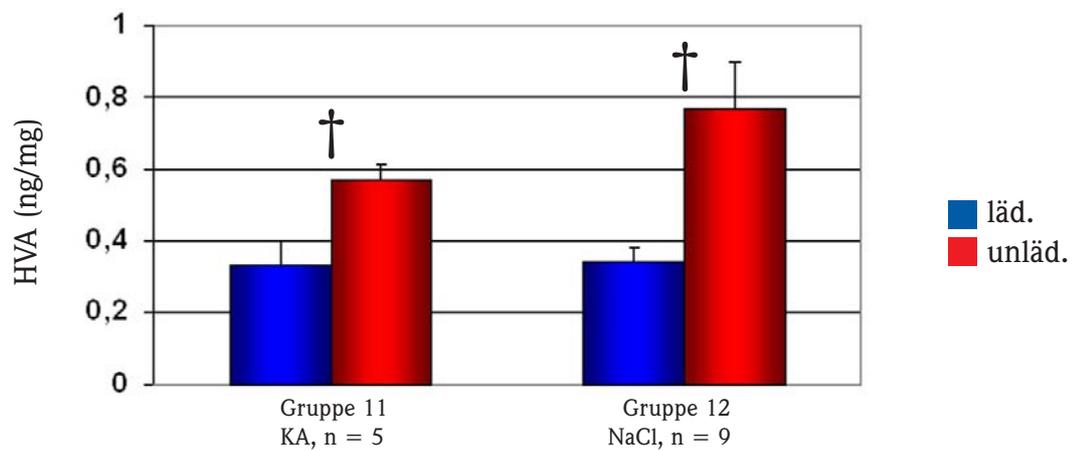
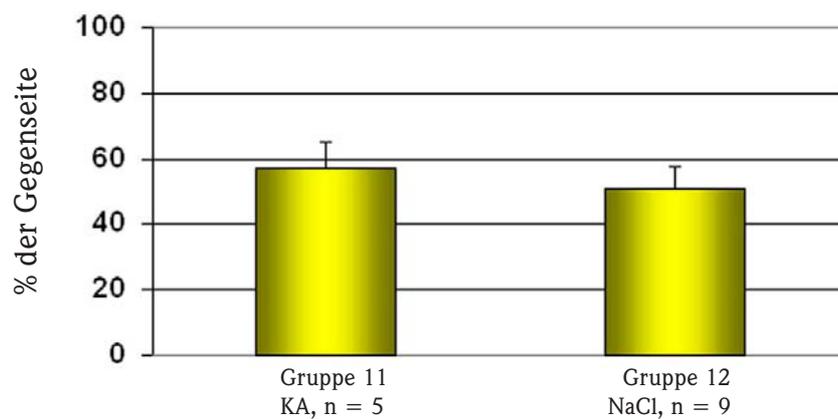


Abb. 94: Gruppen 11 und 12: Striatales HVA in Relation zur unlädierten Gegenseite +/- StA



Unter den neuen, experimentellen Strategien zur Behandlung des MP könnte der seit geraumer Zeit zur symptomatischen Therapie angewandten Läsion bzw. Ausschaltung des NST eine besondere Bedeutung zukommen. Wie im Tiermodell beschrieben wurde, soll die Ausschaltung dieses Kernes der Basalganglien nigrale dopaminerge Neuronen vor toxininduziertem Untergang bewahren (Piallat et al., 1996; Nakao et al., 1999). Dies würde bedeuten, daß die funktionelle Ausschaltung, z.B. durch Tiefenhirnstimulation, nicht nur symptomatische Verbesserung bewirkt, sondern gleichzeitig auch noch funktionierende dopaminerge Neuronen der SN vor Degeneration schützte, also eine neuroprotektive Wirkung hätte. Trotz experimenteller Hinweise auf einen solchen neuroprotektiven Mechanismus ist dieser bzw. die Rolle, die er im Verlauf der Erkrankung spielt, weiterhin sehr umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer durch Kainsäure- bzw. Chinolinsäureläsion exzitatorisch bedingten Ausschaltung des NST auf die toxininduzierte Degeneration dopaminergener Neuronen der SNc im 6-OHDA bzw. 3-NP-Tiermodell des MP untersucht. Ziel der Arbeit war erstens die Überprüfung der bereits publizierten, aber umstrittenen Ergebnisse zweier anderer Arbeitsgruppen (Piallat et al., 1996; Nakao et al., 1999) und zweitens die weitergehende Charakterisierung bzw. Ausdehnung dieser Untersuchungen auf die klinisch relevante, wichtige Fragestellung, ob auch eine zeitlich verzögerte Ausschaltung des NST noch neuroprotektiv auf nigrale Neuronen wirken könnte.

In der nun folgenden Diskussion sollen methodische Schwierigkeiten besprochen und anschließend dem Beobachteten möglicherweise zugrundeliegende Mechanismen reflektiert werden.

4.1 Kritische Betrachtung der Methodik

Die Intention der Arbeit besteht in der Beobachtung von Veränderungen infolge eines durch Chemoläsion zumindest funktionell ausgeschalteten NST.

Die stereotaktisch durchgeführte vollständige Läsion des relativ kleinen NST ist technisch nicht einfach, oft schwierig zu überprüfen und vermutlich einer der kritischsten Punkte der vorliegenden Studie. So konnte in den Gruppen 7 - 12, in denen der Nachweis einer NST-Läsion mittels CO-Färbung erfolgt war, nur bei insgesamt 7 NST-lädierten Tieren, also 11,9 % aller, bei denen eine vollständige Läsion des NST beabsichtigt war, das optimale und angestrebte Ergebnis „NST nicht mehr nachweisbar = in der Cytochromoxidasefärbung transparent“ gefunden werden. Als noch deutlich lädiert konnten insgesamt 20 Tiere, entsprechend 33,9 % aller NST-lädierten, eingestuft werden, also obengenannte plus „NST deutlich geringere Dichte“ (Übersicht aller experimentellen Gruppen siehe 2.2). Nakao beschreibt bei ähnlichem Versuchsaufbau insgesamt zwei unvollständig, aber dennoch deutlich NST-lädierte Tiere von zehn, bei denen eine Läsion angestrebt worden war, also eine Läsionsquote von 80 % (Nakao et al., 1999). Piallat betont ebenso, ausschließlich Tiere mit vollständig zerstörtem NST in die Gruppen eingeschlossen zu haben. Er kommt bei $n=10$ und zehn letztendlich eingeschlossenen Tieren auf eine „Trefferquote“ von 100 % (Piallat et al., 1996). Des weiteren fällt auf, daß Nakao et al. und Piallat et al. als stereotaktische Koordinaten für die Angabe der Tiefe ab Dura Koordinaten angeben, die sich um 0,3 mm unterscheiden, nämlich Nakao et al. $-7,8$ mm ab Dura und Piallat et al. $-7,5$ mm ab Dura. Da es jedoch bei beiden Arbeitsgruppen zu befriedigenden Läsionen des NST kam, ist davon auszugehen, daß diese Korrektur aufgrund des unterschiedlichen Ausgehens vom Bregma bzw. von interaural notwendig ist.

Auffällig war, daß selbst bei gliär markiertem Stichkanal in korrekter Ebene und in korrekter Tiefe, wodurch die korrekte Lage der Kanüle angezeigt wird, oftmals ein histomorphologisch intakter und bei intensiver CO-Färbung als funktionell intakt zu betrachtender NST erkennbar war. Grobe methodische Fehler, wie ein fehlerhaftes Aufziehen von Trägersubstanz ohne lädierende Säure, können eine solche insuffiziente Läsion zur Folge gehabt haben. In diesem Fall wären die wider Erwarten nicht erfolgten Läsionen jedoch erkennbar auf eine Operationssitzung bzw. auf einzelne zufällige Fehler begrenzt, was aber nicht der Fall war. Die Möglichkeit der Schadhaftheit der Toxine wurde durch Verwendung verschiedener Chargen mit hoher Wahrscheinlichkeit widerlegt. Die

Durchgängigkeit der zur Läsion verwendeten Kanülen wurde mehrfach kontrolliert, so daß auch eine Verstopfung der Lumina als Fehlerquelle ausscheidet. Vielmehr waren die Läsionen oftmals im Ansatz erkennbar, aber nicht eindeutig, was auch das Einführen mehrerer Bewertungskriterien nebeneinander, der CO-Färbung, der KV-Färbung sowie dem computergesteuerten Vermessen der NST-Fläche, und eines abgestuften Bewertungsschemas innerhalb von CO- und KV-Färbung notwendig machte.

Ein weiteres Problem stellte die Standardisierung der CO-Färbung dar. Die Möglichkeiten, die diese Färbemethode bietet, werden erst dann voll ausgenutzt, wenn man die optische Dichte des Kernareals mißt und somit eine Korrelation zur funktionellen Aktivität herstellen kann. Würde dies gelingen, wäre eine weit- aus differenziertere Betrachtung der Daten möglich. Dies setzt einen streng standardisierten Färbeablauf voraus. Die Reaktion ist als enzymvermittelte histochemische Methode temperaturabhängig und soll bei 37°C durchgeführt werden (Vila et al., 1996). Weil die Schnitte aber auf gelatinierten Objektträgern fixiert werden sollen, war eine Inkubation in 37°C über längere Zeit nicht möglich, da sie sich bei diesen Temperaturen vom Objektträger lösten. Erstaunlicherweise sind ähnliche Probleme in den die Methode etablierenden Arbeiten (Wong-Riley, 1979, Vila et al., 1996) nicht beschrieben, hier sind scheinbar problemlos sogar Inkubationszeiten von bis zu 48 Stunden versucht worden. Optimale Ergebnisse wurden in der vorliegenden Studie nach etwa sieben Stunden erzielt, wobei aus bisher unklaren Gründen nicht immer nach der gleichen Zeit gleich gute Färbeargebnisse erzielt werden konnten, was manchmal ein Fortführen der Inkubation unter Sichtkontrolle bis zum Erlangen eines makroskopisch identifizierbaren NST notwendig machte. Äußere Temperatureinflüsse konnten ebenso als Fehlerquellen ausgeschlossen werden wie defekte Inhaltsstoffe der Färbelösung.

Trotzdem erwies sich die CO-Färbung als äußerst praktikable Methode zur Bewertung einer tatsächlichen Läsion des NST, da hier die NST-Intensität nur mit der kontralateralen Seite des Gehirns verglichen wurde. Die entstandene Schwankung in der Gesamtfärbungszeit war für diese Bewertung nicht relevant, die optimale Ausnutzung der CO-Färbung mittels Messung der optischen Dichte läßt es jedoch nicht zu. Dies ist für die Zwecke der vorliegenden Studie aber auch nicht notwendig. Gelingt die völlige Läsion des NST, ist die Dichtemessung überflüssig. Für nachfolgende, differenzierte Experimente zur Untersuchung von Korrelation von NST-Funktion und Ausmaß der möglichen Neuroprotektion

könnte die Messung der optischen Dichte des NST mit Hilfe der CO-Färbung aber sicherlich sehr wertvoll sein.

Unter den gegebenen Voraussetzungen konnte keine durchgehend eindeutige NST-Läsion erzielt werden, und das Einbringen eines CO-Dichtekoeffizienten als Korrelat funktioneller neuronaler Aktivität in statistische Überlegungen wäre nur unter aufwendigeren technischen Voraussetzungen und nach Behebung der o.a. methodischen Schwierigkeiten möglich.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse jedoch, daß es trotz der methodischen Schwierigkeiten und des damit verbundenen nicht vollständigen Ausnutzens der Methodik hinsichtlich einer Korrelation zwischen NST-Schadigungsgrad und Effekt in der SN wichtig war, die CO-Färbung überhaupt durchzuführen. Dadurch konnten die Tiere aus der Analyse genommen werden, bei denen der NST nur sehr unvollständig lädiert war und die somit die Streuung deutlich erhöht hätten.

4.2 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Insgesamt zeigten sich keine positiven Einflüsse einer Läsion des NST weder auf Zell- noch auf Transmitterebene. Dabei ist es unwichtig, ob die nigro-striatale Depletion dopaminergere Fasern durch das Toxin 3-NP oder 6-OHDA ausgelöst und ob der NST durch KA oder QA lädiert wird. Insgesamt zeigt sich allenfalls ein kleiner Effekt zu Ungunsten der NST-lädierten Gruppe auf Transmitterebene, wenn die Läsion des NST erst nach Beginn der Degeneration der dopaminergen Fasern geschieht, also eine Situation, wie sie beim am Morbus Parkinson erkrankten Patienten vorliegt. Da dieser Effekt jedoch nicht auf Zellebene vorliegt (was er nicht muß – denkbar wäre auch, daß ein schädigender Einfluß nicht ganz zum Zelltod, sondern nur zu einem Funktionsverlust führt), sich vor allem aber auch nicht in den Abbauprodukten von DA (also DOPAC und HVA) widerspiegelt, sollte das Ergebnis mit einiger Vorsicht betrachtet werden.

Ziel der Arbeit war es, die widersprüchliche Studienlage bezüglich des Effektes einer KA-induzierten NST-Läsion auf eine 6-OHDA-Schädigung (Nakao et al., 1999, kein Effekt vs. Piallat et al., 1996, positiver Effekt) aufzuhellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen wie bei Nakao et al., 1999 keinen Effekt. In der Diskussion der Ergebnisse führt Nakao et al. als mögliche Erklärung der Diskrepanz an, daß unterschiedliche Konzentrationen von 6-OHDA (4 mg vs. 2 mg) und unterschiedliche Applikationsgeschwindigkeiten (0,5 ml/min vs. 0,1 ml

/min) verwendet wurden. Auch wenn dieses Argument unwahrscheinlich erschien, da die Gesamtdepletion in der Arbeit von Nakao et al. dosisabhängig zwischen 60 % und 30 % im Vergleich zur gesunden Seite und damit in der selben Größenordnung wie die bei Piallat et al. lag, kann dies als Ursache ausgeschlossen werden, da in der vorliegenden Arbeit für alle Parameter die Bedingungen gewählt wurden, die jeweils zu einem protektiven Effekt geführt haben (selbes gilt also für die Behandlung mit 3-NP / QA).

Während bei Nakao et al. darüber hinaus auch die unterschiedliche Art der NST-Läsion eine Rolle gespielt haben könnte – in seiner Arbeit wird der NST durch QA, bei Piallat et al. durch KA lädiert – konnte auch dieses als Ursache durch die vorliegende Arbeit ausgeschlossen werden, da vergleichend dasselbe Behandlungsschema mit beiden NST-Schädigungen durchgeführt wurde. Auch wenn auf die methodischen Schwierigkeiten bezüglich der NST-Schädigung bereits hingewiesen wurde (siehe 4.1), so zeigt sich doch, daß in beiden Behandlungsparadigmen ein ähnlich hoher Grad an Depletion des nigrostriatalen Systems – sowohl auf Transmitter- als auch auf Zellebene – erzielt wurde und dieser mit den in der Literatur beschriebenen Daten gut einhergeht. Daher scheinen methodische Schwierigkeiten bzw. Unterschiede in der Auswirkung auf die diskrepanten Ergebnisse eine untergeordnete Rolle zu spielen. Für die Güte der vorliegenden Daten spricht weiterhin, daß trotz der sehr aufwendigen Eingriffe nur geringe Standardfehler vorliegen, die Zahlen also sehr homogen sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den positiven Einfluß der NST-Läsion im 3-NP-Modell, wie bei Nakao et al. publiziert, zu replizieren. Auch hier konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Effekt nachgewiesen werden. Wieder sprechen die geringe Standardabweichung ebenso wie die erwartungsgemäße Schädigung des nigrostriatalen Systems in allen Paradigmen für die Güte der durchgeführten Studie.

Auch im 3-NP-Modell wurden unterschiedliche Toxine für die NST-Läsion ebenso wie das bei Nakao publizierte Behandlungsschema verwendet. Aufgrund der geringen Standardabweichung scheint es unwahrscheinlich, daß eine höhere Fallzahl zu einem anderen Ergebnis geführt hätte. Mögliche Mechanismen des Zelltods, die dann auch Unterschiede zwischen den Modellen hätten erklären können (insgesamt sei angemerkt, daß die Schädigung mit 3-NP nicht selektiv das dopaminerge System betrifft) sollen unter 4.3 diskutiert werden, hier sei im folgenden noch auf einen Aspekt eingegangen.

Betrachtet man die Ergebnisse bei Nakao et al. im Detail, so zeigt sich, daß der protektive Effekt nicht bei jeder Dosis von 3-NP erzielt werden kann. Er tritt nur

bei 125 und 250 nmol 3-NP auf, in der vorliegenden Arbeit wurden 250 nmol verwendet. Bei 500 nmol 3-NP gibt es keinen Unterschied mehr zwischen NST-lädierten und -unlädierten Tieren mehr. Eine mögliche Erklärung wäre also, daß eine NST-Läsion nur bei einer geringen Schädigung des nigrostriatalen Systems einen protektiven Einfluß entfalten kann, ab einem bestimmten Schwellenwert jedoch die Mechanismen nicht mehr greifen. Wäre nun dieser Schwellenwert in der Größenordnung von etwa 250 nmol 3-NP, so könnte es sein, daß die Schädigung bei Nakao et al. gerade noch schwach genug, in der vorliegenden Arbeit jedoch bereits zu stark gewesen ist. Dieses könnte nur durch eine weitere Durchführung der vorliegenden Behandlungsparadigmen mit einer Dosis von 125 nmol 3-NP geklärt werden.

Im Vergleich der Ergebnisse drängt sich jedoch eine weitere Frage auf. Auch in der vergleichenden Studie mit 6-OHDA verwendet Nakao et al. aufsteigende Dosierungen. Vergleicht man die Gruppen QA/3-NP und QA/6-OHDA in jeweils niedrigster Dosierung von 3-NP und 6-OHDA, so zeigt sich kein relevanter Unterschied. Der „protektive“ Effekt ergibt sich dadurch, daß die Schädigung zwischen NaCl/3-NP und NaCl/6-OHDA nicht vergleichbar ist. In der vorliegenden Arbeit ist dies jedoch bei den gewählten Dosierungen der Fall, denn danach wurden sie ausgesucht. Dies würde zum einen die Diskrepanz zwischen Nakao et al. und Pierrat et al. unabhängig vom Schädigungsmechanismus ebenso wie den fehlenden Effekt in der vorliegenden Arbeit erklären. Ungeklärt bleibt, ob sich das Bild bei halber Dosierung 3-NP ändern würde bzw. warum sich dies, auch wenn das Ausmaß der Schädigung in den publizierten Ergebnissen nicht vergleichbar ist, nicht auch auf die NST-Gruppe bezieht. Dennoch besteht in dieser Diskrepanz am ehesten ein Erklärungsansatz. Es würde darüber hinaus nahe legen, daß nicht wirklich ein protektiver Effekt auf Grund der Verbindungen der einzelnen Hirnregionen vorliegt (siehe hierzu auch 4.4).

Dies legen dann auch die Ergebnisse des dritten Abschnittes der vorliegenden Studie nahe, nämlich der Effekt einer NST-Läsion nach Beginn eines nigrostriatalen Untergangs. Hier zeigt sich ebenfalls kein positiver Einfluß, sondern im Gegenteil auf Transmitterebene ein Einfluß zu Ungunsten der NST behandelten Tiere.

Die vorliegende Studie hat jedoch erneut gezeigt, wie schwierig es ist, experimentelle Daten zu reproduzieren. Vor etwaigen Rückschlüssen sollte dieses erst einmal gelingen. Zunächst müssten jedoch die methodischen Schwierigkeiten behoben und im Anschluß eine weitere Serie durchgeführt werden.

Der Vorteil der vorliegenden Studie besteht darin, daß mögliche Einflüsse unterschiedlicher Behandlungsschemata, also etwa die Verwendung von QA vs. KA, den Einfluß einer gleichzeitigen Färbung mit FG, der Abstand zwischen der NST-Behandlung und der intrastriatalen Läsion und weitere Aspekte durch die vielen verschiedenen Behandlungsgruppen kontrolliert wurden. Über alle Gruppen sind Ergebnisse vergleichbar, darüber hinaus in sich sehr homogen – auch das spricht für die Studie.

Neben den methodischen Schwierigkeiten liegt ein Nachteil darin, daß auf Grund der Fülle der verschiedenen Behandlungen zusätzlich keine Dosisabhängigkeit der Toxine 3-NP und 6-OHDA getestet wurde. In nachfolgenden Studien sollte dies berücksichtigt werden zu Lasten der Behandlungsvielfalt, da sich hier keine Abhängigkeit zeigte. Dieses ist im übrigen für Nachfolgestudien ein Ergebnis von höchst pragmatischer Bedeutung.

4.3 Mechanismen des Zelltodes

Will man der Frage nach möglichen neuroprotektiven Effekten der Ausschaltung des NST nachgehen, so gilt es zunächst die Mechanismen zu diskutieren, die in den verwendeten Modellen dem striatonigralen Zelltod zu Grunde liegen können. Interessant wird diese Frage besonders dann, wenn die verschiedenen Modelle unterschiedliche Ergebnisse liefern. In der vorliegenden Arbeit wurde in keinem der verwendeten Modelle 6-OHDA und 3-NP ein signifikanter neuroprotektiver Effekt beobachtet, Piallat jedoch wies ihn im 6-OHDA-Modell nach (Piallat et al., 1996), hierbei aber nur bei Läsion des NST eine Woche vor striataler 6-OHDA-Injektion, nicht jedoch wenn die NST-Läsion 15 Tage nach 6-OHDA-Injektion erfolgte (Piallat et al., 1996). Nakao hingegen sah den neuroprotektiven Effekt auf dopaminerge Neurone der SN zwar im 3-NP-Modell, nicht jedoch im 6-OHDA-Modell, bei NST-Läsionen jeweils zwei Wochen vor striataler Toxinapplikation (Nakao et al., 1999). Eine neuere Arbeit der Arbeitsgruppe um Carvalho (Carvalho u. Nikkah, 2001) beschreibt einen signifikanten neuroprotektiven Effekt einer Ibotensäureläsion des NST bei Applikation eine Woche vor striataler 6-OHDA-Läsion, jedoch lediglich auf dopaminerge nigrale Zellen, nicht aber auf TH-positive nigrostriatale Bahnen.

Nach Sauer und Oertel (1994) führt die Injektion von 6-OHDA ins Striatum zur Aufnahme der Substanz in die terminalen neuronalen Endigungen der an den Injektionsort projizierenden dopaminergen Neuronen. Nach retrogradem Transport in den Zellkörper kommt es zur Autooxidation zu Wasserstoffperoxid, H_2O_2 , (Heikkila u. Cohen, 1971; Heikkila u. Cohen, 1973), welches für sich relativ untoxisch ist, sofern es nicht in exzessiven Mengen vorkommt (Halliwell, 1992). Dieses Hydrogenperoxid reagiert seinerseits mittels im Gewebe anzutreffender reduzierter Metallionen zu hochreaktiven Hydroxylsauerstoff-Radikalen (Halliwell, 1992). Nun kommt es zu einer Schädigungskaskade durch eine sofortige Reaktion mit jeglicher Form von in lebenden Zellen anzutreffenden Molekülen, die auch die mitochondrialen Elektronentransportsysteme einbezieht (Youdim et al., 1993). Durch die resultierende mitochondriale Dysfunktion kommt es zur Senkung des zellulären Energieniveaus, eine Situation, in der die potentielle Toxizität des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat auf Zellen mit schadhaftem intrazellulären Metabolismus zum Tragen kommen kann (Novelli et al., 1988). Glutamat induziert die Depolarisation der neuronalen Membranen und hebt die spannungsabhängige Blockade der NMDA-Kanäle

durch Magnesium (Mg^{2+}) auf. Da die Rückkehr zum Ruhepotential abhängig von der ATP-Synthese, also vom energetischen Niveau der Zelle ist, kommt es bei niedrigem Energieniveau zur verlängerten Depolarisation und zum vermehrten Einstrom von Calcium (Ca^{2+}) durch die für Ca^{2+} höchst durchlässigen NMDA-Kanäle (Greenamyre et al., 1999). Bei steigendem intrazellulären Ca^{2+} kommt es zur Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen und somit zur Auto-destruktion der Zelle (Beal et al., 1993) sowie wiederum zu vermehrter mitochondrialer Dysfunktion, da Ca^{2+} hochaffin gegenüber Mitochondrien ist, wo es zur Bildung freier Radikale und zur Depolarisation der Mitochondrien kommt (Greenamyre et al., 1999). Ein weiterer denkbarer Schädigungsmechanismus entsteht durch die katalytische Eigenschaft des Ca^{2+} auf die Stickoxid-Synthetase (nitric oxide synthase, NOS), welche die Reaktion von Arginin zu Citrullin vermittelt (Beckmann et al., 1990). Das hierbei entstehende Stickoxid (NO) reagiert mit Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot-}$) zum höchst reaktiven, oxidierenden Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) (Dawson et al., 1991), wobei ein möglicher Schädigungsmechanismus des Peroxynitrit die Nitration von Tyrosinresten an Proteinen (Ischiropoulos et al., 1992), ein anderer die Aktivierung des Enzyms Poly-ADP-Ribose-Synthetase (PARS) darstellt, was zu abnorm hohem ATP-Verbrauch und rapidem Verbrauch von Energievorräten führt (Zhang et al., 1994). NO scheint den aus exitotoxischen Einflüssen resultierenden Zelltod zu vermitteln (Dawson et al., 1991; Rodriguez et al., 1998). In Lewy-Körperchen dopaminergischer Neuronen der SNc an MP Erkrankter konnte eine vermehrte Immunreaktivität auf Nitrotyrosin gezeigt werden, was seinerseits Vorkommen von NO^{\cdot} und Peroxynitrit anzeigt, quasi als Marker für abgelaufene oxidative Modifikation neuraler Proteine (Good et al., 1998).

Die eben genannten spannungsabhängigen Mg^{2+} -Blockaden von NMDA-Rezeptoren verhindern eine exzessive Stimulation der Rezeptoren durch physiologische Glutamat-Konzentrationen (Cox et al., 1989). Es existieren zwei mögliche Arten der Überstimulation: Zum einen die „strong exitotoxicity“, wie sie beispielsweise im Rahmen einer Ischämie auftritt, große Mengen zuviel ausgeschütteten oder zuwenig wiederaufgenommenen Glutamats verdrängen den Block und stimulieren die NMDA-Rezeptoren exzessiv, zum anderen die „weak exitotoxicity“, wobei Stoffwechselveränderungen eine toxische Wirkung endogener Glutamatkonzentrationen bewirken (Zeevalk u. Nicklas, 1991; Rodriguez et al., 1998).

Bei der Frage, wie 3-NP toxisch auf dopaminerge Neurone nach striataler Applikation wirkt, kam die Arbeitsgruppe um Zeevalk zu dem Schluß, daß 3-NP in Zellkulturen über metabolische Veränderungen und über exzitatorische Mechanismen zum Zelltod dopaminerger Neurone führt (Zeevalk et al., 1995; Zeevalk et al., 1995). Die intrastriatale Applikation von 3-NP, welches die Succinyldehydrogenase des Citratzyklus inhibiert, führt zu einem Absinken des striatalen ATP-Levels und zum Ansteigen von Laktat (Brouillet et al., 1993; Beal et al., 1993), und die Expression von cFos in der SNc bei 3-NP-Applikation, nicht aber bei 6-OHDA, läßt die Überaktivität von Glutamatrezeptoren auf nigralen Zellen vermuten (Aronin et al., 1991; Nakao et al., 1999).

Die Tatsache, daß sich in den Untersuchungen von Nakao et al., 1999, der gewünschte neuroprotektive Effekt nur in der 3-NP-Gruppe, nicht aber in der 6-OHDA-Gruppe gezeigt hat, erklärt die Gruppe damit, daß der Zelltod bei 6-OHDA durch freie Radikale, nicht jedoch durch metabolische Veränderungen oder Exotoxizität hervorgerufen wird. Er unterschlägt aber die oben aufgeführte, nach der Radikalbildung folgende Schädigungskaskade, die eben doch in einer metabolisch-energetischen Veränderung resultieren kann, die ihrerseits die Exzitotoxizität bahnen könnte. Somit haben 3-NP und 6-OHDA potentiell die gleiche Endstrecke bei unterschiedlicher Initialwirkung. Hat 3-NP möglicherweise auf den Energiestoffwechsel nigrostriataler Neuronen unmittelbar Auswirkungen, so geschieht dies bei 6-OHDA über die „Hintertür“ der Radikalbildung.

4.4 Die Rolle des Nucleus subthalamicus

Welche Position nimmt der NST in der Pathogenese des MP ein? Steht er am Anfang oder am Ende, sind die Effekte seiner glutamatergen Efferenzen Symptom oder Ursache? Ist seine Überfunktion „nur“ das Ergebnis der aus dem Gleichgewicht geratenen Basalganglien, oder steht am Anfang eine glutamaterge subthalamonigrale Projektion, die durch ein metabolisches Tief der Zielregion zum trojanischen Pferd für die jetzt verwundbare dopaminerge Zelle wird? Beschleunigt er lediglich die Progredienz des aus anderen Ursachen eintretenden nigralen Zelltodes beim MP, oder ist er dessen unabdingbare Voraussetzung?

Die potentielle Toxizität des Exzitotoxins Glutamat mit Überwindung der Mg^{2+} -Blockade des NMDA-Rezeptors und Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} mit konsekutiver mannigfaltiger Schädigung der Zelle wirkt sich über die denkbaren Wege der „strong excitotoxicity“ und der „weak excitotoxicity“ aus, letztere beispielsweise dadurch, daß metabolischen Anforderungen wegen mitochondrialer Dysfunktionen, wie einer verminderten Aktivität des Komplex I der Atmungskette (Greenamyre et al., 1999) nicht ausreichend genügt wird (Blandini et al., 1996). Glutamat gelangt durch Projektionen vom NST an die dopaminerge Zelle der SNc (Hammond et al., 1978; Rosales et al., 1994; Piallat et al., 1999), welche reziprok dopaminerg in den NST projiziert (Hassani et al., 1997). Die exzitotoxischen Eigenschaften des Glutamat führen schließlich zum Zelluntergang. Hohe Konzentrationen von Glutamatrezeptoren auf SNc-Neuronen könnten diesen Prozeß begünstigen (Ong et al., 1997).

Dies leitet einen Prozeß mit umfassenden Veränderungen innerhalb der Basalganglien ein. Es verschiebt sich ihr Gleichgewicht so, daß der die Outputregion modulierende NST die hemmende Instanz so stark aktiviert, daß sie die Bewegungsabläufe dominiert. Es resultiert das klinische Bild. Darüber hinaus könnte die NST-Überaktivität Schäden am internen Segment des Globus pallidus, der Substantia nigra pars reticulata sowie am Nucleus pedunculopontinus des Hirnstammes bewirken, Zielregionen glutamaterger Projektionen des NST, die beim Primaten nachgewiesen werden konnten (Feger et al., 1997; Scarnati u. Florio, 1997), welche für die L-Dopa-resistenten Anteile bei fortgeschrittenen Formen des MP verantwortlich sein könnten (Rodriguez et al., 1998).

Das glutamaterge System bestimmt somit Ursache und Auswirkungen der Veränderungen beim MP (Blandini et al., 1996).

Geht man hiervon aus, dann sollte eine Unterbrechung der Projektionen, in deren synaptischem Ende in der SNc bei der Ratte pleomorphe Vesikel mit Immunreaktion auf Glutamat zu finden sind (Parent u. Hazrati, 1995), also subthalamonigraler glutamaterger Projektionen, zur Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit dopaminergener Zellen führen. Andere auf die dopaminergen Zellen der SN glutamaterg afferente Bahnen können ihrerseits dafür verantwortlich gemacht werden, daß eine NST-Läsion nicht völlig vor Toxizität z.B. durch 3-NP schützt (Nakao et al., 1999). Der protektive Effekt durch NST-Läsion konnte mehrfach gezeigt werden (Saji et al., 1996; Piallat et al., 1996; Piallat et al., 1999; Nakao et al., 1999; Benazzouz et al., 2000; Carvalho et al., 2001), auch NMDA-Rezeptorantagonisten zeigten neuroprotektive Effekte in Parkinson-Modellen (Turski et al., 1991; Zuddas et al., 1992; Lange et al., 1993; Brouillet et al., 1993). Aber auch Beobachtungen wie die Verstärkung der präsynaptischen enzymatischen Umwandlung von L-Dopa zu Dopamin durch Glutamat-Antagonisten an NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren (Starr, 1995) tragen zur Diskussion um eine rationale Grundlage ihres Einsatzes bei. Leider erweisen sich unspezifische NMDA-Antagonisten aufgrund mannigfaltiger neuropsychiatrischer Nebenwirkungen in der klinischen Langzeitanwendung am Menschen als nicht brauchbar (Rodriguez et al., 1998). Antiglutamaterge Substanzen wie Lamotrigin oder Riluzol sollen die Ausschüttung von Glutamat herabsetzen und dadurch die Exzitotoxizität vermindern und zeigten in MP-Tiermodellen Zeichen neuroprotektiver Eigenschaften (Jones-Humble et al., 1994; Boireau et al., 1994; Barneoud et al., 1996). Die subthalamische Infusion von NMDA-Antagonisten wie MK-801 erweist sich als protektiv gegenüber dopaminergen Zellen der SNc im MP-Modell (Blandini et al., 2001), was deutlich den Verdacht auf die direkte Beteiligung von aus dem NST stammenden Glutamat beim Untergang nigraler Zellen im Parkinson-Modell impliziert.

Beim Primaten wurden hohe Konzentrationen der ionotropen postsynaptischen Glutamatrezeptor-Untereinheiten GluR1, GluR2/3, drei der vier (GluR1-4) unterschiedlichen Untereinheiten ionotroper AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat)-Kainat-Rezeptoren und NMDA-Rezeptor-1, einer von zwei identifizierten NMDA-Familien mit acht Isoformen A-H (Nicoletti et al., 1996; Hollmann u. Heinemann, 1994), sowie geringere Konzentrationen des metabotropen präsynaptischen Rezeptors mGluR1a in der SNc gefunden, wobei GluR1 und GluR2/3 insbesondere am Zellkörper und an größeren Dendriten lokalisiert waren und NMDA-Rezeptor-1 und mGluR1a eher auf kleinen Dendri-

ten zu finden waren (Ong et al., 1997). NMDA-Rezeptoren scheinen in die glutamaterge Afferenz subthalamonigraler und corticonigraler Bahnen auf Neuronen der SNc involviert zu sein, während AMPA-Kainat-Rezeptoren die Afferenzen vom Nucleus pedunculopontinus zu vermitteln scheinen (Rodriguez et al., 1998).

Ipsilaterale NST-Läsionen führen bei unilateraler Läsion nigrostriataler Bahnen zum Anstieg der Enzymaktivitäten von Succinatdehydrogenase und Cytochromoxidase, Markern neuronaler Aktivität, in der Outputregion und in der SNr (Blandini et al., 1997). In vitro konnte der durch die metabolischen Inhibitoren 3-NP oder Malonat herbeigeführte Untergang dopaminergener Zellen durch NMDA potenziert und durch MK-801 verhindert werden, bei nigraler Infusion von Malonat in vivo zeigte sich gleiches, interessanterweise jedoch nicht bei intrastriataler Malonatapplikation (Sonsalla et al., 1998). Eine andere Studie versuchte ebenfalls zu klären, wo die Schädigung über NMDA-Rezeptoren stattfindet, ob präsynaptisch am dopaminergen Terminus im Striatum oder postsynaptisch auf den Zellsomata der nigralen Neuronen. Auch hier führte die intranigrale, nicht aber die intrastriatale NMDA-Rezeptor-Blockade zur Protektion vor den Einflüssen von Malonat (Zeevalk et al., 2000).

Zusammenfassend gilt festzuhalten, daß all diese Ergebnisse die Hypothese des während eines zytoenergetischen Defizites an der dopaminergen Zelle der SN ablaufenden, postsynaptisch NMDA-Rezeptor-vermittelten Prozesses stützen. Die Pathogenese des MP könnte folgendermaßen aussehen: Kommt es einmal zu einer möglicherweise durch genetisch determinierte mitochondriale Dysfunktion bedingten Funktionsminderung einzelner dopaminergener Neuronen der SN, werden diese verwundbar gegenüber physiologischen Glutamatkonzentrationen („weak excitotoxicity“). Es kommt zum Zelltod einer nigralen Subpopulation und nach der heutigen Kenntnis der Verschaltung der Basalganglien zur Überfunktion des NST, wodurch wiederum Neuronen der SN durch Glutamat geschädigt werden („strong excitotoxicity“). Die anderen von dieser potentiell toxischen Überfunktion der glutamatergen Transmission betroffenen Kernareale des Gehirns könnten für im Verlauf einer fortgeschrittenen Erkrankung auftretende L-Dopa-resistente Erscheinungen verantwortlich sein. Zwischen NST und SN entsteht ein Circulus vitiosus, der den Tod nigrostriataler Zellen zur Folge hat und in vivo durch die Unterbrechung der subthalamonigralen glutamatergen Übertragung verhindert oder zumindest reduziert werden kann.

In der Zusammenschau der angeführten Daten erhärtet sich dieser Verdacht einer wesentlichen Rolle des NST beim toxininduzierten und auch beim „idiopathischen“ nigralen Zelluntergang, wobei die zum Teil vorzufindende Widersprüchlichkeit der wenigen Läsionsexperimente und die in dieser Arbeit geschilderten methodischen Schwierigkeiten die Notwendigkeit der Wiederholung und Optimierung der in der vorliegenden Studie dargestellten Versuche verdeutlichen. Nachdem man in in kleinem Umfang durchgeführten Experimenten eine zuverlässige Läsionstechnik entwickelt hat, sollten Studien mit größeren Fallzahlen durchgeführt werden, wobei erneut auch der Einfluß des Läsionszeitpunktes in bezug auf die Toxinapplikation von Interesse wäre. Des weiteren sollte das Ausmaß der beobachteten Protektion auch mit unterschiedlicher Läsionsstärke des NST untersucht werden. Durch Messung der optischen Dichte in der Cytochromoxidasefärbung steht ein Maß für die neuronale Aktivität zur Verfügung, und so kann eine Korrelation zwischen NST-Aktivität und nigralem Zelluntergang hergestellt werden. Die Untersuchung des Effektes der funktionellen Ausschaltung des NST durch Elektrostimulation sollte sich anschließen.

Würde sich der Verdacht eines beim MP in postulierter Form pathogenetisch ausschlaggebenden NST hierbei erhärten, so sollten sich durchaus klinische Konsequenzen ergeben. Der frühe Einsatz von Glutamatantagonisten hätte ebenso eine rationale Grundlage wie eine frühzeitige Intervention durch neurochirurgische Verfahren wie der Tiefenhirnstimulation, die beide dann neuroprotektiv und krankheitsverlangsamend, wenn nicht gar krankheitsaufhaltend wirken sollten. Wichtig ist hier jeweils die frühzeitige Intervention, da schon beim Auftreten der ersten typischen Symptome ein großer Umfang an nigralen Zellen untergegangen ist und nur die rechtzeitige Unterdrückung der subthalamonigralen Projektionen in obigem Sinne Erfolg haben kann.

Das idiopathische Parkinson-Syndrom zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Der ihm zugrundeliegende progressive Verlust dopaminerger nigrostriataler Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra und das daraus resultierende Dopamindefizit innerhalb des Striatums führt nach der heutigen Kenntnis der Organisation der Basalganglien zu einer enthemmten Aktivität des Nucleus subthalamicus und nachfolgend zur Hyperaktivität inhibitorischer GABAerger Neuronen des medialen Pallidumsegments auf Thalamuskerngebiete. Somit sinkt die exzitatorische Funktion der Thalamuskerngebiete auf die motorischen Kortexareale.

Neuerdings werden exzitatorische glutamaterge Neurone zwischen dem Nucleus subthalamicus und der Substantia nigra postuliert, wobei die neurotoxische Eigenschaft des Glutamats auf unter Umständen metabolisch vorgeschädigte dopaminerge Neurone der Substantia nigra bei der Ätiologie des Morbus Parkinson eine Rolle spielen könnte.

Schon seit einiger Zeit kommt klinisch die prinzipiell reversible funktionelle Ausschaltung des Nucleus subthalamicus oder des medialen Pallidumsegments mittels chronischer Hochfrequenzstimulation bzw. die thermokoagulatorische und somit irreversible Läsion des medialen Pallidumsegments beim fortgeschrittenen Morbus Parkinson zum Einsatz.

Der genaue Wirkmechanismus der oben angeführten Eingriffe ist noch nicht hinreichend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der neuroprotektive Effekt von Kainsäure- und Chinolinsäureläsionen des Nucleus subthalamicus auf dopaminerge Neurone der Pars compacta der Substantia nigra im subakuten 6-Hydroxydopamin- und im 3-Nitropropionsäure-Modell des Morbus Parkinson untersucht.

Intrastriatale Injektionen des Katecholamin-Neurotoxins 6-Hydroxydopamin bzw. des Mitochondriengifts 3-Nitropropionsäure führen über Wochen zur Degeneration Tyrosinhydroxylase-positiver bzw. Fluorogold-markierter dopaminerger Neurone der Pars compacta der Substantia nigra. Sprague-Dawley-Ratten erhielten zusätzlich hierzu unilaterale Läsionen des Nucleus subthalamicus durch Kainsäure oder Chinolinsäure bzw. Injektionen physiologischer oder phosphatgepufferter Kochsalzlösung in den Kontrollgruppen.

Beobachtet wurde der Einfluß der unilateralen Nucleus subthalamicus-Läsionen auf den Umfang der Substantia nigra-Degeneration sowohl bei Läsion vor als auch nach intrastriatler Toxininjektion.

Hierbei konnten die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen nicht gestützt werden, wonach eine Läsion des Nucleus subthalamicus in den verwendeten Modellen neuroprotektive Effekte auf die Neuronenpopulationen der Substantia nigra zeigen soll.

Eine Wiederholung der Experimente nach Optimierung der Methodik der NST-Läsion und Läsionsquantifizierung, ggf. mit verschiedenen Dosierungen von 3-NP und 6-OHDA erscheint daher zwingend notwendig, dies insbesondere auch deshalb, weil sich aus den Ergebnissen der Arbeiten entscheidende klinisch-therapeutische Konsequenzen mit Folgen für die Prognose der Erkrankten ergeben könnten.

1. Agid Y, Ruberg M, Raisman R, Hirsch E, Javoy-Agid F (1990) The biochemistry of Parkinson's disease. In: Stern G (Ed.) Parkinson's disease. Chapman and Hall Medical, London 99-125
2. Albin RL, Young AB, Penney JB (1995) The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 18(2): 63-64
3. Anderson JJ, Chase TN, Engber TM (1992) Differential effect of subthalamic nucleus ablation on dopamine D1 and D2 agonist-induced rotation in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.*, 588: 307-310
4. Aronin N, Chase K, Sagar SM, Sharp FR, DiFiglia M (1991) N-methyl-D-aspartate receptor activation in the neostriatum increases c-fos and fos-related antigens selectively in medium-sized neurons. *Neuroscience.* 44(2): 409-420
5. Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in primates. *Mov Disord*, 6: 288-92
6. Aziz TZ, Peggs D, Argarwal E, Sambrook MA, Crossman AR (1992) Subthalamic nucleotomy alleviates parkinsonism in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-exposed primates. *Br J Neurosurg*, 6: 575-82
7. Barneoud P, Mazadier M, Miquet JM, Parmentier S, Dubedat P, Doble A, Boirea A (1996) Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*, 74(4): 971-983
8. Baunez C, Nieoullon A, Amalric M (1995) In rat model of parkinsonism, lesions of the subthalamic nucleus reverse increases of reaction time but induce a dramatic premature responding deficit. *J. Neurosci.*, 15(10): 6531-6541
9. Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.*, 13(10): 4181-4192
10. Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W (1993) Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci.*, 16(4): 125-131

11. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(4): 1620-1624
12. Benabid AL, Pollak P, Gervason C, Hoffmann D, Gao DM, Hommel M, Pe J (1991) Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet*, 337: 403-406
13. Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur. J. Neurosci.*, 5(4): 382-389
14. Benazzouz A, Piallat B, Ni ZG, Koudsie A, Pollak P, Benabid AL (2000) Implication of the subthalamic nucleus in the pathophysiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell Transplant.*, 9(2): 215-221
15. Blond S, Caparros-Lefebvre D, Parker F (1992) Control of tremor and involuntary movement disorders by chronic stereotactic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *J Neurosurg*, 77: 62-68
16. Bergman H, Wichmann T, De Long MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesion of the subthalamic nucleus. *Science*, 249: 1436-38
17. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20(4): 415-455
18. Blandini F, Garcia-Osuna M, Greenamyre JT (1997) Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 9(7): 1407-1413
19. Blandini F, Nappi G, Greenamyre JT (2001) Subthalamic infusion of an NMDA antagonist prevents basal ganglia metabolic changes and nigral degeneration in a rodent model of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 49(4): 525-529
20. Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT (1996) Glutamate and Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.*, 12(1): 73-94
21. Boireau A, Dubedat P, Bordier F, Peny C, Miquet JM, Durand G, Meunier M, Doble A (1994) Riluzole and experimental parkinsonism: antagonism of MPTP-induced decrease in central dopamine levels in mice. *Neuroreport*, 5(18): 2657-2660

22. Bouras C, Schulz P, Constantinidis J, Tissot R (1986) Differential effects of acute and chronic administration of haloperidol on substance P and enkephalins in diverse rat brain areas. *Biol. Psych.*, 16: 169-174
23. Braak H, Braak E (1990) Die Beteiligung der entorhinalen Region und der isokortikalen Rinde bei der Parkinson-Krankheit. In: Fischer PA (Hrsg.): *Parkinson-Krankheit und Nigraprozeß*. Editiones <Roche>, Basel, 47-53
24. Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schulz C, de Vos RA, Jansen EN (1995) Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 46 (Suppl.): 15-31
25. Bravi D, Mouradian MM, Roberts JW, Davis, TL, Sohn YH, Chase TN (1994) Wearing-off fluctuations in Parkinson's disease: contribution of post-synaptic mechanisms. *Ann. Neurol.*, 36(1): 27-31
26. Brouillet E, Beal MF (1993) NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport*, 4(4): 387-390
27. Brouillet E, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, Srivastava R, Roy DS, Rosen BR, Beal MF (1993) Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.*, 60(1): 356-359
28. Carvalho GA, Nikkhah G (2001) Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. *Exp. Neurol.*, 171(2): 405-417
29. de Carvalho LP, Bochet P, Rossier J (1996) The endogenous agonist quinolinic acid and the non-endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem. Int.*, 28: 445
30. Chergui K, Akaoka H, Charley PJ, Saunier CF, Buda M, Chouvet G (1994) Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurones via NMDA receptors. *Neuroreport*, 5(19): 1185-1188
31. Chesselet MF, Delfs JM (1996) Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci.*, 19(10): 417-422
32. Cox JA, Lysko PG, Henneberry RC (1989) Excitatory amino acid neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured neurons: role of the voltage-dependent magnesium block. *Brain Res.*, 499(2): 267-272
33. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(14): 6368-6371

34. Ehringer H, O Hornykiewicz (1960) Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wochenschrift*, 38: 1236-1239
35. Errea JM, Ara JR (1999) Depression and Parkinson´s disease. *Rev. Neurol.*, 28(7): 694-698
36. Evers S, Obladen M (1994) Epidemiology and therapie of Parkinson´s disease in inpatient nursing homes. *Z. Gerontol.*, 27(4): 270-275
37. Feger J, Hassani OK, Mouroux M (1997) The subthalamic nucleus and its connections. New electrophysiological and pharmacological data. *Adv. Neurol.*, 74: 31-43
38. Garrett E, Crutcher A, Crutcher M (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.*, 13(7): 266-271
39. Gasser T (1996) Spielen genetische Faktoren in der Entstehung des idiopathischen Parkinson-Syndroms eine Rolle? *Psycho*. 22: 48-53
40. Goedert M (2001) Parkinson´s disease and other alpha-synucleinopathies. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39(4): 308-312
41. Goetz CG, Stebbins GT, Klawans HL, Koller WC, Grossman RG (1991) United Parkinson Foundation neurotransplantation registry on adrenal medullary transplants: presurgical and 1-year and 2-year follow-up. *Neurology*, 41(11): 1719-1722
42. Good PF, Hsu A, Werner P, Pearl DP, Olanow CW (1998) Protein nitration an Parkinson´s disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57(4): 338-342
43. Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE (1999) Mitochondrial dysfunction in Parkinson´s disease. *Biochem. Soc. Symp.*, 66: 85-97
44. Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59(5): 1609-1623
45. Hammond C, Deniau JM, Rizk A, Feger J (1978) Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. *Brain Res.*, 151(2): 235-244
46. Hassani OK, Francois C, Yelnik J, Feger J (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res.*, 749(1): 88-94
47. Hattori N, Tanka M, Ozawa T, Mizuno Y (1991) Immunohistological studies on complexes I, II, III and IV of mitochondria in Parkinson´s disease. *Ann. Neurol.*, 30: 563-571

48. Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Naunert M, Gauger L, Kordower JH, Olanow CW (1999) Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Arch. Neurol.*, 56(2): 179-187
49. Hawkes CH (1997) Is Parkinson's disease inherited? *Br. J. Hosp. Med.*, 57(4): 130-133
50. Heikkila R, Cohen G (1971) Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science*, 172: 1257-1258
51. Heikkila RE, Cohen G (1973) 6-hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidant intermediate. *Science*, 181: 456-457
52. Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17(5): 427-442
53. Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17: 31-108
54. Hong JS, Yoshikawa K, Kanamatsu T, Sabol SL (1985) Modulation of striatal enkephalinergic neurons by antipsychotic drugs. *Fed. Proc.*, 44: 2535-2540
55. Hornykiewicz O (1982) Neurotransmitter changes in Parkinson's disease. In: Marsden CD, Fahn S (Hrsg.) *Movement Disorders 2.*, Butterworths, London, 41-58
56. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. A clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 55: 181-184
57. Iacorno RP, Shima F, Lonser R, Kuniyoshi S, Maeda G, Yamoda S (1995) The results, indications and physiology of posteroventral pallidotomy for patients with Parkinson's disease. *Neurosurgery*, 36(6): 1118-1125; discussion 1125-1127
58. Ikebe S, Tanaka M, Ozawa T (1995) Point mutations of mitochondrial genome in Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 28(2): 281-295
59. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem. Biophys.*, 298(2): 431-437
60. Jacob H (1978) Neuropathologie des Parkinson-Syndroms und die Seneszenz des Gehirns. In: Fischer PA (Hrsg.): *Langzeitbehandlung des Parkinson-Syndroms*. Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, 5-25
61. Jenner P (2001) Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.*, 24(5): 245-246

62. Jenner P, Schapira AH, Marsden CD (1992) New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology*, 42(12): 2241-2250
63. Jones-Humble SA, Morgan PF, Cooper BR (1994) The novel anticonvulsant lamotrigine prevents dopamine depletion in C57 black mice in the MPTP animal model of Parkinson's disease. *Life Sci.*, 54(4): 245-252
64. Kawamata H, McLean PJ, Sharma N, Hyman BT (2001) Interaction of alpha-synuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. *J. Neurochem.*, 77(3): 929-934
65. Klockgether T, Turski L (1993) Towards an understanding of the role of glutamate in experimental parkinsonism: agonist-sensitive sites in the basal ganglia. *Ann. Neurol.*, 34(4): 585-593
66. Kuhn W, Müller T (1998) *Morbus Parkinson: medikamentöse Therapie, diagnostische und klinische Grundlagen*. Thieme, Stuttgart, New York
67. Krack P, Limousin P, Benabid AL, Pollak P (1997) Chronic stimulation of the subthalamic nucleus improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Lancet*, 350: 1676
68. Lange KW, Rausch ND, Gsell W, Naumann M, Oestreicher E, Riederer P (1994) Neuroprotection by dopamine agonists. *J. Neural. Transm.*, 43 (Supl.): 183-201
69. Levy R, Hazrati LN, Herrero MT, Vila M, Hassani OK, Mouroux M, Ruberg M, Aseni H, Agid X, Feger J, Obeso JA, Parent A, Hirsch EC (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neurosci.*, 76(2): 335-343
70. Lewy FH (1912) Paralysis agitans I. Pathologische Anatomie. In: Lewandrowsky M (Hrsg.) *Handbuch der Neurologie*. Springer. Berlin. 920-933
71. Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas J, Broussolle E, Perret J, Benabid A (1995) Effekt on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet*, 345: 91-95
72. Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *New E J Med*, 339: 1105-11
73. Löffler G, Petrides PE (1997) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 496 ff.
74. Lucking CB, Brice A (2000) Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57(13-14): 1894-1908

75. Ludolph AC, Seelig M, Ludolph AG, Sabri MI, Spencer PS (1992) ATP deficits and neuronal degeneration induced by 3-nitro-propionic acid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 648: 300-302
76. MacDonald MC, Pollack P, Benazzouz A (1995) Effects on parkinsonian sign and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet*, 345: 91-95
77. Marsden CD (1990) Neurophysiology. In: Stern G (Hrsg.) *Parkinson's disease*. Chapman and Hall Medical, London, 57-98
78. Marshall JF, O'Dell SJ, Weihmuller FB (1993) Dopamine-glutamate interactions in methamphetamine-induced neurotoxicity. *J. Neural Transm. (Gen. Sect.)*, 91: 241-254
79. Marttila RJ (1992) Epidemiology. In: Koller WC (Ed.): *Handbook of Parkinson's disease*. 2nd Edition. Marcel Dekker Incl., New York, Basel, Hong-Kong, 35-57
80. Miller WC, DeLong MR (1987) The basal ganglia II. In: Carpenter MB, Jajaman A (Eds.): *Plenum Press*, New York, 415-427
81. Nakao N, Nakai E, Nakai K, Itakura T (1999) Ablation of the subthalamic nucleus supports the survival of nigral dopaminergic neurons after nigrostriatal lesions induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *Ann. Neurol.*, 45: 640-651
82. Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knopfel T (1996) Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci.*, 19(7): 267-271
83. Nitter K (1978) Die Auswirkungen stereotaktischer Eingriffe beim Auftreten von Hyperkinesen unter L-Dopa-Behandlung. In: Fischer PA (Hrsg.): *Langzeitbehandlung des Parkinson-Syndroms*. Schattauer, Stuttgart, New York, 189-193
84. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.*, 451: 205-212
85. Obeso JA, Guridi J, DeLong M (1997) Surgery for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 62: 2-8
86. O'Dell SJ, Weihmuller FB, Marshall JF (1992) MK-801 prevents methamphetamine-induced striatal dopamine damage and reduces extracellular dopamine overflow. In: *Neurotoxins and Neurodegenerative Disease*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 648: 317-319

87. Oertel WH (1999) Kommentar. In: Oertel WH (Hrsg.) Pharmakotherapie der Parkinson-Krankheit, Editiones <Roche>, Basel, Grenzach-Wyhlen, 3-4
88. Oertel WH, Kupsch A (1993) Pathogenesis and animal studies of Parkinson's disease. *Current Opinion Neurolog. Neurosurg.* 6(3): 323-332
89. Oertel WH, Quinn N (1996) Parkinsonism. In: Brandt T, Diener HC, Caplan LR, Kennard C, Dichgans J (Hrsg.), *Neurological disorders: course and treatment: Chapter 64.* Academic Press, San Diego, California, 715-772
90. Olanow CW (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 16(11): 439-444
91. Olanow CW, Kordower JH, Freeman TB (1996) Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci.*, 19(3): 102-109
92. Ong WY, He Y, Garey LJ (1997) Localisation of glutamate receptors in the substantia nigra pars compacta of the monkey. *J. Hirnforsch.*, 38(3): 291-298
93. Parent A, Hazrati L (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of the subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 20(1): 128-154
94. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormality of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 26(6): 719-723
95. Parkinson J (1817) *An essay on the shaking palsy.* Sherwood, Neely and Jones, London.
96. Paxinos G, Watson C (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York
97. Perret JE, Benabid AL (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet*, 345: 91-95
98. Piallat B, Benazzouz A, Benabid AL (1996) Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: Behavioral and immunohistochemical studies. *Eur. J. Neurosci.*, 8: 1408-1414
99. Piallat B, Benazzouz A, Benabid AL (1999) Neuroprotective effect of chronic inactivation of the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.*, 55: 71-77
100. Poewe W, Ceballos-Baum AO, Conrad B (1996) Parkinson-Krankheit. In: Conrad B, Ceballos-Baum AO. (Hrsg.) *Bewegungsstörungen in der Neurologie.* Georg Thieme Verlag. 30-67
101. Poewe W, Gerstenbrand F, Ransmeyer G (1983) Klinische Manifestationstypen des Parkinson-Syndroms. *Neuropsychiatr. Clin.* 2: 223-227

102. Poewe WH, Lees AJ, Stern GM (1986) Low-dose L-dopa therapy in Parkinson's disease: a 6-year follow-up study. *Neurology*, 36(11): 1528-1530
103. Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J (1993) Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Rev. Neurol.*, 149(3): 175-176
104. Pollak P, Benabid AL, Gervason C, Hoffman D, Seigneuret E, Perret J (1993) Long term effects of chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus in different types of tremor. *Adv Neurol*, 60: 408-13
105. Rajput AH (1984) Epidemiology of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.*, 11(Suppl.1): 156-159
106. Rajput AH (1992) Frequency and cause of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.*, 19(Suppl.1): 103-107
107. Rajput AH, Offord KP, Beard CM, Kurland LT (1984) Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. *Ann. Neurol.*, 16(3): 278-282
108. Riederer P, Sofic E, Rausch WD (1989) Pathobiochemistry of the extrapyramidal system: a "short note" review. In: Przuntek H, Riederer P (Eds.): *Early Diagnosis and Preventive Therapie in Parkinson's Disease*. Springer, Wien, New York, 139-149
109. Riepe M, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO, Spencer PS, Allen CN (1992) Inhibition of energy metabolism by 3-nitropropionic acid activates ATP-sensitive potassium channels. *Brain Res.*, 586(1): 61 ff.
110. Romeis B (1989) Nervengewebe. In: Romeis B, Böck P (Hrsg.): *Mikroskopische Technik*. Urban u. Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 575-576
111. Rosales MG, Flores G, Hernandez S, Montinez-Fong D, Aceves J (1994) Activation of subthalamic neurons produces NMDA receptor-mediated dendritic dopamine release in substantia nigra pars reticulata: a microdialysis study in the rat. *Brain Res.*, 645(1-2): 335-337
112. Saji M, Blau AD, Volpe BT (1996) Prevention of transneuronal degeneration of neurons in the substantia nigra reticulata by ablation of the subthalamic nucleus. *Exp. Neurol.*, 141(1): 120-129
113. Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-Hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neurosci.* 59: 401-415

114. Scarnati E, Florio T (1997) The pedunclopontine nucleus and related structures. Functional organisation. *Adv. Neurol.*, 74: 97-110
115. Schapira AHV (1994) Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease – a critical appraisal. *Mov. Disorders*, 9(2): 125-138
116. Schneider E (1997) Diagnostik und Therapie des Morbus Parkinson. De Gruyter, Berlin, New York
117. Schneider E, Baas H, Jacobi P (1985) Suizidalität beim Parkinson-Syndrom. In: Schnaberth G, Auff E (Hrsg.): *Das Parkinson-Syndrom*. Wissenschaftl. Dienst <Roche>, Wien, 113-117
118. Schwarcz R, Whetsell WO JR, Mangano RM (1983) Quinolinic acid: An endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 219: 316
119. Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G, Schneider E (1996) Possible environmental, occupational and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*, 46(5): 1275-1284
120. Siegfried J, Lippitz B (1994) Chronic electrical stimulation of the VL-VPL complex and of the pallidum in the treatment of movement disorders. Personal experience since 1982. *Stereotact. Funct. Neurosurg.*, 62: 71-75
121. Simpson JR, Isacson O (1993) Mitochondrial impairment reduces the threshold for in vivo NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Exp. Neurol.*, 121: 57
122. Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD (1998) Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids*, 14(1-3): 69-74
123. Sonsalla PK, Nicklas WJ, Heikkila RE (1989) Role for excitatory amino acids in methamphetamine induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science*, 243: 398-400
124. Sonsalla PK, Riordan DE, Heikkila RE (1991) Competitive and non-competitive antagonists at NMDA receptors protect against metamphetamine-induced dopaminergic damage in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256: 506-512
125. Starr MS (1995) Antiparkinsonian actions of glutamate antagonists – alone and with L-DOPA: a review of evidence and suggestions for possible mechanisms. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.*, 10(2-3): 141-185
126. Stein MB, Heuser IJ, Juncos JL, Uhde TW (1990) Anxiety disorders in patients with Parkinson's disease. *Am. J. Psychiatry*. 147: 217-220

127. Stone TW, Burton NR (1988) NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS. *Progr. Neurobiol.*, 30: 333 ff.
128. Stone TW, Perkins MN (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in the rat CNS. *Eur. J. Pharmacol.*, 72: 411
129. Talairach J, Paillas JE, David M (1950) Dyskinésie de type hémiballique traitée par cortecotomie frontale limitée, puis par coagulation de l'anse lenticulaire et de la portion interne du globus pallidus : amélioration importante depuis un an. *Rev Neurol (Paris)*, 83 : 440-51
130. Trenkwalder C, Schwarz J, Gebhard J, Ruland D, Trenkwalder P, Hense HW, Oertel WH (1995) Starnberg trial on epidemiology of Parkinsonism and hypertension in the elderly. Prevalence of Parkinson's disease and related disorders assessed by a door-to-door survey of inhabitants older than 65 years. *Arch. Neurol.*, 52(10): 1017-1022
131. Trojanowski JQ, Lee VM (2001) Parkinson's disease and related neurodegenerative synucleinopathies linked to progressive accumulations of synuclein aggregates in brain. *7(3): 247-251*
132. Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Loschmann PA, Wachtel H (1991) Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature*. 352(6336): 573
133. Vieregge P, Kleinherz J, Fassel H, Jorg J, Kompf D (1991) Epidemiology and out-patient care in Parkinson's disease – results from a pilot-study in northern Germany (Schleswig-Holstein). *J. Neural Transm. Suppl.*, 33: 115-118
134. Vila M, Levy R, Herrero MT, Faucheux B, Obeso JA, Agid Y, Hirsch EC (1996) Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry. *Neurosci.*, 71: 903-912
135. Wang SJ, Fuh JL, Teng EL, Liu CY, Lin KP, Chen HM, Lin CH, Wang PN, Ting, YC, Wang HC, Lin KN, Chou P, Larson EB, Liu HC (1996) A door-to-door survey of Parkinson's disease in a Chinese population in Kinmen. *Arch. Neurol.* 53: 66-71
136. Wang Y (1991) The incidence and prevalence of Parkinson's disease in the People's Republic of China. *Chung Hua Liu Hsing Ping Hsueh Tsa Chih*, 12(6): 363-365
137. Watkins JC (1978) Excitatory amino acids. In: McGeer, Olney, McGeer (Eds.): *Kainic acid as a tool in Neurobiology.*, Raven Press, New York, 37
138. Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21: 165

139. Whitehouse PJ (1986) Clinical and neurochemical consequences of neuronal loss in the nucleus basalis of Meynert in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Adv. Neurol.*, 45: 393-397
140. Wichmann T, Bergman H, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. III. Changes in motor behavior and neuronal activity in the internal pallidum induced by subthalamic inactivation in the MPTP model of parkinsonism. *J. Neurophysiol.*, 72(2): 521-530
141. Wong-Riley MMT (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.*, 171: 11-28
142. Wong-Riley MMT (1989) Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.*, 12: 94-101
143. Youdim MB, Ben-Shachar D, Eshel G, Finberg JP, Riederer P (1993) The neurotoxicity of iron and nitric oxide. Relevance to the ethiology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.*, 60: 259-266
144. Young WS, Bonner TI, Brann MR (1986) Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 9827-9831
145. Zeevalk GD, Derr-Yellin E, Nicklas WJ (1995) NMDA receptor involvement in toxicity to dopamine neurons in vitro caused by the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.*, 64(1): 455-458
146. Zeevalk GD, Derr-Yellin E, Nicklas WJ (1995) Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275(3): 1124-1130
147. Zeevalk GD, Manzano L, Sonsalla PK (2000) NMDA receptors modulate dopamine loss due to energy impairment in the substantia nigra but not striatum. *Exp. Neurol.*, 161(2): 638-646
148. Zeevalk GD, Nicklas WJ (1991) Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257(2): 870-878
149. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1994) Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, 263(5147): 687-689
150. Zhang ZX, Roman GC (1993) Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology*, 12(4): 195-208

151. Zuddas A, Oberto G, Vaglini F, Fascetti F, Fornai F, Corsini GU (1992) MK-801 prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in primates. *J. Neurochem.*, 59(2): 733-739

3-NP	3-Nitropropionsäure
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AK	Antikörper
AP	anterio-posterior
CO	Cytochromoxydase
DA	Dopamin
DAB	3,3´-Diaminobenzidin
DOPAC	Dihydroxyphenylelessigsäure
FG	Fluorogold
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure (gammaaminobutyric acid)
GPi	internes Pallidumsegment (Globus Pallidus pars interna)
HVA	Homovanillinsäure
KA	Kainsäure (Kainic acid)
KV	Kresylviolett
ML	medio-lateral
MP	Morbus Parkinson
MPTP	N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NST	Nucleus subthalamicus
PB	Phosphatpuffer (Phosphate buffer)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PD	Morbus Parkinson (Parkinson´s disease)
PS	Parkinson-Syndrom
QA	Chinolinsäure (Quinolinic acid)
SAC	Tötung der Tiere (Sacrifice)
SF	Standardfehler
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
StA	Standardabweichung des Mittelwertes
STN	Nucleus subthalamicus (Subthalamic nucleus)
TH	Tyrosinhydroxylase
VD	ventro-dorsal

- Abb. 1: National Library of Medicine, History of
Medicine Division, USA
- Abb. 2: Arnold G et al. (1998) Die Parkinson´sche
Krankheit, Ein Wegbegleiter, Pharmacia &
Upjohn GmbH, IDM, Michelstadt
- Abb. 5,6,7: PhotoDisc Europe Ltd., Twickenham, UK
- Abb. „Hirnoberfläche“: Tony Stone Bilderwelten, München

Alle übrigen Abbildungen, Grafiken und Tabellen sind selbst erstellt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. H. Oertel für die freundliche Annahme als Doktorand, meinen Betreuern, Herrn Dr. Jürgen Sautter und Herrn Dr. Christopher Earl für die herzliche und intensive Begleitung meiner Dissertation, sowie Herrn Alvarez-Fischer, Assistent am medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde der Universität Marburg für seine kritischen Anmerkungen, den medizinisch-technischen Assistentinnen Dorothee Köhler und Sabine Anfimov für die schöne Zeit im Labor und schließlich der Chefsekretärin Frau Hauer für Ihre freundliche Unterstützung.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. G. W. Himmelmann vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg für die statistische Beratung.

VERZEICHNIS

der akademischen Lehrer

10

Meine akademischen Lehrer waren Herr Professor Dr. W. H. Oertel, Herr Dr. C. Earl, sowie Dr. J. Sautter in **Marburg**.

Darüber hinaus an der **Philipps-Universität Marburg** die Damen und Herren Professoren und Dozenten Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Berthold, Bien, Brilla, Christiansen, Czubayko, Daut, Dodl, Elsässer, Feddersen, Feuser, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Goeke, Görg, Gotzen, Grau, Gressner, Grimm, Griss, Grzeschik, Habermehl, Happle, Hasilik, Havemann, Heidenreich, Hellwig, Herzum, Hesse, Heubel, Heufelder, Hilgermann, Hoffmann, Höltermann, Joseph, Junge, Kaffarnick, Kälble, Kern, Kim-Berger, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Külkens, Kummer, Lammel, Lange, Lauer, Lemke, Lennartz, Leonhardt, Leppek, Lippert, Lorenz, Maisch, Mannerz, Mannheim, Martin, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Niessing, Peter, Pfab, Radsak, Ramaswamy, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schindler, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schüffel, Schulz, Seitz, Seyberth, Siegel, Slenzka, Sernal, Steiniger, Sturm, v. Wichert, Vohland, Voigt, Wagner, Weide, Weihe, Werner, Westermann, Zwioerek, sowie an der **Ludwig-Maximilians-Universität München** die Herren Professoren und Chefarzte Ketterl, Klein, Kohl, Kreuzmayr, Moshage und Pfeiffer.