

Klinik für Neurologie der
Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung von Neuroprotektion des nigro-striatalen Dopaminsystems nach unmittelbar vs.
verzögert initiiertes chronischer tiefer Hirnstimulation des Nucleus subthalamicus im
6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Charité-

Universitätsmedizin Berlin

von

Regina Rita Schweibold
aus Schweinfurt

Datum der Promotion: 11.12.2015

Meinen Eltern
und Geschwistern

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
a-Syn	alpha-Synuclein
Abb.	Abbildung
DBS	Deep Brain Stimulation
GABA	Gammaaminobuttersäure
GPe	Globus pallidus externus
GPI	Globus pallidus internus
HFS	High Frequency Stimulation (Hochfrequenzstimulation)
H&E	Hämatoxyllin und Eosin (histologische Routinefärbung)
i.p.	iIntraperitoneal
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
KG	Körpergewicht
L-DOPA	Levodopa
MAO-B	Monoaminoxidase B
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie

MT	Neucleus terminalis Tractus optici accessorii
PET	Positronenemissionstomographie
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
STN	Nucleus subthalamicus
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosinhydroxylase

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
Abstrakt	8
1. Einleitung	12
1.1. Morbus Parkinson oder Idiopathisches Parkinson-Syndrom	12
1.1.1 Historischer Hintergrund und moderne Definition	12
1.1.2 Post-mortem Zyto- / Histopathologie und in-vivo Diagnostik.....	13
1.1.3 Ätiologie und Mechanismen der Neurodegeneration.....	14
1.2. Pathophysiologie und Therapieansätze des Idiopathischen Parkinson- Syndroms.....	17
1.2.2 Therapieansätze des Idiopathischen Parkinsonsyndroms	20
1.2.3 Tiefe Hirnstimulation	22
1.3. Eigene Zielsetzung	28
2. Material und Methoden	30
2.1. Versuchstiere	30
2.2. Haltungsbedingungen.....	30
2.3. Substanzen und Pufferlösungen	31
2.3.1 Verwendete Substanzen	31
2.3.2 Fixier- und Pufferlösungen.....	32
2.4. Experimentelles Design.....	32
2.5. Das 6-OHDA-Parkinsonmodell der Ratte.....	33
2.6. Amphetamininduzierte Rotation	35
2.7. 6-OHDA-Läsion und Implantation des Mikrostimulationssystems	36
2.7.1 6-OHDA-Läsion.....	37
2.8. Gehirngewinnung.....	39
2.9. Histologische Aufarbeitung.....	40
2.9.1 Orientierungsschnitte und Einschlusskriterien.....	40
2.9.2 Histologie / Immunzytochemie	40
2.9.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der Tyrosinhydroxylase	40
2.9.2.2 Stereologische Auswertung der nigralen Serien	41
2.9.3 Tyrosinhydroxylase-Densitometrie des posterolateralen Striatums.....	43
2.10. Statistische Auswertung	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Einschlusskriterien	45
3.2 Amphetamininduziertes Rotationsverhalten	45

3.3.1 Stereologisch basierte Zellzählung Tyrosinhydroxylase-immunreaktiver Neurone der SNc	48
a) Analyse der Überlebensrate anhand des phänotypischen Markers TH aller Gruppen.....	48
b) Vergleich der totalen Anzahl TH-immunreaktiver Zellen aller Gruppen.....	50
3.4. Tyrosinhydroxylase-Densitometrie des dorsolateralen Striatum	52
4. Diskussion	54
4. 1. Amphetamininduzierte Rotation	54
4.2. Verhaltenseffekte nach tiefer Hirnstimulation	55
4.3. Effekte der implantierten Elektrode im umgebenden Gewebe	56
4.4. Nigrale Neuroprotektion und Neuromodulation	56
4.5. TH-Immunreaktivität	59
Literaturverzeichnis	62
Lebenslauf	72
Eidesstattliche Versicherung	73
Danksagung	74

Abstrakt

Einleitung

Das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) oder M. Parkinson ist eine durch den Untergang dopaminergener Neurone der Substantia nigra bedingte progrediente Bewegungsstörung. Goldstandard in der Therapie stellt die Dopamin-Substitution mittels L-DOPA dar. Die tiefe Hirnstimulation oder Deep Brain Stimulation (DBS) ist eine etablierte Therapieoption für Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium. In der hier vorgestellten Studie wurden mögliche neuroprotektive Effekte der DBS auf die dopaminergen Neurone der SNc untersucht. In Vorgängerstudien, wurden mittels neurochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen Hinweise auf nigrale Neuroprotektion detektiert.

Methoden

Die Versuche wurden an 34 männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Das substanzinduzierte Rotationsverhalten nach unilateraler 6-OHDA-Injektion (Ungerstedt-Modell) wurde angewendet. Die Tiere wurden in eine Kontroll-, DBS- und Early-Stim-Gruppe- entsprechend der Initiation und Dauer der Stimulation unterteilt. Mittels immunhistochemischer Färbungen und stereologischer Auswertungen wurden Tyrosinhydroxylase – immunreaktive Neurone der SNc quantifiziert. Die Tyrosinhydroxylase fungiert als Surrogatmarker für das Überleben von dopaminergen SNc-Neuronen.

Ergebnisse

Die Analyse der Rotationsdaten erbrachte keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die Quantifizierung der TH-immunreaktiven Neurone der lädierten und nicht-lädierten Seite der SNc zeigte in den Stimulationsgruppen eine statistisch signifikant höheren prozentualen Anteil dopaminergener Neurone verglichen mit der Kontrollgruppe. Der Vergleich der absoluten Zellzahlen der Gruppen zeigt eine signifikant erhöhte Präservation des dopaminergen Phänotyps auf den

lädierten Seiten der im Intervall STN-stimulierten und der frühzeitig STN-stimulierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem stellten wir auch auf den nicht-lädierten Seiten beider Stimulationsgruppen eine signifikant erhöhte Zellzahl TH-positiver Neurone. Die densitometrische Analyse der TH-positiven Fasern im dorsolateralen Striatum erbrachte den Nachweis einer signifikant erhöhten TH Fiber Density in der Gruppe Early-Stim-Gruppe im Vergleich zu STN naiven Kontrollen und den im Intervall STN-stimulierten (STN-DBS) Tieren.

Diskussion

Die vorgestellte Studie zielte darauf ab, mögliche neuroprotektive Auswirkungen zweier unterschiedlicher Paradigmen der STN-DBS in der SNc anhand des Surrogatmarkers Tyrosinhydroxylase und der striatalen Densitometrie nachzuweisen. Die Auswertung der erhobenen Ergebnisse lässt drei Kernaussagen zu:

1. Unabhängig vom DBS-Paradigma (Early-Stim. vs. STN-DBS) hat die STN-DBS einen neuroprotektiven Effekt auf den nigralen dopaminergen Phänotyp.
2. Eine erhöhte Präservierung TH-immunreaktiver Axonterminalen im Striatum nach Early-Stim-DBS.
3. In den Verhaltenstest ließ sich keine funktionelle Korrelation mit den o.g. Ergebnissen nachweisen.

In dieser Arbeit wurde somit der Nachweis eines neuroprotektiven Effektes der STN-DBS durch die Quantifizierung TH-positiver SNc-Neurone und mittels Densitometrie des Striatums erbracht werden. Auf Verhaltensebene zeigte sich kein Effekt.

Derzeit wird eine zusätzliche immunhistochemische Färbung zur Kollokalisierung von TH und NeuN ausgewertet. Hier soll der spezifische Nachweis der neuronalen Vitalität zusätzlich zur dopaminergen Präservierung nach DBS erfolgen. Künftige Studien sollten geeignete Stimulationsparadigmen untersuchen. Zudem sollte die Etablierung neuer Tiermodelle des IPS im Fokus künftiger Studien stehen.

Abstract

Object

The idiopathic Parkinson-Syndrome or Parkinson's Disease is a movement disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra pars compacta. Dopamine substitution via L-DOPA represents the Goldstandard in Therapy. DBS has been well established as a therapy option for patients with an advance state of disease. In this study, we investigated neuroprotective effects of DBS on nigral dopaminergic neurons. Indications of neuroprotective effects, assessed via neurochemical and immune-histochemical analysis could be detected in previous studies.

Methods

Animal tests have been performed on 34 Wistar-rats. Behavioural testing has been assessed via substance-induced rotation behavior after unilateral 6-OHDA-injection (Ungerstedt-model). Animals have been separated in control-, DBS- and Early-Stim-group according to initiation of stimulation. TH-immunoreactive Neurons have been quantified via immune-histochemical staining and stereological analysis. Tyrosinhydroxylase is an established marker for survival of dopaminergic SNc-neurons.

Results

In the analysis of rotation data, we saw no difference between the groups. Quantification of TH-immunoreactive neurons of the lesioned and non-lesioned nigral side revealed a significant higher percental amount of dopaminergic neurons compared to control. Comparison of absolute cell numbers of groups showed a significant higher preservation of the dopaminergic phenotype on the lesioned side of delayed-onset-stimulation and the early stimulated group. Moreover, we detected a significant higher number of TH-positive neurons on the non-lesioned side. Striatal densitometry showed a significant higher TH-fiber-density in the early-stim-group compared to control and late-onset-group.

Discussion

The present study focused on the evidence of neuroprotective effects of DBS in two different

stimulation-paradigms. Therefore, we quantified Tyrosinhydroxylase in nigral cells as a marker for dopamine-metabolism and striatal densitometry. The results can be summarized in three central statements:

1. There is a neuroprotective effect of STN-DBS on the dopaminergic phenotype irrespectively of the stimulation-paradigm.
2. A higher preservation TH-immunoreactive axon-terminals in the striatum after early-onset-stimulation.
3. In behavioural testing we found no evidence of correlation with these results.

In the present study we provide proof of neuroprotective effects of STN-DBS via quantification of TH-positive nigral neurons and striatal densitometry. Behavioural testing revealed no effect of stimulation. At present, we analyse colocalisation of TH and NeuN via immune-histochemical stainings to detect neuronal vitality additional to dopaminergic preservation after DBS. In further studies, stimulation paradigms should be investigated. Furthermore, studies should focus on new animal models of Parkinsonism.

1. Einleitung

1.1. Morbus Parkinson oder Idiopathisches Parkinson-Syndrom

1.1.1 Historischer Hintergrund und moderne Definition

In seinem 1817 veröffentlichten „Essay on the Shaking Palsy“ beschrieb der englische Arzt und Naturforscher Sir James L. Parkinson sechs Patienten (von denen er einen sogar selbst betreut hatte), mit einer Symptomkonstellation bestehend aus Rigor, Tremor und Akinese, die später als die typische Trias von Kardinalsymptomen der nach ihm benannten Erkrankung definiert werden sollten. Der Begriff Schüttellähmung („shaking palsy“) wurde von James Parkinson für die syndromatische Beschreibung von koinzidentem Ruhezitern (Tremor) und Minderbeweglichkeit (Akinese) verwendet und erst durch den berühmten Pathologen und Neurologen der Pariser Salpêtrière J.-M. Charcot im 19. Jahrhundert zugunsten der motorischen Kardinalsymptome Rigor, Tremor, Akinese und posturale Instabilität re-evaluiert [1]. Seither wurde das Krankheitsbild als Morbus Parkinson bezeichnet, und es In dieser Zeit entstanden zahlreiche detaillierte Beschreibungen über motorische und nicht motorische Symptome der Erkrankung. Erst ca. 100 Jahre später erfolgte der Versuch einer zellpathologischen Definition des M. Parkinson durch F.H. Lewy, der 1912 die nach ihm benannten „Lewy-Bodies“ entdeckt hatte. Hier handelt es sich um zytoplasmatische Einschlusskörperchen mit einem in der H&E-Färbung eosinophilen Kern, die Ubiquitin, alpha-Synuclein und andere Proteine enthalten. Sie gelten in der neuropathologischen Diagnostik als nicht nur als pathognomonisch, sondern definieren eines der histopathologischen Kernmerkmale. Das zweite derartige Hauptmerkmal, nämlich die Degeneration nigrostriataler dopaminergischer Projektionsneurone der Substantia nigra, wurde 1919 erstmalig von Tretiakow beschrieben. Korrelierend dazu entdeckten Ehringer und Hornykiewicz 1960 den striatalen Dopaminmangel im Gehirn von Parkinson-Patienten [2] und schufen damit die Grundlage der modernen Dopaminersatz-therapie mit L-DOPA und der Entwicklung weiterer Medikamente zur symptomatischen Therapie.

Klinisch wird M. Parkinson oder synonym das Idiopathische Parkinsonsyndrom durch die o. g.

motorischen Kardinalsymptome Akinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität) definiert. Darüber hinaus lassen sich eine Reihe von nicht-motorischen Symptomen, wie progrediente kognitive Einschränkungen (bis hin zur Demenz), dysregulatorische Störungen des autonomen Nervensystems (z.B. Orthostase, Obstipation), Riechstörungen (Hyposmie), Störungen des Wach-Schlaf-Rhythmus und psychiatrische Symptome wie Depression, Anhedonie, Apathie aber auch Impulskontrollstörungen [3,4] heraus untersuchen; Epidemiologisch betrachtet handelt es sich beim M. Parkinson um die häufigste Basalganglienerkrankung und die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem M. Alzheimer. Es wird eine Inzidenz von 100-200/100000 (0,1-0,2%) angenommen. Die Prävalenzraten können je Region und Altersgruppe variieren. In Deutschland liegen sie in der Gruppe der 70- bis 74- jährigen Jahren bei 700/100000 und in der Gruppe der 75- bis 79-jährigen bei 1800/100000 Einwohnern [5]. Wenngleich ein höheres Lebensalter als einziger konstanter „Risikofaktor“ des sporadischen IPS ausgemacht werden kann (ca. 1-2% der über 65-jährigen ist an M. Parkinson erkrankt [6]), beginnt bei ca. 4% der Patienten beginnt die Erkrankung vor dem 51. Lebensjahr.

1.1.2 Post-mortem Zyto- / Histopathologie und in-vivo Diagnostik

Neben der klinischen Entität ist das IPS oder der M. Parkinson eine pathologisch definierte Erkrankung mit den Leitbefunden 1.) Degeneration von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta (SNc) im Mittelhirn und 2.) Akkumulation von alpha-synuclein-haltigen Einschlüssen in Form von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten. Die SNc ist eine durch Neuromelanin- und Eisenablagerungen hervorgerufene makroskopisch schwarz (lat. nigra) gefärbte Mittelhirnstruktur, in der die nigro-striatalen dopaminergen Projektionsneurone lokalisiert sind, und die im Rahmen der Neurodegeneration zunehmend depigmentiert wird, was im pathologischen Schnittbild eindrucksvoll zur Geltung kommt. Im Rahmen der Krankheitsprogression sind aber auch andere Hirnareale abseits der dopaminergen Neurone in den Neurodegenerationsprozess involviert, was teilweise mit den nicht-motorischen Symptomen der Erkrankung in Übereinstimmung gebracht wird. Auch in diesen Hirnregionen (dazu zählen u.a. der Locus coeruleus, der Raphe-Kernkomplex, der Nucleus basalis Meynert, der Bulbus olfactorius und der dorsale Vagus-Kern) sowie zusätzlich im peripheren (vornehmlich autonomen) Nervensystem (z.B. Darmwandnervensystem, periphere

sympathische Ganglien) finden sich alpha-synuclein-haltige pathologische Einschlusskörperchen. Streng genommen kann der M. Parkinson somit als eine degenerative Multisystemerkrankung des zentralen und peripheren Nervensystems aufgefasst werden, bei dem neben dem Dopaminsystem andere Neurotransmittersysteme affektiert werden (z.B. Noradrenalin, Serotonin und Acetylcholin) [7].

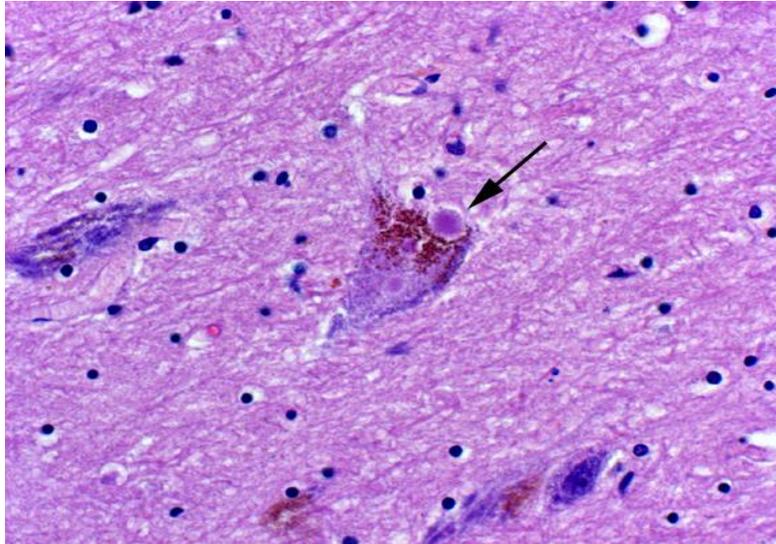
Wenngleich die Diagnosestellung des IPS klinisch erfolgt, können apparativ-diagnostische Verfahren nützliche Zusatzinformationen liefern, insbesondere in der Abgrenzung zu anderweitigen symptomatischen oder degenerativen Parkinson-syndromen. Dabei kommt der strukturellen cerebralen Bildgebung eine große Bedeutung zu, da mittels leistungsstarker MRT-Geräte in der bildgebenden Diagnostik können Basalganglienstrukturen zunehmend genauer dargestellt werden können [8]. Eine Visualisierung der molekularen Basis der Neurodegeneration in-vivo ist zwar gegenwärtig noch nicht verfügbar, aber in Analogie zum beta-Amyloid-PET beim M. Alzheimer für alpha-Synuclein perspektivisch prinzipiell vorstellbar. Dagegen finden nuklearmedizinische Verfahren wie PET und SPECT regelhaft Anwendung, um die gestörte Integrität des nigro-striatalen Dopaminsystems (z.B. F-Dopa-PET, DAT-Scan) aber auch des autonomen Nervensystems (z.B. MIBG-SPECT) funktionell darzustellen. Die transkraniale Mesencephalon-Dopplersonographie kann im Falle einer darstellbaren Hyperechogenität, die mit der Eisenablagerung in der SNc assoziiert ist (s.o.), ebenfalls hilfreich sein.

1.1.3 Ätiologie und Mechanismen der Neurodegeneration

Die Ursache des sporadischen M. Parkinson ist nach wie vor unbekannt, was durch das Synonym Idiopathisches Parkinsonsyndrom treffend zum Ausdruck kommt. Ungeachtet dessen konnten in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die das Verständnis über die Pathogenese und Pathomechanismen beim IPS fundamental verbessert haben. Demnach lässt sich eine einheitliche Ursache für alle IPS-Syndrome weniger ableiten als vielmehr das Zusammenspiel mehrerer Schlüsselfaktoren, sodass anhand der aktuellen Datenlage am ehesten von einer multifaktoriellen Genese der Neurodegeneration beim M. Parkinson ausgegangen werden muss

(sog. „multiple-hits“-Hypothese) [9]. In diesem Zusammenhang spielen alpha-Synuclein (a-Syn), Calcium und Dopamin eine besondere Rolle [10].

Die Analyse von familiären Formen des M. Parkinson, welche ca. 25 % beim IPS ausmachen, führte zur der Entdeckung der pathogenen Rolle von alpha-Synuclein als gemeinsame pathologische Endstrecke auch bei den sporadischen Formen des IPS. Alpha-Synuclein ist ein ubiquitär in Hirnneuronen und vorwiegend präsynaptisch lokalisiertes Protein, das wahrscheinlich eine physiologische Rolle bei der synaptischen Transmissiion spielt (die genaue Funktion ist bisher nur unvollständig verstanden). Unter bestimmten Bedingungen (z.B. Mutationen im a-Syn Gen oder Genen der a-Syn-Degradation, mutagene Wirkung von Umweltgiften [11]) kann das natürlicherweise wasserlösliche Peptid über mehrere Fibrillationsstufen und Oligomerformen zu unlöslichen Aggregaten, die das Korrelat der Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten darstellen (siehe Abbildung 1), polymerisieren. Diese Aggregate haben eine zytotoxische Wirkung und führen in der Sequenz axonal-terminale Schädigung und nachfolgend Neuronentod entsprechend eines „dying-back“-Mechanismus zur Neurodegeneration. Im Rahmen der Parkinson'schen Erkrankung findet sich interessanterweise ein stereotypes Muster der spatio-temporalen Dynamik der a-Syn-Pathologie, was zu der inzwischen weltweit weitestgehend akzeptierten Klassifikation von Braak führte, wonach der Krankheitsverlauf anhand der Lewy-Körperchen-Verteilung im PNS und ZNS in Stadien unterteilt wird [12].



1 Abb. 1: Lewy Körperchen, Quelle: www.studyblue.de

Die pathogene Rolle von Calcium gelangte erst in den letzten Jahren in den Fokus der Ursachenforschung des IPS und basiert auf der Entdeckung eines Schrittmacher-mechanismus von nigralen Dopaminneuronen, dessen molekulares Substrat spannungsgesteuerte Calciumkanäle sind [13]. Entsprechend der Calcium-Hypothese führt die kontinuierliche Schrittmacheraktivität der nigralen Dopaminneurone (die also unabhängig von afferenten Nervenimpulsen aktiv ist) zu einer permanenten Überladung dieser Zellen mit Calcium, welches infolge einer limitierten Pufferkapazität zu einer Schädigung der Mitochondrien und der Atmungskette mit dem Ergebnis des Zelltodes führt. Die Zunahme mitochondrialer DNS-Schäden mit steigendem Lebensalter und der Nachweis eines dopaminergen Zelluntergangs von ca. 10% pro Lebensdekade bei Gesunden unterstützen dieses Konzept ebenso, wie der tierexperimentelle Nachweis von nigraler Neuroprotektion durch bestimmte Calciumkanal-Antagonisten [14]. Basierend auf diesen Ergebnissen sind bereits erste klinische Studien initiiert worden [15].

Obgleich die Rolle von Dopamin als Schlüsselfaktor in der Pathogenese des Im IPS klinisch kontrovers diskutiert wird [16], ergeben sich Anhaltspunkte dafür, dass Dopamin aufgrund seines autooxidativen Katabolismus über die Induktion von oxidativem Stress zu einer Nervenzellschädigung führt, insbesondere im Falle einer gestörten Kompartimentalisierung des Neurotransmitters. Demnach stellt insbesondere das zytosolische (also nicht vesikulär gespeicherte

Dopamin) ein „Risikofaktor“ in diesem Kontext dar [17]. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Evidenz für die fazilitierende Rolle von Dopamin in der Aggregatbildung von α -Synuclein [18,19].

Auch wenn die pathomechanistische Rolle der o.g. Schlüsselfaktoren in der Genese des IPS plausibel erscheinen (der prädominante Untergang von nigralen Dopamineuronen ist und bleibt das charakteristischste pathologische Merkmal der Erkrankung), bleibt das genaue Zusammenspiel dieser Faktoren Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschung. Darüber hinaus sind eine Vielzahl weiterer Faktoren zu berücksichtigen, die v.a. bei der Unterhaltung bzw. der Propagation der Neurodegeneration eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählen insbesondere die Rolle von aktivierter Mikroglia und Inflammation, der Mangel an neurotrophen Faktoren und Glutamat-induzierte Exotoxizität.

1.2. Pathophysiologie und Therapieansätze des Idiopathischen Parkinson- Syndroms

1.2.1 Pathophysiologie

Um den Pathomechanismus der motorischen Störungen, bzw. der Ausbildung der Kardinalsymptome zu verstehen, ist die genaue Betrachtung der Basalganglien und der zugrunde liegenden Neuroanatomie unabdingbar. Die Basalganglien stellen eine ontologisch ältere, subkortikal gelegene Kerngruppen dar, die in der Interkonnektion von Kortex und Thalamus eingebettet sind. Zu den Basalganglien zählen hauptsächlich die vier Kernbereiche/Strukturen: Striatum (Nucleus caudatus, Putamen und ventrales Striatum), Globus pallidus (bestehend aus innerem Segment Globus pallidus internus [Gpi] und äußerem Segment Globus pallidus externus [GPe]), der Substantia nigra (pars reticularis [Snr] und pars compacta [SNc]) und Nucleus subthalamicus (STN). Diese basalganglionären Strukturen sind über zwei parallele Regelkreise miteinander verbunden und stellen somit die funktionell-anatomische Basis der Prozessierung von Willkürbewegungen dar. Wenngleich bis heute nicht alle Aspekte der Initiierung und Modulation von Bewegungsabläufen verstanden sind, lassen sich mit dem anatomischen Modell der

Basalganglien, welches auf das neurotoxische 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP)-Parkinson-Modell des nicht-humanen Primaten zurückgeht [20], wichtige Funktionen des kortiko-basalganglionär-thalamo-kortikalen Regelkreises erklären. MPTP wurde 1983 bei jungen Drogenabhängigen, die nach Konsum einer Designerdroge ein akutes Parkinson-Syndrom entwickelten, welches phänomenologisch nicht von einem IPS zu unterscheiden war, entdeckt [21]. Da es auch beim nicht-humanen Primaten eine analoge Kardinalsymptomatik induzieren kann, gilt MPTP seither als die Modellsubstanz für die Erzeugung eines Parkinsonsyndroms.

In diesem Modell existieren parallel der so genannte “direkte” und der “indirekte” Weg. Das Striatum bildet die Eingangsstruktur und empfängt Impulse aus dem Cortex, der GPi/SNr-Komplex bildet die Ausgangsstruktur der Basalganglien und leitet Impulse zum Thalamus. Diese Ein- und Ausgangsstruktur über zwei Wege miteinander verbunden, die funktionell in Exzitation oder Inhibition des GPi/SNr-Komplexes münden. Der direkte Weg ist D1-Rezeptor-vermittelt, der zweite D2-Rezeptor vermittelt. Bewegungsabläufe werden über überwiegend hemmende und exzitatorische Eigenschaften der einzelnen Strukturen moduliert. Im Gesunden befinden sich Hemmung und Erregung im Gleichgewicht, Willkürbewegungen sind uneingeschränkt möglich. Der beim IPS vorliegende Dopaminmangel bewirkt ein Überwiegen des indirekten Weges und damit des Nucleus subthalamicus. Dadaurch wird der GPi enthemmt und damit den thalamo-kortikale Impulse inhibiert.

NORMAL MOTOR CIRCUIT MOTOR CIRCUIT IN PD

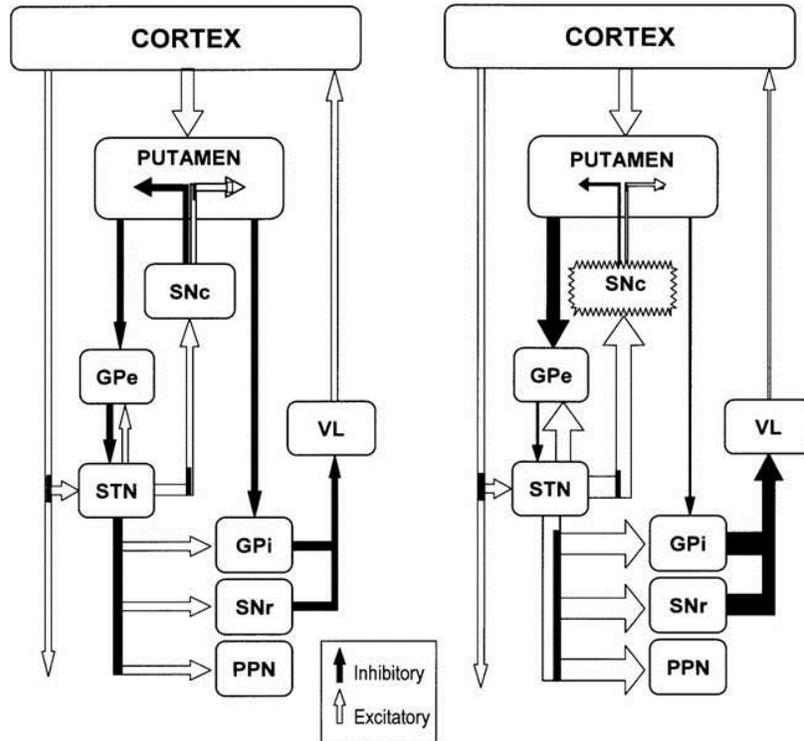


Abb. 2: Funktionelle Verschaltung der Basalganglienkerne im Gesunden und bei M. Parkinson, Quelle: physiologyonline.physiology.org

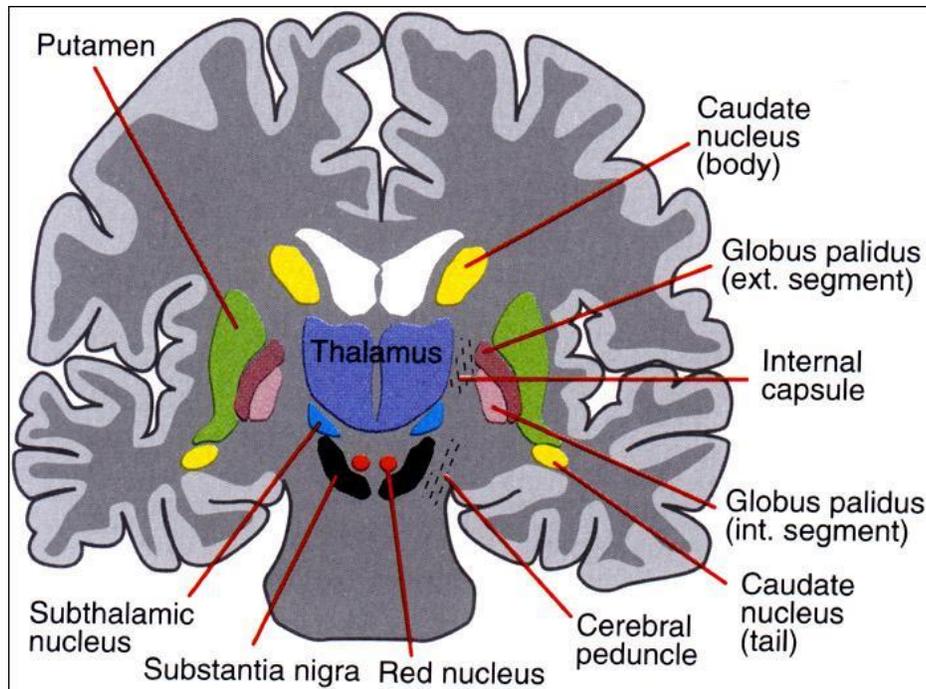


Abb. 3: Schematische Darstellung der Basalganglien im coronaren Schnitt.
Quelle: Health-on-topic.net.

1.2.2 Therapieansätze des Idiopathischen Parkinsonsyndroms

Es sei vorangestellt, dass es derzeit keinen kurativen Ansatz in der Behandlung von M. Parkinson gibt. Für motorische und nichtmotorische Symptome stehen medikamentöse, neuromodulative und neurorestaurative Verfahren zur Verfügung. Nach wie vor stellt die medikamentöse Behandlung den wichtigsten Baustein einer suffizienten Therapie dar. Im Zentrum steht die Substitution des fehlenden Dopamins. Die Dopaminvorstufe Levodopa passiert die Blut-Hirn-Schranke und wird in nigrostriatale dopaminerge Nervenenden und Gliazellen aufgenommen. Es folgt die Decarboxylierung zu Dopamin. Die weiteren Mechanismen der Freisetzung und Inaktivierung entspricht denen des körpereigenen Dopamins. Levodopa wird zusammen mit Hemmstoffen der Dopamindecarboxylase -Benserazid oder Carbidopa- verabreicht, da bei alleiniger Gabe mehr als 70% peripher verstoffwechselt würde. Standardpräparate sind Levopopa/Benserazid und Levodopa/Carbidopa in oraler Darreichungsform unterschiedlicher Stärke. Monoaminoxidase-B (MAO-B) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) erhöhen die Bioverfügbarkeit von L-DOPA.

Mit voranschreitender Erkrankung nimmt die Speicherkapazität von nigrostriatalen Fasern und striatalen Neuronen ab, so dass die Plasmahalbwertszeit schließlich nur 1,5-2 Stunden beträgt. Im Spätstadium und bei ausgeprägten Wirkungsfluktuationen ist als Ultima ratio die intrajeunale Injektion von L-DOPA über eine perkutane Sonde zugelassen [22]. Levodopa stellt nach wie vor das zentrale Medikament der Parkinsontherapie dar. Durch seine Einführung konnte die Lebenserwartung von Betroffenen deutlich gesteigert werden. Es verzögert jedoch nicht die Progression des IPS. Allerdings limitieren Nebenwirkungen den Einsatz dieses Medikaments. So treten regelmäßig Dyskinesien als motorische Komplikationen nach ca. 5-10 Jahren bei der Mehrzahl der IPS-Patienten auf. Weitere Nebenwirkungen sind orthostatische Dysregulation, Übelkeit, Erbrechen sowie neuropsychiatrische Symptome bis hin zu einer dopaminergen Psychose [23]. Es wurde deshalb versucht, durch unterschiedliche Medikamentenkombinationen und späteres Einsetzen von L-Dopa und Erstbehandlung mit einem Dopaminagonisten alternativ zur initialen L-Dopa-Therapie zu entwickeln. Es zeigte sich, dass bei Dopaminagonisten ein vermindertes Auftreten von Dyskinesien zu verzeichnen waren [24]. Ergänzend kommen Dopaminagonisten zum Einsatz. Als Mittel der ersten Wahl gelten Non-Ergotderivate wie Piribedil, Pramipexol und Ropinirol. Es gibt hier orale und transdermale Applikationsformen (Rotigotin). Diese Präparate weisen ein hohes Nebenwirkungsprofil im Sinne von Übelkeit, orthostatischer Dysregulation und Beinödemen auf und werden des Auftretens von kardialen Klappenfibrosen nur noch selten eingesetzt. Dopaminagonisten wirken hauptsächlich über striatale D2 und D3-Dopaminrezeptoren. Glutamat-Antagonisten wie Amantadin hemmen nicht kompetitiv NMDA-Rezeptoren [25] und besitzen eine anticholinerge Wirkung. Es ist zur Behandlung der Kardinalsymptome von Parkinson-Syndromen als Monotherapie und in Kombination mit den o.g. Wirkstoffen zugelassen. Seit kurzem erst wurde ein positiver Effekt auf L-Dopa-induzierte Dyskinesien nachgewiesen [26]. Als Nebenwirkungen können psychotische Symptome, Mundtrockenheit und Appetitlosigkeit auftreten.

In zunehmendem Maße werden neurochirurgische Verfahren in der Parkinsontherapie bedeutsam. 1953 wurden erste Operationen zur Therapie des IPS durchgeführt. Hierbei wurde die A. Choroidea anterior in der Absicht, die Aktivität des Pallidums zu modifizieren, legiert [27], wobei der Schaden dem Nutzen für den Patienten deutlich überwog. Die Ergebnisse dieser Prozedur waren insgesamt

nicht vorhersehbar. Seit den 1950er Jahren trat die anterodorsale Pallidotomie in den Vordergrund. Eine Verbesserung des Rigor konnte erzielt werden, Tremor und Bradykinese blieben unbeeinflusst [28]. Die Läsion des ventrolateralen Thalamus rückte in den Fokus, welche eine Tremorreduktion bewirken konnte, wobei meist Rigor und Bradykinese die kompromittierendsten Symptome des IPS darstellen. Die OP-Risiken und -Komplikationen überwogen dabei weiterhin den positiven Effekten. Zunächst gerieten neurochirurgische Therapieoptionen nach der Einführung von L-DOPA in Vergessenheit. Heutzutage steht die Tiefe Hirnstimulation oder Deep Brain Stimulation im Vordergrund. Auf diese Therapieform wird unten gesondert eingegangen. Weitere neuere operative Optionen sind stereotaktische Läsionen im Bereich des Nucleus ventralis intermedialis oder in der Zona incerta bei ausgeprägtem Ruhetremor und Rigor. Ein Effekt auf die Akinese wurde nicht beobachtet [29]. Die Morbidität dieses Eingriffes liegt bei 4-47% und liegt deutlich über der Morbidität der DBS [30, 31]. Im klinischen Alltag spielen diese Interventionen in Deutschland keine große Rolle mehr. Die unilaterale Pallidotomie wird in den Niederlanden und den USA eingesetzt, in Deutschland dagegen kaum. Sie wird zur Therapie der Kardinalsymptome und der Dyskinesie angewandt. Die positiven Effekte sind verglichen mit der bilateralen DBS vermutlich geringer ausgeprägt [32]. Die Koagulation und damit Läsion des Nucleus subthalamicus wurde nur bei wenigen Patienten durchgeführt. Postoperativ wurden z.T. persistierende Dyskinesien beobachtet, weshalb dieses Verfahren in der EU und in den USA nicht angewandt wird. Seit einigen Jahren wird die intravenöse oder intrazerebrale Injektion von fetalen mesencephalen Stammzellen, sowie von adulten Stammzellen experimentell untersucht. Wegen Transplantat-induzierten Dyskinesien wird das Verfahren unverändert nur experimentell angewandt [33, 34]. Jenseits von medikamentöser und neurochirurgischer Therapie sind Physiotherapie, Logopädie und Ernährungsberatung wesentlich an der Verbesserung der Lebensqualität von Betroffenen beteiligt [35]. Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, durch die Transplantation dopaminergener Neurone den Dopaminverlust durch die zugrunde gegangenen Neurone auszugleichen. Bereits 1979 führte die Arbeitsgruppe um Perlow, sowie Bjorklund und Stenevi diesbezüglich tierexperimentelle Studien durch, welche die Funktionalität dieses Konzepts bestätigten. Diese s.g. Neurotransplantation wurde schließlich 1990 beim Menschen durchgeführt. Als Quelle der dopaminergen Zellen fungierte zunächst das Nebennierenmark, später fetale Mittelhirnzellen [36, 37]. Aus technischer und ethischer Sicht ist die

Neurotransplantation sicherlich als problematisch einzustufen. Es handelt sich hierbei nach wie vor um ausschließlich experimentelle Studien [38, 39].

1.2.3 Tiefe Hirnstimulation

Abgesehen von einigen wenigen Fallbeispielen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde 1987 die moderne tiefe Hirnstimulation durch den französischen Neurochirurgen A. Benabid begründet und die erste tiefe Hirnstimulation im Nucleus ventralis intermedius bei einem Parkinsonpatienten durchgeführt [40]. 1990 erfolgte erstmals eine STN-Ablation bei einem MPTP-behandelten Primaten [41], ebenfalls 1993 wurde erstmalig an Patienten die STN-Stimulation durchgeführt [42]. Es zeigte sich hier eine positive Wirkung auf Akinese und Rigor. Die tiefe Hirnstimulation, im englischen Sprachgebrauch “Deep Brain Stimulation” (DBS) und in Adaptation an die experimentelle Situation auch “High Frequency Stimulation” (HFS) genannt, konnte zunehmend als prinzipiell reversibles Therapieverfahren für Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium etabliert werden. Wirkfluktuationen der Medikamente, das so genannte “On-Off-Phänomen” und Dopamininduzierte Dyskinesien sind Indikationen für diesen reversiblen funktionell-neurochirurgischen Eingriff, der bei fortgeschrittener Erkrankung eine Reduktion der “Off-Zeit”, Reduktion der Dyskinesien und insgesamt eine Steigerung der Lebensqualität bewirken kann. Innerhalb der letzten Jahre konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Patienten von einer deutlich früheren Initiation der DBS profitieren können [43]. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit ist die Untersuchung neuroprotektiver Effekte nach früher DBS in der “Early Stim”-Gruppe, was noch ausführlich erläutert werden wird.

Präoperativ werden Patienten ausführlich neurologisch-psychiatrisch untersucht, auch um eine eventuelle Depression mit erhöhtem Suizidrisiko zu erfassen, da die psychische Vulnerabilität besonders in den ersten Wochen der DBS erhöht werden kann. Es handelt sich um einen stereotaktischen Eingriff. Mittels cerebraler Bildgebung erfolgt die Planung von Trajektorie, dem stereotaktischen Weg der Elektrode, und Zielpunktregion. Intraoperativ werden lokale Feldpotentiale unter klinischer Kontrolle, bzw. Monitoring der Zielsymptomatik abgeleitet. Als Stimulationsort kommen vorrangig bei M. Parkinson der Gpi und der STN in Frage. Wie erläutert, stellt die

Hyperaktivität des STN bzw. die Enthemmung des GPi die Ursache für die Dysbalance in der Basalganglienschleife und damit für die Symptome des IPS dar. In den Folgetagen werden die Stimulatoreinstellungen entsprechend der Klinik des Patienten weiter moduliert. Dies kann sich schwierig darstellen, da psychiatrische Nebenwirkungen (hypomane Affektveränderungen, Depression und andere psychischen Veränderungen) die DBS-Einstellung komplizieren können [44]. Im 5 Jahres-Follow up zeigte sich z.B. entsprechend der Klasse III-Studie von Krack et al. 2003 und nach Schüpbach et al. 2005 eine Verbesserung im motorischen Skalenwert der UPDRS-Scale um 50-60%. Es wurde im Langzeitverlauf eine geringe Zunahme der axialen Akinese mit gleichzeitig stabiler Verbesserung des Ruhetremors beobachtet. Ebenso konnten die Symptome Rigidität und Dyskinesie verbessert werden [45, 46]. Die Dosierung der Dopaminergika kann in den meisten Fällen reduziert werden [47]. Im Vergleich der Zielpunkte STN und GPi ließ sich nach zwei Jahren kein signifikanter Unterschied feststellen [48], nach einer Studie von Volkmann et al. 2009 umfassen OP-Risiken intrazerebrale Blutungen aufgrund von Gefäßläsionen durch die Elektrode. In den großen Zentren beträgt die Mortalität des Eingriffs 0,4%, die Morbidität 1%. Die Hauptkomplikation stellt die Wundinfektion dar, die sich auf das gesamte System ausbreiten kann und die Explantation des Systems zur Folge haben kann. Diese beläuft sich in den erfahrenen Zentren auf 1-1,7%. Ferner können Materialdefekte mit einer Häufigkeit von ca. 1-2%. [49,50]. Die tiefe Hirnstimulation wird mittlerweile auch bei psychiatrischen Erkrankungen wie der therapierefraktären Depression und Zwangserkrankungen eingesetzt.

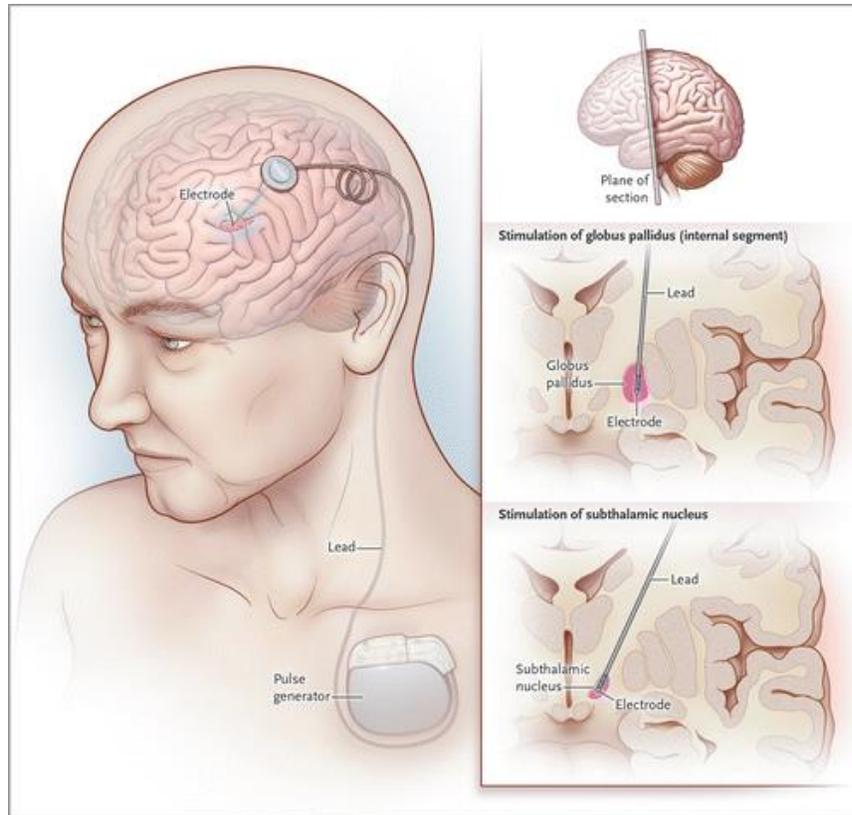


Abb. 4: Positionierung von Elektrode und Stimulator. Quelle: Medtronic

1.2.3.1 Wirkmechanismen der tiefen Hirnstimulation

Trotz der einheitlich gut dokumentierten Wirksamkeit der STN-DBS sind die Wirkmechanismen dieser sehr effektiven symptomatischen Therapiestrategie bisher nur unvollständig verstanden. Durch Ableitung lokaler Feldpotentiale konnten s.g. β -Oszillationen beim IPS nachgewiesen werden. Diese befinden sich im 10-35 Hz-Bereich, treten so beim IPS auf und gelten als pathognomonisch [51]. Die β -Oszillationen werden sowohl durch den Einsatz von L-DOPA als auch durch DBS aufgehoben [52]. Wodurch dieser Effekt der DBS zustande kommt, war bis vor wenigen Jahren unklar. Verschiedene zugrunde liegende Mechanismen werden gegenwärtig diskutiert. Gemäß des oben erläuterten Basalganglienmodells führt eine Inhibition des hyperaktiven STN, zur Wiederherstellung der Balance zwischen Hemmung und Erregung. Normale Willkürbewegungen wären möglich. Filali et al. fanden Hinweise, dass dies durch Hyperpolarisation von STN-Neuronen geschieht. [53]. Im letzten Jahr konnte ein dualer Effekt der DBS auf STN-Neurone nachgewiesen werden. Demnach wird eine Exzitation von Axonen mit gleichzeitiger Inhibition von Neuronen bewirkt [54]. Die klinische Inhibition, aber tatsächliche Exzitation des STN ist durch antidrome Erregungsweiterleitung und damit erhöhter GABA-freisetzung im direkten und indirekten Weg und gleichzeitig einer Suppression subthalamo-nigraler glutamaterger Afferenzen erklärbar [55]. Eine durch DBS induzierte gesteigerte striatale Dopaminfreisetzung wurde 2002 von Meissner et al. Nachgewiesen [56]. Ebenso konnte eine reziproke Erregung des Motokortex über den hyperdirekten Weg nachgewiesen werden [57]. Wie bereits erwähnt, können die für das IPS pathognomonischen β -Oszillationen aufgehoben werden, was ebenfalls die Hypothese der Depolarisation pathologischer Erregungsmuster stützt [58]. Mittels optogenetischer Versuche an 6-OHDA-lädierten Mäusen konnten Gradinaru et al. 2009 nachweisen, dass die Erregung glutamaterger axonaler Afferenzen des STN eine Symptomverbesserung bewirkt [59]. Erregung von Gliazellen oder die reziproke Erregung der V. Zellschicht des Motokortex zeigten keine Wirkung. Die unterschiedlichen Wirkmechanismen der DBS wurden noch nicht vollständig detektiert und verstanden. Dennoch zeigen sich Effekte sowohl auf funktionell-anatomischer als

auch auf Transmitterebene. Welcher Mechanismus letztlich die Symptomverbesserung für den Patienten bewirkt, bleibt unklar.

1.2.3.2 Neuroprotektion durch tiefe Hirnstimulation

Basierend auf den klinische Studien zur Langzeitwirkung der STN-DBS mit Nachweis einer stabilen Symptomkontrolle bis zu neun Jahren wurde neben den symptomatischen Effekten auch eine die Erkrankung modifizierende Wirkung dieses Therapieverfahrens diskutiert. Grundsätzlich werden bis heute hauptsächlich zwei Parkinsonmodelle im Tierexperiment angewendet: das MTPT-Modell des nicht-humanen Primaten, das in Kapitel 1.3.1. beschrieben wurde. Im Rattenmodell dagegen wird 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) zur Dopamin-Depletion benutzt. In Kapitel 2.1. wird dies ausführlich beschrieben. Diese Tiermodelle ermöglichen die Erprobung unterschiedlicher DBS-Paradigmen, also unterschiedliche Zeitpunkte der DBS-Initiation der DBS in Abhängigkeit von der Läsion. Im Sinne eines “Early-Stim-Designs” kann der Stimulationsbeginn unmittelbar nach Läsion erfolgen. In dieser Arbeit führten wir dies in einer Gruppe der Tiere durch. Stimulation *prä-lesionem* wurde ebenfalls durchgeführt. Hier können Effekte auf das gesunde Gewebe untersucht und *post-lesionem* mit weiteren Paradigmen verglichen werden. Stimulation über mehrere Tage bis Wochen wird als chronische Stimulation bezeichnet. Dies entspricht am ehesten der klinischen Situation. Die Stromapplikation kann über eine, mehrere Stunden oder die gesamte Zeit erfolgen.

2004 untersuchte die Gruppe um Maesawa erstmalig den Effekt der Langzeitstimulation im 6-OHDA-Parkinsonmodell der Ratte. In dieser Studie wurden der STN über zwei Wochen unilateral stimuliert. Zwei Wochen nach Läsion zeigte sich ein neuronales Zellüberleben von 29 und 44% in den beiden Kontrollgruppen im Vergleich mit der nichtlädierten Seite. In der DBS-Gruppe wurde mittels TH-immunohistochemischer Färbung ein nigrales neuronales Überleben von 85% quantifiziert (s.u.) [60]. Aus dieser Studie lässt sich zweierlei ableiten: Mögliche

und ein akuter symptomatischer Effekt. Temel et al. konnten 2006 nach bilateraler STN-DBS im Rattenmodell ebenfalls ein signifikantes Überleben dopaminerger Neurone nachweisen [61]. 2008 wurde die erste Placebo-kontrollierte Studie über neuroprotektive Effekte nach Langzeit-STN-HFS veröffentlicht. Hier wurde ein relatives nigrales neuronales Zellüberleben von 50% verglichen mit der Sham-Stimulation- und der nativen Gruppe berichtet [62]. Eine signifikante Anzahl dopaminerger Neurone nach chronischer STN-DBS von zwei bis vier Wochen im 6-OHDA-Modell konnten Spieles-Engemann et al. 2010 nachweisen [63]. Kürzlich konnte in einer Studie von Shinko et al. der neuroprotektive Effekt von hoher Spinal-cord-stimulation über ein bis zwei Wochen auf dem Niveau C1/C2 im 6-OHDA-Modell nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich im Zylinder Test eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten [64].

1.3. Eigene Zielsetzung

Wäre es möglich, einen neuroprotektiven Effekt der DBS einwandfrei nachzuweisen, könnten die Paradigmen der DBS möglicherweise verändert werden. 2004 zeigte Maesawa nach 14-tägiger Stimulation des STN eindruckliche neuroprotektive Effekte anhand von Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen [60]. Anhand der Surrogatmarker Tyrosinhydroxylase in der Substia nigra pars compacta konnte weiterhin ein neuroprotektiver Effekt nach DBS nachgewiesen werden [62]. In dieser Arbeit wird einerseits untersucht, ob der unmittelbare Beginn der Stimulation nach Implantation einen neuroprotektiven Effekt erzielen kann, zum anderen wird eine mögliche Präservierung dopaminerger Neurone der SNc nach mehrtägiger Stimulation untersucht. Hier wurde die Stimulation nach fünf Tagen initiiert. Nach diesem Zeitraum kann eine dem menschlichen Umfang entsprechende Dopamindepletion erwartet werden [65]. Weiterhin wird in dieser Studie beleuchtet werden, inwieweit mit der immunhitochemischen Anfärbung der Tyrosinhydroxylase in der Substantia nigra suffizient neuronales

Zellüberleben quantifiziert werden kann. Somit wird die klinisch relevante Frage der nigralen Neuroprotektion durch DBS im 6-OHDA-Parkinsonmodell der Ratte erneut und deutlich detaillierter beleuchtet.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an 34 männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die der Tierversuchsanstalt Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) entstammten. Das Gewicht der Tiere bei Versuchsbeginn betrug zwischen 250-270 g. Die Bewilligung der in dieser Arbeit dargestellten Tierversuche unterlag den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes § 8 Absatz 1 und wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Tierversuchsnummer G O 320/05 erteilt. Die Anzahl der Versuchstiere, die Dauer der operativen Eingriffe und die daraus resultierenden Belastungen soweit möglich minimiert.

2.2. Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden bis zu Beginn der operativen Eingriffe in Gruppen von 4-5 Tieren untergebracht. Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere in standardisierten, hochwandigen Einzelkäfigen gehalten.

Als Futter dienten Pellets der Firma Altromin® 1324 (Lage, Deutschland), die wie das Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung stand. Die Unterbringung der Tiere erfolgte unter kontrollierten Haltungsbedingungen mit einem Hell-Dunkel-Zyklus (Helligkeitsphase von 6.00-18.00 h), einer Innenraumtemperatur von 18°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50%.

2.3. Substanzen und

Pufferlösungen 2.3.1 Verwendete

Substanzen

Substanz	Hersteller/Bezugsquelle
2-Methylbutan Isopentan	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
2-Propanol	
6-Hydroxydopamin	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Ascorbinsäure	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatrium-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kresylviolett	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Metamizol	Winthron, Fürstenfeldbruck, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pentobarbital-Natrium	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Povidon-Jod	Braun, Melsungen, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Substanzen sowie der Bezugsquellen

2.3.2 Fixier- und Pufferlösungen

Zur späteren Färbung der Gehirnschnitte (u.a. Nissl-Färbung) wurden die Schnitte fixiert. Eine Fixation macht eine histologische Aufarbeitung möglich. Stoffwechselprozesse werden unterbrochen, der Gewebeerfall verhindert. Somit wurde das Gewebe in seinem Zustand erhalten. Dazu wurde mit einer 4% Paraformaldehyd- in 0,1M Phosphat-gepufferten Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS, pH 7,4) als Puffer gearbeitet. Zusammensetzung: Paraformaldehyd, Dinatriumhydrogen- phosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid. Zusätzlich wurde für die Nissl-Färbung ein Azetatpuffer (20mM, pH 4,0) benötigt.

2.4. Experimentelles Design

Die Tiere wurden vor Beginn der Operationen in drei Gruppen eingeteilt: eine chronisch stimulierte Gruppe (STN-DBS), eine akut stimulierte Gruppe (STN-Early-Stim) und eine Kontrollgruppe (STN naiv, n=6). Bei den Tieren mit einem early-onset Stimulationsdesign (Early-Stim n= 4) wurde unmittelbar nach dem Erwachen aus der Narkose die Stimulation begonnen, bei den chronisch stimulierten (DBS n= 10) wurde erst ab dem fünften postoperativen Tag stimuliert. Die Kontrollgruppe (sham-implant) erhielt keine Elektrode, jedoch einen Dummy-Stimulator, der in Größe und Gewicht einem Verum-Stimulator entsprach. Eine Sham-DBS-Gruppe wurde weggelassen, da in der Vorgängerstudie 2008 kein Unterschied zwischen der STN naiv und STN-Sham-Gruppe nachweisbar war [62]. Fünf Tage nach Ankunft wurde die Leerlauf-Amphetaminrotation prä-6-OHDA durchgeführt (siehe unten). Vom 6.-8. Tag erfolgte die 6-OHDA-Läsion unilateral und die Implantation der HFS- bzw. der sham-implant-Gruppe. Ab dem 11. Tag wurde die Stimulation initiiert: bei einem Tier 150 μ A, bei zwei Tieren 100 μ A. Die Stärke der Stimulation wurde in Abhängigkeit von der Stärke der Nebenwirkungen gewählt. Ab dem 23. Tag wurde die post-OP-Amphetaminrotation

vorgenommen. Am Folgetag erfolgten Perfusion und Dekapitation in tiefer Narkose (siehe unten). Anschließend wurden die Gehirne entnommen, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die weiteren Analysen beinhalteten die histologische Aufarbeitung zur Lokalisation der Elektrodenposition und Quantifizierung von TH-positiven Zellen in der Substantia nigra pars compacta und der Messung der TH-Faserdichte im Striatum.

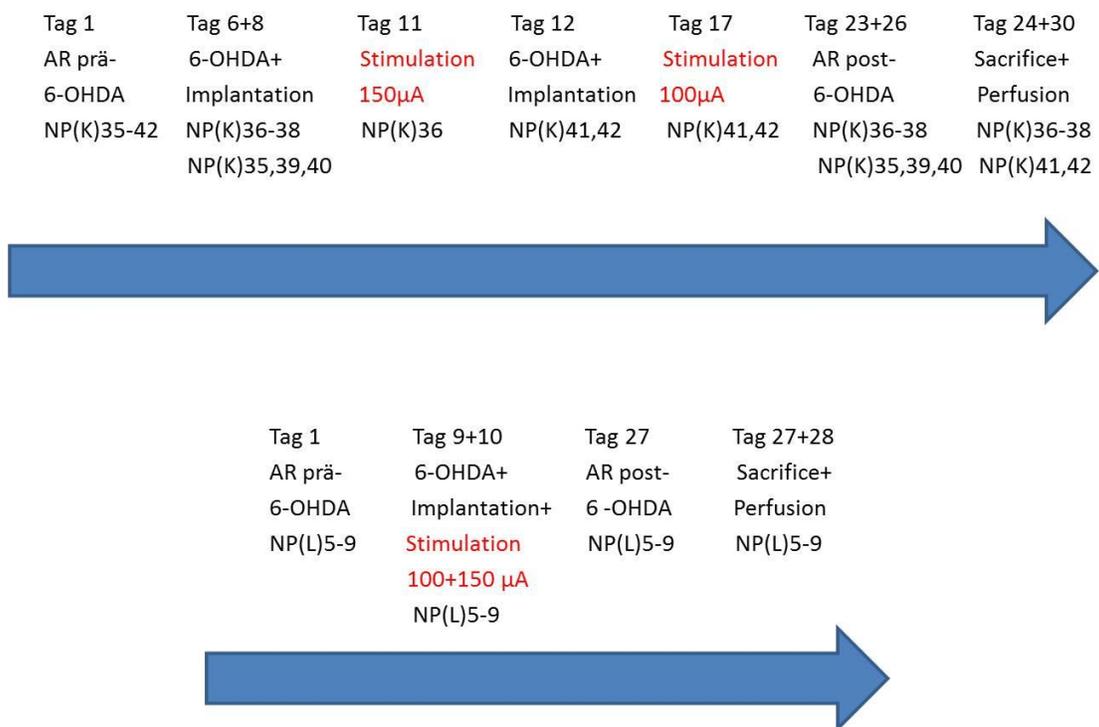


Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der Experimente

2.5. Das 6-OHDA-Parkinsonmodell der Ratte

Für die Versuche wurde erneut das Neurotoxin-basierte 6-OHDA-Modell der Ratte verwendet. Das durch Ungerstedt 1968 entwickelte Modell nutzt die selektive

Neurotoxizität des 6-OHDA [66,67]. Es ist den Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin) strukturell ähnlich und besitzt somit eine hohe Affinität für catecholaminerge Neurone, über die es in die Zelle aufgenommen wird und dort akkumuliert. Es kommt zu einer Autoxidation was zu einer Ausbildung mitochondrialer Dysbalance bzw. Schädigung durch zytotoxische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid, 6-Hydroxy-dopaminquinon, Superoxid-Anionen und Hydroxylanionen führt [68]. Diese führen zum Degeneration dopaminergener Neurone. Wie das Dopamin wird auch 6-OHDA nicht über die Blut-Hirn-Schranke passieren und muss intracerebral stereotaktisch appliziert werden. Nach Injektion in mediale Vorderhirnbündel (MFB), Striatum, SNC wirkt sich das Neurotoxin auf die dopaminergen Neurone der SNC und der ventralen tegmentalen Area (VTA) aus, ebenso auf das Striatum und das mediale Vorderhirnbündel, in dem die nigrostriatalen Projektionsneurone verlaufen [69]. Das Ausmaß der Neurotoxizität ist Dosis- und Geschwindigkeitsabhängig. Nach intrastriatler Injektion erfolgt eine verzögerte, durch einen retrograden Transport bedingte, Degeneration der dopaminergen Neurone der SNC, die je nach Dosis, partiell ausgeprägt sein kann [70,71]. Entsprechend dem Krankheitsverlauf beim Menschen (ca. 60% Zellverlust) wird also keine akute Läsion der dopaminergen Neurone erwirkt. Es besteht die Annahme, dass dies durch oxidativen Stress geschieht, wie es auch als Co-Faktor für die klinische Ätiopathogenese angenommen wird [72,73]. Gemäß dem Ungerstedt-Modell wirkt das Amphetamin auf der nicht-lädierten Seite. Hier wird die Freisetzung von Dopamin im Striatum erhöht. Diese Imbalance hat eine Rotation nach kontralateral zur intakten Seite bzw. zur lädierten Seite nach ipsilateral zur Folge. Im Gegensatz beeinflusst der direkte Dopaminagonist Apomorphin eher das Striatum der lädierten Seite. Es bindet an Dopaminrezeptoren, die durch die Läsion hochreguliert werden. Hierdurch entsteht ebenfalls ein dopaminerges Ungleichgewicht, was eine Rotation des Tieres nach kontralateral zur Läsion zur Folge hat [67]

2.6. Amphetamininduzierte Rotation

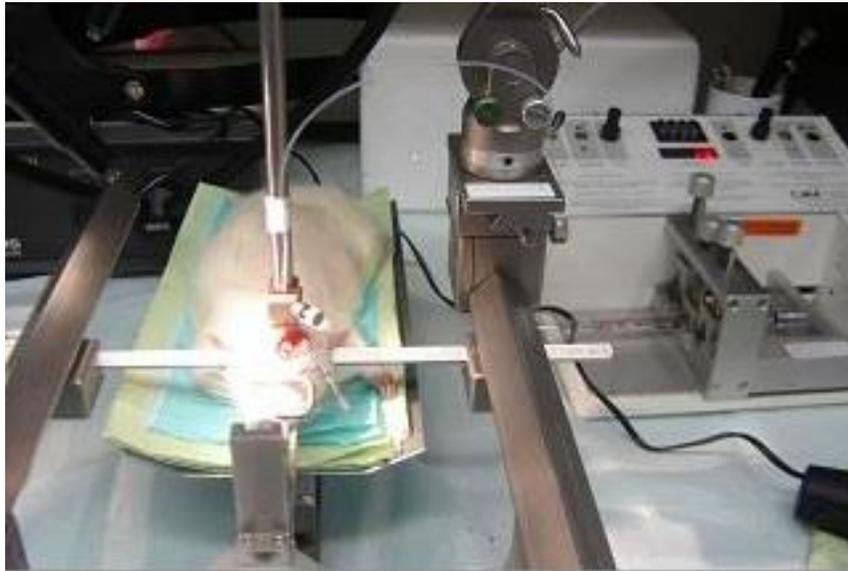
Verhaltenstests wie die auch in unserer Studie verwendete Amphetaminrotation verifizieren die erfolgreiche Läsion. Die größte Bedeutung hat hier das substanzinduzierte Rotationsverhalten nach unilateraler 6-OHDA-Injektion (Ungerstedt-Modell), siehe 2.1.). Durch intraperitoneale, also systemische Injektion des indirekten Dopaminagonisten Amphetamin, bzw. des direkten Agonisten Apomorphin kann eine bezogen auf die Läsionsseite eine ipsiversive bzw. kontraversive Rotation der Tiere ausgelöst werden [67]. Dieser Versuch wird mit dem so genannten Rotameter durchgeführt. Richtung und Anzahl der Rotationen werden hiermit gemessen. Ursache des unterschiedlichen Rotationsverhaltens ist die veränderte Suszeptibilität des dopaminergen Systems und der Dopaminrezeptoren im Striatum [74]. Auf zytopathologischer Ebene kommt es zu Nekrosen und Apoptosen. Der Amphetamin-induzierte Rotationstest wurde fünf Tage *prae-operationem*, sowie einen Tag vor Tötung der Versuchstiere durchgeführt. Hierbei wurde D-Amphetaminsulfat (Sigma, 2.725 mg/kg entsprechen 2 mg/kg Amphetamin in 0,9%-iger NaCl-Lösung) intraperitoneal appliziert. Anschließend wurden die Tiere jeweils in ein Rotameter gesetzt, dabei handelt es sich um eine Plexiglashalbschale (TSE, Bad Homburg, Deutschland) mit Bewegungssensor. Die Ratte kann mittels semiflexiblen Stahldraht am Bewegungssensor befestigt werden. Mittels Rotameter-Software (custom-made) wurde die Berechnung des Netto-Rotations-Asymmetrie-Scores, also des rechts-links-Verhältnisses der Umdrehungen der Tiere mit einem Drehwinkel von 180°/ Minute errechnet. Der Beginn der Aufzeichnung erfolgte 15 Minuten nach Injektion des Amphetamins (Anflutungsphase), gemessen wurde über 60 Minuten.

2.7. 6-OHDA-Läsion und Implantation des Mikrostimulationssystems

2.7.1 6-OHDA-Läsion

Die Läsion mit dem selektiven Neurotoxin 6-Hydroxydopamin wird unilateral durchgeführt. Eine bilaterale Läsion beeinträchtigt die Tiere zu stark [66,67], zudem können bei unilateraler Injektion beide Seiten (gesund vs. lädiert) verglichen werden. Innerhalb der ersten Woche nach intrastriatarer 6-OHDA-Injektion kommt es zu Zellschrumpfungen und zunächst nur teilweisem Funktionsverlust der dopaminergen Neurone. Ab der zweiten Woche schreiten Degeneration und Zellatrophie voran, es handelt sich also um einen progredienten Verlauf [70]. Die Ratten wurden einer unilateralen, striatalen 1-Punkt-Läsion mit 20 µl in der Konzentration 1µg/µl 6-OHDA unter Verwendung der convection enhanced delivery (CED) unterzogen [65]. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, bei dem durch stereotaktische langsame kontinuierliche Applikation eine nachhaltige Diffusion erzielt wird, wodurch der Effekt maximiert werden kann. Als Anästhesie erhielten die Tiere intraperitoneal appliziertes Pentobarbital (Dosis 60 mg/kg KG, gelöst in 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung) und als Booster Chloralhydrat (Dosis 400 mg/kg KG in 0,9 % NaCl), welches je nach Narkosetiefe der Ratte im weiteren Operationsverlauf verabreicht wurde. Nach Rasur der Kopfhaut und eines Teils der linken Flanke wurde der Kopf der Tiere im stereotaktischen Operationsrahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) durch Interauralstifte und einen Incisorstift fixiert. Dort folgte nach Desinfektion eine Inzision der Kopfhaut zur Freilegung des Periosts. Als Bezugspunkt wurde das Bregma dargestellt und der Schädelknochen wurde entsprechend der anteriorposterioren und mediolateralen Koordinaten, basierend auf dem Atlas nach *Paxinos und Watson 1986*, mittels eines Dentalbohrers trepaniert (AP +0,7, ML 2,8, DV -5,0). An der Dura Mater wurde die ventrale Koordinate festgelegt und anschließend ebenfalls trepaniert. Danach erfolgte die Absenkung der an einem stereotaktischen Arm fixierten flexiblen Silikonkanüle

(Außendurchmesser 0,23 mm) gemäß der dorsoventralen Werte. Mittels



2Abbildung 6: 6-OHDA-Läsion linke Hemisphäre, Ratte; Quelle: selbst

einer Hamilton-Mikroliterspritze des Typs CR 400-20 (Hamilton Company, Reno, USA), die über einen Polyethylenschlauch mit der Injektionskanüle verbunden war, erfolgte die Applikation der 6-OHDA-Lösung ($1,0 \mu\text{g} / 1 \mu\text{l}$ mit 0,2% Ascorbat in 0,9% sterilem NaCl) mit einer Geschwindigkeit von $0,2 \mu\text{l}/\text{min}$ in das Striatum. Insgesamt wurden $20 \mu\text{l}$ verabreicht, danach wurde die Injektionskanüle noch für weitere 10 Minuten in ihrer Position belassen, um eine Diffusion in die Gewebe zu unterstützen, bevor die Kanüle retrahiert wurde. Im Anschluss wurde die Wunde gereinigt und mit Histoacryl-Fibrinkleber verschlossen.

2.7.2 Implantation des Mikrostimulationssystems

Mit der Entwicklung eines implantierbaren Mikrostimulationssystems für kleine Labortiere war es möglich, Veränderungen unter der chronischen Tiefenhirnstimulation des Nucleus subthalamicus zu untersuchen [62]. Nach der 6-OHDA-Läsion wurde den Tieren der beiden verum-stimulierten Untergruppen das Mikrostimulationssystem

implantiert, bestehend aus einem implantierbaren Impulsgenerator (IPG) und einer monopolaren Semi-Mikroelektrode aus aktiviertem Iridium. Als Verbindung zwischen diesen beiden Elementen diente ein dafür speziell hergestelltes Kabelsystem, in dem auch die Gegenelektrode (Material MP35N Legierung) integriert war. Die Ratten der scheinstimulierten und –implantierten Gruppen erhielten einen Dummy-Stimulator aus Kunststoff, der in Größe und Gewicht dem Verum-Stimulator entsprach. Bei allen Tieren, die eine Elektrode erhielten, wurden nach abgeschlossener 6-OHDA-Läsion zwei Verankerungsschrauben aus Edelstahl an der Schädelkalotte befestigt. Als Referenzpunkte für die Kalibrierung dienten die Interaurallinie in Bezug auf die anteriorposterioren (AP) Koordinate des STN, basierend auf den stereotaktischen Koordinaten des Atlas nach *Paxinos und Watson 1986* (STN von interaural: AP: +5,4 mm) und das Bregma (STN von Bregma: AP: -3,6 mm; ML: 2,5 mm; DV: -7,5 mm). Zwei Referenzpunkte gewähren bei kleinem Target eine möglichst hohe Zielgenauigkeit. Die Kalibrierung der Elektrode erfolgte auf der Interauralposition bei eingespanntem Tier unter Verwendung der AP-Koordinate. Zusammen mit der mediolateralen Bregma-Koordinate wurde an der errechneten Bregma-Position mit Hilfe eines Dentalbohrers ein Bohrloch gesetzt und die Elektrode auf die dorsoventrale Koordinate des STN in Bezug auf das Bregma bzw. Dura vorsichtig abgesenkt. Es folgte die Fixierung der Elektrode an den bereits vorher angebrachten Verankerungsschrauben mit einem Zwei-Komponenten-Kaltpolymerisat (Technovit®5071). Anschließend wurde ein subkutaner Tunnel entlang des Nackens der Ratte gebahnt, durch den das Verbindungssystem zwischen Stimulationselektrode und IPG subkutan verlegt wurde. Vor Verankerung des IPG in einer Subkutanttasche in der linken Flanke des Tieres wurden die beiden Kabelenden mit Silikon wasserdicht verbunden. Im Bereich der Elektrode an der Schädelkalotte wurden Gelaspon-Gelatinschwämme eingesetzt, um die mechanische Irritation der Kopfhaut durch den Technovit-Sockel zu minimieren und die Granulationsbildung zu unterstützen. Sowohl der Verschluss des Subkutangewebes als auch der Haut erfolgte mit Einzelknopfnähten (Subkutannaht mit Vicryl-Faden, Hautnaht mit Resolon-Faden). Als

postoperative Analgesie erhielten die Tiere 100µl Metamizol-Tropfen (Metamizol-Na, ratiopharm, Deutschland) oral. Für alle Tiere begann am ersten Tag nach den operativen Eingriffen ein 19-tägiger Beobachtungszeitraum. Die Ratten der scheinimplantierten Gruppen wurden lediglich beobachtet, während bei den early- und late-onset stimulierten Tieren in Abhängigkeit der Gruppen-Zuteilung die Initiierung der STN-HFS begann. Folgende Stimulationsparameter kamen dabei zum Tragen: alternierende Impulse mit einer Amplitude zwischen 100 und 150 µA (gebunden an die Verhaltenseffekte wie Rotation und Dyskinesien der Ratte, siehe Bergmann et al., 2004) und einer Frequenz von 130 Hz sowie einer Pulsweite von 52 µs. Die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Stimulatoren konnte durch die Ableitung eines artifiziellen Stromsignals durch den Körper des Tieres mit einem 130 Hz-Filter-basierten 2-Kanal-Verstärkers unter Verwendung von EMG-Oberflächenelektroden an zwei Hautstellen realisiert werden. Dazu wurde das aufgenommene Signal mit einem Oszilloskop (4-Channel Oscilloscope, Hewlett Packard, Paolo Alto, California, USA) aufgezeichnet.

2.8. Gehirngewinnung

Vor Dekapitation am 19. postoperativen Tag wurde die biologische Wirkung der Stimulation nachgewiesen, indem die Stimulationsamplitude für wenige Sekunden auf 300 µA gesteigert wurde. Darunter kam es zu typischen Verhaltensauffälligkeiten wie eine kontralaterale Rotation und/ oder einem sog. paw-waving, die als Beweis einer effektiven DBS-Stimulation betrachtet werden konnten. Unmittelbar danach wurden die Stimulationsamplituden wieder auf ihren Ausgangswert heruntergestellt. Die Tiere wurden mit Chloralhydrat (Dosis 500 mg/kg KG in 0,9%-iger NaCl-Lösung) in tiefe Narkose versetzt, es folgte die transkardiale Perfusion mit 4% Paraformaldehyd und im Anschluss die Dekapitation. Danach wurde die Elektrode rasch retrahiert und die der Gehirne freipäpariert, unmittelbar in Stickstoff-gekühltes Isopentan gelagert und dort für 60 Sekunden schockgefroren. Die nachfolgende Aufbewahrung bei -80°C wurde bis zu den weiteren Analysen beibehalten.

2.9. Histologische Aufarbeitung

2.9.1 Orientierungsschnitte und Einschlusskriterien

Zur Dokumentation der Elektrodenposition erfolgte eine Färbung nach *Nissl*, bei der der verwendete Farbstoff Kresylviolett basophile Strukturen wie z.B. die ribonukleinsäurereichen Schollen in Neuronen anfärbt. Die Schnitte wurden zuerst mit destilliertem Wasser gespült und danach für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur in der 0,2% Kresylviolett-Lösung pH 4.0 gefärbt. Nach erneuter Spülung erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (1 min 70%, 2 min 80%, 5 min 96%, 2x 5 min 100%, 2x 5 min Xylol) und abschließendes Eindeckeln mit Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland).

2.9.2 Histologie / Immunzytochemie

2.9.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der Tyrosinhydroxylase

Zur Quantifizierung der Tyrosinhydroxylase mittels DAB-Nickel-Färbung wurden folgende Antikörper verwendet:

	1. Antikörper	2. Antikörper
TH	mouse anti-TH monoclonal (Sigma T-1299) Konzentration 1:10000	anti-mouse IgG biotinylated (Vector BA 9200) Konzentration: 1:200

Tabelle 2: Antikörper der TH-Immunreaktion

Alle Spülvorgänge dieser immunhistochemischen Färbung wurden mit 0,1 M PBS-Pufferlösung durchgeführt. Nach der Kryotomie wurde zunächst eine Aldehydreduktion mit 1% Natriumborhydrid eine Peroxidaseblockung unter Verwendung eines Wasserstoffperoxid (3%)-Methanol (10%)-TBS (0,05 M)-Gemisches durchgeführt. Es

folgte die insgesamt 30-minütige PBS-Spülung, im Anschluss die 60-minütige Vorinkubation mit Ziegen-Normalserum (5% in TBS/ Triton® [Ferak, Berlin]-Gemisch). Die Hirnschnitte bei 8°C für 24 Stunden mit einem polyklonalen Primärantikörper gegen Ratten-Tyrosinhydroxylase (mouse anti-rat TH, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert (Konzentration 1:10000 in TBS und 2%-igen Ziegen-Normalserum). Die Schnitte wurden dann erneut gespült und es erfolgte die Behandlung mit dem biotinierten Zweitantikörper gegen den TH-Antikörper (Vector, Burlingame, USA) (Konzentration 1:200 in TBS). Im Anschluss erfolgte die Vorbehandlung der Präparate mit einem Avidin-Biotin-Komplex (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) und Diamino-Benzidin (0,05% in 0,05M TBS). Die Farbreaktion wurde mittels Zusatz von 0,03%-igem Wasserstoffperoxid gestartet. Nach Beendigung der Farbreaktion, die durch Abpipettieren der Farblösung und durch den Zusatz von PBS erreicht wurde, erfolgte das Aufziehen der frei flottierenden Schnitte auf Objektträger. Der Vorgang endete mit einer Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol und der anschließenden Eindeckelung mit Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland).

2.9.2.2 Stereologische Auswertung der nigralen Serien

Die Auswertung der nigralen Serien wurde mit der Stereo-Investigator-Software durchgeführt. Um Strukturen eines bestimmten Organs oder einer bestimmten Region vollständig und zeitlich effizient dreidimensional quantifizieren zu können, wird das Prinzip der Stereologie seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts genutzt [75]. Durch repräsentative Gewebeschnitte wird unter Berücksichtigung der Schrumpfung des Gewebes durch Dehydrierung und Fixierung die tatsächliche Zellzahl von der o.g. Software berechnet. Ein Nachteil des Verfahrens besteht im "bias" des Untersuchers, der die zu quantifizierenden Strukturen bestimmt. Dieser kann nie ganz vermieden werden, auch wenn wie in dieser Studie, die Auswertung verblindet erfolgt. Zudem können Deformitäten und Artefakte erhöhen nie vollständig ausgeschlossen werden, bzw. in Berechnung einfließen [75]. Die ermittelte Zellzahl wird als "estimated cell number" bezeichnet. Trotz Eliminierung systemischer Fehler kann die ermittelte Zellzahl nicht

exakt der tatsächlichen Anzahl entsprechen.

Jeder achte Schnitt der je Tier zu untersuchenden SNc wurde ausgewertet. Die Dicke eines Schnittes beläuft sich auf 20 µm. So wurden von jedem Tier 12-14 Schnitte stereologisch [62] ausgewertet. Da wie erläutert, Läsion und Stimulation, bzw. Scheinstimulation unilateral erfolgten, wurden je Gehirnhälfte unterschiedliche Verfahren der Auswertung vorgenommen. Auf der nicht-lädierten Seite erfolgte die Zählung mit dem Optical Fractionator der Stereo-Investigator-Software (MicroBrightField). Hierbei werden im Vorfeld die Parameter der Auswertung festgelegt, um eine möglichst genaue Hochrechnung zur realen Zellzahl zu erzielen. Nach einigen Testdurchläufen legten wir die Framegröße auf 80x70 µm fest, die Gridsize („Rastergröße“), d.h. Der Abstand zwischen den Counting Frames („Zählrahmen“) , die über die auszuwertende Fläche gelegt werden, auf 150x150 µm. In den vorherigen Studie wurde ein Frame von 80x60 µm mit einer Gridsize von 200x150 µm in Anlehnung an die Studie von Maesawa et al. [60]. Wir modifizierten die Parameter wie beschrieben, da so der CE (coefficient of error) auf einen Wert von weniger als 0,5 verringert werden konnte. Zuvor wurde die auszuwertende Fläche vom Auswertenden festgelegt. Die Grenzen der SNc pars compacta wurden in jeder Sektion neu festgelegt, da sich derr Verlauf der SNc von rostral von kaudal verändert [76]. Es wurde ein Leica DMRA-Mikroskop, gemeinsam mit einer 3-CCD-Kamera (Hitachi C2OA) zur Übertragung des Bildes benutzt. Zunächst wurde die TH-positiven, mit Nissl, also einem neuronenspezifischen Marker, gegengefärbten Schnitten ausgewertet. Hierbei werden von der Software die Counting Frames („Zählrahmen“) vorgegeben, anhand derer oben und rechts angrenzende, bzw. innerhalb liegende Zellen mit einem Marker versehen und so quantifiziert werden. Außerhalb der linken und unteren Grenze liegende Neurone wurden nicht gezählt. Im Anschluss erfolgt die computerbasierte Hochrechnung auf die reale Zellzahl im Sinne einer “estimated cell number”. Die TH-positiven Neurone stellten sich im Zytoplasma schwarz mit violett gegengefärbtem Hintergrund dar. Zur Ermittlung der realen Zellzahl durch den Optical Fractionator werden drei Formeln benötigt:

1. $V_{SNC} = S * t * b$
2. $V_D = a * t * d$
3. $N = V_{SNC} (n / V_D)$

Formel 1) ergibt das Volumen der gesamten Snc. „S“ steht hierbei für die Summe der SNC-Flächen, „t“ steht für die Schnittdicke, „b“ steht für die Anzahl der ausgewerteten Schnitte zwischen denen, die ausgewertet werden. Wir bemaßen die Schnittdicke mit 8 µm aufgrund von Methodik-bedingter Schrumpfung [62]

Formel 2) gibt das Volumen aller Zählrahmen wider. Dies ist notwendig, um die Zelldichte zu errechnen. Mit „a“ wird die Fläche des Frames bezeichnet (80*70 um=5600 um), „t“ steht für die Schnittdicke und „d“ für die Anzahl der Frames.

Formel 3) errechnet die Anzahl der TH-positiven Neurone der SNC. „n“ ist die Anzahl der Zellen in allen Counting Frames. Dieser Wert geteilt durch das Frame-Volumen ergibt die Zelldichte, die wiederum zur Errechnung der totalen Zellzahl gemeinsam mit dem Snc-Volumen dient.

Bei Auswertung der lädierten, linken Seite kam der Optical Fractionator nicht zum Einsatz. Fläche und Zellzahl der Snc sind auf dieser Seite erwartungsgemäß ausgedünnt. Daher erfolgte die Zählung manuell. Zum Vergleich beider Seiten wurde eine Tabelle erstellt, in der nach demselben Verfahren die absolute Zellzahl, Volumen der Snc etc. errechnet wurde.

2.9.3 Tyrosinhydroxylase-Densitometrie des posterolateralen Striatums

Anhand densitometrischer Messungen der striatalen Tyrosinhydroxylase kann der Effekt der DBS auf die striatale Dopamintransmission abgeleitet werden. Die densitometrischen Messungen wurden mit der MCID Core Digital Analysis Software durchgeführt. Hierbei

wird die „relative optical density“ (ROD), sowie die „integrated optical density“ (DENS) der Zielregionen gemessen. Drei bis sieben Schnitte je Tier wurden verwendet. Die Lichtintensität während der Messung betrug 170 Lux. Die Schnitte wurden einzeln gerade auf dem Densitometertisch platziert, die Kamera so eingestellt, dass der gesamte Schnitt sichtbar und scharf gestellt ist. Messungen erfolgten im Striatum, im Corpus Callosum. Die „integrated optical density“ wird in Graustufen auf einer Intensitätsskala von schwarz = 0 bit bis weiß = 255 bit angegeben. TH wurde bei 12 bit gemessen. Ermittelt wurden, wie erläutert, jeweils ROD, DENS und die Standardabweichung und verglichen. Die Ergebnisse der Analyse wurden in eine Excel-Tabelle konvertiert und die „mean density“ errechnet.

2.10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des substanzinduzierten Rotationsverhaltens nach 6-OHDA-Läsion erfolgte für alle Gruppen im Rahmen einer Varianzanalyse durch einen one way ANOVA Test. Die Auswertung der Ratio der TH-immunreaktiven Zellen in % für alle Gruppen, sowie der Vergleich der totalen TH-positiven Zellzahl und der striatalen TH-Faserdichte erfolgte ebenfalls mit einem one way ANOVA Test. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem nachfolgenden post-hoc Student-Newman-Keuls-Test ermittelt. Alle Ergebnisse sind folgend als Mittelwert mit Standarderror of Mean (=SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Einschlusskriterien

Einschlusskriterien der vorgestellten Studie waren die histologisch überprüfte korrekte Elektrodenposition sowie eine Depletion dopaminerger Neurone der SNc von mindestens 60%.

3.2 Amphetamininduziertes Rotationsverhalten

Entsprechend des 6-OHDA-Parkinsonmodells wurde am Ende des Beobachtungszeitraumes am Tag vor der Tötung erneut das Amphetamininduzierte Rotationsverhalten der jeweiligen Gruppen über 60 min nach intraperitonealer Injektion von 2.725mg/kg Amphetamin getestet. Gezählt wurden die ipsiversiven Rotationen (Umdrehungen pro Minute: U/min). Vergleich prä-OHDA vs. post-OHDA zeigte sich kein gruppeninterner Unterschied. In der STN-naiv-Gruppe wurden $12,866 \pm 1,728$ ipsiversive Rotationen in der Minute gezählt, in der STN-DBS-Gruppe $13,088 \pm 1,628$ und in der Early-stim-Gruppe $13,335 \pm 2,875$.

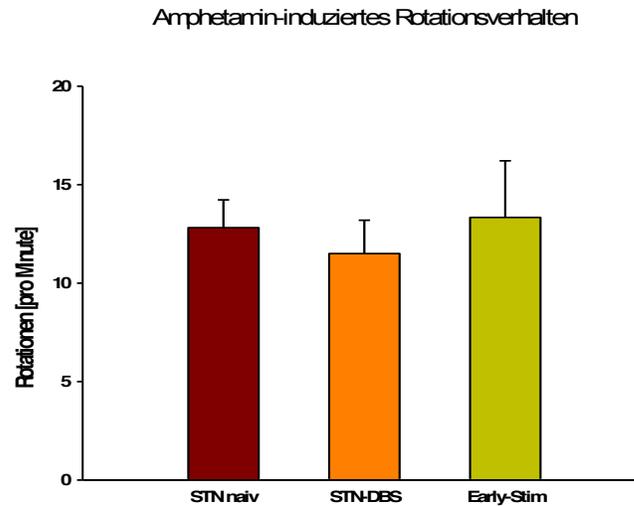


Abb. 7: Anzahl der Amphetamin-induzierten ipsiversiven Nettorotationen, dargestellt als Differenz prä-6-OHDA (entspricht Status vor OP) vs. post-6-OHDA (entspricht Status am Ende des Beobachtungszeitraums) ohne Nachweis gruppeninterner Unterschiede.

3.3. Histologische Auswertung

Es wurden die Tiere für die histologische Aufarbeitung ausgewählt, die entsprechend der klinischen Situation einen neuronalen Zellverlust von mindestens 60% auf der lädierten Seite aufweisen [77]. Es wurde eine Tyrosinhydroxylase-Färbung mit diesen Schnitten durchgeführt. Das Enzym Tyrosinhydroxylase wurde wie beschrieben in den vorhergehenden Studien [62,78] als Markerenzym für neuronale Stoffwechselaktivität und damit dem möglichen Überleben in der Substantia nigra pars compacta herangezogen.

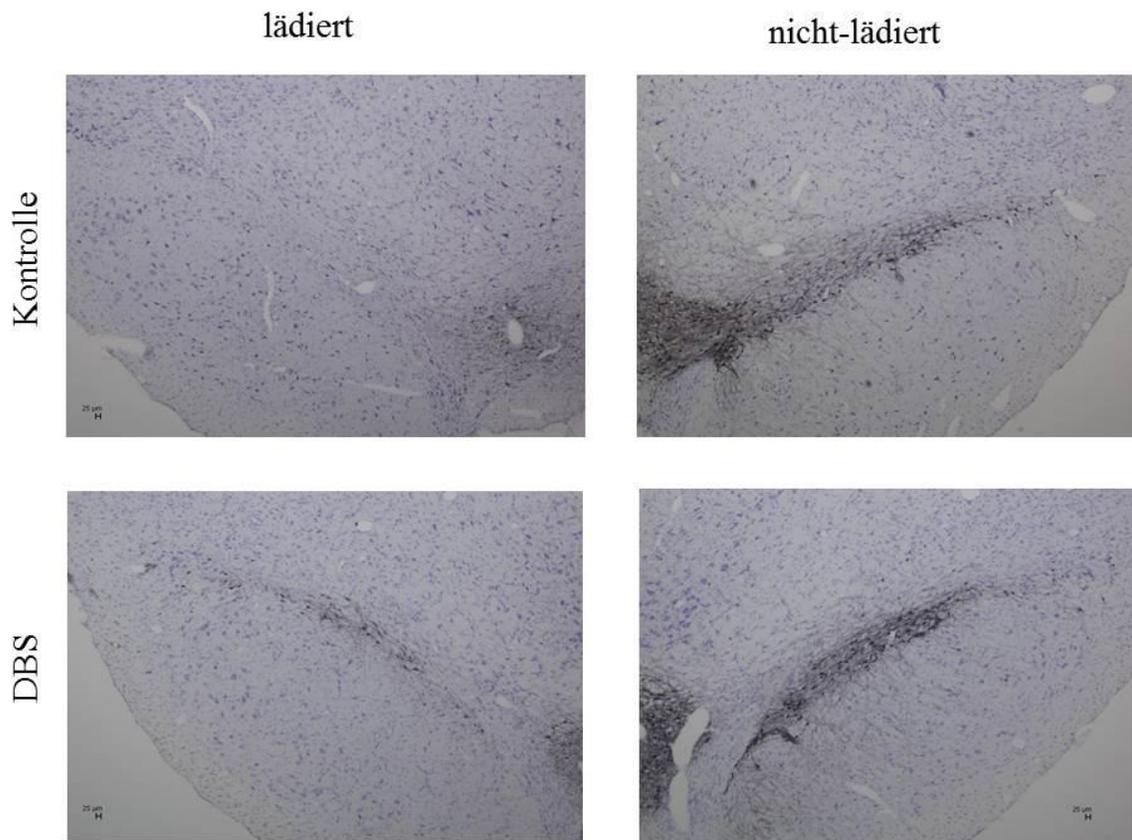


Abb. 8: Tyrosinhydroxylase-immunreaktive Neurone der Snc mit Nissl-Gegenfärbung

3.3.1 Stereologisch basierte Zellzählung Tyrosinhydroxylase-immunreaktiver Neurone der SNc

a) Analyse der Überlebensrate anhand des phänotypischen Markers TH aller Gruppen

Hier wurde der Effekt der STN-DBS auf die Expressionsrate der des phänotypischen Markers TH untersucht. Die Ratio der TH-immunreaktiven dopaminergen Neurone der lädierten Seite zur intakten Seite wurde in allen Gruppen verglichen. Es zeigt sich eine statistisch signifikant erhöhte Ratio in der STN-DBS (31,031% \pm 3,759%) und in der Early-Stim-Gruppe (30,265% \pm 0,901%) verglichen mit der naiven Kontrollgruppe (19,535% \pm 1,970%), $p > 0,05$. Zwischen den beiden Behandlungsgruppen zwigte sich kein Unterschied.

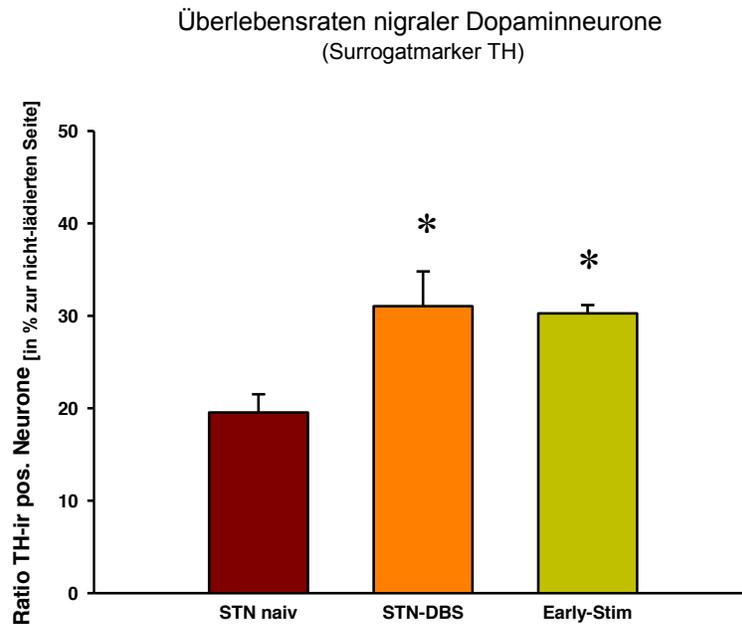


Abb. 9: Anteilsverhältnis isoliert TH-ir positiver nigraler Dopaminneurone in der ipsilateral zur 6-OHDA Läsion gelegenen Substantia nigra compacta (SNc) -ausgedrückt in Prozent zur Gegenseite (kontralaterale SNc)- mit Nachweis signifikant erhöhter *TH-ir Ratios* (*) sowohl in der Gruppe der im Intervall STN-stimulierten (STN-DBS) als auch in der Gruppe der frühzeitig STN-stimulierten (Early-Stim) Ratten im Vergleich zu STN naiven Kontrollen (STN naiv) (* $p < 0.05$). Innerhalb der Behandlungsgruppen (STN-DBS *vs.* Early-Stim) zeigten sich dagegen keine Unterschiede.

b) Vergleich der totalen Anzahl TH-immunreaktiver Zellen aller Gruppen

Sowohl in der Early-Stim- als auch in der STN-DBS-Gruppe ergab die Quantifikation der absoluten Zahlen der isoliert TH-immunreaktiven Neurone der SNc der lädierten Seiten von $4002,000 \pm 247,707$, bzw. $3770,286 \pm 487,681$ eine signifikant erhöhte Anzahl im Vergleich zur totalen Zellzahl der Kontrollgruppe von $2038,667 \pm 220,626$ ($p < 0,05$). Darüber hinaus zeigte sich auf der jeweils nicht lädierten Seite eine signifikante Zellzahl kontralateral zur Stimulation. Diese Unterschiede waren virtuell ersichtlich, nicht aber statistisch signifikant (siehe Abbildung X). Die Spezifizierung einer TH-immunreaktiven Zelle als Neuron basierte auf der Neuronen-spezifischen *Nissl*-Gegenfärbung.

Absolute Zellzahl nigraler TH-ir pos. Dopaminneurone
(lädierte vs. nicht-lädierte Seite)

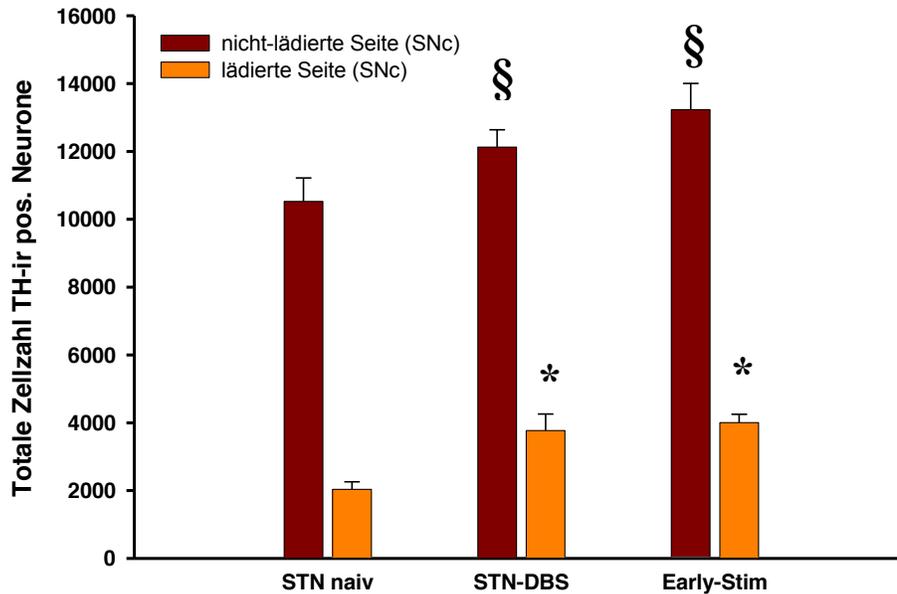


Abb. 10: Absolute Zellzahlen isoliert TH-ir positiver nigraler Dopaminneurone mit Nachweis einer signifikant erhöhten Präservierung des dopaminergen Phänotyps (*) auf der jeweils lädierten Seite in den Gruppen der im Intervall STN-stimulierten (STN-DBS) und der frühzeitig STN-stimulierten (Early-Stim) Ratten im Vergleich zu STN naiven Kontrollen (STN naiv) (* $p < 0.05$). Darüber hinaus zeigte sich bei den STN-stimulierten Tieren (unabhängig vom STN-DBS Paradigma) auch eine signifikant erhöhte Zellzahl TH-ir positiver Neurone (§) in der kontralateral zur 6-OHDA Läsion bzw. STN-DBS gelegenen SNc (§ $p < 0.05$).

3.4. Tyrosinhydroxylase-Densitometrie des dorsolateralen Striatum

Mit der TH-Färbung wurde Stoffwechselaktivität und Vitalität der nigralen Neurone quantifiziert. Der Untergang nigraler Zellen stellt wie erläutert, den Ursprung des Symptomenkomplexes des IPS dar. Ergänzend ist es sinnvoll, Tyrosinhydroxylase-Dichte in den Axonterminalen der nigralen Neurone zu evaluieren (Kupsch et al. 1996). Deshalb wurde mittels Densitometrie die Tyrosinhydroxylase in Striatum und Putamen gemessen. Die striatale TH-Faserdichte in der STN naiv-Gruppe beträgt $0,0762 \pm 0,00853$, in der STN-DBS-Gruppe $0,0983 \pm 0,00778$. In der Early Stim-Gruppe wurde eine weit höhere TH-Dichte von $0,184 \pm 0,0253$ ermittelt. Verglichen mit STN naiv und STN-DBS ist dieser Unterschied statistisch signifikant ($p < 0,05$). Dies kann als Hinweis auf eine erhöhte dopaminerge Transmission im Striatum gewertet werden [78].

Striatale TH-Faserdichte

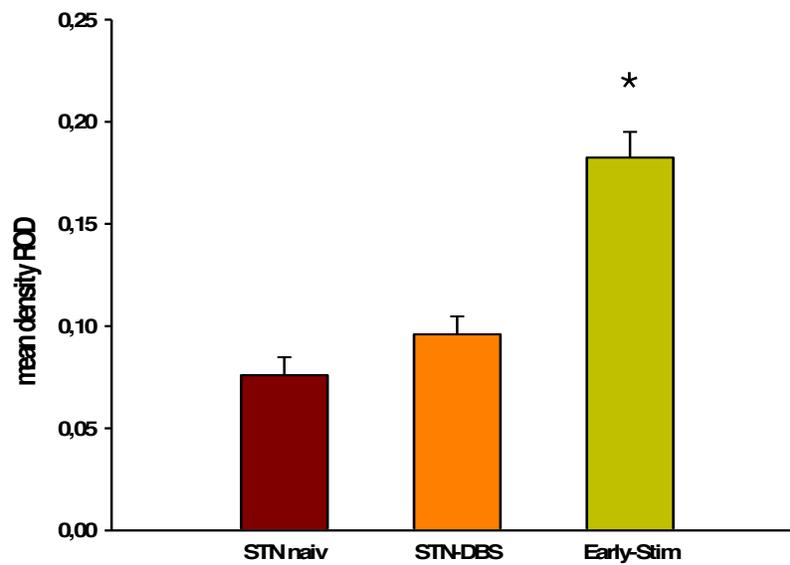


Abb. 11: Densitometrische Analyse der TH-ir positiven Fasern im dorsolateralen Striatum mit Nachweis einer signifikant erhöhten *TH Fiber Density* (*) in der Gruppe der frühzeitig STN-stimulierten Ratten (Early-Stim) im Vergleich zu STN naiven Kontrollen (STN naiv) und im Intervall STN-stimulierten (STN-DBS) Tieren. (* $p < 0,05$).

4. Diskussion

Die vorgestellte Studie zielte darauf ab, mögliche neuroprotektive Auswirkungen zweier unterschiedlicher Paradigmen der STN-DBS in der SNc anhand des Surrogatmarkers Tyrosinhydroxylase und striataler Densitometrie nachzuweisen. Die Auswertung der erhobenen Ergebnisse lässt drei Kernaussagen zu:

1. Unabhängig vom DBS-Paradigma (Early-Stim. vs. STN-DBS) hat die STN-DBS einen neuroprotektiven Effekt auf den nigralen dopaminergen Phänotyp.
2. Eine erhöhte Präservation TH-immunreaktiver Axonterminalen im Striatum nach Early-Stim-DBS.
3. In den Verhaltenstest ließ sich keine funktionelle Korrelation mit den o.g. Ergebnissen nachweisen.

4. 1. Amphetamininduzierte Rotation

Das Rotationsmodell nach Ungerstedt im 6-OHDA-Parkinsonmodell der Ratte ist ein etabliertes Instrument zum intravitalem Nachweis der selektiven Läsion dopaminergener Neurone in der SNc nach unilateraler 6-OHDA-Läsion, wobei insbesondere das Ausmaß der nigralen Läsion bzw. der Dopamindepletion mit der Anzahl der Rotationen korreliert [67]. Durchschnittlich wurden 5 bis 16 Rotationen pro Minute in dieser Studie gemessen. Somit zeigt sich, dass Ausmaß (mindestens 60% nigrale Zelldepletion) in etablierter Weise erfolgt sind. Zwischen der DBS- Kontroll- und Early Stim-Gruppe zeigt sich dabei kein Unterschied. In der Maesawa-Studie, in der formal ebenfalls ein Early-Stim-Paradigma gewählt wurde, konnte nach Stimulation im Rotationstest eine motorische Verbesserung nachgewiesen werden. Da Maesawa bei allen Tieren unmittelbar *post-*

lesionem die Stimulation initiierte, war das Ausmaß der nigralen Läsion gering, bzw. die Präservationsrate in der STN-DBS-Gruppe entsprechend gering. In dieser Studie war die Präservierung TH-immunreaktiver Terminalen nicht mit einer Modulation der Rotation assoziiert. Möglicherweise wurde bei unilateraler Läsion durch die Amphetaminverabreichung ein so genannter “Ceiling-Effekt” erreicht, der keine Differenzierung zwischen den stimulierten Gruppen erlaubt [62]. Tronci et al. untersuchten in einer 2012 veröffentlichten Studie die Korrelation von L-DOPA induzierten Dyskinesien mit Amphetamininduziertem Rotationsverhalten bei 312 6-OHDA-behandelten Ratten. Diese konnte nicht festgestellt werden. Es zeigte sich zudem keine Korrelation zwischen Amphetaminrotation und der Anzahl TH-positiver Zellen in der lädierten Seite der SNc. Die Autoren bewerteten die Amphetaminrotation als schwachen Prädiktor für den Erfolg der 6-OHDA-Läsion [79].

4.2. Verhaltenseffekte nach tiefer Hirnstimulation

In beiden DBS-Gruppen ließen sich repetitive motorische Entäußerungen im Sinne von Kau- und Schmatzbewegungen, Bewegung des Vorderlaufes (s.g. „paw waving“) und kontralaterale Rotationen beobachten. In der Arbeit von Harnack et al. 2004 wurden diese Beobachtungen ausführlich diskutiert [78]. Damals wie heute ist es schwierig, bei nach wie vor spärlicher Dokumentation von post-DBS-Bewegungsmustern diese zu interpretieren und zu evaluieren. 1997 beobachteten Beurrier et al. eine Art Hemiballismus nach STN-HFS bei Affen [80]. Limousin et al. berichtete 1997 von DBS-induzierten Dyskinesien, die von den Stimulationsparametern abhängig waren [81]. Im klinischen Alltag lassen sich vereinzelt Dyskinesien ballistische Bewegungsmuster und Hyperkinesien beobachten [82]. Diese Verhaltenseffekte wurden in dieser Studie jedoch nicht systematisch untersucht, so dass hinsichtlich eines neuroprotektiven Effektes keine Aussage möglich ist.

4.3. Effekte der implantierten Elektrode im umgebenden Gewebe

Inwiefern die Elektrodeninsertion rein mechanisch Einfluss auf die Mechanismen der DBS hat, soll im folgenden erörtert werden. Mikroskopisch zeigten sich keine auffälligen Gewebsveränderungen bis auf einzelne „Zellschrumpfungen“ unmittelbar um die Elektrode. Einschränkend muss erwähnt werden, dass im Rahmen des experimentellen Ansatzes keine Färbung explizit zur Evaluierung einer inflammatorischen Reaktion durchgeführt wurde. In einer 2000 veröffentlichten Studie von Haberler et al. wurden die Gehirne von acht Parkinsonpatienten histologisch untersucht, die DBS für einen Zeitraum bis zu 70 Monaten erhalten haben. Es wurden neben einer milden Gliose keine relevanten Gewebsveränderungen festgestellt [82]. Auch Burbaud et al. stellten 2002 bei einem Patienten postmortal geringe Gewebsverletzung fest und leiteten daraus insgesamt geringe Effekte der Elektrode auf das umgebende Gewebe ab [83]. Hirshler et al. stellten 2010 anhand von [(3)H]PK11195, einem Marker für aktivierte Mikroglia eine Inflammationsreaktion, striatal und nigral, jedoch in größerer Ausbreitung in kortikalen Regionen nach STN-DBS, fest [84]. Zudem zeigten sich nach dem s.g. „Object Recognition Test“ kognitive Defizite auch bei denjenigen Tieren, die ohne Stimulation lediglich eine Elektrode erhalten hatten.

4.4. Nigrale Neuroprotektion und Neuromodulation

In dieser Arbeit sollten mögliche neuroprotektive Effekte der STN-DBS auf dopaminerge nigrale Neurone anhand des Surrogatmarkers TH im nigro-striatalen dopaminergen System untersucht werden. Unsere Ergebnisse, wie auch die der Vorgängerstudie, stützen diese These. In dieser Arbeit ließen sich der Gruppe der chronisch stimulierten Tiere eine Präservierung von 31% TH-positive Zellen in der SNc der lädierten Seite, verglichen mit der intakten Seite, nachweisen. Die akut stimulierte Gruppe wies 30% TH-positive Zellen

auf. In der Kontrollgruppe ließen sich 19% TH-immunreaktive Neurone auf der lädierten Seite quantifizieren. Auch die Quantifizierung der totalen Anzahl der TH-immunreaktiven Neurone zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl auf den lädierten Seiten der stimulierten Tiere. Harnack zeigte 2002 einen signifikanten extrazellulären Anstieg der Dopaminmetabolite DOPAC und HVA nach DBS [85], Meissner konnte 2003 eine erhöhte Aktivität dopaminergener Neurone mit Hinweisen auf eine vermehrte Genexpression dopaminergener Zellen nachweisen [86]. Wie bereits erläutert, zeigten Maesawa et al. 2004 mögliches neuronales Überleben anhand der TH-Quantifizierung von 85% nach akuter Stimulation (siehe oben), die mit dem hier angewendeten Early-Stim-Design vergleichbar ist [60]. In der Maesawa-Studie wurde jedoch im Gegensatz zu dieser Studie monopolar stimuliert. Harnack und Jira konnten 2008 neuronales Zellüberleben anhand des Nachweises von TH von 50% nach chronischer Stimulation zeigen [62]. Auch in dieser Studie konnten Hinweise für protektive Effekte auf dopaminerge Neuronen durch akute und chronische DBS im Vergleich zur Kontrollgruppe objektiviert werden. Hier ist es zum einen sinnvoll, die unterschiedlichen Effekte von akuter und chronischer Stimulation zu betrachten, um letztlich Hinweise für eine Optimierung von Dauer und Stärke der Stimulation in der klinischen Situation ableiten zu können. 2014 wurde eine Studie von He et al. veröffentlicht. Auch hier wurde das 6-OHDA-Parkinsonmodell angewandt und STN-DBS im Hinblick auf die Verbesserung motorischer Symptome und Dopaminfreisetzung im Striatum beleuchtet. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg des extrazellulären Dopamin, sowie eine Induktion der Dopaminfreisetzung im Striatum normal und partial 6-OHDA-lädiertes Ratten. Interessanterweise zeigte sich hier keine erhöhte Anzahl TH-positiver Zellen in der SNc, während die TH-Expression in der SNc signifikant erhöht war verglichen mit der Kontrollgruppe. Dies wurde als Beleg einer gesteigerten striatalen Dopaminfreisetzung durch Modulierung der TH-Expression bei fehlendem neuroprotektiven Effekt auf nigrale dopaminerge Neurone interpretiert [87]. In unserer Studie ließ sich in der DBS-Gruppe ein statistisch signifikanter höherer Anteil TH-

positiver Zellen in der lädierten SNc feststellen. Dies könnte als Hinweis für Neuroprotektion, auch im Kontext mit den Vorgängerstudien, betrachtet werden. In der He-Studie wurden Dauer und Stärke der Stimulation nicht beschrieben, was einen direkten Vergleich erschwert. Dennoch lässt sich nachweisen, dass sich STN-DBS protektiv auf dopaminerge Zellen auswirkt. Betrachtet man nun die Ergebnisse der TH-Quantifizierung (31%) gemeinsam mit der striatalen TH-Densitometrie (16% Early Stim), durch die sich ein erhöhter Dopaminturnover im Striatum nachweisen lässt, so liegt die Annahme nahe, dass STN-DBS eine Induktion der TH zur Folge hat mit vermehrte TH-Immunreaktivität im Striatum bei unverändertem Dopaminmetabolismus. Die Gruppe um Henning et al. Veröffentlichte 2007 eine im Design mit der unseren vergleichbare Studie. Nach der Läsion wurde eine statistisch signifikante Downregulierung von TH-mRNA beobachtet. In der DBS-Gruppe ließ sich ebenfalls eine erhöhte Anzahl TH-positiver Neurone nachweisen. So liegt die Annahme nahe, dass einer DBS-induzierte Upregulation von TH in der SNc eine STN-modulierte Projektion via nigraler Projektionsbahn zugrunde liegt. Diese Ergebnisse stützen sowohl unsere Hypothese des Nachweises nigraler Neuroprotektion durch TH-Quantifizierung, als auch die Hypothese des erhöhten Dopaminmetabolismus durch STN-DBS ermittelt durch die striatale TH-Densitometrie. Weiterhin beobachteten Henning et al. eine Downregulation von Calcium-und Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen Typ IIA und Homer1, welche zu einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Glutamat in den STN-nachgeschalteten Basalganglien führen könnten [88]. Nimmt man also an, dass die Quantifizierung nigraler TH auf der 6-OHDA-lädierten Seite den Nachweis von Neuroprotektion durch DBS erbringen kann, wird diese These durch die Ergebnisse der stimulierten Gruppen gestützt. Denkbar wäre also sowohl ein neuromodulatorischer als auch ein tatsächlich neuroprotektiver Effekt durch DBS. Auf einen möglichen, klinisch nach unilateraler Stimulation beobachteten Effekt der Stimulation auf die kontralaterale Seite weisen auch unsere Ergebnisse hin. Dennoch stellt sich die Frage, ob ein TH-positives Neuron ein tatsächlich vitales Neuron ist. Grundsätzlich besteht die hierbei Möglichkeit, dass es sich

bei der im Zellsoma nachgewiesenen TH lediglich um ein Residuum des Dopaminmetabolismus handelt. In vorangegangenen Studien, besonders bei Maesawa et al. 2004, zeigten sich zwar signifikante Unterschiede zwischen DBS- und Kontrollgruppe, dennoch kann die Aussage, dass es sich bei den quantifizierten TH-positiven Zellen um intakte funktionale nigrale Neurone handelt, nicht einwandfrei getroffen werden. Im Rahmen dieser Studie wird eine ergänzend durchgeführte Quantifizierung der Kolo-kalisation von TH und NeuN in der SNc durchgeführt werden. Hiermit kann ein vitales Neuron exakt spezifiziert. Zudem kann eine Unterscheidung getroffen werden, ob ein 6-OHDA-lädiertes nigrales dopaminerges Neuron nach DBS lediglich residuellen Stoffwechsel betreibt oder tatsächlich vital ist.

4.5. TH-Immunreaktivität

In unserer Studie wurde nach Quantifizierung TH-positiver und damit stoffwechselaktiver Zellen der SNc mittels einer TH-Färbung vorgenommen. Nach wie vor wird die TH-Färbung, wie erläutert, hierzu in zahlreichen Studien verwendet. Jedoch weisen nicht nur Neurone TH-Immunreaktivität auf, sondern auch Gliazellen. Virgone-Calotta et al. zeigten 2013 zeigte eine Modulation von 6-OHDA-lädierten SN-Neuronen durch Gliazellen. Gliazellen und Neurone in der SN interagieren auf besondere Weise miteinander, bis hin zur Penetration von Neuronen durch Gliazellen. Als Resultat zeigte sich, dass es 40% der TH-positiven Neurone gliöse Inklusionen aufwiesen [89]. Es muss zudem erwähnt werden, dass in unserer Studie auch VTA-Neurone TH- immunreaktiv waren, die auf motorische Abläufe keinen Einfluss haben, sondern eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Parkinson-assoziierten Depression spielen [90].

5. Klinische Relevanz

Die Tiefe Hirnstimulation wurde im Laufe der letzten Jahrzehnte zu einer wichtigen Therapieoption des fortgeschrittenen Idiopathischen Parkinsonsyndrom, bzw. M. Parkinson etabliert. Die einzelnen Komponenten der Wirksamkeit wurden, wie zuvor aufgezeigt, in zahlreichen Studien untersucht. Bis heute bleibt der unklar, welche Mechanismen tatsächlich die Symptomverbesserung für den Patienten bewirken. Wie erläutert, bewirkt vor allem die Erregung glutamaterger afferenter Axone des STN die Verbesserung von motorischen Symptomen. Der Vorteil der DBS gegenüber der (stereotaktischen) Subthalamotomie besteht in der Reversibilität des Eingriffs und der Möglichkeit, Stromstärke und Amplitude zu variieren. Der Eingriff als solches ist -wie jede Operation- mit Risiken verbunden. Tiermodelle wie das angewandte 6-OHDA-Läsionsmodell nach Ungerstedt ermöglichen die genaue Untersuchung der Mechanismen dopaminerger Neurodegeneration, sowie neuronaler und klinischer Reaktion auf die DBS. In vielen Vorgängerstudien, wie auch in der hier vorgestellten, lassen sich anhand immunhistologischer Darstellung und Quantifizierung neuroprotektive Effekte ableiten. Welche Mechanismen dies zu Folge haben bleibt weiterhin ungeklärt. Eine Option, die DBS perspektivisch besser und effizienter zu machen, könnte eine s.g. „Coordinated Reset“-Stimulation sein. Dies bedeutet, dass kein durch die Elektrodenkontakte überlappendes Stimulationsfeld erzeugt wird, sondern eines um jeden einzelnen Elektrodenkontakt. Im Tierversuch ließ sich so eine verlängerte Wirkungsdauer der DBS, verglichen mit der bisher verwandten Methode, erzielen [91]. Interessant ist weiterhin die Idee einer „Closed-Loop-Stimulation“. Hier besitzt der Stimulator die Eigenschaft, die lokalen Feldpotentiale des Stimulationsortes zu messen und entsprechend die Stimulation zu modulieren. Auch hier konnten deutlich längere Effekte der DBS aufgezeigt werden [92]. Eine Weiterentwicklung der Stimulationselektroden könnte das perioperative Procedere erleichtern. Beispielsweise mit „Current Steering“-Elektroden, durch die die Stimulation des entsprechenden Targets auch dann gewährleistet wird,

wenn die Elektrode nicht exakt im Zentrum platziert werden konnte [93]. Weitere Studien, die Wirkmechanismen der DBS aufzuklären werden notwendig sein. Hierbei müssen vermehrt Langzeitstudien zum Einsatz kommen, da es viele Untersuchungen zu kurz- und mittelfristigen Veränderungen nach DBS gibt, jedoch kaum zu den Langzeiteffekten, die ja für den Patienten relevant sind. Man muss sich natürlich die Frage stellen, inwieweit sich überhaupt Tiermodelle, die den zeitlichen Verlauf der Parkinsonerkrankung imitieren können, auf die Situation der betroffenen Patienten übertragen lässt. Im Hinblick auf weitere Untersuchungen zur Langzeitstimulation wird das 6-OHDA-Modell sicherlich nicht mehr ohne Weiteres anwendbar sein. Weiterhin sollten vermehrt die Auswirkungen der DBS auf die emotionale Balance der Patienten untersucht werden. Das Verfahren der tiefen Hirnstimulation wird heutzutage längst nicht mehr nur zur Therapie von Bewegungsstörungen angewandt, sondern auch zur Behandlung der therapieresistenten Depression. Weltweit werden weitere Anwendungsmöglichkeiten untersucht, beispielsweise bei Schizophrenie, Autismus und Anorexia nervosa. In dieser Studie konnten neuroprotektive Effekte nach STN-DBS auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Damit wurden die Resultate der Vorgängerstudie bestätigt. In etlichen weiteren Studien der letzten Jahre wurde nigrale Neuroprotektion durch STN-DBS untersucht. Eine doppelimmunhistochemische Färbung zur Kollokalisierung von TH und NeuN zum Nachweis der neuronalen Vitalität durchgeführt. Diese Ergebnisse werden derzeit zur Veröffentlichung komplettiert. In künftigen Studien sollte sowohl die Untersuchung unterschiedlicher Stimulationsparadigmen, als auch weitere immunhistochemische Methoden zum Nachweis nigraler dopaminerger Präservierung im Fokus stehen.

Literaturverzeichnis

1 Goetz CG (2001) History of movement disorders as a neurological specialty: Part 14 of the MDS-sponsored History of Movement Disorders exhibit, Barcelona, June 2000. *Mov Disord.* 16(5):954-9

2 Ehringer H, Hornykiewicz, O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr.* 38:1236-9.

3 Seedat S (2000), Pathological gambling behaviour: emergence secondary to treatment of Parkinson's disease with dopaminergic agents. *Depress Anxiety.* 11(4):185-6.

4 Vriend C (2013), Depression and impulse control disorders in Parkinson's disease: two sides of the same coin? *Neurosci Biobehav* 38:60-71. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.11.001. Epub 2013 Nov 12.

5 De Rijk M (1995), Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology.* 1995 Dec;45(12):2143-6.

6 Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perisinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D (2000), Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. *Italian Longitudinal Study on Aging. Neurology.* 55(9):1358-63.

7 Hornykiewicz, O. (1977) Historical aspects and frontiers of Parkinson's disease research. *Adv Exp Med Biol.*;90:1-20.

8 Ota M, Nakata Y, Ito K, Kamiya K, Ogawa M, Murata M, Obu S, Kunugi H, Sato N (2013) Differential diagnosis tool for parkinsonian syndrome using multiple structural brain measures. *Comput Math Methods Med.* 571289.

9 Sulzer D. (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease.; *Trends Neurosci.* 30(5):244-50.

10 Borgkvist A1, Mosharov EV1, Sulzer D2. (2014) Calcium currents regulate dopamine autoreceptors. *Brain*;137(Pt 8):2113-5.

- 11 Hardy J (2010), Genetic Analysis of Pathways to Parkinson Disease, *J Neuron*; 68(2): 201–20
- 12 Braak H, Rüb U, Del Tredici K (2006) Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 248(1-2):255-8.
- 13 Surmeier DJ. (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*;6(10):933-8.
- 14 Chan CS1, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ.(2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* ;447(7148):1081-6.
- 15 Singer C.(2012) Managing the patient with newly diagnosed Parkinson disease. *Cleve Clin J Med.*;79 Suppl 2:S3-7.
- 16 Fahn S1, Sulzer D. (2004) Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx.*;1(1):139-54.
- 17 Ulusoy A1, Björklund T, Buck K, Kirik D.(2012) Dysregulated dopamine storage increases the vulnerability to α -synuclein in nigral neurons *Neurobiol Dis.*;47(3):367-77.
- 18 Outeiro TF1, Klucken J, Bercury K, Tetzlaff J, Putcha P, Oliveira LM, Quintas A, McLean PJ, Hyman BT. (2009) Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein. *PLoS One.*;4(9):e6906.
- 19 Leong SL1, Cappai R, Barnham KJ, Pham CL. (2009) Modulation of alpha-synuclein aggregation by dopamine: a review. *Neurochem Res.*;34(10):1838-46. doi: 10.1007/s11064-009-9986-8. Epub 2009 May 15.
- 20 Alexander GE, Crutcher MD. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13(7):266-71.
- 21 Langston JW, Ballard PA Jr. (1913) Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med.* 1983 Aug 4;309(5):310.
- 22 Eggert K; Oertel W, Reichmann H, Arnold G, Baas H, Berg D, Deuschl G, Dodel R, Gasser T, Gerlach M, Höglinger G, Jost W, Mehdorn M, Müngersdorf M, Poewe W, Reuther P, Riederer P, Schulz J, Spieker S, Storch A, Tatsch K, Trenkwalder

C, Waldvogel D (2008), Leitlinien: Parkinson-Syndrome – Diagnostik und Therapie <http://www.dgn.org/leitlinien-online-2012/inhalte-nach-kapitel/2346-11-09-2012-parkinson-syndrome-diagnostik-und-therapie.html>

23 Aarons S., Peisah C., Wijeratne C. (2012) Neuropsychiatric effects of Parkinson's disease treatment. *Australas J Ageing*;31(3):198-202.

24 Rascol O1, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE, Abdalla M; 056 Study Group.(2006) Development of dyskinesias in a 5-year trial of ropinirole and L-dopa. *Mov Disord.* 21(11):1844-50.

25 Bormann J. (1989) Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol.*;166(3):591-2.

26 Luginger E1, Wenning GK, Bösch S, Poewe W. (2000) Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 15(5):873-8.

27 RAND RW, STERN WE, ORR JK. (1954) Parkinsonism; early results of occlusion of the anterior choroidal artery. *Calif Med.*;81(4):276-8.

28 Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI. (1992) Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosurg.* 76(1):53-61.

29 Speelman JD1, Bosch DA. (2002) Neurosurgical treatment modalities in Parkinson's disease. *Mov Disord.*;17 Suppl 2:S83-5.

30 Tasker RR. (1998) Deep brain stimulation is preferable to thalamotomy for tremor suppression. *Surg Neurol.*;49(2):145-53; discussion 153-4.

31 Voges J1, Koulousakis A, Sturm V. (2007) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Acta Neurochir Suppl.*;97(Pt 2):171-84.

32 Esselink RA1, de Bie RM, de Haan RJ, Lenders MW, Nijssen PC, van Laar T, Schuurman PR, Bosch DA, Speelman JD. (2009) Long-term superiority of subthalamic nucleus stimulation over pallidotomy in Parkinson disease. *Neurology.* 14;73(2):151-3. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ad536c.

33 Bouchez G1, Sensebé L, Vourc'h P, Garreau L, Bodard S, Rico A, Guilloteau D, Charbord P, Besnard JC, Chalon S.(2008) Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Int.*;52(7):1332-42.

34 Yi BR1, Kim SU, Choi KC.(2013) Development and application of neural stem cells for treating various human neurological diseases in animal models. *Lab Anim Res.* 2013 (3):131-7. doi: 10.5625/lar.2013.29.3.131. Epub 2013 Sep 27.

35 Ebersbach G1, Ebersbach A2, Gandor F2, Wegner B3, Wissel J4, Kupsch A5. (2013) Impact of physical exercise on reaction time in patients with Parkinson's disease-data from the Berlin BIG Study. *Arch Phys Med Rehabil.*;95(5):996-9.

36 Madrazo I, Drucker-Colín R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril JJ.(1987) Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2;316(14):831-4.

37 Lindvall O1, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD, et al.(1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science.* 2;247(4942):574-7.

38 Fahn S. (1992) Fetal-tissue transplants in Parkinson's disease. *N Engl J Med.*;327(22):1589-90.

39 Diederich NJ1, Alesch F. (1997) [Neurosurgical methods in treatment of Parkinson disease. Current status]. *Nervenarzt* ;68(6):466-76.

40 Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol.* 50(1-6):344-6.

41 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 the primate. *Movement Disorders* (6):288-292.

42 Pollak P1, 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 disease. *Rev Neurol (Paris)*. 1993;149(3):175-6.

43 Schuepbach WM1, Rau J, Knudsen K, Volkmann J, Krack P, Timmermann L, Hälbig TD, Hesekamp H, Navarro SM, Meier N, Falk D, Mehdorn M, Paschen S, Maarouf M, Barbe MT, Fink GR, Kupsch A, Gruber D, Schneider GH, Seigneuret E, Kistner A, Chaynes P, Ory-Magne F, Brefel Courbon C, Vesper J, Schnitzler A, Wojtecki L, Houeto JL, Bataille B, Maltête D, Damier P, Raoul S, Sixel-Doering F, Hellwig D, Gharabaghi A, Krüger R, Pinsker MO, Amtage F, Régis JM, Witjas T, Thobois S, Mertens P, Kloss M, Hartmann A, Oertel WH, Post B, Speelman H, Agid Y, Schade-Brittinger C, Deuschl G; EARLYSTIM Study Group. (2013) Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N Engl J Med*. 2013 Feb 14;368(7):610-22

44 Chopra A1, Tye SJ, Lee KH, Sampson S, Matsumoto J, Adams A, Klassen B, Stead M, Fields JA, Frye MA.(2012) Underlying neurobiology and clinical correlates of mania status after subthalamic nucleus deep brain stimulation in Parkinson's disease: a review of the literature. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2012 Winter;24(1):102-10.

45 Herzog J1, Volkmann J, Krack P, Kopper F, Pötter M, Lorenz D, Steinbach M, Klebe S, Hamel W, Schrader B, Weinert D, Müller D, Mehdorn HM, Deuschl G. (2003) Two-year follow-up of subthalamic deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord*. Nov;18(11):1332-7.

46 Schüpbach WM1, Chastan N, Welter ML, Houeto JL, Mesnage V, Bonnet AM, Czernecki V, Maltête D, Hartmann A, Mallet L, Pidoux B, Dormont D, Navarro S, Cornu P, Mallet A, Agid Y. (2005) Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: a 5 year follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Dec;76(12):1640-4.

47 Perestelo-Pérez L1, Rivero-Santana A, Pérez-Ramos J, Serrano-Pérez P, Panetta J, Hilarion P. (2014) Deep brain stimulation in Parkinson's disease: meta-analysis of randomized controlled trials. *JNeurol*. Nov;261(11):2051-60. 2.

48 Follett KA1, Weaver FM, Stern M, Hur K, Harris CL, Luo P, Marks WJ Jr, Rothlind J, Sagher O, Moy C, Pahwa R, Burchiel K, Hogarth P, Lai EC, Duda JE, Holloway K, Samii A, Horn S, Bronstein JM, Stoner G, Starr PA, Simpson R, Baltuch G, De Salles A, Huang GD, Reda DJ; CSP 468 Study Group. (2010) Pallidal versus

subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *Engl J Med.* Jun 3;362(22):2077-91.

49 Potter-Nerger M1, Wenzelburger R, Deuschl G, Volkmann J (2009). Impact of subthalamic stimulation and medication on proximal and distal bradykinesia in Parkinson's disease. *Eur Neurol.* 2009;62(2):114-9.

50 Voges J1, Hilker R, Bötzel K, Kiening KL, Kloss M, Kupsch A, Schnitzler A, Schneider GH, Steude U, Deuschl G, Pinski MO. (2007) Thirty days complication rate following surgery performed for deep-brain-stimulation. *Mov Disord.* Jul 30;22(10):1486-9.

51 Gatev P1, Darbin O, Wichmann T. (2006) Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders. *Mov Disord.* Oct;21(10):1566-77.

52 Giannicola G1, Rosa M, Servello D, Menghetti C, Carrabba G, Pacchetti C, Zangaglia R, Cogliamanian F, Scelzo E, Marceglia S, Rossi L, Priori A. (2012) Subthalamic local field potentials after seven-year deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2012 Oct;237(2):312-7.

53 Carlson JD1, Cleary DR, Cetas JS, Heinricher MM, Burchiel KJ.(2010) Deep brain stimulation does not silence neurons in subthalamic nucleus in Parkinson's patients. *J Neurophysiol.* Feb;103(2):962-7.

54 Dvorzhak A1, Gertler C2, Harnack D2, Grantyn R1. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus leads to presynaptic GABA(B)-dependent depression of subthalamo-nigral afferents. (2013) *PLoS One.* Dec 23;8(12):e82191.

55 Buchanan RJ1, Darrow DP2, Meier KT3, Robinson J4, Schiehser DM5, Glahn DC6, Nadasdy Z7.(2014) Changes in GABA and glutamate concentrations during memory tasks in patients with Parkinson's disease undergoing DBS surgery. *Front Hum Neurosci.* Mar 7;8:81.

56 Meissner W, Harnack D, Paul G, Reum T, Sohr R, Morgenstern R, Kupsch A. (2002) Deep brain stimulation of subthalamic neurons increases striatal dopamine metabolism and induces contralateral circling in freely moving 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett.* 328(2):105-8.

57 Sedláčková S1, Rektorová I, Srovnalová H, Rektor I. (2009) Effect of high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on reaction time, clinical features

and cognitive functions in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm.* Sep;116(9):1093-101.

58 Rosenbaum R1, Zimnik A2, Zheng F3, Turner RS4, Alzheimer C3, Doiron B5, Rubin JE5.(2014) Axonal and synaptic failure suppress the transfer of firing rate oscillations, synchrony and information during high frequency deep brain stimulation. *Neurobiol Dis.* 2014 Feb;62:86-99.

59 Gradinaru V1, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K. (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science.* Apr 17;324(5925):354-9.

60 Maesawa S, Kaneoke Y, Kajita Y, Usui N, Misawa N, Nakayama A, Yoshida J. (2004) Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. *J Neurosurg.* 100(4):679-87.

61 Temel Y1, Visser-Vandewalle V, Kaplan S, Kozan R, Daemen MA, Blokland A, Schmitz C, Steinbusch HW. (2006) Protection of nigral cell death by bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Brain Res.* 20;1120(1):100-5.

62 Harnack D, Meissner W, Jira JA, Winter C, Morgenstern R, Kupsch A (2008), Placebo-controlled chronic high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus preserves dopaminergic nigral neurons in a rat model of progressive Parkinsonism. *Exp Neurol.* 210(1):257-60.

63 Spieles-Engemann AL1, Behbehani MM, Collier TJ, Wohlgenant SL, Steece-Collier K, Paumier K, Daley BF, Gombash S, Madhavan L, Mandylbur GT, Lipton JW, Terpstra BT, Sortwell CE. (2010) Stimulation of the rat subthalamic nucleus is neuroprotective following significant nigral dopamine neuron loss. *Neurobiol Dis.* Jul;39(1):105-15.

64 Shinko A1, Agari T1, Kameda M1, Yasuhara T1, Kondo A1, Tayra JT1, Sato K1, Sasaki T1, Sasada S1, Takeuchi H1, Wakamori T1, Borlongan CV2, Date II. (2014) Spinal cord stimulation exerts neuroprotective effects against experimental Parkinson's disease. *PLoS One.* Jul 10;9(7):e101468.

65 Oiwa Y1, Sanchez-Pernaute R, Harvey-White J, Bankiewicz KS. (2003) Progressive and extensive dopaminergic degeneration induced by convection-enhanced delivery of 6-hydroxydopamine into the rat striatum: a novel rodent model of Parkinson disease. *JNeurosurg.* Jan;98(1):136-44.

- 66 Ungerstedt U. (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 5(1):107-10.
- 67 Ungerstedt U, Arbuthnott G. (1970) Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24:485– 493.
- 68 Jonsson, G., Sachs, C., (1970) Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 9, 141–155.
- 69 Bezard E1, Imbert C, Gross CE.(1998) Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic. *Rev Neurosci.*;9(2):71-90.
- 70 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. *Neuroscience.* 59(2):401-15.
- 71 Kirik D1, Rosenblad C, Björklund A. (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* Aug;152(2):259-77.
- 72 Henchcliffe C1, Beal MF. (2008) Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.* Nov;4(11):600-9.
- 73 Jenner P. (2007) Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.*;83:507-20.
- 74 Meissner W1, Reum T, Paul G, Harnack D, Sohr R, Morgenstern R, Kupsch A.(2001) Striatal dopaminergic metabolism is increased by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neurosci Lett.* May 11;303(3):165-8.
- 75 Müller SA (2008): Prüfung und Etablierung stereologischer Methoden zur Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in experimentellen Tumoren, Berlin, Journal-Nr.: 3270

- 76 Oorschot DE (1996). Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol.* Mar 18;366(4):580-99.
- 77 Double KL1, Halliday GM, McRitchie DA, Reid WG, Hely MA, Morris JG. (1996) Regional brain atrophy in idiopathic parkinson's disease and diffuse Lewy body disease. *Dementia.* Nov-Dec;7(6):304-13.
- 78 Harnack D, Winter C, Meissner W, Reum T, Kupsch A, Morgenstern R. (2004) The effects of electrode material, charge density and stimulation duration on the safety of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats. *J Neurosci Methods.* 138(1-2):207-16.
- 79 Tronci E1, Shin E, Björklund A, Carta M. (2012) Amphetamine-induced rotation and L-DOPA-induced dyskinesia in the rat 6-OHDA model: a correlation study. *Neurosci Res.* Jun;73(2):168-72.
- 80 Beurrier C1, Bezard E, Bioulac B, Gross C.(1997)Subthalamic stimulation elicits hemiballismus in normal monkey. *Neuroreport.* May 6;8(7):1625-9.
- 81 Pollak P1, Benabid AL, Limousin P, Benazzouz A.(1997) Chronic intracerebral stimulation in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 1997;74:213-20.
- 82 Herzog J1, Deuschl G.(2010) [Deep brain stimulation for Parkinson's disease]. *Nervenarzt.* Jun;81(6):669-79.
- 82 Haberler C1, Alesch F, Mazal PR, Pilz P, Jellinger K, Pinter MM, Hainfellner JA, Budka H. (2000) tissue damage by chronic deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* Sep;48(3):372-6
- 83 Burbaud P1, Vital A, Rougier A, Bouillot S, Guehl D, Cuny E, Ferrer X, Lagueny A, Bioulac B.(2002) Minimal tissue damage after stimulation of the motor thalamus in a case of chorea-acanthocytosis. *Neurology.* Dec 24;59(12):1982-4.
- 84 Hirshler YK1, Polat U, Biegon A.(2010) Intracranial electrode implantation produces regional neuroinflammation and memory deficits in rats. *Exp Neurol.* Mar;222(1):42-50.

- 85 Meissner W1, Harnack D, Paul G, Reum T, Sohr R, Morgenstern R, Kupsch A.(2002) Deep brain stimulation of subthalamic neurons increases striatal dopamine metabolism and induces contralateral circling in freely moving 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett.* Aug 9;328(2):105-8.
- 86 Meissner W1, Harnack D, Reese R, Paul G, Reum T, Ansorge M, Kusserow H, Winter C, Morgenstern R, Kupsch A.(2003) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus enhances striatal dopamine release and metabolism in rats. *JNeurochem.* May;85(3):601-9.
- 87 He Z1, Jiang Y2, Xu H3, Jiang H3, Jia W3, Sun P4, Xie J5.(2014) High frequency stimulation of subthalamic nucleus results in behavioral recovery by increasing striatal dopamine release in 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Behav Brain Res.* Apr 15;263:108-14.
- 88 Henning J1, Koczan D, Glass A, Karopka T, Pahnke J, Rolfs A, Benecke R, Gimsa U.(2007) Deep brain stimulation in a rat model modulates TH, CaMKIIa and Homer1 gene expression. *Eur J Neurosci.* Jan;25(1):239-50.
- 89 Virgone-Carlotta A1, Uhlrich J, Akram MN, Ressnikoff D, Chrétien F, Domenget C, Gherardi R, Despars G, Jurdic P, Honnorat J, Nataf S, Touret M.(2013) Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease. *Glia.* Oct;61(10):1645-58.
- 90 Winter C1, von Rumohr A, Mundt A, Petrus D, Klein J, Lee T, Morgenstern R, Kupsch A, Juckel G.(2007) Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behav Brain Res.* Dec 3;184(2):133-41. Epub Jul 7.
- 91 Popovych OV1, Tass PA.Desynchronizing electrical and sensory coordinated reset neuromodulation. (2012) *Front Hum Neurosci.* Mar 20;6:58.
- 92 Rosa M1, Giannicola G, Servello D, Marceglia S, Pacchetti C, Porta M, Sassi M, Scelzo E, Barbieri S, Priori A. (2011) Subthalamic local field beta oscillations during ongoing deep brain stimulation in Parkinson's disease in hyperacute and chronic phases. *Neurosignals.* 19(3):151-62.
- 93 Martens HC1, Toader E, Decré MM, Anderson DJ, Vetter R, Kipke DR, Baker KB, Johnson MD, Vitek JL. (2011) Spatial steering of deep brain stimulation volumes using a novel lead design. *Clin Neurophysiol.* Mar;122(3):558-66.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Regina Rita Schweibold, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung von Neuroprotektion des nigro-striatalen Dopaminsystems nach unmittelbar vs. verzögert initiiertes chronischer tiefer Hirnstimulation des Nucleus subthalamicus im 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 09.12.2014

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte all jenen herzlich danken, die mich bei dieser Arbeit fachlich, technisch und moralisch unterstützt haben.

Herrn Dr. med. Daniel Harnack und Herrn Prof. Dr. med. Andreas Kupsch.

Frau Renate Winter und Frau Christiane Kölske für die großartige technische Unterstützung im Labor.

Herrn Dipl.-Ing. Ingo Przesdzing für die stets freundliche und geduldige Einweisung und Betreuung bei der stereologischen Auswertung im Institut für Experimentelle Neurologie (CCM).

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Carl Walther Kiwit.

Frau Nadja von Prümmer, Herrn Alexander von Prümmer und Frau Dr. rer. nat. Petya Georgieva für die Hilfe bei Formatierung und Bildanordnung.

Frau Dr. med. Julia-Maleen Kronsbein für die wunderbare freundschaftlich-moralische Unterstützung.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für Ohr und Herz.