

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Versuchstiere**

Die  $dt^{sz}$ -Hamstermutante ist eine rekombinierte Sublinie (UGA 700) Syrischer Goldhamster (*Mesocricetus auratus auratus*), die ursprünglich aus der Inzuchtlinie BIO 86.93, von „BIO Research Consultants“ (Cambridge, MA, USA) durch Punktmutation hervorgegangen ist (s. 2.4.3.). Die in den pharmakologischen Versuchen verwendeten weiblichen und männlichen dystonen Hamster wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin gezüchtet.

Die für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten Altersgruppen (31 und >90 Tage) von Kontrolltieren sowie  $dt^{sz}$ -Hamstern wurden ebenfalls im hiesigen Institut für Pharmakologie und Toxikologie gezüchtet. Die als Kontrolltiere verwendeten Syrischen Goldhamster entstammten einer Auszuchtlinie von Lakeview-Hamstern, die ursprünglich aus dem Zentralinstitut für Versuchstierkunde (Hannover/Empelde, BRD) bezogen wurden und in keiner genetischen Verwandtschaft zur  $dt^{sz}$ -Mutante stehen. Die Kontrollhamster und  $dt^{sz}$ -Hamster waren den gleichen Zucht-, Haltungs- und Versuchsbedingungen ausgesetzt.

##### **3.1.2. Haltung und Fütterung**

Das Absetzen der Versuchstiere vom Muttertier erfolgte am 21. Lebenstag. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Hamster wurfweise in Makrolonkäfigen (Normtyp 3) gehalten, bis sie im Alter von etwa 35 Tagen nach dem Geschlecht getrennt und in Gruppen von 2-5 Tieren zusammengesetzt wurden. Die Haltung erfolgte auf Standardeinstreu für Labortiere (Altromin, Fa. Altrogge, Lage, BRD) bei einer Raumtemperatur von 23-25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Das Lichtprogramm war in den Monaten November bis März auf eine Lichtperiode von 5:00 bis 19:00 Uhr, in den Monaten April bis Oktober von 6:00 bis 19:00 Uhr eingestellt. Durch die längere Lichtphase in den Wintermonaten konnten bessere Zuchterfolge erzielt werden. Die Hamster erhielten Wasser und Altromin-Spezial-Diät-Futter (Nr. 7204, Fa. Altrogge, Lage, BRD) mit Zusatz von Sonnenblumenkernen und getrockneten Grünfutterpellets ad libitum.

Tab. 4

Substanz (manipulierter Rezeptor/ Enzym)	Bindungsstelle am Glutamatrezeptor/ Enzym	Dosierungen (/0,5 µl/Hemisphäre)	Lösungsmittel
NBQX (AMPA-Rezeptor)	AMPA-Bindungsstelle (Antagonist)	0,03 µg; 0,08 µg; 0,16 µg; 0,25 µg	0,9% NaCl- Lösung
AP-5 (NMDA-Rezeptor)	NMDA-Bindungsstelle (Antagonist)	0,5 µg; 1,0 µg	0,9% NaCl- Lösung
HA-966 (NMDA-Rezeptor)	Glycin-Bindungsstelle (partieller Agonist)	10 µg; 20 µg	0,9% NaCl- Lösung
MK-801 (NMDA-Rezeptor)	Ionenkanal (Antagonist/Blocker)	4 µg	0,9% NaCl- Lösung
NBQX + AP-5 (AMPA-+ NMDA- Rezeptor)	AMPA- und NMDA-Bindungsstelle (Antagonisten)	0,03 µg (NBQX) + 0,5 µg (AP-5); 0,08 µg (NBQX) + 1 µg (AP-5)	0,9% NaCl- Lösung
7-NI (NOS)	NOS (Inhibitor)	0,1 µg 0,4 µg	5% DMSO 15% DMSO
NPLA (NOS)	NOS (Inhibitor)	2,5 µg; 5 µg; 7,5 µg	0,9% NaCl- Lösung

**Tab. 4:** Verwendete Substanzen mit den entsprechenden Bindungsstellen und Funktionen. Es wurden ein AMPA-Rezeptorantagonist, 3 NMDA-Rezeptorantagonisten, eine Kombination sowie 2 NOS-Inhibitoren eingesetzt. Alle Substanzen wurden am Versuchstag in 0,9%iger NaCl-Lösung bzw. in DMSO gelöst.

### 3.1.3. Verwendete Substanzen

**NBQX**-Di-Natriumsalz, **(+)-HA-966**, **NPLA** und **7-NI** wurden von der Firma Tocris (Bristol, UK) bezogen. Die Substanzen **D(-)-AP-5** und **(+)-MK-801-Hydrogen-Maleat** (Dizozilpin) und das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) stammten von der Firma Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Die 0,9%ige NaCl-Lösung zum Lösen der Substanzen wurde von der Firma Braun (Meisungen, BRD) bezogen. Die verwendeten Substanzen, ihre Bindungsstellen an den Glutamatrezeptoren bzw. an das Enzym NOS, die gewählten Dosierungen, und die entsprechenden Lösungsmittel sind in *Tab. 4* (s.o.) aufgeführt. Das Injektionsvolumen betrug bei allen striatalen Applikationen 0,5 µl/Hemisphäre.

Alle Substanzlösungen wurden jeweils vor Versuchsbeginn angesetzt. Die benötigten Wirkstoffmengen wurden auf einer Feinwaage (Fa Sartorius, Goettingen, BRD) abgewogen und anschließend auf einem Magnetprüher im Vehikel gelöst. Die Dosierungen wurden in Anlehnung an Literaturangaben bei Nagern gewählt, in denen die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen charakteristische Verhaltensänderungen hervorriefen (s. 2.6.1 und 2.6.2).

## **3.2. Methoden**

Zur Untersuchung der Bedeutung des striatalen glutamatergen Systems in der Pathophysiologie der primären Dystonie des  $dt^{sz}$ -Hamsters wurden 2 unterschiedliche Vorgehensweisen gewählt:

- pharmakologische Manipulationen von striatalen Glutamatrezeptoren,
- immunhistochemische Untersuchungen von  $NOS^+$ - Interneuronen, die funktionell eng mit dem glutamatergen System verbunden sind.

### **3.2.1. Pharmakologische Manipulationen von striatalen Glutamatrezeptoren**

Dieser Abschnitt der Arbeit umfaßte folgende Methoden:

- Induktion und Beurteilung der Dystonie bei  $dt^{sz}$ -Hamstern ante operationem,
- striatale bilaterale Implantation der Führungskanülen,
- Mikroinjektionen und Beurteilung der Dystonie bei operierten  $dt^{sz}$ -Hamstern,
- transkardiale Perfusion mit Formaldehyd zur Überprüfung der Lokalisation der Führungskanülen.

#### 3.2.1.1. Induktion und Beurteilung der Dystonie

Die Versuchstiere wurden am Tag des Absetzens vom Muttertier (21. Lebenstag) mit Ohrmarkierungen versehen und erstmals getestet. Vom 21. bis etwa zum 28. Lebenstag wurden sie wiederholt auf ihre Dystonieausprägung untersucht, um  $dt^{sz}$ -Hamster mit reproduzierbaren Dystoniestadien zu selektieren. Die Substanzen wurden in der Lebensphase der maximalen Ausprägung der Dystonie, also i.d.R. zwischen dem 30. und 42. Lebenstag, appliziert (s.u. und 2.4.3.1.).

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte (um Refraktärphasen infolge Erschöpfung vom vorhergehenden Versuchstag zu vermeiden) alle 2-3 Tage und mit Rücksicht auf den zirkadianen Rhythmus der Tiere stets im Zeitraum von 8:30 bis 14:00 Uhr. Um jahreszeitliche Einflüsse so weit wie möglich auszuschließen, fanden die Versuche in einem vom Tageslicht abgeschirmten Raum statt, dessen Beleuchtung die Hamster einer Lichtintensität von 320 bis 480 Lux aussetzte. Die Raumtemperatur betrug 22-26 °C.

Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde 2 Tage vor bzw. nach der eigentlichen Substanzapplikation das Vehikel (i.d.R. 0,9%ige NaCl-Lösung, Ausnahme: 5 bzw. 15%iges DMSO in isotoner NaCl-Lösung) appliziert. Die Vehikelapplikationen bieten einerseits Vergleichswerte für die Wirkung der Substanz und andererseits eine Kontrolle über Schwankungen in der Ausprägung der Dystonie.

Die Auslösung der Dystonie mittels mildem Streß erfolgte durch ein standardisiertes Verfahren, der sog. "triple stimulation technique" (Löscher et al., 1989; Richter und Löscher, 1998). Dieses Prozedere ermöglicht es, die Ausprägung der Dystonie unter vergleichbaren Umständen zu beurteilen. Es besteht aus

1. Herausfangen des Einzeltieres aus dem Gruppenkäfig, Umsetzen in eine Tierwaage, Herausfangen aus der Tierwaage.
2. Fixieren des Tieres und Injektion des Vehikels oder einer Substanzlösung. Die Applikation erfolgte entweder intraperitoneal (Injektionsvolumen 5 ml/kg) oder intrastriatal (0,5 µl/Hemisphäre).
3. Umsetzen des Einzeltieres in einen leeren Makrolonkäfig zur anschließenden dreistündigen Beobachtung.

Der individuell maximal erreichte Schweregrad kann je nach Tier und Alter (s.u.) variieren, i.d.R. wird er jedoch innerhalb von 3 h nach der Streßinduktion erreicht (Richter und Löscher, 1998). Daher wurden die Tiere im Anschluß an die Auslösung der Dystonie durch die „triple stimulation technique“ über 3 h beobachtet.

Wie bereits in Kapitel 2.4.3.1. erwähnt, kann Schlaf den Schweregrad dystoner Attacken mildern. Daher ist es in der dreistündigen Beobachtungszeit notwendig, die Versuchstiere durch taktile Reize, wie z.B. Anstoßen der Flanke mit einem Stift, am Schlafen zu hindern (Richter und Löscher, 1998). Die ermittelten Körpergewichte (KGW), die jeweiligen Injektionszeitpunkte, ungewöhnliche Verhaltensweisen und der Zeitpunkt des Einsetzens der verschiedenen Schweregrade der Dystonie wurden protokolliert.

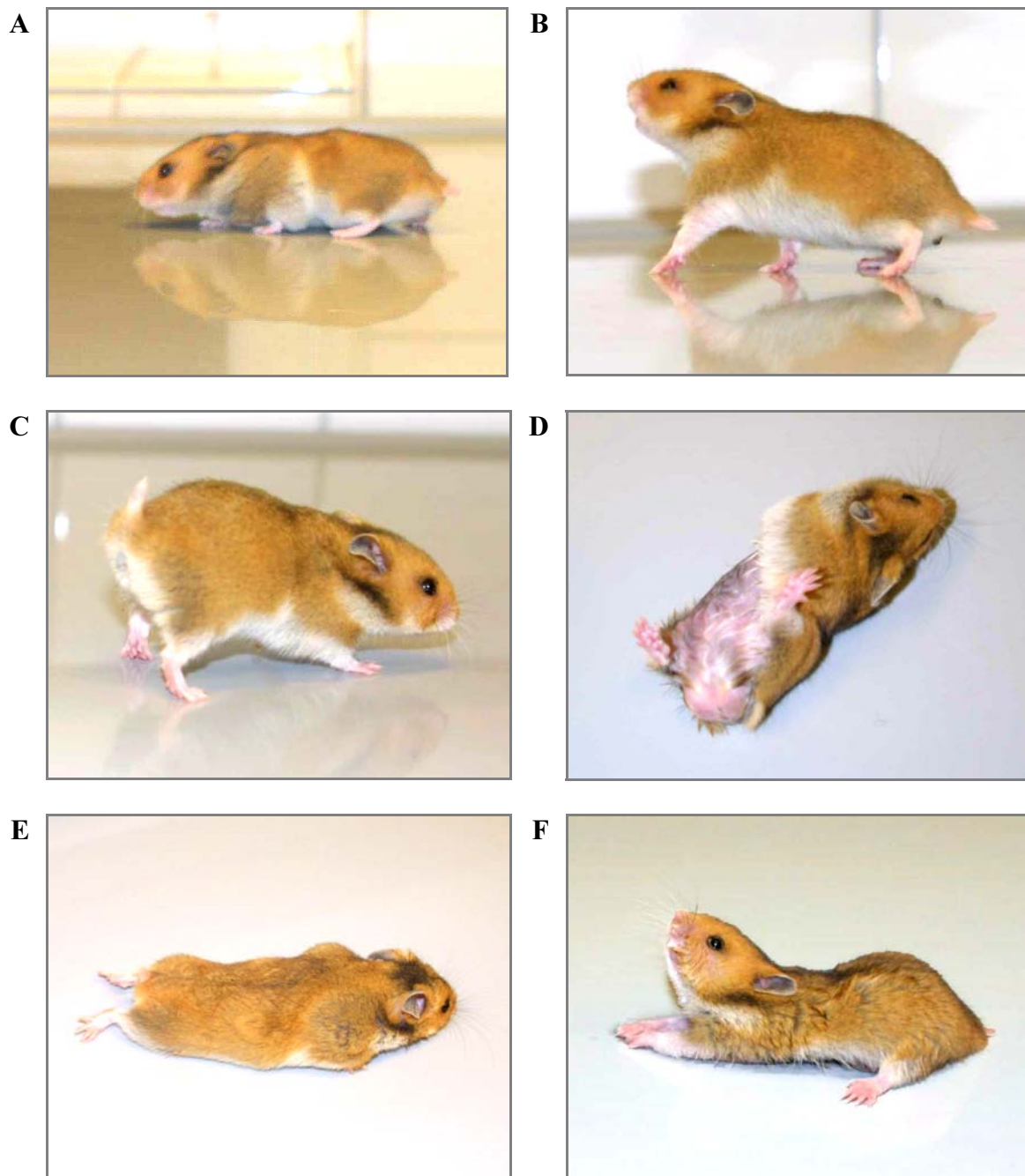
Um die pharmakologische Beeinflussung der Dystonie möglichst objektiv beurteilen zu können, sind die unterschiedlichen Schweregrade eindeutig definiert. Daher erfolgt die Beurteilung der Dystonie nach einem etablierten Score-System mit 6 Stadien (Richter und Löscher, 1998).

Die Stadien lassen sich im einzelnen wie folgt charakterisieren (zur Symptomatik s. auch Abb. 7):

- **Stadium 1:** Die Tiere zeigen stark angelegte Ohren sowie eine abgeflachte Körperhaltung beim Laufen.
- **Stadium 2:** Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch ein verzögertes Aufsetzen der Vordergliedmaßen während des Laufens. Die Tiere richten sich häufig auf („Rearing“), zeigen dabei teils abnorme Bewegungen der Vorderextremitäten und bilaterale Verzerrungen der Gesichtsmuskulatur mit freigelegten Schneidezähne („Grimassieren“).
- **Stadium 3:** Als Folge einer Erhöhung des Muskeltonus zeigt sich eine Hyperextension der Hintergliedmaßen mit einem bizarren Gang, bei dem die Tiere nur mit den vorderen Zehngliedern aufsetzen.
- **Stadium 4:** In diesem Stadium ist auch der Rumpf von den starken Muskelkontraktionen betroffen. Die Tiere verlieren infolge schraubenartiger Bewegungen das Gleichgewicht und kippen zur Seite oder vornüber.
- **Stadium 5:** Die Hamster können sich aufgrund tonisch nach kaudal gestreckter Hinterextremitäten nur mühsam über die Vordergliedmaßen fortbewegen.
- **Stadium 6:** Die Tiere zeigen eine sitzende Haltung mit nach kranial gestreckten Vorder- und Hinterextremitäten, einen versteiften nach oben gerichteten Schwanz sowie eine Immobilität. Windende Halsbewegungen und Opisthotonus können kombiniert mit rötlicher Tränenflüssigkeit, Salivation und einem abwechselnden Anheben der Vordergliedmaßen auftreten.

Der Zeitraum bis zum Auftreten eindeutiger dystoner Bewegungsstörungen (Stadium 2) wird als „Latency to onset“ (kurz: Latency on) und der bis zum Erreichen des Stadium 6 als „Latency to maximum“ (kurz: Latency max) bezeichnet. Diese Zeiträume können als weitere Kriterien zur Beurteilung der antidystonen Eigenschaften einer Substanz herangezogen werden, da sie genauere Rückschlüsse auf die Progression der Dystonie erlauben (Fredow und Löscher, 1991; Löscher et al., 1989; Richter und Löscher, 1998).

Abb. 7



**Abb. 7:** Dystone Bewegungen und Haltungen bei  $dt^{sz}$ -Hamstern nach der Streßinduktion durch die „triple stimulation technique“ (s. 3.2.1.1.). **A** zeigt den Hamster im Stadium 1 mit abgeflachter Körperhaltung und angelegten Ohren. Im Stadium 2 (**B**) sind das sog. Grimassieren und „Stehschritt-artige“ Bewegungen der Vordergliedmaßen mit einem zögernden Aufsetzen zu beobachten. **C** zeigt den für das Stadium 3 charakteristischen Gang mit versteiften Hintergliedmaßen und vorwiegend auf den letzten Zehngliedern. Das Stadium 4 (**D**) ist gekennzeichnet durch schraubenartige Bewegungen des Rumpfes. Im Stadium 5 (**E**) sind die Hintergliedmaßen nach kaudal gestreckt. **F** zeigt einen  $dt^{sz}$ -Hamster im Stadium 6, gekennzeichnet durch Immobilität mit nach kranial gestreckten Vorder- und Hinterextremitäten, Opisthotonus und einer verstärkten Salivation.

Die Hamster durchlaufen unter Einhaltung der Reihenfolge nicht immer alle Stadien. So können zum Erreichen des maximalen Schweregrades auch Stadien „übersprungen“ werden, und eine Erholung, d.h. eine Reduktion des Schweregrades innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 3 h, ist bei einer durchschnittliche Dauer dystoner Attacken von 2-5 h ebenfalls möglich (Richter und Löscher, 1998).

Wie bereits erwähnt (s. 2.4.3.1.), konnte in früheren Studien ein altersabhängiger Verlauf der dystonen Bewegungsstörungen bei der  $dt^{sz}$ -Hamstermutante nachgewiesen werden (Löscher et al., 1995). Ab dem 16. Lebenstag sind spontan auftretende dystone Attacken zu beobachten, die ca. zwischen dem 30. und 42. Lebenstag einen maximalen Schweregrad erreichen. Dieser auch als MAX-Phase bezeichnete Zeitraum ist geeignet, um Substanzen auf ihre antidystone Wirkung zu testen. Nach dem 42. Lebenstag nimmt der Schweregrad bis zur Spontanremission kontinuierlich ab, so daß im Alter von 70 Tagen keine dystonen Bewegungsstörungen durch Streß auslösbar sind (Richter und Löscher, 1998). Die für die vorliegende Dissertation durchgeführten Untersuchungen fanden in der MAX-Phase statt, da aufgrund früherer Untersuchungen mit systemischen Gaben von Glutamatrezeptor-antagonisten (s. 2.4.3.4.) eine antidystone Wirkung der Substanzen vermutet wurde.

Die Beurteilung der Hyper- und Hypolokomotion erfolgte ebenfalls nach einem Score-System (Löscher und Hönack, 1992). Dazu wurde initial ein taktile Reiz gesetzt. Zeigte das untersuchte Tier anschließend nur kurzzeitig eine Bewegung, lag keine Hyperlokomotion vor (Score 0). Die Tiere zeigten eine geringgradige Hyperlokomotion (Score 1), wenn nach diesem Reiz eine verstärkte Bewegung auftrat, die jedoch von Ruhepausen unterbrochen wurde. Waren diese Ruhepausen nur sehr kurz, handelte es sich um eine mittelgradige Hyperlokomotion (Score 2). Bei einer hochgradigen Hyperlokomotion (Score 3) bewegten sich die Hamster ohne Unterbrechungen. Tiere mit einer geringgradigen Hypolokomotion bewegten sich nach dem taktilen Reiz bis zur nächsten Ecke des Makrolonkäfigs. Lag eine mittelgradige Hypolokomotion vor, so gingen sie nur wenige Schritte. Bei einer hochgradigen Hypolokomotion blieben die Tiere sitzen.

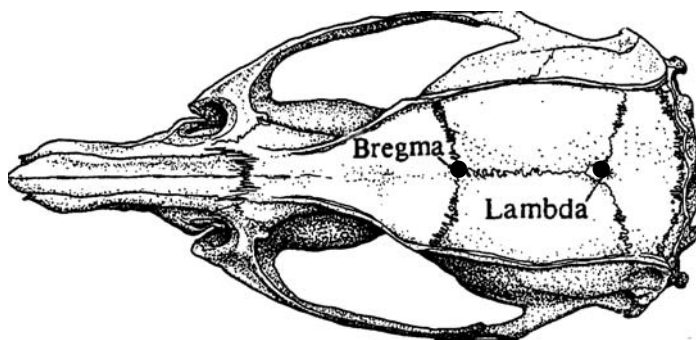
### 3.2.1.2. Stereotaktische Implantation der Führungskanülen

Den Versuchstieren wurden im Alter von 28-32 Tagen die Führungskanülen für die bilateralen striatalen Mikroinjektionen chronisch implantiert. Für die Narkose wurde den Tieren 70 mg/kg KGW Pentobarbital (Fa. Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) mit einem

Injektionsvolumen von 5 ml/kg KGW intraperitoneal verabreicht.

Die Operation basiert auf der Methode von Paxinos und Watson (1986). Nach der Rasur der Kopfbehaarung im Bereich des Operationfeldes wurden die Hamster mittels zweier metallischer Stifte in den äußeren Gehörgängen und einer Fixierung des Oberkiefers in eine stereotaktische Apparatur (Fa. TSE, Bad Homburg, BRD) eingespannt. Zur Desinfektion des Operationsfeldes diente 70%iges Ethanol.

**Abb. 8**



**Abb. 8:** Schädel einer Ratte mit den eingezeichneten Knochenplatten (nach Paxinos und Watson, 1986). Gekennzeichnet sind die Kreuzungspunkte der Knochennähte Bregma und die Sutura Lamboidea (Lambda). Diese Punkte dienen bei der stereotaktischen Operation der Orientierung bei der dorso-ventralen Ausrichtung des Schädels und für die Lokalisation der Führungskanülen.

Anschließend wurden die Kopfhaut und die Unterhaut über der Medianen mit einem Skalpell 2 cm eröffnet. Die Schädeldecke wurde durch stumpfe Präparation freigelegt, das Periost mittels Skalpell abgelöst und der Knochen durch Benetzung mit 30%igem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) desinfiziert und geblichen. Hierdurch traten die Kreuzungspunkte der bindegewebigen Knochennähte, die Sutura lamboidea (Lambda) und Bregma (s. Abb. 8), besser zum Vorschein und konnten auf die gleiche Höhe ausgerichtet werden.

Danach wurden die Trepanationsstellen für die chronische Implantation beider Führungskanülen markiert. Die Wahl der Koordinaten erfolgte in Anlehnung an frühere Untersuchungen zu striatalen Effekten dopaminerger und GABAerger Substanzen (Hamann und Richter, 2002; Rehders et al., 2000) und nach der Durchführung eigener Vorversuche: 1,5 mm anterior und 2,3 mm lateral zu Bregma. Die Trepanationsstellen für die Aufnahme von 3 Halteschrauben wurden ebenfalls markiert und anschließend mit den anderen Markierungen ausgebohrt (Bohrer: Dremel, Breda, Niederlande).

Die Halteschrauben wurden eingedreht, die rechte und die linke Führungskanüle (Länge: 12,2 mm, äußerer Durchmesser: 0,70 mm, innerer Durchmesser: 0,45 mm) auf 2,7 mm ventral von Bregma abgesenkt und mit dem Kunststoff-Kaltpolymerisat Paladur® (Fa. Heraeus, Hanau, BRD) zusammen mit den Halteschrauben an der Schädeldecke fixiert. Die Kopfhaut wurde



rostral und kaudal des Paladur®-Aufbaus durch Einzelhefte adaptiert.

Um eine Verlegung des Kanals der Führungskanülen sowie eine Verunreinigung mit Einstreu zu vermeiden, wurden nach Aushärtung des Kunststoff-Kaltpolymerates Mandrins eingesetzt. Nach Beendigung der Operation verblieben die Tiere bis zum Erwachen unter Beobachtung auf einer Wärmematte.

### 3.2.1.3. Mikroinjektionstechnik

Im Anschluß an das Absetzen der Hamster vom Muttertier mit dem 21. Lebenstag wurden alle 2-3 Tage durch Streß dystone Attacken ausgelöst (s. 3.2.1.1.), bis konstante Schweregrade erreicht waren. Zwischen dem 28. und 32. Lebenstag wurden die Führungskanülen für die Injektionen chronisch bilateral direkt in das dorsale Striatum implantiert (s. 3.2.1.2.). Anschließend wurden bei den Hamstern nach einer postoperativen Rekonvaleszenzzeit von mindestens 2 Tagen erneut alle 2-3 Tage die dystonen Bewegungsstörungen ausgelöst.

Die pharmakologischen Untersuchungen erfolgten ab dem zweiten Testtag post operationem. Hierfür wurde den Tieren in der Vehikelkontrolle das Vehikel (NaCl-Lösung bzw. 5%iges DMSO) direkt in das dorsale Striatum appliziert. Diese Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an die „triple stimulation technique“, d.h. die Tiere wurden zuerst aus dem Käfig gefangen, anschließend in einer Tierwaage gewogen und nach dem erneuten Herausfangen mit einer Hand fixiert, um die Mandrins zu entfernen. Anschließend konnten die Injektionskanülen eingesetzt und der Hamster in einen leeren Makrolonkäfig gesetzt werden. Die Injektionskanülen hatten einen äußeren Durchmesser von 0,40 mm, einen inneren Durchmesser von 0,20 mm und eine Länge von 13,2 mm, so daß sie nach dem Einführen in die Führungskanülen dieselben um einen mm überragten.

Wie aus der Abb. 9 ersichtlich, waren sie über einen durchsichtigen Mikrotubus aus flexiblem Plastik der Firma CMA (Solna, Schweden) mit jeweils einer Hamilton-Spritze (Bonaduz, Schweiz) mit einem Fassungsvermögen von 0,5 µl verbunden. In diesen Plastik-Schläuchen wurde (durch 2 Luftblasen getrennt vom Vehikel bzw. der Substanz) eine Farbstofflösung (Thionin) aufgezogen. Durch die Bewegung der Thioninlösung im Schlauch während der Injektion konnte die applizierte Menge kontrolliert werden.

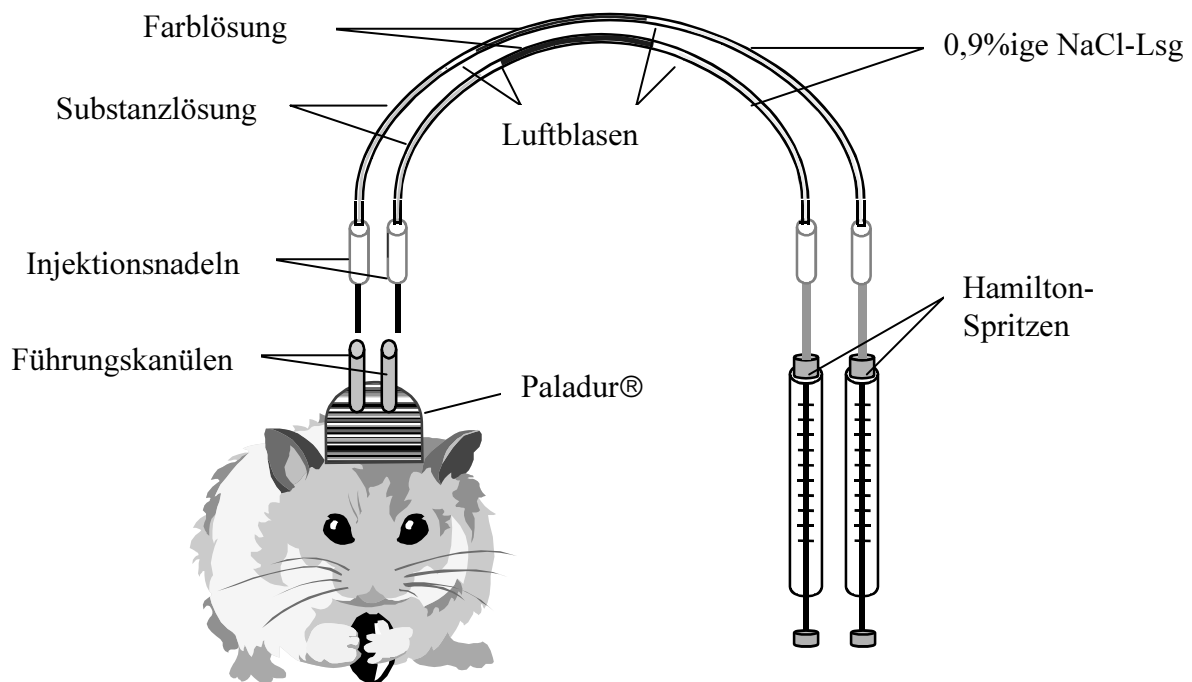
Die Tiere konnten sich anschließend frei im Käfig bewegen. Das Injektionsvolumen von 0,5 µl wurde über einen Zeitraum von 5 min (0,1 µl/min) bilateral appliziert in Analogie zu früheren Studien bei der *dt<sup>sz</sup>*-Mutante (Hamann und Richter, 2002; Rehders et al., 2000). In

den folgenden 5 min verblieben die Injektionskanülen in den Führungskanülen, um ein vollständiges Diffundieren der Vehikel-/bzw. Substanzlösung in das umgebene Gewebe zu gewährleisten.

Anschließend wurden die Hamster fixiert, die Injektionskanülen entfernt und die Mandrins wieder eingesetzt. Die Beobachtung der Versuchstiere erfolgte über 3 h, in denen Stadien, Latenzzeiten und Verhaltensauffälligkeiten protokolliert wurden. Die Vorgehensweise wurde an den darauf folgenden Testtagen erst mit der Substanzlösung und dann erneut mit dem Vehikel durchgeführt.

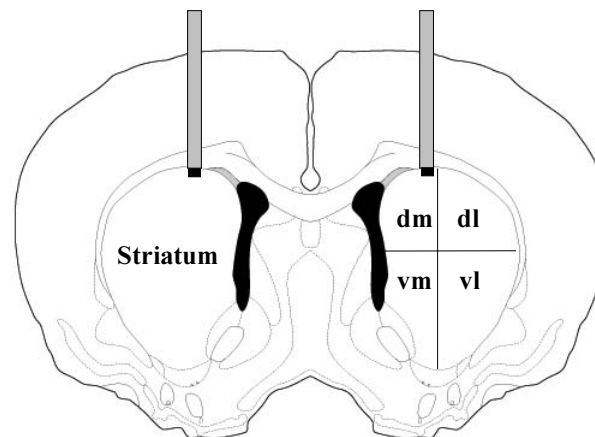
An denselben Tieren wurden 1-3 Substanzapplikationen vorgenommen, zwischen denen jeweils ein Zeitraum von 4-5 Tagen lag. Im Anschluß an die Versuchsreihe wurden die Hamster perfundiert und die Lokalisation der Führungskanülen überprüft (s. 3.2.1.4.). In die Auswertung sind nur Tiere einbezogen worden, deren Führungskanülen im dorsalen Bereich des Striatums lokalisiert waren (s. Abb. 10).

**Abb. 9**



**Abb. 9:** Aufbau des Systems für die Mikroinjektionen. Über Plastikschläuche sind 2 Hamilton-Spritzen (Fassungsvolumen = Injektionsvolumen = 0,5 µl) mit den Injektionsnadeln verbunden. Zwischen Substanz- bzw. Vehikellösung und der NaCl- Lösung ist eine durch Luftblasen separierte Farblösung aufgezogen, die eine kontrollierte Applikation ermöglicht. Die Injektionsnadeln (Länge 13,2 mm) wurden in die Führungskanülen (Länge: 12,2 mm) der Hamster eingesetzt und nach 1 min erfolgte die Applikation der Substanz-/bzw. Vehikellösung über einen Zeitraum von 5 min (0,1 µl/min). Die Injektionsnadeln verweilten anschließend für weitere 5 min in den Führungskanülen.

**Abb. 10**



**Abb. 10:** Transversalschnitt eines Hamstergehirns in der Ebene +1,5 mm relativ zu Bregma (aus Morin und Wood, 2001) mit Lokalisation der chronisch implantierten Führungskanülen (graue Stifte) und eingesetzten Injektionskanülen (schwarze „Spitzen“). In die statistische Auswertung kamen nur Tiere, bei denen die korrekte Lokalisation nachgewiesen werden konnte. Desweiteren ist die Unterteilung des mittleren Gehirnbereiches (+1,9-0,2 mm relativ zu Bregma) in das dorsomediale (dm), dorsolaterale (dl), ventromediale (vm) und ventrolaterale (vl) Striatum dargestellt.

Die verwendeten Substanzen und Dosierungen sind der *Tab. 5* zu entnehmen. Für die Mikroinjektionen wurden insgesamt 108 *dt<sup>sz</sup>*-Hamster verwendet.

#### 3.2.1.4. Perfusion und histologische Untersuchungen zur Lokalisation der Führungskanülen

Um die Lokalisation der Führungskanülen überprüfen zu können, mußten von den Gehirnen der Versuchstiere histologische Schnitte angefertigt werden.

Nach Versuchsende wurden die Hamster mit Pentobarbital (100 mg/kg KGW i.p.) in tiefe Narkose gelegt. Zeigten sie eine flache Atmung und keine Tiefensensibilität mehr, wurden sie in gestreckter Haltung auf dem Rücken liegend fixiert. Nach Eröffnung der Brusthöhle mit einer Schere erfolgte die Punktion des linken Herzventrikels mit einer Knopfkanüle, welche dann mit einer Klemme fixiert wurde. Anschließend fand die Eröffnung des rechten Herzohres statt. Die Knopfkanüle war über ein Schlauchsystem und einen Drei-Wege-Hahn mit 2 Behältern verbunden, welche jeweils Fixanslösung (phosphatgepuffertes 4%iges Formaldehyd) bzw. 0,01 M phosphatgepufferte NaCl-Lösung (Herstellung s. Anhang, Tab. 1) enthielten. Um die Bildung von Blutkoagula zu vermeiden, wurde erst eine Spülung mit

NaCl-Lösung (pro Tier ca. 80 ml) vorgenommen. Anschließend erfolgte mit etwa 100 ml die Perfusion.

Zur Vermeidung von Gewebeschädigungen wurden die Gehirne nach der Entnahme für 24-48 h in einer 30%igen phosphatgepufferten Zuckerlösung aufbewahrt, bevor mit dem Gefriermikrotom (Fa. MICROM, Walldorf, BRD) 40 µm dicke Transversalschnitte angefertigt wurden. Nach Auffangen der Schnitte in 0,1 M Phosphatpuffer folgte das Aufziehen mit einer Gelatinelösung (Herstellung s. Anhang, Tab. 1) auf entfettete Objektträger. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Thionin gefärbt (Herstellung und Färbeprotokoll s. Anhang Tab. 1 und 2) und mit Entellan® (Merck, Darmstadt, BRD) eingedeckt.

Die Lokalisation der Führungskanülen konnte anschließend mit Hilfe des stereotaktischen Atlas für das Hamstergehirn (Morin und Wood, 2001) unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena, BRD) bei 25-facher Vergrößerung beurteilt werden.

### **3.2.2. Immunhistochemische Markierung und Bestimmung der Dichte striataler NOS<sup>+</sup>-Interneurone**

Bei der Markierung der striatalen NOS<sup>+</sup>-Interneurone und deren Auszählung wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Perfusion der *dt<sup>sz</sup>*-Hamster und der Kontrolltiere (s. 3.2.2.1.),
- Aufbereitung der Gehirne und Anfertigung der Schnitte (s. 3.2.2.1.),
- immunhistochemische Markierung (s. 3.2.2.1.),
- Auszählung der NOS<sup>+</sup>-Interneurone mittels der Bildanalyse (s. 3.2.2.2.).

#### 3.2.2.1. Stickoxidsynthetase (NOS)-Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden jeweils 8 (MAX-Phase, Alter: 31 Tage) bzw. 7 (nach Spontanremission, Alter >90 Tage) männliche und weibliche *dt<sup>sz</sup>*-Hamster und gleichaltrige Kontrolltiere verwendet (Geschlecht, Geburtsdatum und Tiergruppen s. Anhang Tab. 23). Alle Hamster wurden mit dem 21. Lebenstag vom Muttertier abgesetzt und nach der Streßinduktion durch die „triple stimulation technique“ über einen Zeitraum von 3 h beobachtet. Am 30. Lebenstag erfolgte eine Wiederholung dieser Untersuchungen. An beiden Testtagen entwickelten die *dt<sup>sz</sup>*-Hamster schwere dystone Bewegungsstörungen, während die

Kontrolltiere, wie erwartet, keine Symptome zeigten. Am 80. Lebenstag traten auch bei den *dt<sup>sz</sup>*-Hamstern, die für die Untersuchungen nach der Spontanremission verwendet wurden, keine Dystonien mehr auf.

Am 31. Lebenstag bzw. zwischen dem 92. und 98. Lebenstag wurden die Hamster transkardiell erst mit 0,01 M phosphatgepufferter NaCl-Lösung und anschließend mit 4%igem Paraformaldehyd perfundiert (Herstellung s. Anhang, Tab. 1; Methode s. 3.2.1.4.). Die Gehirne wurden entnommen und in Anlehnung an frühere Studien (Nobrega et al., 1999) über Nacht in 4%igem phosphatgepuffertem Paraformaldehyd aufbewahrt, um eine gleichmäßige Fixierung des Gehirngewebes und somit eine homogene Markierung der Neurone bei der anschließenden Immunhistochemie gewährleisten zu können. Anschließend erfolgte eine Aufbewahrung in einer 30%igen phosphatgepufferten Zuckerlösung bei 4 °C über einen Zeitraum von mindestens 2 Tagen.

Von den Gehirnen wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Fa. MICROM, Walldorf, BRD) jeweils 40 µm dicke Transversalschnitte in 3 Serien angefertigt: eine Serie wurde für vergleichende Untersuchungen mit Thionin gefärbt (Färbeprotokoll s. Anhang Tab. 2). Die anderen beiden Serien waren jeweils für die Markierung Calretinin-reaktiver Interneurone (nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertation) sowie der NOS<sup>+</sup>-Interneurone vorgesehen. Die Anfertigung erfolgte von der Ebene 2,9 mm bis -5,4 mm relativ zu Bregma.

Die immunhistochemische Markierung von NOS-haltigen Zellen erfolgte zur Übersicht in folgenden Schritten:

- Inkubation der Schnitte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,
- Inkubation mit einer „Blocking“-Lösung zur Reduktion unspezifischer Markierungen,
- Inkubation mit dem primären Ak (bindet direkt an die nNOS),
- Inkubation mit dem sekundären Ak (bindet an den primären Ak),
- Inkubation mit dem Enzym Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (setzt die Farbreaktion um),
- Vorinkubation mit DAB (Farbreagenz),
- Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Substrat für die Meerrettich-Peroxidase: DAB wird umgesetzt und sichtbar).

Nach dem Anfertigen der Gehirnschnitte wurden diese in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen (pH 7,4) und anschließend 3-mal in TRIS-gepufferter isotoner NaCl-Lösung (TBS=tris-buffered saline; pH 7,6; Herstellung s. Anhang Tab. 1) für 10 min gewaschen. Diese „Reinigung“ erfolgte zwischen allen Vorgängen und wird im Folgenden nicht weiter explizit erwähnt.

Zuerst wurden die Schnitte über einen Zeitraum von 30 min in 5 ml TBS unter Zusatz von 75  $\mu$ l  $H_2O_2$  vorinkubiert, um eventuell vorhandene Blutrückstände zu beseitigen. Die anschließende Inkubation in 2 ml der „Blocking-Lösung“ (Herstellung s. Anhang Tab. 1) erfolgte für 60 min. Zweck dieser Lösung ist es, unspezifische Bindungen des primären Ak zu reduzieren. Danach konnten die Schnitte mit dem primären Ak (monoklonales Anti-nNOS aus der Maus, 1:2000, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD) versetzt werden und über einen Zeitraum von 20 h bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wurden die Gehirnschnitte über 60 min mit dem sekundären Ak (Kaninchen-Anti-Maus IgG, biotinyliert, Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, BRD) in einer Konzentration von 1:500 inkubiert. Die Ak-Konzentrationen für die MAX-Phase waren in Vorversuchen ermittelt worden. Um eine ausreichende Umspülung der Präparate zu gewährleisten, erfolgten die Inkubationen im primären und sekundären Ak in einer sog. „Carrierlösung“ (Herstellung s. Anhang, Tab. 1). Der anschließende Zusatz des Enzyms Streptavidin-Meerrettichperoxidase (= horse radish peroxidase; 8  $\mu$ l auf 3 ml TBS) erfolgte für 60 min. Die Vorinkubation der Schnitte mit dem Nickel-versetzten DAB (in Form einer DAB-Lösung, Herstellung s. Anhang Tab. 1) benötigte 15 min, und die Farbreaktion wurde durch die direkte Zugabe von 1  $\mu$ l  $H_2O_2$  pro 4 ml DAB-Lösung in Gang gesetzt. Die Gehirnschnitte verblieben weitere 15 min in der Lösung, um abschließend nochmals 3-mal in TBS gewaschen zu werden.

Nach der immunhistochemischen Markierung wurden die Schnitte nach anterior-posterior-Ebene sortiert und auf entfettete Objektträger gezogen, welche vorher mit einer Glycerin-Eiweiß-Lösung beschichtet worden waren (Herstellung s. Anhang Tab. 1). Nach der Reinigung der getrockneten Objektträger in Terpeneol konnten sie mit Hilfe von Entellan® eingedeckt werden.

### 3.2.2.2. Zählung der striatalen NOS<sup>+</sup>-Interneurone

Die Zählung der NOS<sup>+</sup>-Interneurone erfolgte mittels eines Bildanalyse-Systems (Fa. Visitron Systems GmbH, Puchheim, BRD), welches die durch ein Mikroskop (Fa Zeiss, Jena, BRD) vergrößerten und über eine Kamera (Spot RT Slider) aufgenommenen Gehirnschnitte auf den Monitor eines Computers projizierte.

Zunächst wurde das Striatum anhand des stereotaktischen Atlas für das Hamstergehirn (Morin und Wood, 2001) in eine anteriore (2,4 mm bis 1,9 mm), eine mediale (1,9 mm bis 0,2 mm) und eine posteriore (0,2 mm bis -0,3 mm) Region unterteilt. Der mediale Bereich des Striatums konnte aufgrund seiner Größe zusätzlich in ein dorsomediales, dorsolaterales, ventromediales und ventrolaterales Striatum differenziert werden (s. Abb. 10). Diese Einteilung erfolgte in Anlehnung an frühere Untersuchungen, die zeigten, daß zwischen diesen Gehirnregionen Unterschiede bezüglich der Morphologie und Neurochemie existieren (Gernert et al., 2000; Richter und Löscher, 1998). Für die Quantifizierung der NOS<sup>+</sup>-Interneurone wurde aus beiden Gehirnhälften jeden Schnittes ein Bildausschnitt pro Subregion ausgezählt. Dies erfolgte bei einer 400-fachen Vergrößerung (Okular: 10-fach, Objektiv: 40-fach) unter Fokussierung der Neurone in den unterschiedlichen Bildebenen in Anlehnung an die Methode des „optischen Disektors“ (Saper, 1996; West, 1999).

Die ausgezählten NOS<sup>+</sup>-Interneurone konnten anschließend auf ihre striatale Dichte umgerechnet werden. Dieses erfolgte mittels einer Formel, welche durch die Messung der Flächen der ausgezählten Bildausschnitte und der bekannten Schnittdicke (40 µm) wie folgt erstellt wurde:

$$\begin{aligned} \text{Dichte} &= \text{Anzahl gezählte Neurone} / \text{mm}^3 \\ &= \text{Anzahl gezählte Neurone} / \text{Schnittdicke [mm]} \times \text{Bildbreite [mm]} \times \text{Bildhöhe [mm]} \\ &= \text{Anzahl gezählte Neurone} / 0,04 \text{ mm} \times 0,296 \text{ mm} \times 0,222 \text{ mm} \\ &= \text{Anzahl gezählte Neurone} / 0,00263 \text{ mm}^3 \\ &= (\text{Anzahl gezählte Neurone} \times 380,23) / \text{mm}^3 \end{aligned}$$

Die Objektträger wurden vor der Auszählung verschlüsselt, um zu vermeiden, daß der Untersucher Kenntnis darüber hatte, ob es sich um Schnitte von dystonen Tieren bzw. Kontrolltieren handelte. Erst nach Ermittlung aller Werte wurden die Schnitte entschlüsselt und es erfolgte die Zuordnung zu den jeweiligen Tiergruppen.

### 3.3. Statistische Versuchsauswertung

#### 3.3.1. Lokale striatale Untersuchungen

In den jeweiligen Tiergruppen wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) mit der Standardabweichung und dem Standardfehler (S.E.) aus den maximal erreichten Schweregraden der dystonen Bewegungsstörungen getrennt nach der ersten, zweiten und dritten Beobachtungsstunde ermittelt. Um Signifikanzen in den Veränderungen des Schweregrades zwischen den Vehikelkontrollen und der Substanzapplikation zu berechnen, wurde erst eine Friedmann-Varianzanalyse (signifikant bei  $p < 0,05$ ) und bei Signifikanz anschließend ein einseitiger Wilcoxon-Test (signifikant bei  $p < 0,05$ ) durchgeführt, bei dem keine Normalverteilung vorausgesetzt wird. Hierfür wurden jeweils die maximal erreichten Schweregrade der Vor- bzw. Nachkontrolle mit denen unter der Substanzapplikation verglichen. Die statistische Auswertung der Latenzzeiten bis zum Auftreten erster dystoner Bewegungsstörungen (Latency on) erfolgte nach dem gleichen Verfahren. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Programms SigmaStat® (Version 2.0) durchgeführt.

#### 3.3.2. Immunhistochemische Untersuchungen

Nach der Auszählung der NOS<sup>+</sup>-Interneurone konnten die Verschlüsselungen der Objektträger aufgelöst und die Gehirnschnitte den entsprechenden Tiergruppen (*dt<sup>sz</sup>*-Hamster oder Kontrolle) zugeordnet werden. Von den Werten der protokollierten Auszählungen wurden pro Tier und Gehirnhälfte je Region der ( $\bar{x}$ ) mit S.E. und Standardabweichung ermittelt. Anschließend wurden jeweils von den *dt<sup>sz</sup>*-Hamstern und von den Kontrolltieren alle Mittelwerte der rechten Gehirnhälfte mit denen der linken Gehirnhälfte mittels des gepaarten t-Testes (für verbundene Stichproben) verglichen. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen rechter und linker Gehirnhälfte auftraten, folgten weitere Auswertungen, in denen jeweils die Mittelwerte beider Gehirnhälften einfließen.

Die statistischen Auswertungen signifikanter Unterschiede zwischen den *dt<sup>sz</sup>*-Hamstern und den Kontrolltieren erfolgten mittels eines einseitigen t-Testes für unverbundene Stichproben (Student's t-Test, signifikant bei  $p < 0,05$ ).

Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SigmaStat® (Version 2.0) durchgeführt.