

4. ERGEBNISSE

4.1. Pharmakologische Untersuchungen

Um die Bedeutung des glutamatergen Systems in der Pathophysiologie der primären Dystonie zu untersuchen, wurden verschiedene Bindungsstellen der ionotropen Glutamatrezeptoren pharmakologisch manipuliert und die NOS-Inhibitoren 7-NI und NPLA appliziert (s. Tab. 4).

Für die pharmakologischen Untersuchungen wurden die dt^{sz} -Hamster zwischen dem 30. und 44. Lebensstag auf ihre Dystonieausprägung getestet. Nach der Induktion der Bewegungsstörung mit Hilfe der „triple stimulation technique“ erfolgte eine Beobachtung der Versuchstiere über einen Zeitraum von jeweils 3 h, in denen die Schweregrade der Dystonie, beurteilt nach einem Scoresystem von 1 bis 6, und Verhaltenseffekte protokolliert wurden (s. 3.2.1.1.). Die Methodik der striatalen Mikroinjektion ist in Kapitel 3.2.1.3. beschrieben. Für die Auswertung der antidystonen Wirkung der applizierten Substanzen wurden die maximal erreichten Schweregrade der ersten, zweiten und dritten h mit denen der Vor- sowie Nachkontrolle verglichen. So war es möglich, die Progression der dystonen Attacken sowie den Beginn und die Dauer der Substanzwirkung zu beurteilen. Auch die Erfassung der Latenzen bis zum Auftreten der verschiedenen Stadien, wie der „Latency on“, also der Zeitraum bis zum Auftreten des Stadium 2, war zur Beurteilung der Progression mit und ohne Substanzapplikation sinnvoll. Um die Latenzzeiten bis zum Einsetzen des Stadiums 6 auswerten zu können, hätten pro Tiergruppe mindestens 5 Tiere das Stadium 6 sowohl in beiden Vehikelkontrollen als auch unter der Substanzgabe entwickeln müssen. Da dieses bei keinem der applizierten Wirkstoffe auftrat, konnte die „Latency max“ nicht ausgewertet werden.

Der in früheren Studien beschriebene altersabhängige Dystonieverlauf (Richter und Löscher, 1998) konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Individuelle Unterschiede in der Dystonieausprägung führten jedoch dazu, daß bei einigen untersuchten dt^{sz} -Hamstern die Phase der maximalen Ausprägung der Dystonie über den 42. Lebensstag hinausreichte. Diese Beobachtung wurde auch von Rehders (1999) beschrieben. Bei diesen Versuchstieren mit länger währender Dystonie erfolgte daher noch bis zum 44. Lebensstag eine Substanzapplikation.

Mit Abschluß der durchgeführten Untersuchungen wurden die Versuchstiere perfundiert und von den Gehirnen histologische Schnitte angefertigt. Hierdurch konnten eine fehlerhafte Lokalisation der Führungskanülen oder infektiöse Prozesse aufgedeckt und eine Einbeziehung dieser Versuchstiere in die Auswertung verhindert werden. Rehders et al. (2000) konnten in Studien zur Wirkung striatal applizierter Dopaminagonisten und -antagonisten zeigen, daß die Verhaltenseffekte der Substanzen nach einer Applikation im dorsomedialen Bereich denen im dorsolateralen Bereich des Striatums entsprechen. Daher gingen auch Hamster in die Auswertung mit ein, deren Führungskanülen im dorsolateralen Striatum lokalisiert waren.

Insgesamt gingen von den 108 operierten Hamstern 9 Tiere (8,3%) aufgrund ihrer Lokalisation, 10 Tiere (9,3%) aufgrund einer Infektion nicht mit in die statistische Auswertung ein.

In den folgenden Kapiteln werden die Wirkungen der applizierten Substanzen auf den Schweregrad dystoner Attacken sowie ihr Einfluß auf die Latency on dargestellt. In *Tabelle 5* sind die jeweiligen Gruppengrößen aufgelistet.

4.1.1. Manipulation des AMPA-Rezeptors

Der kompetitive AMPA-Rezeptorantagonist **NBQX** wurde in den Dosierungen 0,03 µg, 0,08 µg, 0,16 µg und 0,25 µg/0,5 µl/Hemisphäre appliziert.

Die Wirkungen von NBQX in den unterschiedlichen Dosierungen sind in Abb. 11 dargestellt. Bei der niedrigsten Dosierung (0,03 µg/Hemisphäre) konnte kein Einfluß der Substanz auf den Schweregrad der Dystonie festgestellt werden. Nach der Applikation von 0,08 µg/Hemisphäre zeigte sich in der dritten Beobachtungsstunde eine signifikante Reduktion des Schweregrades dystoner Attacken ($p < 0,01$). Bei der Dosierung von 0,16 µg/Hemisphäre waren keine signifikanten Effekte zu beobachten, in der zweiten und dritten Beobachtungsstunde zeigten sich lediglich Tendenzen zur Abnahme des Schweregrades. Nach der Injektion von 0,25 µg NBQX/Hemisphäre wurde das Fehlen von Effekten auf den Schweregrad in höheren Dosierungen bestätigt.

Die *Latency on* war bei den Dosierungen 0,08 µg ($p < 0,01$) und 0,25 µg ($p < 0,05$) pro Hemisphäre unter Substanzgabe signifikant verlängert, d.h. das Auftreten erster dystoner Bewegungen war verzögert (s. Tab. 5).

Abb. 11

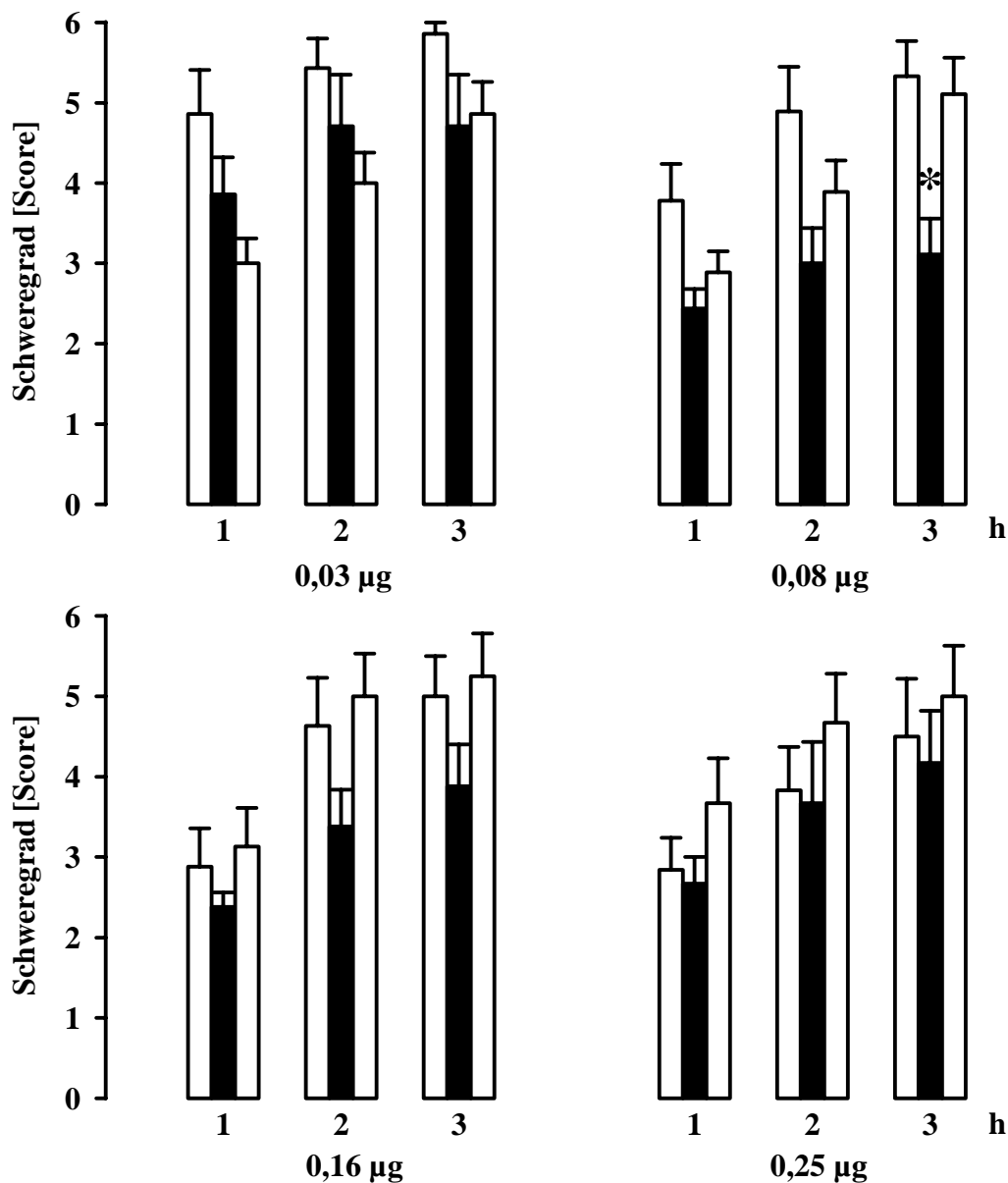


Abb. 11: Wirkung des kompetitiven AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX nach bilateraler striataler Applikation von 0,03 µg, 0,08 µg, 0,16 µg und 0,25 µg pro Hemisphäre auf den Schweregrad dystoner Attacken bei *dt^{sz}*-Hamstern. Das Injektionsvolumen betrug 0,5 µl pro Hemisphäre. Der individuelle Schweregrad wurde nach Streßinduktion durch die „triple stimulation technique“ innerhalb von 3 h erreicht. Angegeben sind die (x) + S.E., die sich aus dem jeweils maximal erreichten Dystoniestadium der Hamster in der ersten, zweiten und dritten h nach Streßinduktion ergeben. Diese Aufteilung des Beobachtungszeitraums in 3 Einzelstunden diente der Erfassung der Progression der Dystonie. Dadurch sind Rückschlüsse auf das Einsetzen der Wirkung sowie auf die Wirkungsdauer möglich. Die Vor- bzw. Nachkontrollen (offene Balken) erfolgten in Form von Vehikelapplikationen 2-3 Tage vor bzw. nach Substanzapplikation (geschlossene Balken) im Alter der maximalen Dystoniausprägung (i.d.R. 30.-42. Lebensstag) an denselben Tieren, so daß jedes Tier seine eigene Kontrolle darstellte. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Effekte der Substanz auf den Schweregrad der Dystonie im Vergleich zur Vor- und Nachkontrolle (* $p < 0,01$). Die Größen der Tiergruppen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5

Wirkung der Substanzen auf die „Latency on“

Substanz	Dosis	„Latency on“ [min]			(n)
		Vorkontrolle	Substanz	Nachkontrolle	
NBQX	0,03 µg	3,3 ± 0,7	3,9 ± 0,9	3,7 ± 0,8	7
	0,08 µg	8,3 ± 2,0	14,8 ± 3,3**	8,4 ± 2,2	9
	0,16 µg	12,5 ± 1,8	17,0 ± 3,8	15,1 ± 2,6	8
	0,25 µg	2,8 ± 0,4	7,7 ± 1,7*	3,3 ± 0,6	6
AP-5	0,50 µg	4,3 ± 0,6	7,8 ± 1,3	6,1 ± 2,0	10
	1,00 µg	10,8 ± 1,8	11,7 ± 1,5	11,9 ± 3,3	10
HA-966	10,00 µg	4,9 ± 0,9	10,9 ± 4,2	3,3 ± 0,7	7
	20,00 µg	6,4 ± 2,2	6,0 ± 0,7	4,4 ± 0,5	8
MK-801	4,00 µg	5,4 ± 1,0	8,6 ± 4,6*	4,2 ± 0,6	8
NBQX+ AP-5	0,08 µg +0,50 µg	3,8 ± 0,8	8,7 ± 3,0	3,3 ± 0,4	6
	0,16 µg +1,00 µg	5,3 ± 1,1	4,8 ± 0,9	3,8 ± 0,8	9
7-NI	0,10 µg	5,3 ± 1,2	12,0 ± 2,9*	5,0 ± 0,8	6
	0,40 µg	4,1 ± 0,5	6,6 ± 1,8	5,6 ± 0,9	8
NPLA	2,50 µg	9,8 ± 3,4	11,9 ± 2,4	6,3 ± 0,5	9
	5,00 µg	5,8 ± 0,5	9,8 ± 2,5	5,7 ± 1,0	9
	7,50 µg	7,1 ± 1,5	9,3 ± 2,0	7,5 ± 0,7	8

Tab. 5: Latency on, d.h. die Latenzzeit von der Induktion der Dystonie bis zum Auftreten erster eindeutiger Bewegungsstörungen (Stadium 2), nach bilateraler striataler Applikation der angeführten Testsubstanzen bei dt^{sz} -Hamstern. Angegeben sind ebenfalls die Tierzahlen (n) der entsprechenden Gruppen. Die Latenzzeiten sind als (x) + S.E. angegeben, getrennt nach Vorkontrolle, Substanzversuch und Nachkontrolle. Sternchen kennzeichnen signifikante Effekte auf die Latency on im Vergleich zur Vor- und Nachkontrolle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Die Applikation der niedrigsten Dosierung (0,03 µg/Hemisphäre) löste bei 2 Versuchstieren eine geringgradige Hyperlokomotion aus. In der ersten Beobachtungsstunde trat nach der Applikation von 0,08 µg/Hemisphäre bei fast allen Tieren eine geringgradige Hypolokomotion auf, die bei einigen Tieren bis zum Versuchsende anhielt und bei anderen in eine geringgradige bis mittelgradige Hyperlokomotion umschlug. Desweiteren zeigten einige Tiere in diesem Zeitraum eine geringgradige Ataxie. Bei mehreren Hamstern war eine verstärkte Putzaktivität und/oder Scharren und eine Piloerektion zu beobachten. Ein Versuchstier zeigte eine verstärkte Reaktion auf taktile Reize. Nach der Applikation von 0,16 µg/Hemisphäre entwickelten mehrere Tiere ab der ersten Beobachtungsstunde eine mittelgradige Hyperlokomotion und eine geringgradige Ataxie. Bei 2 Tieren war ab der 30. bzw. ab der 120. min eine flache Körperhaltung mit angehobenem Kopf, phasisch vermehrtes Scharren und eine verstärkte Tasthaarvibration zu beobachten. Bei der höchsten Dosierung (0,25 µg/Hemisphäre) zeigten fast alle Versuchstiere eine ausgeprägte Hyperlokomotion und Hyperaktivität (Putzen, Scharren), 2 Tiere eine geringgradige Ataxie über den gesamten Beobachtungszeitraum und eine Hypersensibilität für taktile Reize.

4.1.2. Manipulation des NMDA-Rezeptors

4.1.2.1. Manipulation der Glutamat-Bindungsstelle

Der kompetitive NMDA-Rezeptorantagonist **AP-5** wurde in den Dosierungen 0,5 µg und 1,0 µg pro Hemisphäre striatal appliziert.

Abb. 12 zeigt die Wirkung des AP-5 auf den Schweregrad dystoner Attacken in beiden Dosierungen. Bei der Dosierung von 0,5 µg/Hemisphäre waren über den Beobachtungszeitraum von 3 h keine signifikanten antidystonen Effekte zu beobachten. Auch nach der Applikation von 1 µg/Hemisphäre trat keine signifikante Reduktion des Schweregrades dystoner Attacken auf.

Die *Latency on* war weder bei der Dosierung von 0,5 µl/Hemisphäre noch nach der Applikation von 1 µg/Hemisphäre nicht signifikant verlängert (s. Tab. 5).

Alle Versuchstiere zeigten nach der Applikation von 0,5 µg AP-5 pro Hemisphäre in der ersten Beobachtungsstunde eine geringgradige Hyperlokomotion. Bei 2 Tieren hielt sie über die zweite h an und bei einem Hamster konnte sie bis zum Versuchsende beobachtet werden.

Abb. 12

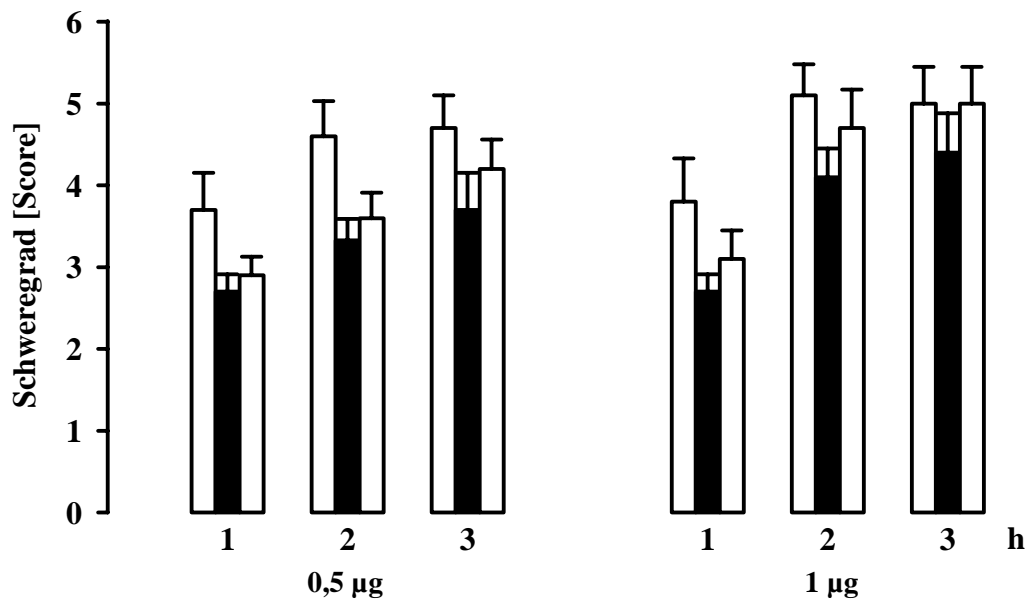


Abb. 12: Wirkung des kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten **AP-5** nach bilateraler striataler Applikation in den Konzentrationen von 0,5 µg und 1 µg/0,5 µl/Hemisphäre auf den Schweregrad der Dystonie bei der Hamstermutante. Angegeben sind die (x) + S.E. in der ersten, zweiten und dritten h des Untersuchungszeitraums nach Applikation von Vehikel für die Vor- und Nachkontrolle (offene Balken) bzw. Substanz (geschlossene Balken). Die Größen der Tiergruppen sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 11.

In den ersten 2 Beobachtungsstunden zeigten 2 Tiere eine verstärkte Reaktion auf taktile Reize und vereinzelt während der ersten h Stereotypien (Putzaktivität, Scharren und Grimassieren). Nach der striatalen Injektion von 1 µg AP-5 pro Hemisphäre entwickelten alle Hamster in den ersten 30 min eine geringgradige Hypolokomotion. Bei 5 Tieren schlug sie in eine mittelgradige Hyperlokomotion um und hielt bei 3 Hamstern bis zum Versuchsende an. Fünf Tiere zeigten eine geringgradige bis mittelgradige Ataxie über alle 3 Beobachtungsstunden. Vereinzelt traten ein ruckartiger Gang, eine verstärkte Grabe- und Putzaktivität, „Piano Playing“ (die Hamster sitzen und bewegen die Vordergliedmaßen wie ein Klavierspieler), Grimassieren und eine verstärkte Reaktion auf taktile Reize auf. Ein Tier wies über 5 min Myoklonien an der rechten Vordergliedmaße auf. Aufgrund der ausgeprägten Verhaltenseffekte durch 1 µg AP-5 wurden keine höheren Dosierungen getestet.

4.1.2.2. Manipulation der Glycin-Bindungsstelle

HA-966 ist ein partieller Agonist der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors mit geringer intrinsischer Aktivität und wurde in den Dosierungen 10 µg und 20 µg pro Hemisphäre auf seine Wirkung auf die Dystonie getestet.

Abb. 13

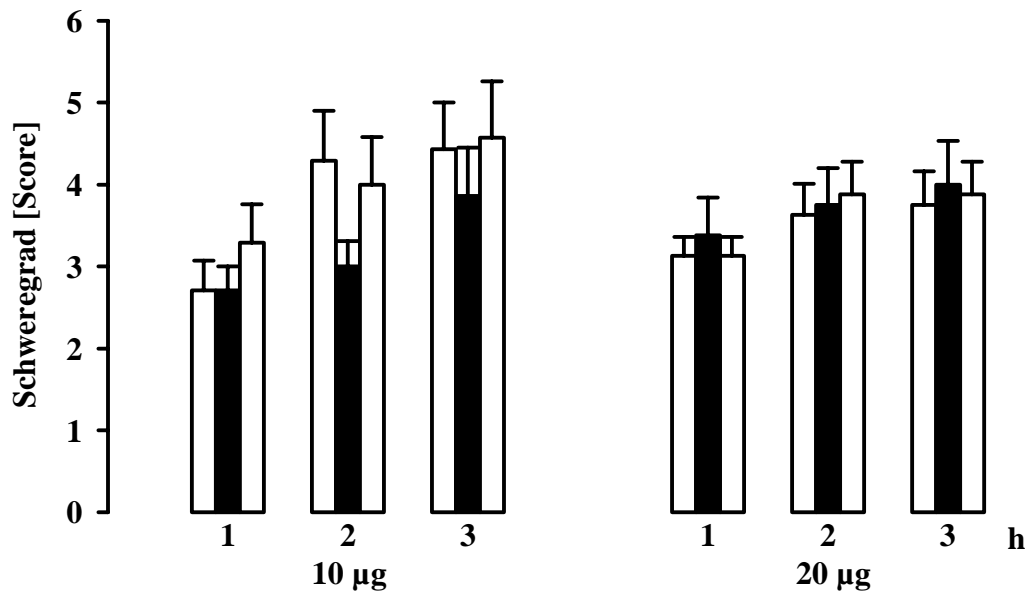


Abb. 13: Wirkung von HA-966 nach bilateraler striataler Applikation in den Dosierungen von 10 µg und 20 µg pro Hemisphäre auf den Schweregrad dystoner Attacken bei dt^{sz} -Hamstern. Das Injektionsvolumen betrug 0,5 µl pro Hemisphäre. Angegeben sind die (x) + S.E. in der ersten, zweiten und dritten h des Untersuchungszeitraumes nach Applikation von Vehikel für die Vor- und Nachkontrolle (offene Balken) bzw. Substanz (geschlossene Balken). Die Größen der Tiergruppen sind der Tab. 5 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 11.

Nach der striatalen Applikation von 10 µg HA-966 pro Hemisphäre konnte in keiner der 3 Beobachtungsstunden eine signifikante antidystone Wirkung der Substanz festgestellt werden (s. Abb. 13). Auch bei der Dosierung von 20 µg pro Hemisphäre trat keine signifikante Reduktion dystoner Attacken auf.

Bei beiden Dosierungen war keine Beeinflussung der *Latency on* durch die Applikation von HA-966 zu beobachten (s. Tab. 5).

Bei fast allen Tieren trat nach der Injektion von 10 µg pro Hemisphäre eine geringgradige bis mittelgradige Hyperlokomotion auf, die teils bis zur zweiten bzw. dritten h anhielt. Einige Hamster putzten sich vermehrt, zeigten ein verstärktes Abwehrverhalten oder ein sog. Rearing, d.h. Aufrichten. Bei einem Hamster war in den letzten beiden h eine geringgradige Ataxie zu beobachten. Bei der höheren Dosierung entwickelten alle Tiere eine deutliche Hyperlokomotion, 2 Hamster waren gering- bis mittelgradig ataktisch, 2 Tiere zeigten ein abgeflachte Körperhaltung mit webenden Kopfbewegungen und ein Hamster putzte sich verstärkt.

Abb. 14

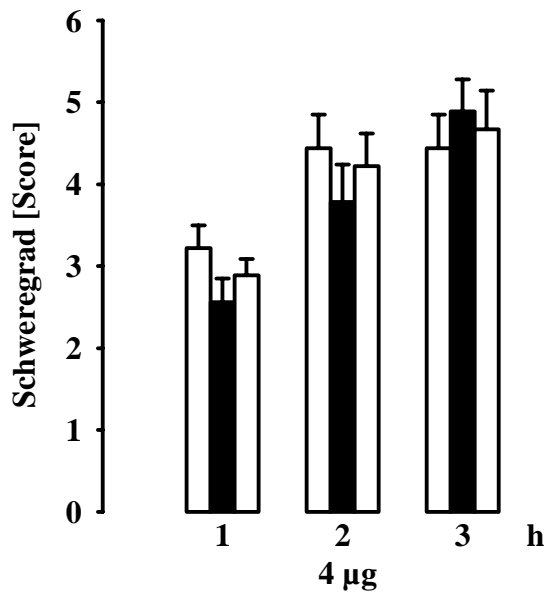


Abb. 14: Wirkung des nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Kanalblockers **MK-801** nach bilateraler striataler Applikation von 4 $\mu\text{g}/0,5 \mu\text{l}$ /Hemisphäre auf den Schweregrad der Dystonie bei der Hamstermutante. Angegeben sind die (x) + S.E. in der ersten, zweiten und dritten h des Untersuchungszeitraums nach Applikation von Vehikel für die Vor- und Nachkontrolle (offene Balken) im Vergleich zur MK-801-Injektion (geschlossene Balken). Die Größe der Tiergruppe ist der Tab. 5 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 11.

4.1.2.3. Manipulation des Ionenkanals

Die Wirkung des nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptorkanalblockers **MK-801** als Hydrogenmaleat (Dizozilpin) auf den Schweregrad dystoner Attacken wurde in der Konzentration 4 $\mu\text{g}/0,5 \mu\text{l}$ /Hemisphäre untersucht. Eine Erhöhung der Dosierung war nicht möglich, da die Substanz sich nicht in einer höheren Konzentration im Vehikel lösen ließ. Auch mangelnde Effekte auf die Dystonieschwere trotz deutlicher Verhaltenseffekte sprachen gegen den Einsatz weiterer Dosierungen. Wie Abb. 14 zeigt, hatten 4 $\mu\text{g}/\text{Hemisphäre}$ MK-801 keine signifikante Wirkung auf den Schweregrad der Dystonie.

Die *Latency on* war im Vergleich zu der Vor- und Nachkontrolle allerdings signifikant verlängert ($p < 0,05$, Tab. 5).

Bei allen Hamstern war eine meist geringgradige Hyperlokomotion zu beobachten, die bei einigen Tieren bis zum Ende der zweiten bzw. dritten Versuchsstunde anhielt. Desweiteren reagierten alle Tiere verstärkt auf taktile Reize, und fast alle Hamster zeigten eine geringgradige bis mittelgradige Ataxie. Vereinzelt traten abgeflachte Körperhaltung, vermehrtes Scharren und Strecken auf.

Abb. 15

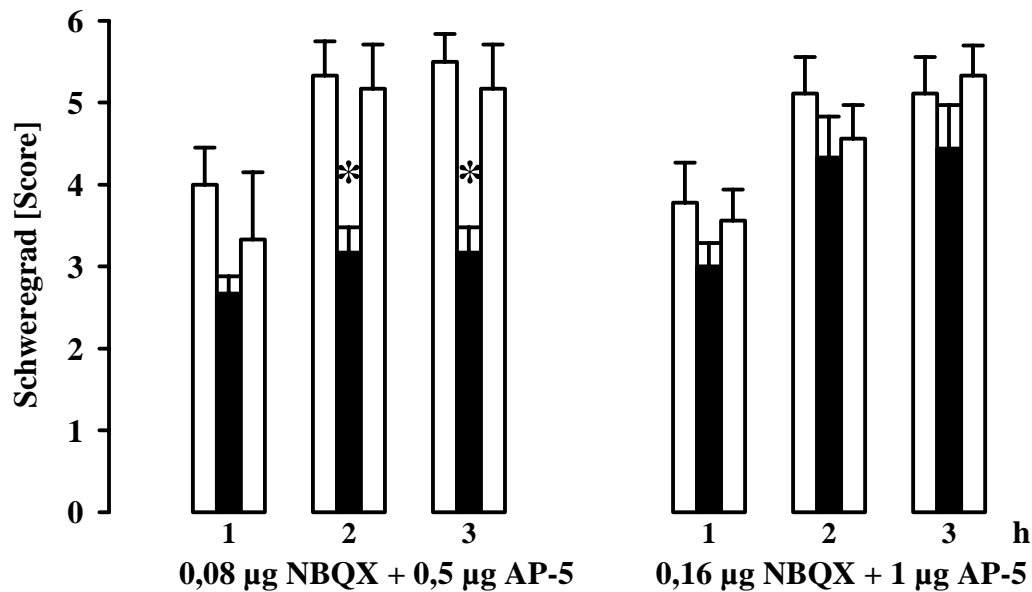


Abb. 15: Wirkung der **kombinierten** bilateralen striatalen Applikation des kompetitiven AMPA-Rezeptorantagonisten **NBQX** mit dem kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten **AP-5** in den Konzentrationen 0,08 µg NBQX + 0,5 µg AP-5 sowie 0,16 µg NBQX + 1 µg AP-5/0,5 µl pro Hemisphäre auf den Schweregrad dystoner Attacken bei *dt^{sz}*-Hamstern. Angegeben sind die (x) + S.E. in der ersten, zweiten und dritten h des Untersuchungszeitraumes nach Applikation von Vehikel für die Vor- und Nachkontrolle (offene Balken) bzw. Substanz (geschlossene Balken). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Effekte der Substanz auf den Schweregrad der Dystonie (* $p < 0,05$). Die Größen der Tiergruppen sind in der Tab. 5 aufgeführt. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 11.

4.1.3. Kombinierte Manipulation ionotroper Glutamatrezeptoren

Die Glutamatrezeptor-Antagonisten **NBQX** und **AP-5** wurden kombiniert in 2 Dosierungen appliziert: 0,08 µg NBQX mit 0,5 µg AP-5 sowie 0,16 µg NBQX mit 1 µg AP-5 pro Hemisphäre.

Nach der Applikation von 0,08 µg NBQX und 0,5 µg AP-5 zeigten sich sowohl in der zweiten als auch in der dritten Beobachtungsstunde eine signifikante Reduktion des Schweregrades dystoner Attacken (jeweils $p < 0,05$). Bei der Dosierung von 0,16 µg NBQX und 1 µg AP-5 war jedoch nur eine tendenzielle Abschwächung der Dystonie zu beobachten (s. Abb. 15).

Im Vergleich zu den Einzelapplikationen dieser Substanzen waren bei einer Dosierung von 0,5 µg AP-5 keine Signifikanzen zu beobachten und nach einer Applikation von 0,08 µg NBQX nur in der dritten h eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) dystoner Attacken

aufgetreten. Vergleicht man die Potenz in der Reduktion des Schweregrades von NBQX allein mit der Kombination, so ist festzustellen, daß das Verhältnis von Vor- bzw. Nachkontrolle zu der Substanzapplikation annähernd gleich ist.

Bei beiden Dosierungen traten durch die Applikation der Substanzen keine signifikanten Veränderungen der *Latency on* auf.

Nach der Mikroinjektion von 0,03 µg NBQX und 0,5 µg AP-5 konnte bei fast allen Hamstern in den ersten beiden Beobachtungsstunden eine geringgradige bis mittelgradige Hyperlokomotion und bei 2 Tieren eine geringgradige Ataxie festgestellt werden. Mehrere Tiere zeigten in der ersten h eine verstärkte Putzaktivität und Strecken. Vereinzelt traten Scharren, Kopftiefhaltung, „Licking“, eine erhöhte Angriffslust und eine verstärkte Sensibilität auf taktile Reize auf. Bei den höheren Konzentrationen konnte zusätzlich vermehrt das sog. „Rearing“ beobachtet werden.

4.1.4. Inhibition der neuronalen Stickoxidsynthetase (nNOS)

4.1.4.1. 7-Nitroindazol (7-NI)

Der NOS-Inhibitor 7-NI wurde in den Dosierungen 0,1 µg und 0,4 µg pro Hemisphäre striatal appliziert. Aufgrund seines hydrophoben Charakters wurde es in 5% bzw. 15%igem DMSO gelöst. Eine weitere Erhöhung der Dosierung war nicht möglich, da sich die Substanz auch in hochprozentigem DMSO nicht mehr lösen ließ. Das DMSO zeigte nach den Kontrollapplikationen keine Effekte auf das Verhalten der Hamster.

Abb. 16 zeigt die Wirkung von 7-NI auf den Schweregrad dystoner Attacken in beiden Dosierungen. Weder in der Konzentration 0,1 µl 7-NI/0,5 µl 5%iges DMSO/Hemisphäre noch in der Konzentration 0,4 µl 7-NI/0,5 µl 15%iges DMSO/Hemisphäre konnte eine signifikante Reduktion des Schweregrades dystoner Attacken beobachtet werden.

Die *Latency on* war bei der Dosierung von 0,1 µg 7-NI pro Hemisphäre signifikant verlängert ($p < 0,05$). Nach der Applikation von 0,4 µg 7-NI/Hemisphäre war dieser Effekt hingegen nicht mehr feststellbar (s. Tab. 5).

Nach der Applikation von 0,1 µg 7-NI/Hemisphäre entwickelten 2 Tiere während der ersten 20 min nach der Applikation eine geringgradige Hypolokomotion. Bei der Dosierung von 0,4 µg/Hemisphäre hatte ein Hamster über die ersten 20 min des Untersuchungszeitraumes eine

gering- bis mittelgradige Hypolokomotion. Innerhalb dieses Zeitraumes zeigten 3 Hamster ein verstärktes Putzverhalten.

Abb. 16

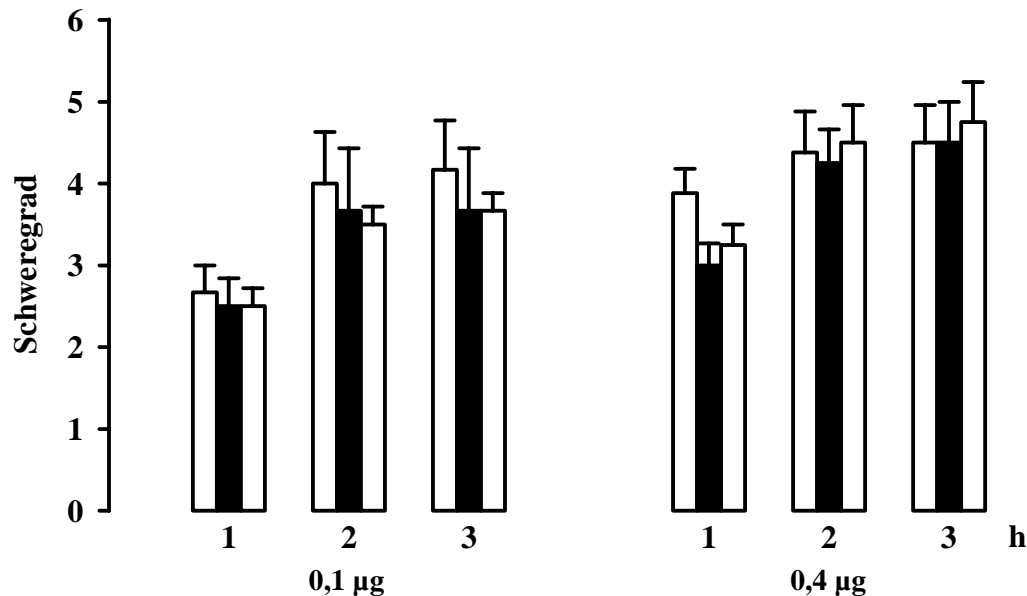


Abb. 16: Wirkung des NOS-Inhibitors 7-NI nach bilateraler striataler Applikation von 0,1 µg und 0,4 µg pro Hemisphäre auf den Schweregrad dystoner Attacken bei *dt^{sz}*-Hamstern. Das Injektionsvolumen betrug 0,5 µl pro Hemisphäre, die Substanz war in 5%igem (0,1 µg 7-NI) oder 15%igem (0,4 µg 7-NI) DMSO gelöst. Angegeben sind die (x) + S.E in der ersten, zweiten und dritten h des Untersuchungszeitraumes nach Applikation von Vehikel für die Vor- und Nachkontrolle (offene Balken) bzw. Substanz (geschlossene Balken). Die Größen der Tiergruppen sind der Tab. 5 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen s. Abb. 11.

N^o-Propyl-L-Arginin (NPLA)

Die Wirkung von NPLA, einem hochselektiven Inhibitor der nNOS, auf den Schweregrad dystoner Attacken wurde in den Dosierungen 2,5 µg, 5 µg und 7,5 µg pro Hemisphäre untersucht.

Bei keiner der applizierten Dosierungen konnte eine signifikante Reduktion des Schweregrades der Dystonie bei *dt^{sz}*-Hamstern beobachtet werden (s. Abb. 17).

Bei der Dosierung von 2,5 µg konnten keine Verhaltenseffekte beobachtet werden. Bei 5 µg pro Hemisphäre zeigten 3 Tiere in den ersten 20 min nach der Applikation eine geringgradige Hypolokomotion, einige Tiere zeigten eine geringgradige Ataxie und putzten sich vermehrt. Vermehrtes Putzverhalten zeigte sich auch nach der Applikation von 7,5 µg pro Hemisphäre.

Abb. 17

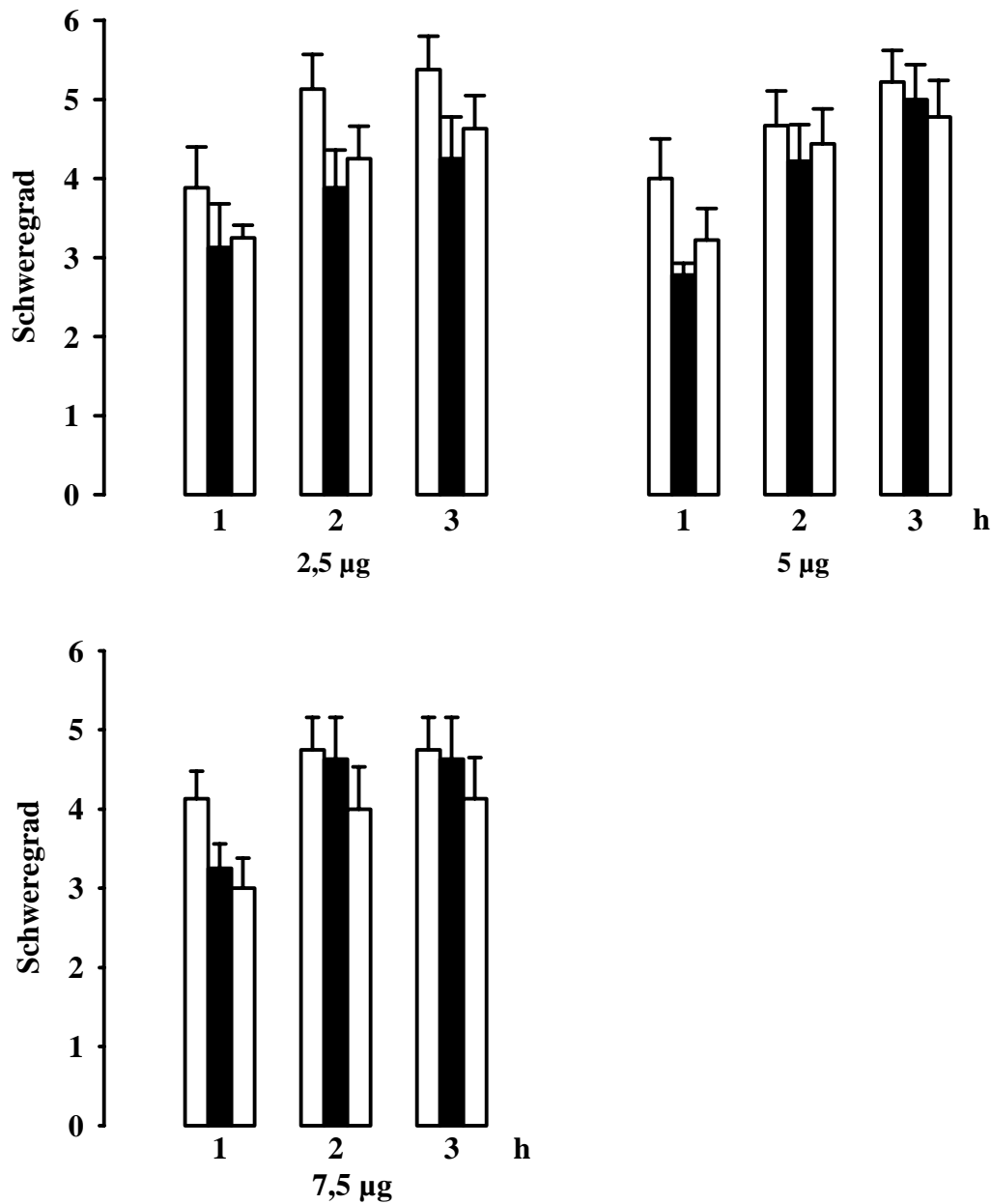


Abb. 17: Wirkung des selektiven nNOS-Inhibitors **NPLA** in den Konzentrationen 2,5 µg, 5,0 µg und 7,5 µg/0,5 µl/Hemisphäre auf den Schweregrad der Dystonie bei der Hamstermutante. Angegeben sind die (x) + S.E. in der ersten, zweiten und dritten h des Untersuchungszeitraumes nach Applikation von Vehikel für die Vor- und Nachkontrolle (offene Balken) bzw. Substanz (geschlossene Balken). Die Tiergruppengrößen sind der Tab. 5 zu entnehmen. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 11.

4.2. Dichte striataler NOS⁺-Interneurone

4.2.1. Markierung und Morphologie der NOS⁺-Interneurone

Die Dichte der striatalen NOS⁺-Interneurone wurde bei folgenden Tieren untersucht:

- 8 *dt^{sz}*-Hamster und Kontrolltiere im Alter von 31 Tagen (MAX-Phase)
- 7 *dt^{sz}*-Hamster und Kontrolltiere im Alter von über 90 Tagen (nach der Spontanremission der Dystonie)

In Vorversuchen war eine optimale Konzentration des primären monoklonalen Maus-Anti-NOS-Ak von 1:2000 ermittelt worden. Bei dieser Konzentration waren die NOS⁺-Interneurone gleichmäßig markiert und setzten sich sichtbar vom umgebenen Gewebe ab (s. Abb. 18 - 20). Auch die Verteilung der markierten Neurone in den Gehirnschnitten stimmte mit Literaturangaben über die Verteilung von NOS⁺-Interneuronen in Rattengehirnen überein. So fand sich im zerebralen Kortex ein reiches Netzwerk NOS-reaktiver Nervenfortsätze und eine kleine Population von NOS⁺-Interneuronen (Tong und Hamel, 2000). Schon frühere Studien mit markierten PV⁺-Interneuronen hatten gezeigt, daß keine geschlechtsspezifischen Unterschiede beim *dt^{sz}*-Hamster existierten. Dies war auch für die immunhistochemischen Markierungen der NOS⁺-Interneurone zu beobachten, so daß eine gemeinsame Auswertung von weiblichen und männlichen Tieren innerhalb der Gruppen erfolgen konnte.

Die für diese Studien verwendeten 8 (3 männlich /5 weiblich) bzw. 7 (4 männlich /3 weiblich) *dt^{sz}*-Hamster und 8 (5 männlich /3 weiblich) bzw. 7 (2 männlich /5 weiblich) Kontrolltiere wurden am 21. und am 30. Lebenstag auf ihre Dystonieausprägung getestet (s. 3.2.1.1.). Am 21. Lebenstag hatten die *dt^{sz}*-Hamster, welche für die Untersuchungen in der MAX-Phase verwendet wurden, einen durchschnittlichen Schweregrad von $2,63 \pm 0,32$ und die Hamstermutanten, welche für die Studien nach der Spontanremission verwendet wurden, einen Durchschnitt von $3,57 \pm 0,69$. Am 30. Lebenstag zeigten erstere einen durchschnittlichen Schweregrad von $3,88 \pm 0,64$ und letztere von $2,43 \pm 0,30$. Die Kontrolltiere zeigten wie erwartet an beiden Untersuchungstagen keine Bewegungsstörungen. Die für die Untersuchungen nach der Spontanremission verwendeten *dt^{sz}*-Hamster zeigten am 80. Lebenstag ebenfalls keine Symptome mehr.

Die getesteten Hamster wurden für die Untersuchungen in der Lebensphase der maximalen Ausprägung der Dystonie (31. Lebenstag) und im Alter nach der Spontanremission (zwischen dem 92. und 98. Lebenstag) transkardiell perfundiert (s. 3.2.1.4.). Nach Anfertigung der

Gehirnschnitte und immunhistochemischer Markierung der NOS⁺-Interneurone (s. 3.2.2.1.) erfolgte die Auszählung an codierten Objektträgern, so daß der Untersucher kein Wissen über die Gruppenzugehörigkeit der jeweiligen Schnitte hatte.

Vor der Zählung wurden die markierten Zellen erneut auf ihre Übereinstimmung in der Morphologie und Verteilung von NOS⁺-Interneuronen mit Literaturangaben untersucht (s. 2.6.3.1.). Wie aus den Abb. 18-20 (MAX-Phase) und Abb. 21-23 (nach Spontanremission) ersichtlich, waren die regionalen Unterschiede in der Zelldichte vergleichbar mit den Beschreibungen in der Literatur (s.o.) (Tong und Hamel, 2000). Die Zellen wiesen etwa 15-20 µm große striatale Zellkörper mit kräftig schwarz angefärbten Somata auf (s. Abb. 20 und 23), was Literaturangaben entsprach (Morello et al., 1997; Wu und Parent, 2000). Deutlich sind 3 bis 5 Fortsätze mit relativ wenigen Verzweigungen zu erkennen, die nicht mit „spines“ besetzt sind (Kawaguchi et al., 1995; Nakano et al., 2000).

4.2.2. Dichte der striatalen NOS⁺-Interneurone in der MAX-Phase und nach der Spontanremission der Dystonie

Die Zählung der striatalen NOS⁺-Interneurone erfolgte in Anlehnung an die Methode des sog. optischen Disektors (Saper, 1996; West, 1999), die in Kapitel 3.2.2.2. genauer erläutert wurde, an codierten Schnittpräparaten. Nach Ermittlung aller Werte wurden die Schnitte entschlüsselt und den jeweiligen Tiergruppen zugeordnet, um subjektive Einflüsse bei der Zählung zu vermeiden.

Für die Zählung und Auswertung wurde das Striatum, wie in Kapitel 3.2.2.2. näher erläutert, in 6 Regionen unterteilt: das anteriore (2,4 bis 1,9 mm relativ zu Bregma) und das mediale Striatum (1,9 bis 0,2 mm relativ zu Bregma), das zusätzlich in einen dorsomedialen, dorsolateralen, ventromedialen und ventrolateralen Bereich eingeteilt worden ist (s. Abb. 10), sowie das posteriore (-0,3 bis +0,2 mm relativ zu Bregma) Striatum.

Abb. 18

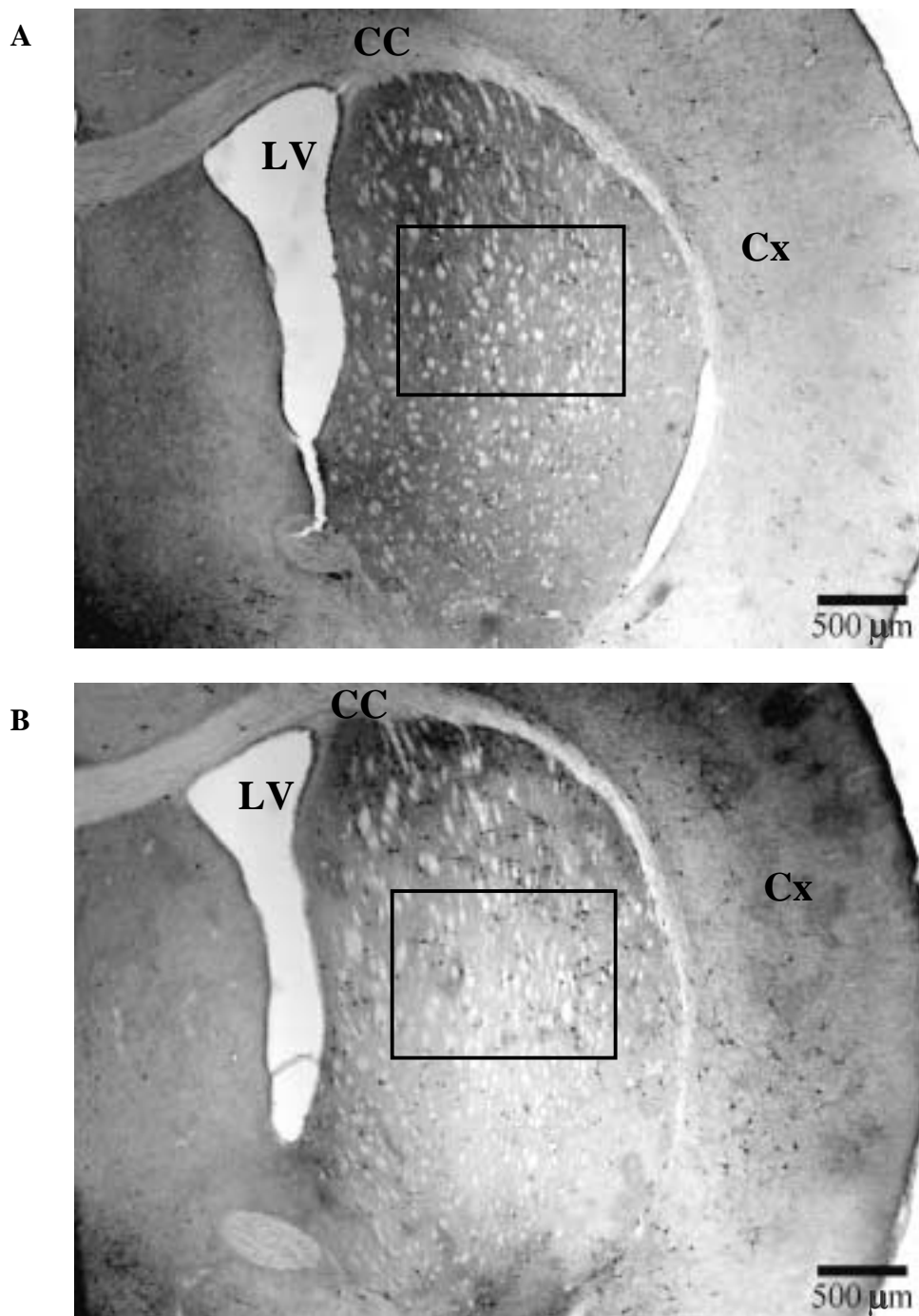


Abb. 18: Histologische Abbildungen des rechten Striatums eines 31 Tage alten *dt^{sz}*-Hamsters (A) und eines gleichaltrigen Kontrolltieres (B) bei 25-facher Vergrößerung nach Markierung der NOS⁺-Interneurone. Dargestellt sind Gehirnschnitte der AP-Ebene +1,20 (mm relativ zu Bregma). Im Bildzentrum befindet sich das Striatum, das durch seine lockere Struktur gekennzeichnet ist, und in dem nNOS-Antigen-markierte Nervenzellen, die hier durch ihre schwarze Färbung deutlich sichtbar lokalisiert sind. Umrahmt ist es vom Callosum (CC), der wiederum vom Kortex (Cx) umgeben ist. Zur Medianen wird das Striatum vom lateralen Ventrikel (LV) begrenzt. Der Rahmen markiert den Ausschnitt, aus dem die weiteren Vergrößerungen (100- und 400-fach, Abb. 19 und 20) entnommen wurden, die Länge der Referenzbalken entspricht 500 μm im histologischen Schnitt.

Abb. 19

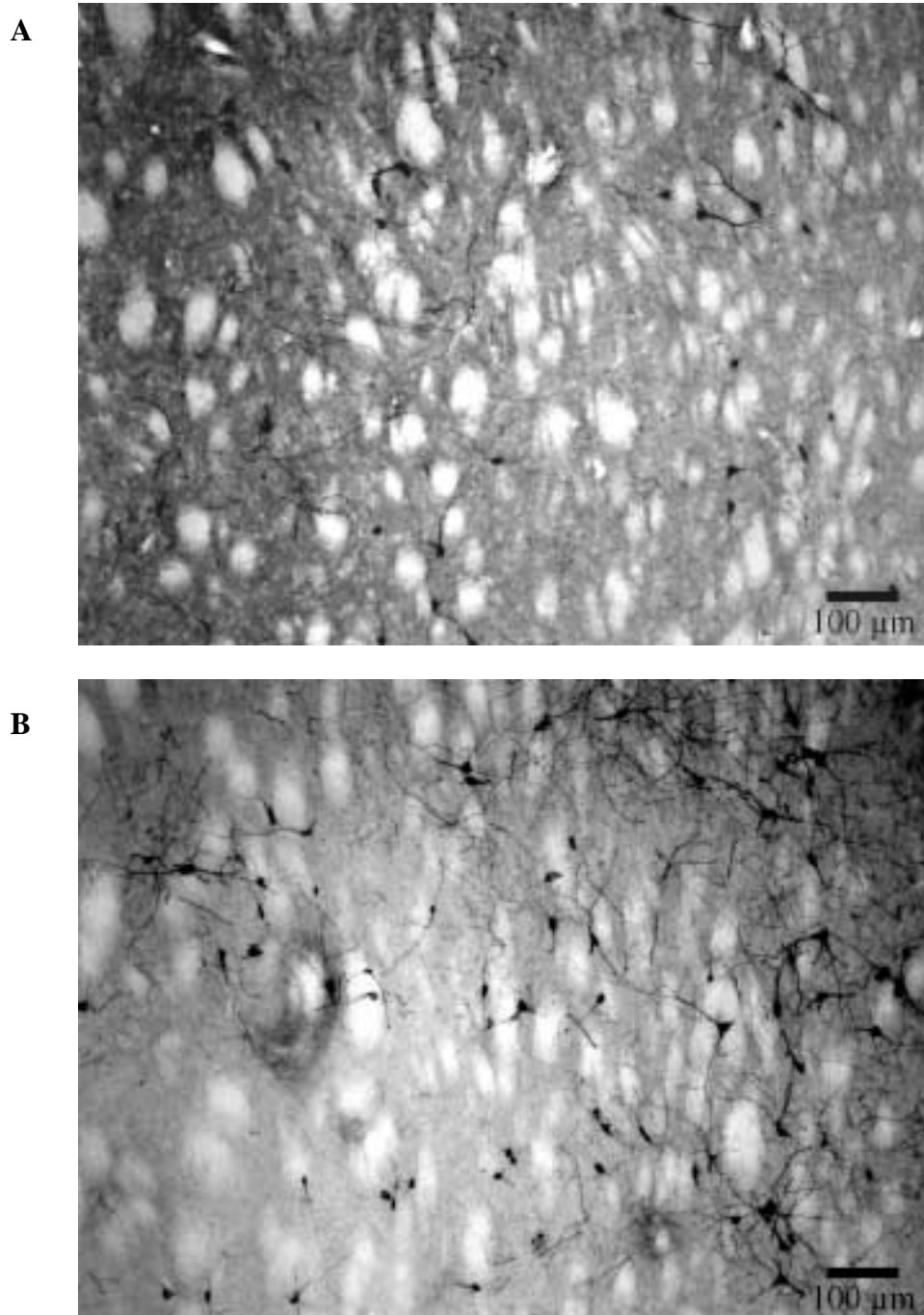


Abb. 19: Histologische Abbildungen des Striatums (s. Abb. 18) eines 31 Tage alten dt^{sz} -Hamsters (**A**) und eines gleichaltrigen Kontrolltieres (**B**) bei 100-facher Vergrößerung. Die NOS^+ -Interneurone sind als schwarz markierte Zellen mit teils weitreichenden Ausläufern deutlich zu erkennen. Beim Vergleich beider Aufnahmen wird deutlich, daß bei den dt^{sz} -Hamstern eine geringere Dichte der NOS^+ -Interneurone vorliegt. Die Länge der Referenzbalken entspricht 100 μm im histologischen Schnitt.

Abb. 20

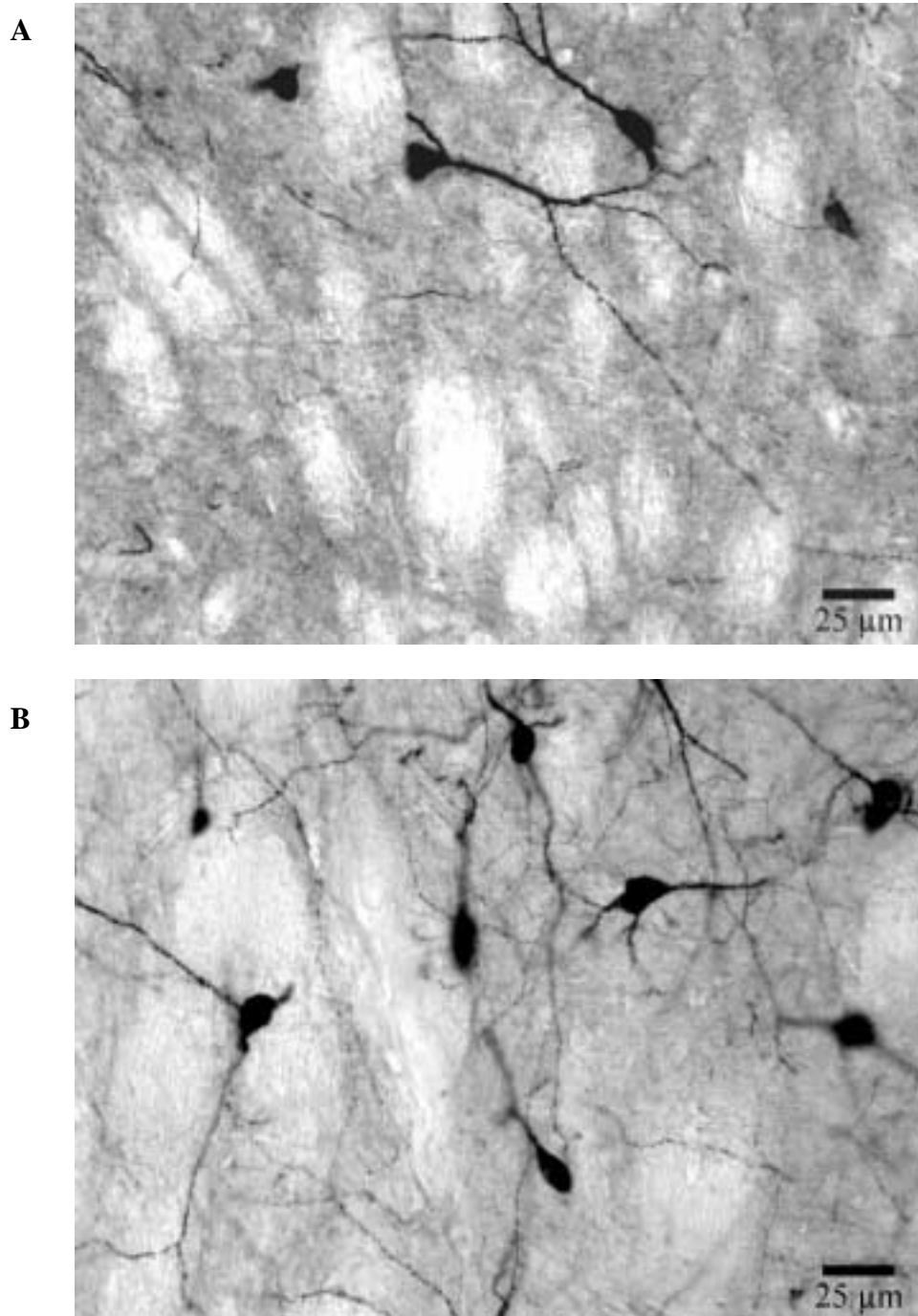


Abb. 20: Histologische Abbildungen des Striatums (s. Abb. 18) von einem *dt^{sz}*-Hamster (A) und einem Kontrolltier (B) im Alter von 31 Tagen unter 400-facher Vergrößerung. Die in der Literatur angegebene Größe der Nervenzellsomata von 15-25 μm kann anhand der 25 μm langen Referenzbalken bestätigt werden. Auch die beschriebenen 3-5 Nervenzellfortsätze sind deutlich zu erkennen. Wie bereits bei 100-facher Vergrößerung zeigt sich auch hier eine geringere Dichte der NOS⁺-Interneurone beim *dt^{sz}*-Hamster im Vergleich zum Kontrolltier. Die Verzweigungen der Zellfortsätze erscheinen bei der *dt^{sz}*-Mutante geringer ausgebildet zu sein als bei Kontrollhamstern.

Abb. 21

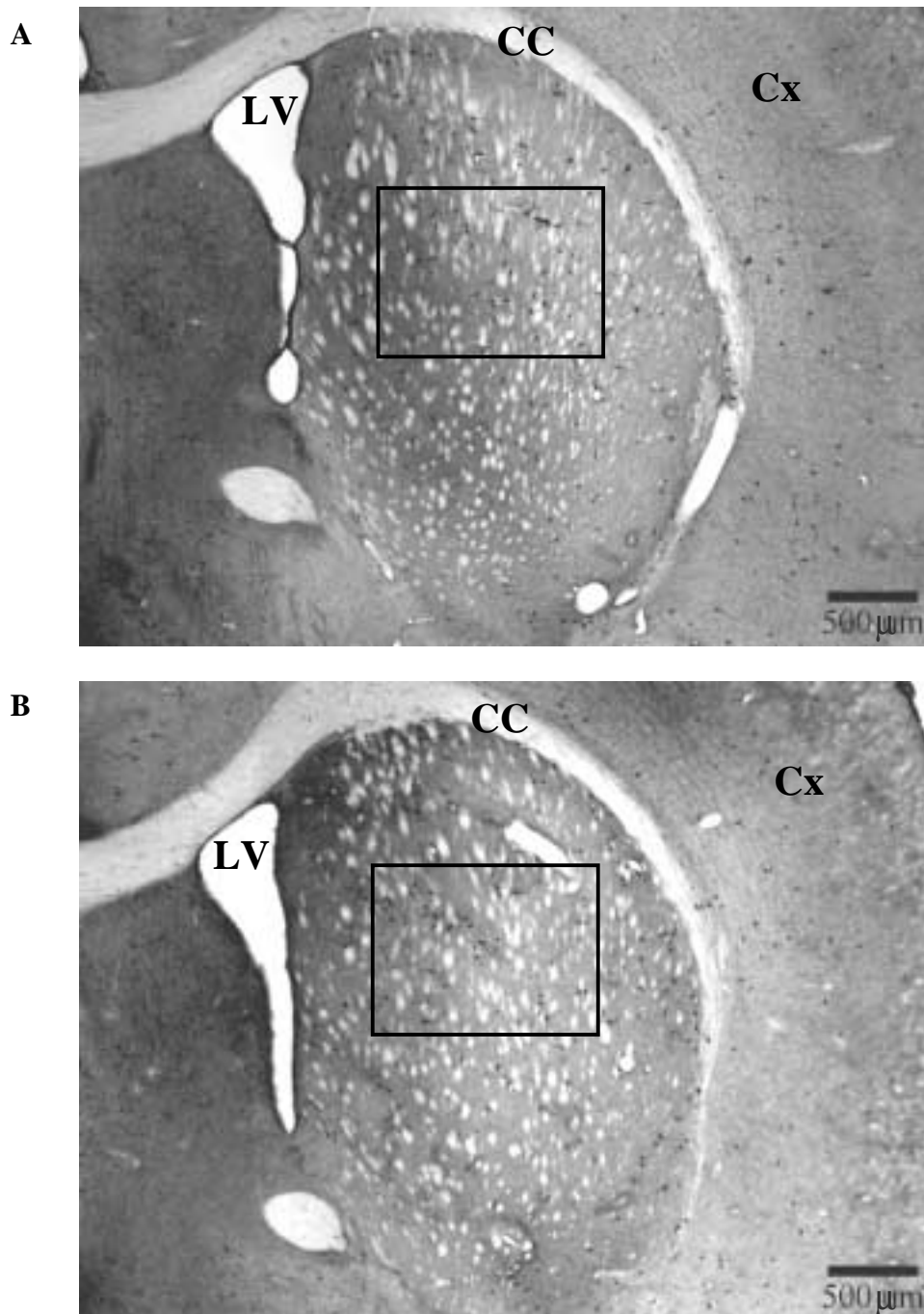


Abb. 21: Abbildungen histologischer Schnitte eines *dt^{sz}*-Hamsters (**A**) im Alter nach der Spontanremission der Dystonie (>90 Tage) und eines gleichaltrigen Kontrolltieres (**B**) bei 25-facher Vergrößerung nach Markierung der NOS⁺-Interneurone. Dargestellt sind die rechten Gehirnhälften der AP-Ebene +1,20 (mm relativ zu Bregma). Das sich im Bildzentrum befindende Striatum ist von schwarz markierten NOS⁺-Nervenzellen durchsetzt. Der hell abgesetzte Corpus Callosum (CC) bildet die Grenze zum Kortex (Cx). Zur Medianen wird das Striatum vom lateralen Ventrikel (LV) begrenzt. Der Rahmen markiert den Ausschnitt, aus dem die weiteren Vergrößerungen (100- und 400-fach, Abb. 22-23) entnommen wurden, die Länge der Referenzbalken entspricht 500 μm im histologischen Schnitt.

Abb. 22

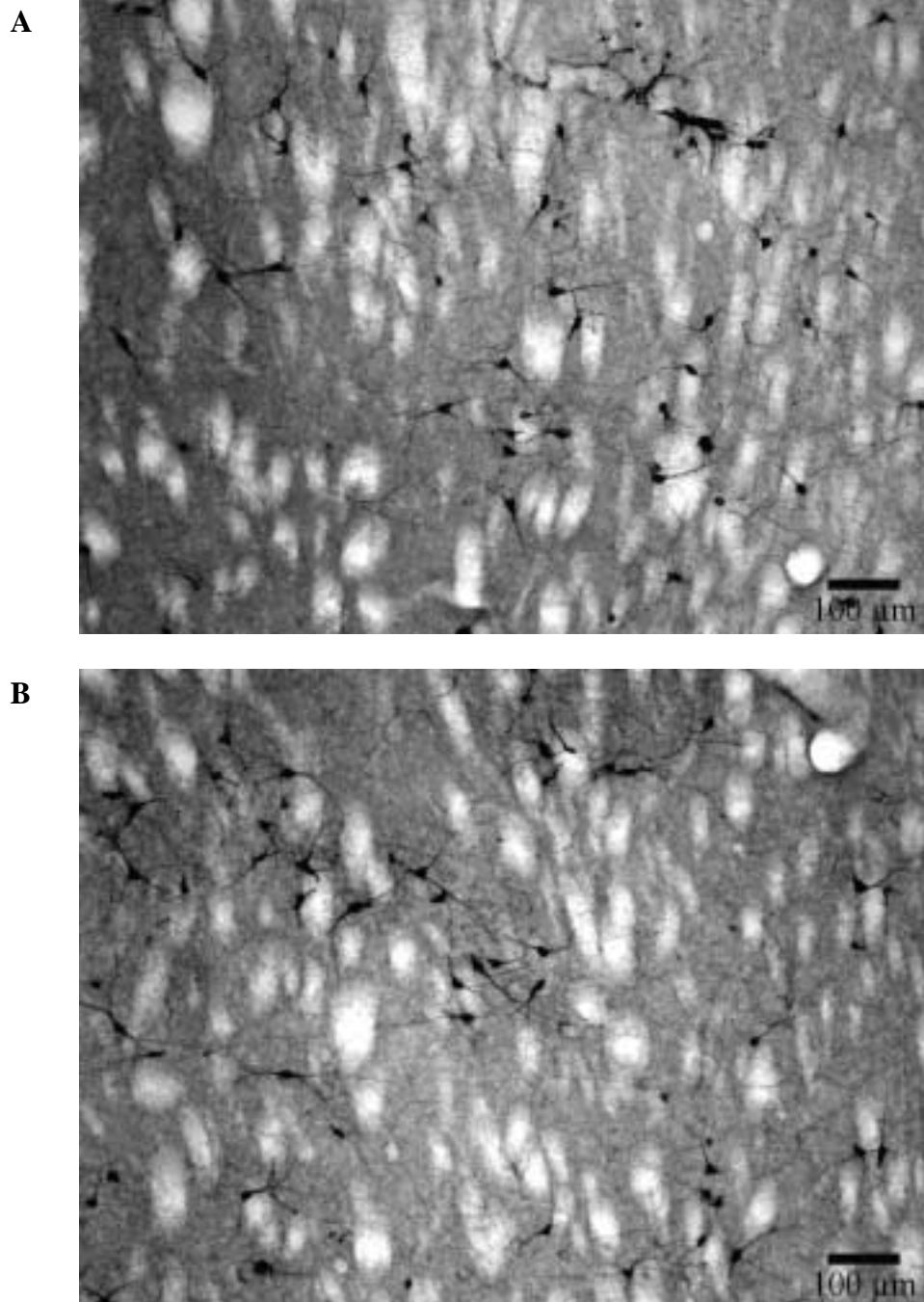


Abb. 22: Histologische Abbildungen des Striatums (s. Abb. 21) eines *dt^{sz}*-Hamsters (**A**) im Alter nach der Spontanremission der Dystonie und eines gleichaltrigen Kontrolltieres (**B**) bei 100-facher Vergrößerung. Die schwarz markierten Zellen mit ihren teils weitreichenden Fortsätzen sind die markierten NOS-reaktiven Interneurone. Im Gegensatz zu den Tieren im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie (Abb. 18-20) sind hier keine Unterschiede in der Dichte NOS⁺-Interneurone feststellbar. Die Länge der Referenzbalken entspricht 100 μm im histologischen Schnitt.

Abb. 23

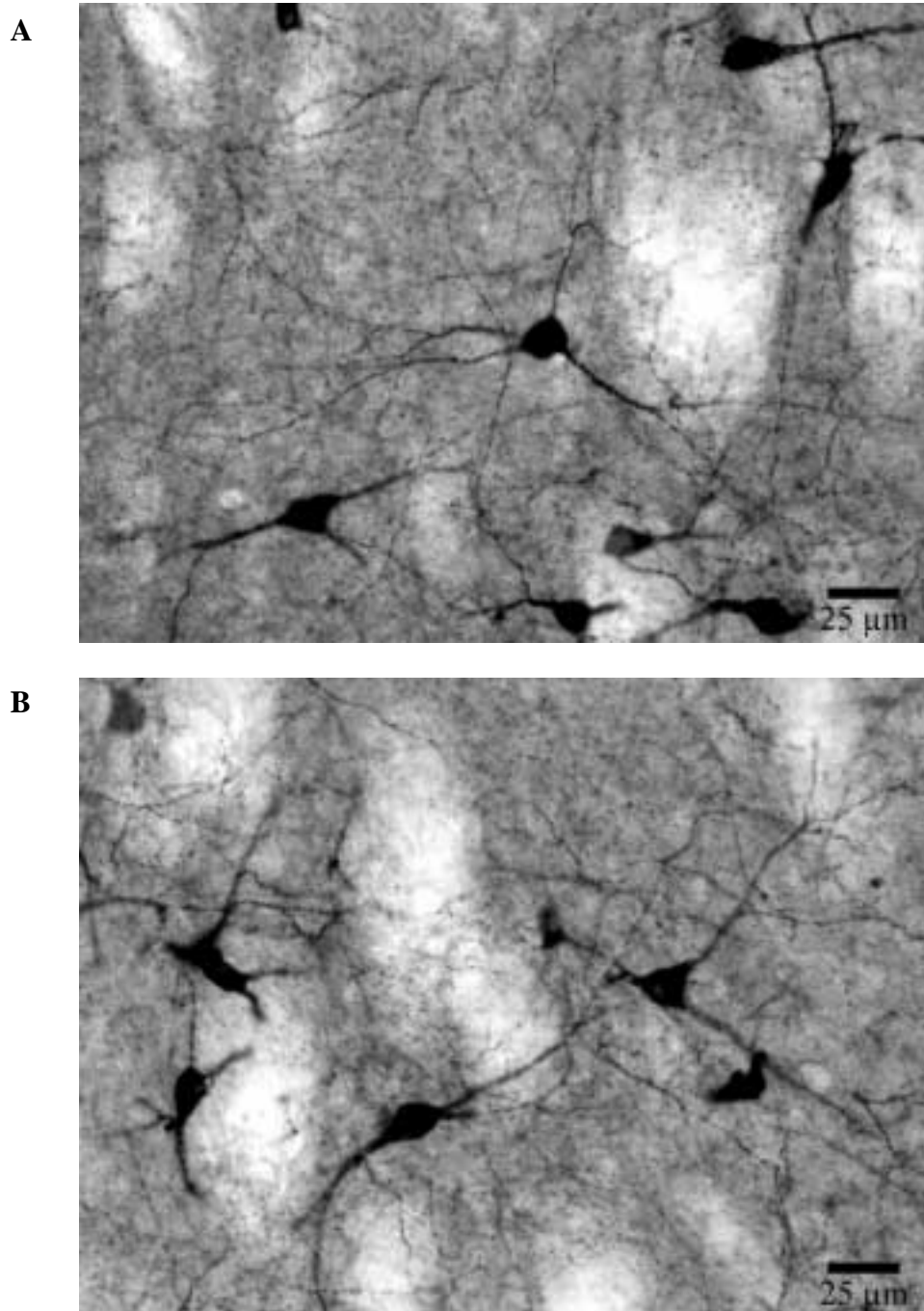


Abb. 23: Histologische Abbildungen des Striatums eines dt^{sz} -Hamsters (s. Abb. 21) im Alter nach der Spontanremission der Dystonie (>90 Tage) und eines gleichaltrigen Kontrolltieres unter 400-facher Vergrößerung. Die Größe der Nervenzellsomata kann anhand der 25 μm langen Referenzbalken auf etwa 20 μm geschätzt werden. Die markierten Neurone besitzen etwa 3-5 deutlich zu erkennende Nervenzellfortsätze, deren Dichte bei dt^{sz} - und Kontrollhamstern vergleichbar sind.

Von jedem Gehirnschnitt dieses Bereiches wurde pro Region ein mittlerer Bildauschnitt unter der 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Die Dichte der NOS⁺-Interneurone konnte anschließend mittels der in Kapitel 3.2.2.2. hergeleiteten Formel (Dichte [Neurone] = (Anzahl der gezählte Neurone x 380,23)/mm³) errechnet werden. In die statistische Auswertung gingen die arithmetischen Mittel der Einzelwerte der jeweiligen Regionen pro Tier und Gehirnhälfte ein (s. tabellarischer Anhang).

4.2.2.1. Dichte der striatalen NOS⁺-Interneurone in der MAX-Phase

Zuerst wurden die Werte der rechten und linken Gehirnhälfte mit Hilfe des gepaarten t-Testes bei den A-Tieren (p=0,885) und bei den *dt^{sz}*-Tieren (p=0,371) verglichen. Da bei beiden Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gehirnhälften bestanden, gingen in die nachfolgenden Auswertungen die Werte beider Gehirnhälften gemeinsam ein.

Anschließend konnten die Dichten der striatalen NOS⁺-Interneurone der *dt^{sz}*-Hamster mittels eines einseitigen ungepaarten Student's t-Testes mit denen der Kontrolltiere verglichen werden.

Die statistische Auswertung aller ermittelten Werte zeigte, daß die Dichte der NOS⁺-Interneurone im **gesamten Striatum** bei den *dt^{sz}*-Hamstern im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant reduziert war (p<0,001) (Abb. 25). Die mittlere Dichte betrug bei den Kontrolltieren 945 Neurone/mm³ ± 31. Im Vergleich hierzu war sie bei den *dt^{sz}*-Hamstern mit 751 Neurone/mm³ ± 28 um 21% vermindert.

Um zu ermitteln, welche striatalen Subregionen besonders von dieser Reduktion betroffen sind, wurden diese anschließend einzeln miteinander verglichen. Wie in Abb. 24 deutlich zu erkennen, zeigte sich, daß das Ausmaß der Reduzierung stark differierte und nur in 3 Subregionen, dem dorsomedialen, dorsolateralen und ventrolateralen Striatum, statistisch nachgewiesen werden konnte.

Die mittlere Dichte NOS⁺-Interneurone im **anterioren Striatum** der *dt^{sz}*-Hamster war mit 762 Neuronen/mm³ ± 55 im Vergleich zu 972 Neurone/mm³ ± 96 der Kontrolltiere tendenziell, jedoch nicht signifikant (p = 0,068) reduziert.

Abb. 24

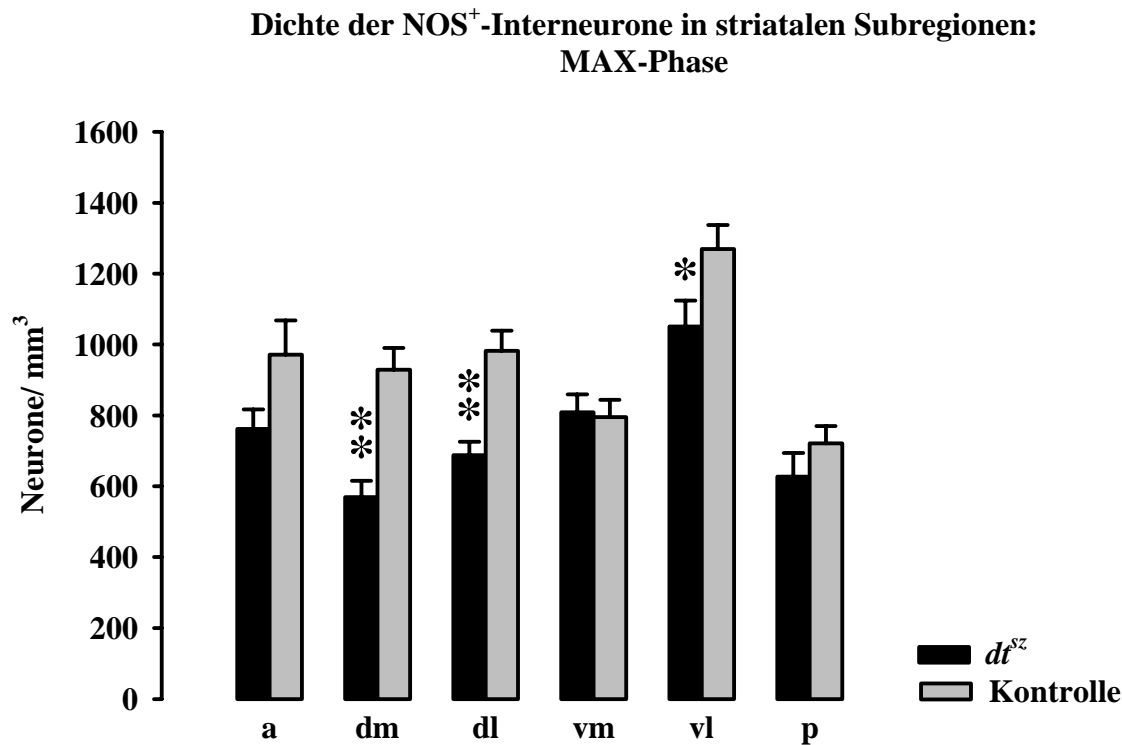


Abb. 24: Dichte von NOS⁺-Interneuronen in striatalen Subregionen von *dt^{sz}*-Hamstern (schwarze Balken) im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie (MAX-Phase) und Kontrollhamstern (graue Balken) gleichen Alters und beiden Geschlechts. Das Striatum wurde analog zu früheren Studien anderer Interneuronen-Typen in 6 Subregionen unterteilt: das *anteriore* Striatum (a), das *dorsomediale* Striatum (dm), das *dorsolaterale* Striatum (dl), das *ventromediale* Striatum (vm), das *ventrolaterale* Striatum (vl) und das *posteriore* (p) Striatum. Angegeben sind die (x) + S.E. von jeweils 8 Tieren. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede in der Dichte der NOS⁺-Interneurone der *dt^{sz}*-Hamster im Vergleich zu den Kontrolltieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Im **dorsomedialen Striatum** betrug die Dichte der NOS⁺-Interneurone bei den *dt^{sz}*-Hamstern durchschnittlich $569 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 47$ und bei den Kontrolltieren $929 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 61$. Damit war sie bei den *dt^{sz}*-Hamstern im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant ($p < 0,001$) um 39% reduziert.

Im **dorsolateralen Striatum** zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) bei den Tiergruppen: die *dt^{sz}*-Hamster wiesen in dieser Region mit $688 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 38$ eine deutlich geringere mittlere NOS⁺-Interneuronendichte auf als die Kontrollhamster mit $982 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 57$. Diese Differenz entspricht einer Reduktion um 30%.

Abb. 25

**Dichte der NOS⁺-Interneurone im Gesamtstriatum in der
MAX-Phase und nach der Spontanremission der Dystonie (Alter >90 Tage)**

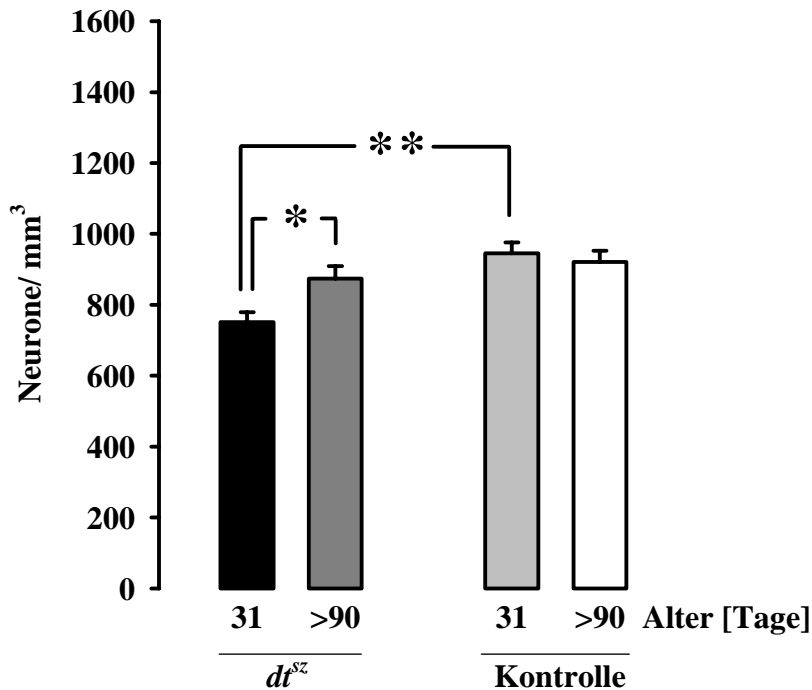


Abb. 25: Dichte der NOS⁺-Interneurone im Gesamtstriatum von *dt^{sz}*-Hamstern im Alter der maximalen Ausprägung dystoner Attacken (31 Tage, MAX-Phase, schwarzer Balken) und im Alter nach der Spontanremission der Dystonie (>90 Tage, dunkelgrauer Balken) sowie Kontrollhamstern gleichen Alters (31 Tage hellgrauer Balken, >90 Tage, weißer Balken). Angegeben sind die (x) + S.E. von jeweils 8 (MAX-Phase) bzw. 7 Tieren (nach der Spontanremission). Die Sternchen kennzeichnen signifikante Abweichungen der NOS⁺-Interneuronendichte beim *dt^{sz}*-Hamster in Abhängigkeit vom Alter und im Vergleich zu den Kontrollhamstern (*p<0,01; **p<0,001).

Im **ventromedialen Striatum** waren keine Abweichungen in der Dichte NOS⁺-Interneurone zwischen den Tiergruppen festzustellen. Die durchschnittliche Dichte von 809 Neuronen/mm³ ± 50 bei den *dt^{sz}*-Hamstern entsprach in etwa der mittleren Dichte der Interneurone der Kontrolltiere mit 795 Neuronen/mm³ ± 49 (p=0,845).

Im **ventrolateralen Striatum** fielen bei beiden Tiergruppen relativ hohe Interneuronendichten auf. Die *dt^{sz}*-Hamster wiesen eine durchschnittliche striatale Dichte von NOS⁺-Interneuronen mit 1051 Neuronen/mm³ ± 73 auf, die Kontrolltiere hatten eine mittlere Dichte von 1269 Neuronen/mm³ ± 68. Somit war die striatale Dichte NOS⁺-Interneurone bei den *dt^{sz}*-Hamstern im ventrolateralen Striatum signifikant um 17% (p=0,037) reduziert.

Zwischen den mittleren Dichten der NOS⁺-Interneurone bei den *dt^{sz}*-Hamstern und Kontrolltieren gab es im **posterioren Striatum** keine signifikanten Differenzen. Die *dt^{sz}*-Hamster wiesen eine durchschnittliche Dichte von 627 Neuronen/mm³ ± 67 und die Kontrolltiere eine mittlere Dichte von 721 Neuronen/mm³ ± 49 auf.

Die Faserdichte der NOS⁺-Interneurone wurde nicht quantifiziert. Wie aus Abb. 20 hervorgeht, erschien die Faserdichte bei der *dt^{sz}*-Mutante (Abb. 20A) geringer zu sein als bei den altersgleichen Kontrollhamstern (Abb. 20B).

4.2.2.2. Dichte der striatalen NOS⁺-Interneurone nach der Spontanremission der Dystonie

Weder bei den *dt^{sz}*-Hamstern (p=0,330) noch bei den Kontrolltieren (p=0,418) konnten mit Hilfe des *gepaarten* Student's t-Testes signifikante Unterschiede in den durchschnittlichen Dichten der NOS⁺-Interneurone der rechten und linken Gehirnhälften festgestellt werden. Daher erfolgten auch hier die weiteren Auswertungen gleichermaßen mit den Werten beider Seiten.

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Dichten der striatalen NOS⁺-Interneurone der *dt^{sz}*-Hamster mittels eines einseitigen *ungepaarten* Student's t-Testes im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie konnten nun nach Spontanremission keine signifikanten Abweichungen (p=0,315) in der mittleren Dichte der NOS⁺-Interneurone im **Gesamtstriatum** zwischen *dt^{sz}*-Hamstern und Kontrolltieren mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 25). Die *dt^{sz}*-Hamster hatten eine durchschnittliche Dichte von 874 Neuronen/mm³ ± 35, die Kontrolltiere von 921 Neuronen/mm³ ± 31.

In einzelnen striatalen Subregionen lagen jedoch signifikante Unterschiede vor (s. Abb. 26).

Im **anterioren Striatum**, in dem bei den 31 Tage alten *dt^{sz}*-Hamstern nur tendenziell eine verminderte mittlere Dichte der NOS⁺-Interneurone zu beobachten war, fand sich nun im Vergleich zu den Kontrollhamstern eine signifikant geringere Dichte (p=0,005). Diese betrug bei den *dt^{sz}*-Hamstern 861 Neurone/mm³ ± 52 und bei den Kontrolltieren 1123 Neurone/mm³ ± 67. Die Differenz lag somit bei 23%.

Abb. 26

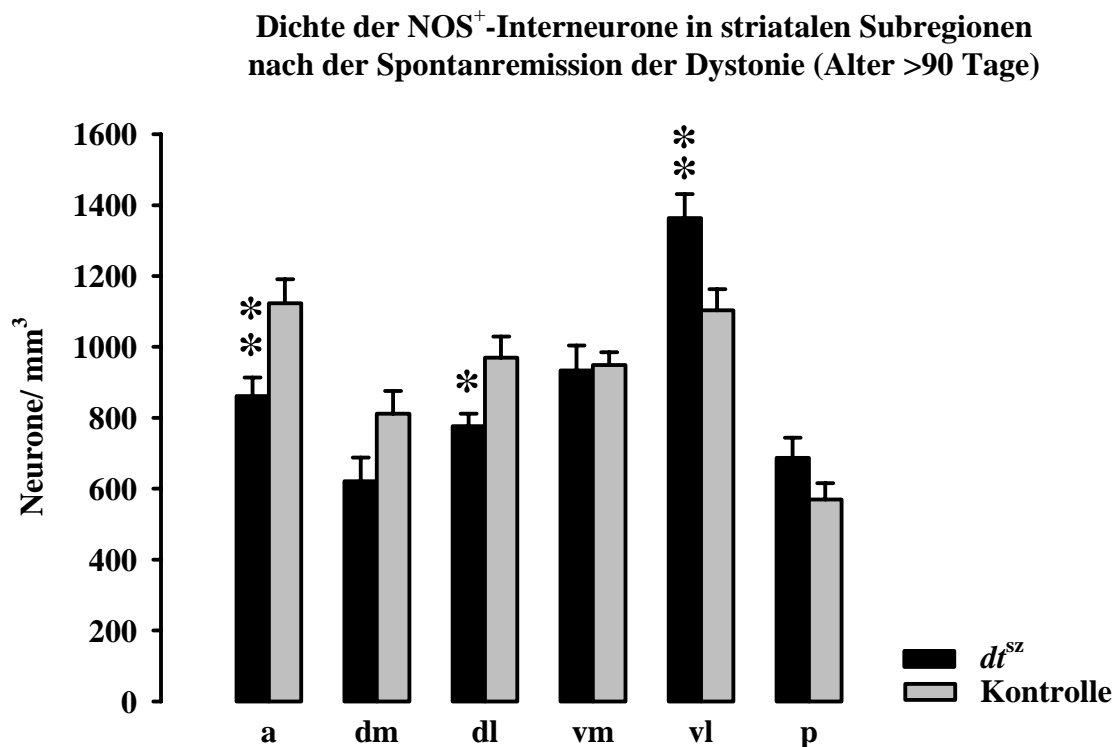


Abb. 26: Dichte der NOS⁺-Interneurone in striatalen Subregionen von *dt^{sz}*-Hamstern (schwarze Balken) im Alter nach der Spontanremission der Dystonie (>90 Tage) und von Kontrollhamstern (graue Balken) gleichen Alters. Das Striatum wurde analog zu früheren Studien anderer Interneuronen-Typen in 6 Subregionen unterteilt: das *anteriore* Striatum (a), das mittlere Striatum mit einer *dorsomedialen* (dm), einer *dorsolateralen* (dl), einer *ventromedialen* (vm) und einer *ventrolateralen* (vl) Region sowie das *posterio*re (p) Striatum. Angegeben sind die (x) + S.E. von jeweils 7 Tieren. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede in der Dichte der NOS⁺-Interneurone der *dt^{sz}*-Hamster im Vergleich zu den Kontrolltieren (*p<0,05;**p<0,01).

Im **dorsomedialen Striatum** waren hingegen keine signifikanten Abweichungen in der mittleren Dichte ermittelbar, lediglich die Tendenz einer Verminderung bei den *dt^{sz}*-Hamstern blieb erhalten (p=0,05). Die mittlere Dichte NOS⁺-Interneurone betrug bei den *dt^{sz}*-Hamstern 621 Neurone/mm³ ± 67 und bei den Kontrolltieren 811 Neurone/mm³ ± 64.

Im **dorsolateralen Striatum** zeigte sich, wie bei den Untersuchungen in der MAX-Phase, bei den *dt^{sz}*-Hamstern eine signifikante Reduktion der mittleren Dichte NOS⁺-Interneurone (p=0,010) gegenüber den Kontrolltieren. Die Differenz war mit 20% jedoch geringer ausgeprägt als im Alter von 31 Lebenstagen (30%). Die *dt^{sz}*-Hamster hatten eine

durchschnittliche Dichte von $776 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 36$ und die Kontrollhamster von $969 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 60$.

Im **ventromedialen Striatum** waren, wie auch in der MAX-Phase, keine signifikanten Unterschiede zwischen der Hamstermutante und den Kontrolltieren zu erkennen ($p=0,854$). Die mittlere Dichte betrug bei den dt^{sz} -Hamstern $934 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 70$ und bei den Kontrolltieren $948 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 37$.

Wie aus der Abb. 26 ersichtlich, hatten sich die Verhältnisse im **ventrolateralen Striatum** umgekehrt. Die mittlere Dichte der NOS^+ -Interneurone war bei den dt^{sz} -Hamstern mit $1364 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 67$ im Vergleich zu den Kontrolltieren mit $1103 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 60$ um 24% signifikant erhöht ($p=0,008$).

Im **posterioren Striatum** war die durchschnittliche Dichte der NOS^+ -Interneurone bei den dt^{sz} -Hamstern und Kontrolltieren vergleichbar ($p=0,120$). Sie betrug bei der Hamstermutante im Mittel $687 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 57$ und bei den Kontrolltieren $570 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 46$.

Zwischen dt^{sz} - und Kontrollhamstern ergab sich nicht mehr der Eindruck einer veränderten Faserdichte (vgl. Abb. 23A vs. 23B) wie bei den Gruppen jüngerer Tiere (s. Abb. 20A vs. Abb. 20B).

4.2.3. Ontogenese der striatalen NOS^+ -Interneurone

Nachfolgend wird auf die Dichte der NOS^+ -Interneurone innerhalb derselben Tiergruppen eingegangen, um die postnatale Entwicklung dieser Zellen bei der Mutante und den Kontrolltieren zu verdeutlichen.

Die Dichte der NOS^+ -Interneurone im **gesamten Striatum** war bei den dt^{sz} -Hamstern zwischen dem 31. und dem 90. Lebenstag von $751 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 28$ auf $874 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 35$ signifikant ($p<0,01$) um 16% angestiegen (s. Abb. 25). Die Kontrolltiere zeigten mit einer mittleren Dichte von $945 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 31$ am 31. Lebenstag und $921 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 31$ nach dem 90. Lebenstag keine altersabhängigen Abweichungen im Gesamtstriatum ($p=0,591$) (s. Abb. 25).

Abb. 27

Dichte der NOS⁺-Interneurone in striatalen Subregionen bei *dt^{sz}*-Hamstern in der MAX-Phase und nach der Spontanremission der Dystonie (Alter >90 Tage)

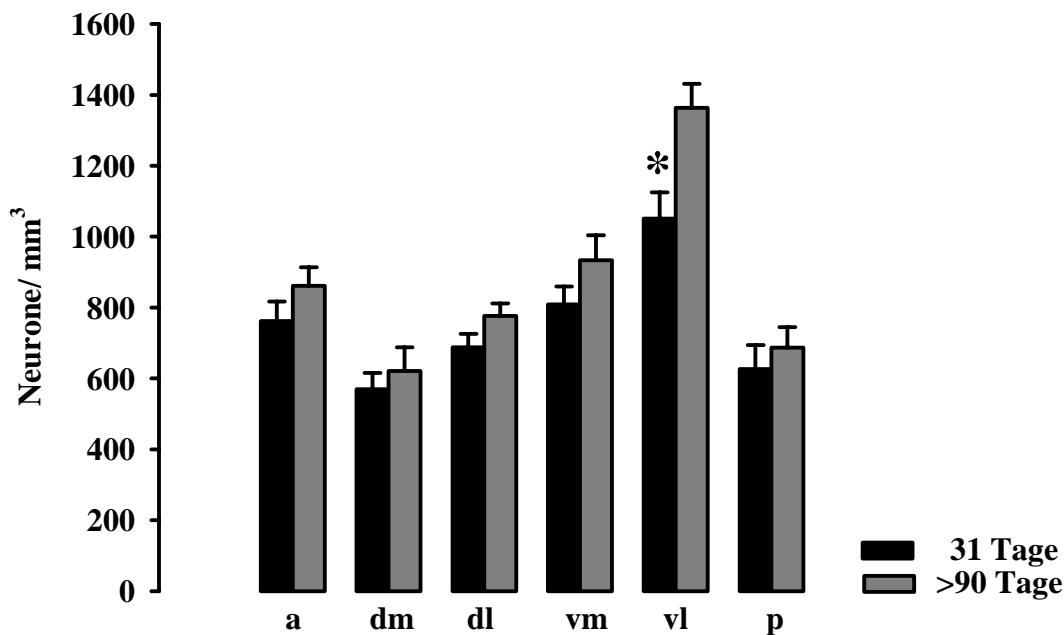


Abb. 27: Dichte der NOS⁺-Interneurone in striatalen Subregionen von *dt^{sz}*-Hamstern im Alter der maximalen Ausprägung dystoner Attacken (31 Tage, MAX-Phase, schwarze Balken) und im Alter nach der Spontanremission der Dystonie (>90 Tage, dunkelgraue Balken). Das Striatum wurde analog zu früheren Studien anderer Interneuronen-Typen in 6 Subregionen unterteilt: das *anteriore* Striatum (a), das mittlere Striatum mit einer *dorsomedialen* (dm), einer *dorsolateralen* (dl), einer *ventromedialen* (vm) und einer *ventrolateralen* (vl) Region sowie das *posteriore* (p) Striatum. Angegeben sind die (x) + S.E. von 8 (MAX-Phase) bzw. 7 (nach der Spontanremission) Tieren. Signifikante Unterschiede in der NOS⁺-Interneuronendichte beim *dt^{sz}*-Hamster zwischen MAX-Phase und Alter nach der Spontanremission sind mit Sternchen gekennzeichnet (*p<0,01).

Die Aufschlüsselung nach Subregionen gibt jedoch ein differenzierteres Bild von der Entwicklung dieses Interneuronentypes im Striatum des Hamsters (s. Abb. 27 und 28). Bei der Hamstermutante fiel in allen Subregionen ein teils nur tendenzieller, im ventrolateralen Striatum signifikanter Anstieg (p=0,004) der NOS⁺-Interneurone auf (s. Abb. 27). Bei den Kontrolltieren war hingegen nur in zwei Regionen (anterior und ventromedial) eine tendenzielle Zunahme erkennbar, die sich im ventromedialen Striatum statistisch bestätigen ließ (p=0,021). In den übrigen Subregionen zeigte sich eine Tendenz zur Abnahme der Dichte (s. Abb. 28).

Abb. 28

**Dichte der NOS⁺-Interneurone in striatalen Subregionen bei Kontrollhamstern
am 31. Lebenstag und nach dem 90. Lebenstag**

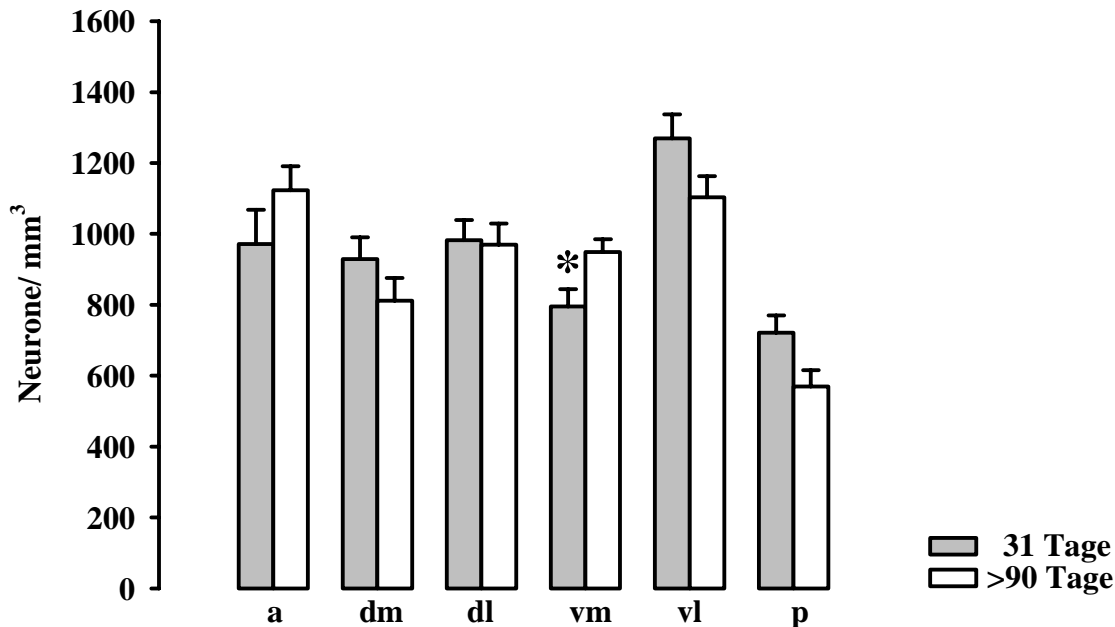


Abb. 28: Dichte NOS⁺-Interneurone in striatalen Subregionen von Kontrollhamstern im Alter von 31 Tagen (graue Balken) und über 90 Tagen (weiße Balken). Das Striatum wurde analog zu früheren Studien anderer Interneuronen-Typen in 6 Subregionen unterteilt: das *anteriore* Striatum (a), das *dorsomediale* Striatum (dm), das *dorsolaterale* Striatum (dl), das *ventromediale* Striatum (vm), das *ventrolaterale* Striatum (vl) und das *posteriore* (p) Striatum. Angegeben sind die (\bar{x}) + S.E. von 8 (31 Tage) bzw. 7 Tieren (>90 Tage). Signifikante Unterschiede in der Dichte der NOS⁺-Interneurone der *Kontrolltiere* zwischen dem 31. Lebenstag und Alter nach dem 90. Lebenstag sind mit einem Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

In beiden Tiergruppen war ein schwacher tendenzieller Anstieg der mittleren Dichte der NOS⁺-Interneurone zwischen dem 31. und 90. Lebenstag im **anterioren Striatum** zu beobachten, der sich weder bei den *dt^{sz}*-Hamstern ($p=0,203$) noch bei den Kontrolltieren ($p=0,221$) statistisch belegen ließ.

Weder im **dorsomedialen**, noch im **dorsolateralen Striatum** waren bei den Tiergruppen signifikante Abweichungen in der Neuronendichte in Abhängigkeit vom Alter zu erkennen. Die *dt^{sz}*-Hamster hatten im Alter von 31 Tagen eine mittlere Dichte von $569 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 47$ im dorsomedialen und $688 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 38$ im dorsolateralen Striatum und zeigten bei einer durchschnittlichen dorsomedialen Dichte von $621 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 67$ und

dorsolateralen Dichte von $776 \text{ Neurone/mm}^3 \pm 36$ im Alter von über 90 Tagen keine signifikanten Veränderungen (dorsomedial: $p=0,521$; dorsolateral: $p=0,196$).

Auch bei den Kontrolltieren zeigten sich im dorsalen Striatum keine signifikanten altersabhängigen Unterschiede in der Neuronendichte: mit 31 Lebenstagen wiesen sie im dorsomedialen Striatum eine mittlere Dichte von $811 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 64$ und im dorsolateralen von $982 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 57$ auf, während sie im Alter von über 90 Tagen eine durchschnittliche dorsomediale Dichte von $811 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 64$ ($p=0,196$) und dorsolaterale Dichte von $969 \text{ Neuronen/mm}^3 \pm 60$ ($p=0,880$) zeigten.

Im **ventromedialen Striatum** war bei den dt^{sz} -Hamstern ein tendenzieller altersabhängiger Anstieg von 809 ± 50 auf $934 \pm 70 \text{ Neurone/mm}^3$ (vom 31. zum >90 . Lebenstag) zu erkennen, der sich jedoch statistisch nicht bestätigen ließ ($p=0,152$). Bei den **Kontrolltieren** nahm die Dichte mit 795 ± 49 am 31. Lebenstag und $948 \pm 37 \text{ Neuronen/mm}^3$ im Alter von über 90 Tagen signifikant um 19% zu ($p=0,021$).

Im **ventrolateralen Striatum** stieg die mittlere Dichte der NOS^+ -Interneurone bei der Hamstermutante von 1051 ± 73 in der MAX-Phase auf $1364 \pm 67 \text{ Neuronen/mm}^3$ nach der Spontanremission der Dystonie signifikant um 30% an ($p=0,004$). Bei den Kontrolltieren war hingegen eine tendenzielle Reduktion von 1269 ± 68 im Alter von 31 Tagen auf $1103 \pm 60 \text{ Neurone/mm}^3$ im Alter von über 90 Tagen zu beobachten ($p=0,082$).

Im **posterioren Striatum** waren bei beiden Tiergruppen keine signifikanten altersabhängigen Abweichungen in der Dichte der NOS^+ -Interneurone festzustellen. Die dt^{sz} -Hamster wiesen eine mittlere Dichte von 627 ± 67 in der MAX-Phase und von $687 \pm 57 \text{ Neuronen/mm}^3$ nach der Spontanremission der Dystonie auf ($p=0,503$). Die mittlere Dichte der Kontrolltiere betrug im Alter von 31 Tagen 721 ± 49 und im Alter von über 90 Tagen $687 \pm 57 \text{ Neuronen/mm}^3$ ($p=0,658$).