

5. DISKUSSION

Der in dieser Arbeit verwendete dt^{sz} -Hamster stellt heute das einzige etablierte und gut charakterisierte genetische Tiermodell für die paroxysmale nicht-kinesiogene dystone Choreoathetose (PDC) des Menschen dar, eine Form der Dystonie bei der die dystonen Attacken durch Streß, Alkohol oder Koffein ausgelöst werden können (Richter und Löscher, 2002). Phänotypisch weist der dt^{sz} -Hamster zahlreiche Übereinstimmungen zu der humanen PDC auf. So treten sowohl beim Menschen als auch bei dieser Hamstermutante bei unbeeinträchtigtem Bewußtsein Attacken unfreiwilliger Muskelkontraktionen auf, die drehende Bewegungen und Haltungen erzeugen und über mehrere h anhalten können (Bhatia, 1998; Richter und Löscher, 1998; Rothwell, 1995). Während dieser Attacken sind keine EEG-Veränderungen nachweisbar, elektrophysiologische Untersuchungen zeigten jedoch eine verminderte Aktivität der Neurone des GPi (Gernert et al., 2000; Vitek, 2002). Sowohl beim Menschen als auch bei der Hamstermutante haben GABA-mimetische Substanzen und die tiefe Hirnstimulation einen mildernden Einfluß auf die Erkrankung (Fahn, 1995; Fredow und Löscher, 1991; Harnack et al., 2004). In Hinblick darauf, daß jeweils keine durch Standardtechniken nachweisbaren Veränderungen im ZNS festgestellt werden konnten, erscheint der dt^{sz} -Hamster daher als ein geeignetes Tiermodell für die Erforschung der primären PDC des Menschen.

Die teils unterschiedlichen anatomischen und morphologischen Verhältnisse innerhalb der Basalganglien zwischen Nagetieren und Primaten müssen bei der Interpretation von Befunden in Hinblick auf ihre Bedeutung beim Menschen berücksichtigt werden. Die Möglichkeit der Untersuchung großer Tiergruppen unter Einsatz teils invasiver Methoden ist jedoch im Vergleich zu den Untersuchungen an Humanpatienten ein großer Vorteil.

5.1. Aspekte zur Methodik

5.1.1. Induktion und Beurteilung der Bewegungsstörung

Die von Löscher et al. 1989 eingeführte „triple stimulation technique“, ein standardisiertes Prozedere zur Induktion der Dystonie beim dt^{sz} -Hamster, ergab auch in den hier durchgeführten Untersuchungen reproduzierbare Schweregrade. Die dt^{sz} -Hamster bildeten innerhalb der 3 Untersuchungsstunden sequenzartig dystone Bewegungsstörungen aus, die

anhand eines Scoresystems (s. 3.2.1.1.) zuverlässig bewertet werden konnten. Frühere sowie eigene Untersuchungen mit nicht-dystonen Kontrolltieren konnten zeigen, daß das Stadium 1 dieses Scoresystems, in dem die Hamster eine flache Körperhaltung zeigen, nicht spezifisch für die Ausbildung der Bewegungsstörung ist. Vielmehr scheint es als eine Reaktion auf den Streßstimulus nach dem Einsetzen in den leeren Makrolonkäfig Ausdruck eines tierartspezifischen Angstverhaltens zu sein. Daher wurde, analog zu früheren Veröffentlichungen, erst das Stadium 2 zur Auswertung der *Latency on* herangezogen (Fredow und Löscher, 1991).

In der Ausprägung der Dystonie gab es, wie auch schon von Hamann (2000) und Rehders (1999) beobachtet, sowohl zwischen den Würfen als auch zwischen den einzelnen Wurfgenossen ausgeprägte Differenzen bezüglich der maximal entwickelten Schweregrade. Tiere mit nur geringer Dystonieausprägung wurden daher innerhalb der ersten beiden Testwochen ausselektiert und nicht für die Versuche verwendet. Desweiteren war ein jahreszeitlicher Einfluß auf den Schweregrad dystoner Attacken erkennbar, der sich während der Herbst- und Wintermonate in einer allgemeinen Verminderung äußerte und sich in den Frühlingsmonaten wieder verstärkte. Diese Beobachtung kann ihre Ursache in dem veränderten Lichtregime der Wintermonate haben, welches jedoch aus Gründen einer abfallenden Zuchtleistung zur Aufrechterhaltung der Tierzahlen notwendig erschien. Zu dieser Zeit zeigten einige Würfe zusätzlich ein verzögertes altersabhängiges Auftreten der Dystonie und konnten noch über den 42. Lebensstag hinaus (bis zum 44. Lebensstag) für Versuche mit vermeintlich antidystonen Substanzen verwendet werden.

5.1.2. Striatale Applikation

Die pharmakologische Manipulation striataler Rezeptoren durch Mikroinjektionen zeigte sich bereits in früheren Studien als geeignete Methode zur Aufklärung der pathophysiologischen Bedeutung verschiedener Neurotransmittersysteme in der *dt^{sz}*-Hamstermutante (Hamann und Richter, 2002; Rehders et al., 2000). Die Implantation erfolgte auch bei den eigenen Untersuchungen ebenfalls in das dorsomediale Striatum, da frühere Studien vornehmlich Abweichungen in dieser Subregion zeigten (Richter und Löscher, 2002). Durch die chronische Implantation der Führungskanülen konnte eine korrekte Applikation gewährleistet und durch die nachfolgende histologische Aufbereitung des Gehirns kontrolliert werden.

Da sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in früheren Studien (Rehders, 1999) bei der Hamstermutante keine Unterschiede in den Verhaltenseffekten von Substanzen innerhalb des dorsalen Striatums festgestellt werden konnten, wurden auch die vereinzelt Tiere mit Sitz der Führungskanülen im *dorsolateralen* Striatum in die Auswertung einbezogen. Durch die Anfertigung histologischer Präparate konnte zusätzlich das Vorhandensein infektiöser Prozesse im Gehirn operierter Tiere überprüft werden, die möglicherweise zu verfälschten Ergebnissen führen. Die relativ hohe Infektionsrate von 9,3% läßt sich durch die Einführung eines neuen Systems an Führungskanülen und Mandrins erklären, welche sich aufgrund fehlender Bezugsmöglichkeiten früherer Materialien ergab. Ein mangelnder Verschluß der Führungskanülen durch die Mandrins konnte inzwischen behoben und gleichzeitig die Infektionsrate gesenkt werden.

Die Mikroinjektionstechnik und das damit injizierte Volumen während der Versuche ließen sich durch den aufgezogenen Farbstoffspiegel in den Schläuchen und die auftretenden Verhaltenseffekte bei den Tieren gut kontrollieren. Das gewählte Injektionsvolumen von 0,5 µl/Hemisphäre erscheint hinsichtlich des bei Ratten üblichen striatalen Injektionsvolumens von 1,0 µl/Hemisphäre als angemessen (Wang und McGinty, 1996). Das für die Ratten angegebene Volumen steht in Einklang mit Studien, die bei einer applizierten Substanz eine Diffusionsstrecke von ca. 2 mm, ausgehend von der Injektionsstelle, nachweisen konnten (Martin, 1991). Somit ist wahrscheinlich, daß bei dem gewählten Injektionsvolumen nicht das Gesamtstriatum manipuliert wurde. Eine Begrenzung der Wirkung auf die dorsomediale Subregion ist jedoch nicht sicher zu gewährleisten. Einer Applikation geringerer Volumina widersprach die teils begrenzte Löslichkeit der verwendeten Substanzen. Die pharmakologischen Manipulationen wurden schon mit dem gewählten Injektionsvolumen von 0,5 µl pro Hemisphäre in den eigenen Untersuchungen teils durch die mangelnde Löslichkeit von Substanzen im neutralen pH-Bereich begrenzt. Substanzen, die sich nur im stark sauren oder basischen Milieu lösen lassen, wurde aufgrund der Gefahr von Neuroläsionen (Jansson et al., 1999) nicht in den Versuchen verwendet.

Aufgrund von Tierschutzaspekten und des großen operativen Aufwandes wurden die Gruppengrößen möglichst klein gehalten und die Hamster jeweils für die Untersuchung mehrerer Substanzen verwendet. Letzteres erscheint in Hinblick auf die zeitlichen Abstände zwischen den Versuchen und die jeweils beobachteten substanztypischen Verhaltenseffekte unproblematisch.

5.1.3. Immunhistochemie

Frühere immunhistochemische Studien konnten eine reduzierte Dichte hemmender GABAerger PV⁺-Interneurone im Striatum von *dt^{sz}*-Hamstern im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren nachweisen (Gernert et al., 2000). Im Alter nach der Spontanremission der Dystonie waren hingegen keine signifikanten Abweichungen mehr feststellbar (Richter und Hamann, 2002). Aufgrund fehlender Kenntnisse über die Dichte weiterer striataler Interneuronentypen bei der Hamstermutante sowie in Hinblick auf die enge Verknüpfung der NOS⁺-Interneurone mit dem glutamatergen System, wurde in der vorliegenden Arbeit die striatale Dichte dieses Nervenzelltyps in Altersabhängigkeit bei der Hamstermutante untersucht.

Die gewählte Methode zur immunhistochemischen Markierung der striatalen NOS⁺-Interneurone beim *dt^{sz}*-Hamster und Kontrolltieren erwies sich in den eigenen Untersuchungen als geeignet. Dieser Interneuronentyp zeichnet sich neben dem Gehalt an nNOS durch einen Gehalt an Somatostatin, Neuropeptid Y, GABA (bzw. Glutamat-decarboxylase) sowie NADPH-d aus (Kawaguchi et al., 1995). In früheren Studien konnte eine vollständige Übereinstimmung in der Markierung von striatalen Rattenneuronen mit nNOS und NADPH-d gezeigt werden. Auch Somatostatin und das Neuropeptid Y konnten in Kollokalisierung mit diesen Substanzen nachgewiesen werden (Figueredo-Cardenas et al., 1996). Die immunhistochemische Markierung mit Ak gegen nNOS erweist sich somit als geeignete Methode zur Darstellung NOS⁺-Interneurone des Striatums. In anderen Regionen des Vorderhirn, so u.a. im Kortex und Hippocampus, finden sich ebenfalls nNOS⁺ Neurone anderen Zelltyps, die jedoch aufgrund der Fragestellung und ihrer Lokalisation bei der Auswertung der immunhistochemischen Präparate keine Rolle spielten (Weiss et al., 1998). Im Striatum sind ausschließlich Interneurone nNOS⁺ (Morello et al., 1997). Die in den eigenen Untersuchungen markierten Zellen stimmten sowohl in der Verteilung als auch in der Morphologie mit den Literaturangaben von Ratten-NOS⁺-Interneuronen überein (Morello et al., 1997; Tong und Hamel, 2000; Wu und Parent, 2000).

Die Zählung der markierten Interneurone erfolgte in Anlehnung an die von Saper (1996) und West (1999) beschriebene Methode des optischen Disektors, d.h. alle Ebenen der Schnitte wurden durchgemustert. Hierdurch konnten mittels der bekannten Ausmaße des Bildausschnittes und der vollständig berücksichtigten Schnittdicke die Interneuronendichten ermittelt werden. Diese besitzen im Vergleich zu absoluten Zahlen eine größere Aussagekraft, da sie eventuelle Unterschiede bezüglich der Gehirnvolumina relativieren (Hamann, 2000).

Die gewählten Bildausschnitte lagen im mittleren Bereich der jeweiligen Subregionen (s. Abb. 10) und somit in Abhängigkeit von der Schnittebene bei allen Gehirnen im gleichen Gebiet. Durch die Kodierung der Objektträger und die große Anzahl an ausgezählten Schnitten kann daher davon ausgegangen werden, daß eine zufällige und repräsentative Ermittlung der Interneuronendichten erfolgte. Die im anterioren und posterioren Striatum geringere Anzahl der Schnitte im Vergleich zu den anderen Subregionen kann durch den größeren Einfluß von Schwankungen in den Neuronendichten zu einer verminderten Aussagekraft statistischer Auswertungen geführt haben.

5.2. Ergebnisse

5.2.1. Pharmakologische Untersuchungen

5.2.1.1. Glutamatrezeptorantagonisten

Um die Hypothese einer striatalen glutamatergen Überaktivität während dystoner Attacken beim dt^{sz} -Hamster zu überprüfen, wurden striatale Manipulationen des glutamatergen Systems durchgeführt. In früheren Untersuchungen zeigte die systemische Applikation von AMPA- und NMDA-Rezeptorantagonisten eine antidystone Wirkung bei der Hamstermutante (Löscher und Richter, 1993; Richter et al., 1991; 1993). Hinweise auf eine Involvierung des striatalen glutamatergen Systems gaben sowohl Rezeptor-autoradiographische Studien als auch elektrophysiologische Untersuchungen (Köhling et al., 2004; Nobrega et al., 2002). Bei dt^{sz} -Hamstern, die während der Ausbildung dystoner Attacken getötet wurden, konnte durch autoradiographische Untersuchungen mit der Substanz $[H^3]$ AMPA eine signifikant reduzierte AMPA-Rezeptorbindung im dorsomedialen, dorsolateralen und posterioren Striatum, im ventromedialen THA und im frontalen Kortex im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden. Diese Befunde wurden von den Autoren als Gegenregulation einer unter Streßeinwirkung eintretenden glutamatergen Überaktivität interpretiert (Nobrega et al., 2002). Elektrophysiologische Studien an Gehirnschnitten zeigten eine erhöhte Erregbarkeit der kortikostriatalen Synapsen und eine verstärkte LTP in Präparaten von dt^{sz} -Hamstern, die während dystoner Attacken getötet wurden. Anschließende elektrophysiologische Untersuchungen in Kombination mit dem NMDA-Ionenkanalblocker MK-801 deuten darauf hin, daß die erhöhte Erregbarkeit mit einer verstärkten präsynaptischen Glutamatausschüttung einhergeht (Köhling et al., 2004). Diese Annahme wurde durch die in einigen Konzentrationen antidyston wirksame striatale Applikation des AMPA-Rezeptorantagonisten

NBQX und die kombinierte Applikation der AMPA- bzw. NMDA-Rezeptorantagonisten NBQX und AP-5 nur partiell bestätigt.

Der selektive kompetitive AMPA-Rezeptorantagonist NBQX (Lees, 2000) zeigte nach striataler Applikation eine antidystone Wirkung vergleichbar mit den in früheren Studien durchgeführten systemischen Injektionen (Richter et al., 1993). Eine signifikante Reduktion des Schweregrades der Dystonie trat in den eigenen Untersuchungen jedoch nur bei einer Konzentration von 0,08 µg pro Hemisphäre in der dritten Untersuchungsstunde auf, hier jedoch in Kombination mit einer signifikant verlängerten *Latency on*. Bei den höheren Konzentrationen (0,16 und 0,25 µg) war lediglich die Tendenz eines antidystonen Effektes zu erkennen. Die ausbleibende Wirkung bei einer Konzentration von 0,03 µg kann in Übereinstimmung mit den kaum vorhandenen Verhaltenseffekten auf eine zu geringe Dosierung zurückzuführen sein. Die bei den höheren Konzentrationen aufgetretene Hypo- bzw. Hyperlokomotion und die Ataxie sind typische Verhaltenseffekte und stimmen mit Literaturangaben überein (Fletcher und Lodge, 1996; Richter et al., 1993). Die fehlende antidystone Wirkung der höheren Dosierungen kann mit der systemischen Wirkungen nicht verglichen werden, da ein geringeres Konzentrationsspektrum getestet wurde (Richter et al., 1993). Wie in Kapitel 2.5.2.1.2. erläutert, zeigen die AMPA-Rezeptoruntereinheiten eine starke Verbreitung auf den inhibitorischen PV⁺-Interneuronen (Bernard et al., 1997). Dieser Neuronentyp gewährleistet einen Großteil der striatalen Hemmung GABAerger Projektionsneurone und ist bei der *dt^{sz}*-Hamstermutante im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie signifikant reduziert (Gernert et al., 2000). Es ist denkbar, daß die Applikation des NBQX in den höheren Konzentrationen eine verhältnismäßig stärkere Wirkung auf die AMPA-Rezeptoren der an sich schon in verringerter Anzahl vorhandenen PV⁺-Interneurone hatte, wodurch eine Hemmung der GABAergen Projektionsneurone durch diesen Neuronentyp noch stärker reduziert und somit eine antidystone Wirkung wieder aufgehoben wurde. Desweiteren wäre eine unterschiedlich starke Verbreitung und Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren auf den Projektionsneuronen des direkten und indirekten Weges möglich, Studien hierzu sind noch nicht durchgeführt oder veröffentlicht worden.

Wider Erwarten bewirkte keine der striatal applizierten NMDA-Rezeptorantagonisten eine signifikante Reduktion des Schweregrades dystoner Attacken beim *dt^{sz}*-Hamster. Diese Befunde stehen in starkem Gegensatz zu den systemischen Applikationen, bei denen sowohl MK-801 als auch das HA-966 eine eindeutige antidystone Wirkung zeigten (Löscher und Richter, 1993; Richter et al., 1991). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß der selektive

NMDA-Rezeptorkanalblocker MK-801 (Rang et al., 2003) aufgrund mangelnder Löslichkeit nicht in einer höheren Konzentration als 4 µg/0,5 µl pro Hemisphäre getestet werden konnte. Bei dieser Konzentration zeigten sich allerdings schon starke substanztypische Verhaltenseffekte wie Hyperlokomotion, Ataxie und Stereotypien, was Beobachtungen bei Ratten entsprach (Schmidt und Kretschmer, 1997). Die bei der getesteten Konzentration aufgetretene Verlängerung der *Latency on* könnte jedoch ein Hinweis auf eine antidystone Wirkung darstellen, die erst bei höheren Konzentrationen in Form einer Reduktion des Schweregrades eingesetzt hätte. Die Substanz HA-966 ist ein partieller Agonist der Glycin-Bindungsstelle und löste bereits in der getesteten Konzentration von 10 µg pro Hemisphäre substanztypische Verhaltenseffekte, wie eine Hyperlokomotion und Anxiolyse aus (Morrow et al., 1999), welche durch die Applikation von 20 µg HA-966 verstärkt wurden. Bei beiden Dosierungen traten weder eine Verringerung der Latenzzeiten noch eine Reduktion des Schweregrades auf. Der kompetitive Antagonist AP-5 bindet an die Glutamat-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors (Magnusson, 1998), und seine striatale Wirkung kann aufgrund einer mangelnden Blut-Hirnschrankgängigkeit (Schmidt und Kretschmer, 1997) nicht mit systemischen Applikationen verglichen werden. Die in der Literatur als typische Verhaltenseffekte beschriebenen Hyperlokomotionen und Stereotypien (Schmidt und Kretschmer, 1997) konnten schon bei einer Dosierung von 0,5 µg pro Hemisphäre beobachtet werden. Bei 1 µg AP-5 wurden sie so ausgeprägt, daß auf eine höhere Dosierung verzichtet wurde.

Insgesamt stützen die Befunde der striatal applizierten NMDA-Antagonisten somit nicht die Hypothese einer Involvierung einer striatalen glutamatergen Überaktivität in die Pathogenese der Dystonie beim *dt^{sz}*-Hamster. Auch die Bindungsstudien am NMDA-Rezeptor deuteten nicht auf eine entscheidende Rolle der striatalen NMDA-Rezeptoren hin (Nobrega et al., 1997). Die signifikant erhöhte Ligandenbindung im ventrolateralen THA (Nobrega et al., 1997) und die erhöhten Konzentrationen des endogenen Glutamaterezeptorantagonisten Kynurensäure im Kleinhirn und Hirnstamm (Richter und Hamann, 2003), weisen auf eine Involvierung anderer Hirnregionen hin. Letztere wurden von den Autoren als eine Gegenregulation glutamaterger Überaktivität interpretiert. Extrastriatale Veränderungen könnten die besonders hohe Diskrepanz zwischen den Effekten der striatal und systemisch applizierten Substanzen erklären.

Desweiteren ist zu berücksichtigen, daß NMDA-Rezeptoren nicht die Hauptkomponente des exzitatorischen postsynaptischen Potentials striataler Neurone generieren (Calabresi et al., 1996) und zur Aktivierung einer Vordepolarisation der Membran, i.d.R. durch AMPA-Rezeptoren, bedürfen (Hardingham und Bading, 2003). Diese befinden sich in Kolokalisation mit den NMDA-Rezeptoren auf den striatalen Projektionsneuronen (Küppenbender et al., 2000).

Die kombinierte striatale Applikation des AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten AP-5 zeigte bei den Dosierungen 0,08 µg (NBQX) und 0,5 µg (AP-5) sowohl in der zweiten als auch in der dritten h signifikante antidystone Effekte auf den Schweregrad dystoner Attacken. Die höhere Dosierung von 0,16 µg NBQX und 1,0 µg AP-5 konnte zwar eine tendenzielle, jedoch keine signifikante antidystone Wirkung erzielen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Einzelwirkung von NBQX, welche auch nur in der Dosierung von 0,08 µg/ Hemisphäre eine signifikante Reduktion des Schweregrades bewirkte. Die beobachteten Verhaltenseffekte waren vergleichbar mit denen, die bei den entsprechenden Einzeldosierungen aufgetreten sind. Die Ergebnisse der kombinierten Applikation bestätigen die antidystone Wirkung des AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX, das Ausmaß der Reduktion des Schweregrades konnte durch die Kombination mit AP-5 jedoch nicht überzeugend verstärkt werden. Betrachtet man die bereits diskutierte physiologische Rolle des striatalen NMDA-Rezeptors, so ist also davon auszugehen, daß dieser Rezeptortyp im Striatum dystoner Hamster nicht kritisch in die Manifestation dystoner Attacken involviert ist.

Wie oben erwähnt, ist in Hinblick auf die deutlich antidystonen Effekte der systemisch im Gegensatz zu den striatal verabreichten Glutamat-Rezeptorantagonisten davon auszugehen, daß auch andere Hirnregionen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der primären Dystonie des dt^{sz} -Hamsters spielen. Die in früheren Untersuchungen nachgewiesene verminderte Aktivität der Neurone des EPN, die vermutlich auf dem Verlust striataler PV^+ -Interneurone beruht (Gernert et al., 2000), führt in Anlehnung an die Hypothese zur Entstehung von Bewegungsstörungen (s. Abb. 2) zu einer erhöhten thalamischen glutamatergen Aktivität. Die systemisch applizierten Glutamat-Antagonisten können somit auch eine verstärkte exzitatorische Transmission zum Kortex inhibiert haben.

Trotz der Befunde der striatalen pharmakologischen Untersuchungen kann in Hinblick auf die Verteilung und Funktion der jeweiligen Glutamatrezeptoren eine kortikostriatale glutamaterge Überaktivität nicht ausgeschlossen werden, ihre Bedeutung in der Manifestation dystoner Attacken beim dt^{sz} -Hamster scheint jedoch eher gering. Modelle zum Verständnis striataler

Interaktionen zwischen den GABAergen Projektionsneuronen und PV⁺-Interneuronen gehen davon aus, daß bei längerer kortikostriataler Aktivität initial eine Inhibition ganzer Gruppen von Projektionsneuronen durch die PV⁺-Interneurone erfolgt, die zu einer Unterdrückung des vorherigen Netzwerkstatus führt. Anschließend wird durch die kortikostriatale Transmission ein neuer Netzwerkstatus erzeugt, der hauptsächlich durch die laterale Inhibition der Projektionsneurone limitiert wird (Plenz, 2003). Die nachgewiesene signifikant reduzierte Dichte der PV⁺-Interneurone beim *dt^{sz}*-Hamster führt somit vermutlich nicht nur zu einer verminderten Inhibition von Projektionsneuronen, sondern auch zu einer mangelnden Synchronisierung der glutamatergen und dopaminergen Afferenzen. Desweiteren erklärt sie durch die fehlende Erneuerung des Netzwerkstatus die verstärkte LTP in den Gehirnpräparaten der Hamstermutante (Köhling et al., 2004).

Die pharmakologischen Untersuchungen unterstreichen somit die herausragende Bedeutung der reduzierten Dichte der GABAergen PV⁺-Interneurone.

5.2.1.2. NOS-Inhibitoren

Um der Hypothese einer veränderten striatalen NO-Synthese als Resultat einer erhöhten kortikostriatalen glutamatergen Aktivität bzw. einer verminderten Dichte nNOS⁺ striataler Interneurone beim *dt^{sz}*-Hamster als Beitrag zur Manifestation dystoner Attacken nachzugehen, wurden striatale Applikationen von Inhibitoren der nNOS durchgeführt. Systemisch hatten NOS-Inhibitoren in früheren Untersuchungen bei der *dt^{sz}*-Mutante eine Verbesserung der Symptomatik bewirkt (Richter et al., 2000), was zur Hypothese einer antidystonen Wirkung nach intrastriataler Gabe dieser Substanzen Anlaß geben konnte. Andererseits ließen die Befunde einer verminderten Dichte NOS⁺-Interneurone in der vorliegenden Arbeit bei einer pathophysiologischen Bedeutung des Interneuronenmangels prodystone Effekte von NOS-Inhibitoren erwarten (s. 5.2.2.). Als Bindeglied zwischen der synaptischen und nicht-synaptischen Weiterleitung kann durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren vermehrt gebildetes NO als frei-diffundierbares Gas die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter umliegender Zellen modulieren (Bogdanov und Wurtman, 1997; Buchholzer und Klein, 2002; West und Galloway, 1997b). Da frühere Studien auf eine gestörte kortikostriatale glutamaterge Aktivität beim *dt^{sz}*-Hamster hinweisen (s. 5.2.1.1.), ist auch eine veränderte NO-Freisetzung nicht unwahrscheinlich. Die in vorherigen Studien durch die systemische Applikation von nNOS-Inhibitoren erzielte signifikante Reduktion des Schweregrades

dystoner Attacken (Richter et al., 2000) konnte jedoch durch die striatalen Verabreichungen nicht bewirkt werden.

Der nNOS-Inhibitor 7-NI erzielte weder in der Dosierung von 0,1 µg noch von 0,4 µg pro Hemisphäre eine Reduktion des Schweregrades dystoner Attacken. Die bei einigen Tieren beobachtete Hypolokomotion in der ersten Stunde ist ein substanztypischer Verhaltenseffekt und wurde auch in anderen Studien nach systemischer Applikation beobachtet (Richter et al., 2000). Aufgrund der mangelnden Löslichkeit im Vehikel konnte 7-NI nicht in höheren Dosierungen beim *dt^{SZ}*-Hamster getestet werden. Auch NPLA bewirkte als hochselektiver Antagonist der nNOS keine antidystone Wirkung. Als relativ „neue“ Substanz mit mangelnden Literaturangaben über Verhaltenseffekte können die Beobachtungen nur mit den Wirkungen anderer nNOS-Inhibitoren verglichen werden. Aufgrund der hohen Potenz des NPLA, welches ein 800-fach stärkerer Inhibitor der nNOS im Vergleich zu herkömmlichen Substanzen sein soll (El-Haddad et al., 2002), war die Dosierung von 2,5 µg pro Hemisphäre schon relativ hoch. Da sich auch bei steigender Konzentration der verabreichten Lösungen kein antidystoner Effekt einstellte, jedoch Verhaltenseffekte auftraten, kann davon ausgegangen werden, daß die fehlende Wirksamkeit von NPLA nicht auf unzureichend hohen Dosierungen basierte.

Die Befunde der pharmakologischen Manipulation der striatalen nNOS deuten nicht auf eine abnorme striatale NO-Freisetzung im Zusammenhang mit der Manifestation dystoner Attacken beim *dt^{SZ}*-Hamster hin. Da striatales NO hauptsächlich durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren freigesetzt wird (Bogdanov und Wurtman, 1997), stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der mangelnden antidystonen Wirkung der striatal applizierten NMDA-Rezeptorantagonisten. Würde eine verstärkte striatale Freisetzung von Dopamin und Glutamat durch NO (West und Galloway, 1997b) bei der Hamstermutante von Bedeutung sein, so hätten die Inhibitoren der nNOS eine Reduktion des Schweregrades dystoner Attacken bewirkt, wie sie schon nach systemischer Applikation beobachtet werden konnte (Richter et al., 2000). So kann bezüglich der Diskrepanz zwischen den Effekten systemisch vs. striatal verabreichter Substanzen auch bei diesen Befunden eine Involvierung anderer Gehirnregionen in die Pathogenese der primären paroxysmalen Dystonie beim *dt^{SZ}*-Hamster vermutet werden. Hinweise darauf liefern sowohl die veränderte NMDA-Rezeptorbindung im ventrolateralen THA als auch die veränderten Kynurensäurekonzentrationen im Kleinhirn und Hirnstamm (s.o.). Daher sollten die vorliegenden Befunde einen Anlaß für lokale pharmakologische

Manipulationen des glutamatergen Systems weiterer Gehirnregionen, wie des EPN und der thalamischen Kerne, geben.

5.2.2. Untersuchung der striatalen NOS⁺-Interneurone

Durch die immunhistochemische Markierung und Zählung der striatalen NOS⁺-Interneurone im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie (31 Tage) und im Alter nach der Spontanremission (>90 Tage) bei *dt^{sz}*-Hamstern und gleichaltrigen Kontrolltieren sollte der Hypothese einer ontogenetisch veränderten Dichte dieses Neuronentyps nachgegangen werden. GABAerge PV⁺-Interneurone sind bei der Hamstermutante im Vergleich zu Kontrolltieren altersabhängig stark reduziert, nach der Spontanremission der Dystonie ist jedoch eine normalisierte Dichte aufzufinden (Richter und Hamann, 2002). Dieser Befund stellt die erste nachgewiesene pathomorphologische Abweichung in diesem Tiermodell dar. Durch histologische Standardtechniken konnten von Wahnschaffe et al. (1990) in früheren Studien keine Veränderungen im ZNS festgestellt werden. Die PV⁺-Interneurone sind hauptverantwortlich für die Hemmung striataler Projektionsneurone, und ihre reduzierte Dichte, die im Einklang mit verschiedenen pharmakologischen, neurochemischen und elektrophysiologischen Beobachtungen steht, ist maßgeblich an der Pathogenese der primären Dystonie beim *dt^{sz}*-Hamster beteiligt (Gernert et al., 2000). Weitere Interneurontypen waren beim *dt^{sz}*-Hamster bislang nicht erforscht worden, Befunde in Tiermodellen anderer Basalganglien-assoziiierter Bewegungsstörungen, wie z.B. Chorea Huntington, konnten jedoch bereits eine Involvierung NOS⁺-Interneurone in das Krankheitsgeschehen nachweisen (Deckel et al., 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene signifikante Reduktion der striatalen NOS⁺-Interneurone um 21% und die Normalisierung der Dichte im Gesamtstriatum nach Spontanremission der Dystonie bei der *dt^{sz}*-Mutante erweckt den Eindruck eines kausalen Zusammenhangs dieses Befundes mit dem Auftreten dystoner Attacken beim *dt^{sz}*-Hamster. Die durchgeführten lokalen pharmakologischen Untersuchungen mit den nNOS-Inhibitoren (s.o.) sprechen jedoch gegen eine kritische Involvierung der NOS⁺-Interneurone in die Pathogenese der primären Dystonie beim *dt^{sz}*-Hamster. Denn ginge man davon aus, daß der NOS⁺-Interneuronenmangel eine pathophysiologische Bedeutung im Sinne eines Primäredefektes bei der *dt^{sz}*-Mutante habe, so hätten die striatalen Applikationen von NOS-Inhibitoren eine Verschlimmerung der Dystonie hervorrufen müssen.

Im Gegensatz zu den striatalen PV⁺-Interneuronen, die in allen Subregionen im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie beim *dt^{sz}*-Hamster reduziert sind (Richter und Hamann, 2002), ist die Dichte der NOS⁺-Interneurone in diesem Alter nur im dorsalen und ventrolateralen Striatum signifikant vermindert. Die eindrucksvollsten Reduktionen konnten im dorsomedialen (-39%) und dorsolateralen (-30%) Striatum nachgewiesen werden. Dies erscheint in Hinblick auf die neurochemischen und autoradiographischen Untersuchungen (Nobrega et al., 2002; 1996; Richter et al., 1998), die ebenfalls Abweichungen vornehmlich im dorsalen Striatum zeigen konnten, nicht überraschend. Insbesondere im dorsomedialen Striatum zeigten sich Hinweise auf eine erhöhte neuronale Aktivität (Gernert et al., 1999; Richter et al., 1998). Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Reduktion der NOS⁺-Interneurone Ausdruck einer verminderten nNOS-Expression im Sinne einer Gegenregulation darstellt. Hinsichtlich des Mangels an PV⁺-Interneuronen erscheint dies jedoch unwahrscheinlich.

Interpretiert man die Befunde nicht im Sinne einer verminderten Expression der nNOS sondern als Ausdruck einer verringerten Zellzahl, so kann in Hinblick auf die reduzierte Dichte PV⁺-Interneurone auch eine allgemeine Verzögerung der Gehirnentwicklung als Ursache in Betracht gezogen werden. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die Untersuchungen von Burgunder et al. (1999), in denen keine Unterschiede in der Expression des Wachstumsproteins GAP-43 im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden konnte. Eine generell retardierte Gehirnentwicklung im Sinne einer verminderten Zellproliferation beim *dt^{sz}*-Hamster erscheint somit nicht wahrscheinlich.

Dennoch können die Befunde der immunhistochemischen Untersuchungen als eine Verzögerung der Ontogenese der NOS⁺-Interneurone gedeutet, und hierdurch eine Normalisierung der Dichte im Alter von über 90 Tagen erklärt werden. So könnte eine retardierte Zellmigration v.a. die Veränderungen der Dichte in den striatalen Subregionen beim *dt^{sz}*-Hamster erklären. Durch Studien an embryonalen Gehirnen von Säugern konnte nachgewiesen werden, daß die Interneurone während der Ontogenese vom medialen Ganglionhügel (MGE), dieser befindet sich ventrolateral des lateralen Ventrikels, tangential in das Striatum migrieren (Hamasaki et al., 2003). Die Interneurone wandern demnach von ventral über lateral nach dorsal durch das Striatum. Betrachtet man die Subregionen, so zeigt sich im Alter nach der Spontanremission bei den *dt^{sz}*-Hamstern im Vergleich zu den Kontrolltieren sogar eine signifikant erhöhte Dichte im ventrolateralen Striatum. Im dorsomedialen Striatum hat sich die Dichte der NOS⁺-Interneurone normalisiert, und im

dorsolateralen Striatum, der Region, die mit dem anterioren Striatum am weitesten von der MGE entfernt war, ist noch eine signifikante Reduktion der Dichte um 20% (in der MAX-Phase: 30%) nachweisbar. Vermutlich aufgrund der größeren Standardfehler konnte in der MAX-Phase kein und in der Post-MAX-Phase hingegen ein signifikanter Unterschied zwischen den Interneuronendichten im anterioren Striatum zwischen dt^{sz} -Hamstern und Kontrolltieren nachgewiesen werden. Diese Region befindet sich ebenfalls weit entfernt vom MGE und eine retardierte Normalisierung der Dichte im Vergleich zu den anderen Regionen wäre denkbar. Aufgrund fehlender Studien und somit mangelnder Kenntnisse über die Zellmigration bei älteren Tieren sind diese Überlegungen jedoch rein hypothetisch. Für eine verzögerte Gehirnentwicklung könnte ebenfalls der Eindruck einer verminderten Faserdichte der NOS^+ -Interneurone im Striatum der Hamstermutante im Alter der maximalen Dystoniaausprägung sprechen (Shepherd, G.M., 1983). Die reduzierte Faserdichte war bei striatalen PV^+ -Interneuronen von dt^{sz} -Hamstern dieses Alters stärker ausgeprägt (Gernert et al., 2000) als bei den NOS^+ -Interneuronen.

In Hinblick auf die fehlende antidystone Wirkung der NOS-Inhibitoren im Alter der maximalen Ausprägung der Dystonie scheint die Reduktion der NOS^+ -Interneurone nicht kritisch in die Pathophysiologie der primären paroxysmalen Dystonie beim dt^{sz} -Hamster involviert zu sein. Zu berücksichtigen ist, daß die Modulation der Transmitterfreisetzung durch NO nach heutigem Kenntnisstand eine geringere Wirkung auf die akute neuronale Aktivität hat als GABAerge PV^+ -Interneurone (Kawaguchi et al., 1995; Koos und Tepper, 1999).

Dennoch muß darauf hingewiesen werden, daß die spezifische Rolle des striatalen NO bis heute nur fragmentarisch untersucht worden ist. So besitzt es neben seinem modulatorischen Einfluß auf zahlreiche Transmittersysteme eine bedeutende Funktion bei der Ausbildung der Langzeitdepression (LTD). Diese ist eine Form der synaptischen Plastizität, die durch wiederholte Aktivierung kortikostriataler Afferenzen provoziert werden kann (Centonze et al., 2003) und in eine Verminderung der Sensibilität der striatalen Projektionsneurone gegenüber glutamaterger Afferenzen resultiert. Die LTD kann durch NOS-Inhibitoren erfolgreich unterbunden werden, ein Mangel an NOS^+ -Interneuronen könnte somit auch einen Einfluß auf die synaptische Plastizität und somit auf das „motorische Gedächtnis“ des dt^{sz} -Hamsters haben.

Auch die Bedeutung der Neuropeptide Somatostatin und Substanz P, sowie des Neurotransmitters GABA, dessen Synthese und Freisetzung unter physiologischen

Bedingungen bei NOS⁺-Interneuronen noch nicht nachgewiesen werden konnte (Kawaguchi et al., 1995), ist bis heute ungeklärt. Bindungsstudien betreffend des Neurokinin-1-Rezeptors, zu welchem Substanz P eine hohe Affinität besitzt, konnten keine Abweichungen in den Gehirnregionen feststellen (Friedman et al., 2002). Die reduzierte Dichte der NOS⁺-Interneurone könnte jedoch zu dem nachgewiesenen GABA-Mangel sowie der signifikant reduzierten Somatostatinexpression innerhalb des Striatums beitragen (Burgunder et al., 1999; Löscher und Hörstermann, 1992).

5.3. Schlußbetrachtungen

Die Ergebnisse der pharmakologischen Manipulationen striataler Glutamatrezeptoren unterstreichen die Wichtigkeit von *in-vivo*-Verfahren zur Einordnung von *in-vitro*-Befunden hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Bedeutung bei Erkrankungen unbekannter Genese.

Obwohl durch elektrophysiologische *in-vitro*-Untersuchungen eine kortikostriatale glutamaterge Überaktivität bei dystonen Hamstern nachgewiesen werden konnte, bestätigten die lokalen pharmakologischen Untersuchungen keine kritische Involvierung des striatalen glutamatergen Systems in die Pathophysiologie der primären paroxysmalen Dystonie beim *dt^{sz}*-Hamster. Die eher moderate antidystone Wirkung des AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX bei der Dosierung von 0,08 µg pro Hemisphäre konnte in keiner weiteren Dosierung erzielt werden, zeigte sich jedoch in Kombination mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten AP-5 (0,5 µg pro Hemisphäre) reproduzierbar. Eine erhoffte Potenzierung der antidystonen Wirkung von NBQX durch die Kombination mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten konnte jedoch nicht festgestellt werden. Der fehlende antidystone Effekt der intrastriatal verabreichten NMDA-Rezeptorantagonisten im Gegensatz zur systemischen Applikation deutet auf eine Involvierung des glutamatergen Systems in anderen Hirnregionen hin. Hinweise für eine veränderte glutamaterge thalamische Aktivität beim *dt^{sz}*-Hamster (s. 5.2.1.1.) sollten in Zusammenhang mit den vorhandenen Untersuchungsergebnissen Anlaß für eine lokale pharmakologische Manipulation weiterer Gehirnstrukturen geben. Da die systemische Applikation von Glutamatrezeptorantagonisten bei der Hamstermutante in früheren Untersuchungen eine ausgeprägte Reduktion des Schweregrades der Dystonie erzielte (Löscher und Richter, 1993; Richter et al., 1991; 1993), könnte das glutamaterge System, gerade in Hinblick auf die Entwicklung hochselektiver Glutamatrezeptorantagonisten

sowie metabotroper Glutamatrezeptorliganden, trotz allem in Zukunft möglicherweise einen therapeutischen Ansatzpunkt bei der Behandlung von Dystonien eröffnen.

Die reduzierte Dichte der immunhistochemisch markierten striatalen NOS^+ -Interneurone ist offensichtlich aufgrund der fehlenden antidystonen Wirkung der nNOS-Inhibitoren kein Resultat von Gegenregulationsprozessen auf eine erhöhte striatale NO-Freisetzung. Der rasant fortschreitende Kenntniszuwachs in der NO-Forschung sollte die Interpretation dieser Befunde in Zukunft erleichtern. Heute ist jedoch davon auszugehen, daß es sich aufgrund mangelnder Effekte von intrastriatal applizierten nNOS-Inhibitoren bei der reduzierten Dichte der NOS^+ -Interneurone beim dt^{sz} -Hamster um ein Epiphänomen handelt. Die beobachtete reduzierte Faserdichte bei den NOS^+ -Interneuronen sollte in weiterführenden Analysen quantitativ bestimmt werden. Da es mit den PV^+ -Interneuronen schon der zweite Zelltyp des dt^{sz} -Hamsters ist, der eine verminderte Dichte im Striatum aufweist, könnten immunhistochemische Untersuchungen weiterer striataler Interneurone, z.B. der cholinergen, zur Aufklärung der primären Dystonie bei der Hamstermutante beitragen.

Die Befunde dieser Arbeit demonstrieren, daß der Interneuronenmangel nicht auf GABAerge PV^+ -Interneuronen beschränkt ist. Für striatale Interneurone und Projektionsneurone ist ein unterschiedliches Migrationsverhalten bekannt (Hamasaki et al., 2003). Denkbar ist, daß bei der dt^{sz} -Mutante eine spezifisch für Interneuronen retardierte postnatale Entwicklung (Zellmigration) im Striatum vorliegt. Dies lassen fehlende Veränderungen in der Dichte von dopaminergen Neuronen, die das Striatum innervieren, vermuten. Weitere Untersuchungen von striatalen GABAergen Projektionsneuronen erscheinen jedoch sinnvoll zu sein, um dieser Annahme weiter nachzugehen.