

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der chronischen unilateralen Hochfrequenzstimulation des
Nucleus subthalamicus auf die neurochemische Transmission im
Striatum naiver Ratten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christina van Delden

aus Gronau / Westfalen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Kupsch
2. Prof. Dr. med. R. Morgenstern
3. Prof. Dr. med. G. Nikkhah

Datum der Promotion: 20.11.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1 Die Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus als neuromodulatives Therapieverfahren – Prinzipien	7
1.2 Anatomie und Funktion der Basalganglien	9
1.2.1 Anatomie	9
1.2.2 Neurotransmitter.....	11
1.2.3 Pathophysiologie der Basalganglien am Beispiel des Morbus Parkinson.....	12
1.3 Wirkmechanismen der STN-HFS	14
1.3.1 STN-HFS in der Behandlung des Morbus Parkinson	14
1.3.2 Klinische Beobachtungen im Kontext der Wirkmechanismen	15
1.3.3 Experimentelle Daten zur Untersuchung von Wirkmechanismen der STN-HFS auf Transmitterebene im Striatum.....	15
1.4 Eigene Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Haltungsbedingungen	19
2.3 Substanzen, Pufferlösungen und Laufmittel für die Hochleistungs-Flüssigkeits- Chromatographie (HPLC)	19
2.3.1 Verwendete Substanzen	19
2.3.2 Pufferlösungen	20
2.3.3 Laufmittel für die HPLC	20
2.4 Versuchsplanung	21
2.5 Implantation des Mikrostimulationssystems	22
2.6 Schnittprotokoll für die Gewinnung von Hirnscheiben und –schnitten	25
2.7 Histologische Aufarbeitung	25
2.8 Gewebepräparation	26
2.9 Gehaltsbestimmung der Catecholamine und Aminosäuren im Striatum mittels HPLC und elektrochemischer, bzw. Fluoreszenzdetektion	27
2.10 Proteinbestimmung nach Lowry	29
2.11 Datenanalyse	30
2.12 Statistische Auswertung	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Definition der Ein- und Ausschlusskriterien	32
3.2 Histologische Verifikation von Elektrodenlage und Schnittebenen	32
3.3 Neurochemische Analyse von Dopamin und Metaboliten	33
3.3.1 Dorsolaterales Striatum	33
3.3.2 Ventrales Striatum.....	36
3.3 Neurochemischen Analyse von Serotonin (5-HT) und HIAA	38
3.3.1 Dorsolaterales Striatum	38
3.3.2 Ventrales Striatum.....	40
3.4 Neurochemischen Analyse der Aminosäuren Glutamat und GABA	42
3.4.1 Dorsolaterales Striatum	42
3.4.2 Ventrales Striatum.....	44
4. Diskussion	47
4.1 Gesteigerte dopaminerge Transmission nach chronischer STN-HFS	48

4.1.1	Extraneuronaler Pool und gesteigerte Aktionspotenzial-vermittelte DA-Freisetzung.....	48
4.1.2	Intraneuronaler (präsynaptischer) Speicherpool mit Steigerung der DA- Neusynthese	52
4.1.3	Neusynthese von dopaminergen Zellen in der SNc	54
4.1.4	Bihemisphärielle Effekte nach unilateraler STN-HFS	55
4.1.5	Veränderungen der dopaminergen Transmission im Kontext der verschiedenen Striatumanteile (dorsolateral vs. ventral)	56
4.2	Beeinflussung der serotoninerger Transmission nach chronischer STN-HFS	59
4.2.1	Verringerte serotoninerge Transmission nach chronischer STN-HFS im ventralen Striatum	60
4.2.2	Veränderungen der serotoninerger Transmission im Kontext der verschiedenen Striatumanteile (dorsolateral vs. ventral)	62
4.3	Differenzierte Beeinflussung der Glutamat- und GABA-Transmission durch chronische STN-HFS	63
4.4	Klinische Relevanz der Studie	65
5.	Zusammenfassung	69
6.	Literaturverzeichnis	71
7.	Danksagung	84
8.	Erklärung zur Selbständigkeit	85
9.	Lebenslauf	86

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin	HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
AADC	Aminosäuredecarboxylase	HVA	Homovanillinsäure
Abb.	Abbildung	IPG	(implantierbarer) Impulsgenerator
Ac	Commissura anterior	IPS	Idiopathisches Parkinson Syndrom (= M. Parkinson)
Ach	Acetylcholin	L-DOPA	Levodopa
AP	antero-posterior	LTP	Long-Term-Potential
BG	Basalganglien	M.	Morbus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	MAO A/B	Monoaminoxidase A/B
CC	Corpus callosum	Me	medial
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	ML	medio-laterale
COMT	Catechol-o-methyl-transferase	MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine
CPu medial	mediales dorsolaterales Striatum (Caudatus+Putamen)	NAcc	Nucleus accumbens
CPu rostr	rostrales dorsolaterales Striatum	NMDA	N-methyl D-aspartat
D1/ D2	Dopamin-Rezeptoren Subtyp 1/ 2	PET	Positronenemissionstomographie
DA	Dopamin	rCBF	regionaler cerebraler Blutfluss
DOPAC	Dihydroxyphenylacetat	Ro	rostral
DRN	Dorsaler Raphe-Kern	SNc	Substantia nigra Pars compacta
DV	dorso-ventral	SNr	Substantia nigra Pars reticulata
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potentiale	SPECT	Single-Photon-Emission-Computed-Tomographie
GABA	Gamma-Aminobuttersäure	STN	Nucleus subthalamicus
Glu	Glutamat	SV	Seitenventrikel
GPe	Globus pallidus externus	TH	Tyrosinhydroxylase
GPi	Globus pallidus internus	TRH	Tryptophanhydroxylase
HFS	Hochfrequenzstimulation	VMAT	vesikulärer Monoamin-Transporter
HIAA	Hydroxyindolessigsäure	VTA	ventrale tegmentale Area

1. Einleitung

1.1 Die Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus als neuromodulatives Therapieverfahren – Prinzipien

Die Hochfrequenzstimulation (HFS) ist ein neuromodulatives Therapieverfahren, das in der Behandlung von Bewegungsstörungen (z.B. idiopathisches Parkinsonsyndrom, essentieller Tremor und Dystonie) und zunehmend auch anderer neuro-psychiatrischer Erkrankungen (z.B. Epilepsie, Zwangs-Kontroll-Störung, Depression) Anwendung findet^{162;44;93;105;123}. Bei der HFS werden insbesondere subkortikale Hirnregionen (z.B. Basalganglien und thalamische Kerne) elektrisch stimuliert. Daher hat sich im klinischen Sprachgebrauch auch der Begriff der „tiefen Hirnstimulation“ (aus dem Englischen „deep brain stimulation – DBS“), bzw. in der Laienpresse und patientenorientierten Publikationen der Begriff „Hirnschrittmacher“ etabliert⁴¹. Der Begriff der Neuromodulation wiederum beschreibt die funktionelle Einflussnahme eines interventionellen Verfahrens (neben der, bzw. zusätzlich zur tiefen Hirnstimulation z.B. Gen-Transfer, intrazerebrale Applikation neurotropher Faktoren^{49;63}) auf die Re-Äquilibrierung eines zuvor gestörten Gleichgewichtes innerhalb des neuronalen Netzwerkes.

Das Prinzip der HFS von tiefen Hirnkernen besteht in der kontinuierlichen und langfristigen (d.h. über Jahre) Applikation von elektrischen Impulsen über dauerhaft im Gehirn implantierte Elektroden. Die Stimulationsparameter (z.B. Polarität, Stimulationsamplitude, Pulsweite, Frequenz) werden dabei von einem ebenfalls implantierbaren, jedoch von extern programmierbaren Impulsgenerator, der mit den Elektroden über ein integriertes Kabelsystem in Verbindung steht, generiert (siehe Abbildung 1). Insbesondere die Verwendung von Stimulations-Repetitionsraten von mehr als 100 pro Sekunde (>100 Hz), also weit oberhalb der Eigenfrequenz von Neuronen, haben den Begriff der „Hochfrequenzstimulation“ begründet. Gewöhnlich wird ein monopolarer Stimulationsmodus gewählt, bei dem entweder einer oder mehrere Kontakte einer in der Regel 4-poligen Stimulationselektrode als Kathode und das Gehäuse des Impulsgenerators als Anode dienen (sogenannte monopolare Stimulation). Neben der Impulsfrequenz ist auch die Länge der Impulse ein für die Wirksamkeit der HFS wichtiger Parameter, in der klinischen Anwendung werden in der Regel Impulse mit einer Länge von 60 - 120µs verwendet¹⁰¹.

Der Hochfrequenzstimulation als eigenständiges neurochirurgisches Therapieverfahren gingen läsionale Techniken zur Steuerung der Basalganglienfunktion voraus, die in der Behandlung von Bewegungsstörungen seit den 1950-er Jahren und teilweise noch heute erfolgreich angewendet werden^{8;95;148;150}. Dabei werden die subkortikalen Kerne durch Radiofrequenz- oder

Thermokoagulation irreversibel zerstört ⁴⁶. Analog zu den läsionalen Verfahren wird auch bei der HFS die Ansteuerung des Zielpunktes mittels stereotaktischen Operationsmethoden vorgenommen. Damit basiert die HFS auf der Übertragung eines Operationsprinzips, welches bereits für läsionale Techniken angewendet wurde. Interessanterweise machte man die Beobachtung, dass die HFS teilweise ähnliche klinische Wirkungen hervorrief wie die Läsion (z. B. Verbesserung des Tremors ¹¹⁷), was zu der Annahme führte, dass es unter der HFS zu einer funktionellen Inhibition der stimulierten Areale kommt. Diese „Effektäquivalenz“ kann durch Ausschaltung des Impulsgenerators und damit der HFS beendet werden, was den reversiblen Charakter des Verfahrens unterstreicht. Der Impulsgenerator ist zudem von extern programmierbar, so dass auch nach der Implantation die Stimulationsparameter verändert und an die klinische Situation des Patienten angepasst werden können. Auch die Position der implantierten Elektrode kann u.U. durch Re-Implantation korrigiert werden. Die Reversibilität des Verfahrens und die postoperative Adaptabilität der Stimulationsparameter sind zwei wesentliche Vorteile der HFS gegenüber läsionalen Verfahren. Der Eingriff ist darüber hinaus einseitig bilateral durchführbar, was die Morbidität, Mortalität und das Auftreten von Nebenwirkungen im Vergleich zu den klassischen läsionalen Verfahren verringert ^{135;156}.

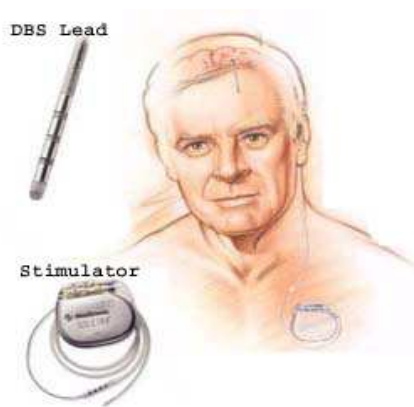


Abbildung 1: Links: Beispiel eines implantierbaren Stimulationssystems für den Menschen, bestehend aus Stimulator mit Extensionskabel und Elektrode (DBS Lead); rechts: Lokalisation des Stimulationssystems in situ. Quelle: ©Medtronic, Inc., www.medtronic.co.uk

Die chronische DBS wurde bereits in der Mitte des 20. Jahrhunderts von mehreren Untersuchungsgruppen zur Behandlung unterschiedlicher Krankheitsbilder (chronische Schmerzleiden ^{78;141}, psychiatrische Erkrankungen wie z. B. Epilepsie ¹⁵⁷, Bewegungsstörungen ¹¹⁶) angewendet.

Die weite Verbreitung der chronischen DBS zur Behandlung von Bewegungsstörungen geht u.a. auf den französischen Neurochirurgen *Benabid* zurück, der das Verfahren Ende der 1980-er Jahre zunächst in der Behandlung des essentiellen Tremors einsetzte und später auch probatorisch bei Patienten mit tremordominantem Morbus Parkinson anwendete ¹⁰. Seine klinischen Beobachtungen wurden zudem unterstützt durch experimentelle Befunde im

Parkinson-Modell des Primaten, welche die Effektiväquivalenz läsionaler und modulativer Verfahren zeigen konnten, was den Einsatz der HFS innerhalb verschiedener basalganglionärer Kerngebiete vorantrieb^{14;17}.

Die Rationale für die Stimulation unterschiedlicher Basalganglienkerne leitete sich dabei von dem wachsenden Verständnis über deren Bau und Funktion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ab, was im nachfolgenden Abschnitt aufgezeigt werden soll³. So beruht unser heutiges Verständnis über die Basalganglien auf Erkenntnissen, die im Parkinson-Modell des nicht-menschlichen Primaten erhoben wurden. Dieses Modell basiert auf der systemischen Applikation des Neurotoxins 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydro-Pyridine (MPTP), was zu einer weitgehend selektiven Degeneration dopaminerger nigraler Neurone führt und ein durch den Dopaminmangel bedingtes Ungleichgewicht im Basalganglienregelkreis hervorruft. Die Folge ist ein Parkinsonsyndrom des nicht-menschlichen Primaten.

1.2 Anatomie und Funktion der Basalganglien

1.2.1 Anatomie

Die Basalganglien sind subkortikal gelegene Kerngebiete, die folgende Strukturen umfassen: Nucleus caudatus und Putamen (zusammen bilden sie das Corpus striatum), Globus pallidus mit einem externen und einem internen Segment (GPe und GPi) und die Substantia nigra pars reticularis (SNr), die entwicklungsgeschichtlich mit dem GPi verwandt ist. Weiterhin werden auch der Nucleus subthalamicus (STN) und die Substantia nigra pars compacta (SNc) den Basalganglien zugerechnet.

Die Basalganglien sind gemeinsam mit dem Cortex an der Ausführung von geplantem und zielgerichtetem Verhalten beteiligt, wobei sie neben der Motorik (Bewegung) auch die emotionale, motivationale und kognitive Komponente beeinflussen⁶⁶.

Unser heutiges Verständnis über die Basalganglien basiert größtenteils auf Modellvorstellungen, die u.a. von *Alexander, de Long und Crutcher* zusammengefasst wurden: hiernach sind die Basalganglien mit dem Cortex und dem Thalamus in Form von fünf unterschiedlichen, parallel organisierten Regelkreisen (sogenannten „Schleifen“; u.a. motorisch und limbisch) verschaltet^{4;5}. Jedem Schaltkreis sind dabei bestimmte Teile von Basalganglienstrukturen zugeordnet, z. T. überlappend. So umfasst z.B. die motorische Schleife Anteile des dorsolateralen Striatums, ventrolateralen GPi und des lateralen STN, wohingegen die limbische Schleife die ventralen Anteile von Striatum (Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium) und Pallidum und den medialen STN mit einbezieht^{5;84}. Auch der Informationseingang in den Regelkreis erfolgt

teilweise aus getrennten Cortexarealen, bei der motorischen Schleife aus dem motorischen und sensomotorischen Cortex, bei der limbischen v.a. aus Hippocampus und Amygdala (siehe Abbildung 2).

Dieses Modell wurde um integrative Regelkreise erweitert, um einen Austausch von Informationen zwischen den parallelen Regelkreisen zu gewährleisten und so ein zielgerichtetes und der jeweiligen Umweltsituation angepasstes Verhalten zu ermöglichen (vergl. *Haber et al.*, 2003⁶⁶).

Exemplarisch soll hier der motorische Regelkreis und seine physiologische Funktionsweise detaillierter dargestellt werden (vergl. z. B. *Alexander und Crutcher* und *Albin et al.*^{4:3}):

Das Striatum stellt die Eingangsstruktur der BG dar, welche exzitatorische, glutamaterge Afferenzen aus verschiedenen Cortexarealen (prämotorisch, supplementär-motorisch) erhält. Vom Striatum projiziert eine monosynaptische Faserbahn zum GPi bzw. zur SNr, weshalb diese Verbindung „direkter Weg“ genannt wird. Außerdem existiert eine weitere (polysynaptische) Verbindung via GPe und STN, die deshalb als „indirekter Weg“ bezeichnet wird. Der GPi und die SNr sind die Ausgangsstrukturen der Basalganglien, von hier ziehen die meisten GABA(Gamma-Aminobuttersäure)-ergen Efferenzen zum Thalamus, der eine Relaisstation für die weiteren Verbindungen zum Cortex darstellt.

Über den „direkten Weg“ gelangen GABA-erge Impulse in den/ die GPi/ SNr, was zu einer Disinhibition thalamischer Neurone und dadurch zu einer Exzitation kortikaler Zellen durch glutamaterge Efferenzen führt.

Über den „indirekten Weg“ kommt es über zwei hintereinander geschaltete GABA-erge Stationen (Striatum→GPe, GPe→STN) zu einer Disinhibition des STN und in der Folge zu einer gesteigerten Aktivierung der inhibitorischen Zellen in den Ausgangsstrukturen der Basalganglien. Dies resultiert in der vermehrten Hemmung der thalamischen und der verminderten Aktivierung der kortikalen Zellen.

Um bestimmte zielgerichtete und willkürliche Bewegungen ausführen zu können, muss entweder der „direkte“ oder der „indirekte Weg“ aktiviert werden, während gleichzeitig der andere Weg inhibiert wird³ (vergleiche Abbildung 2).

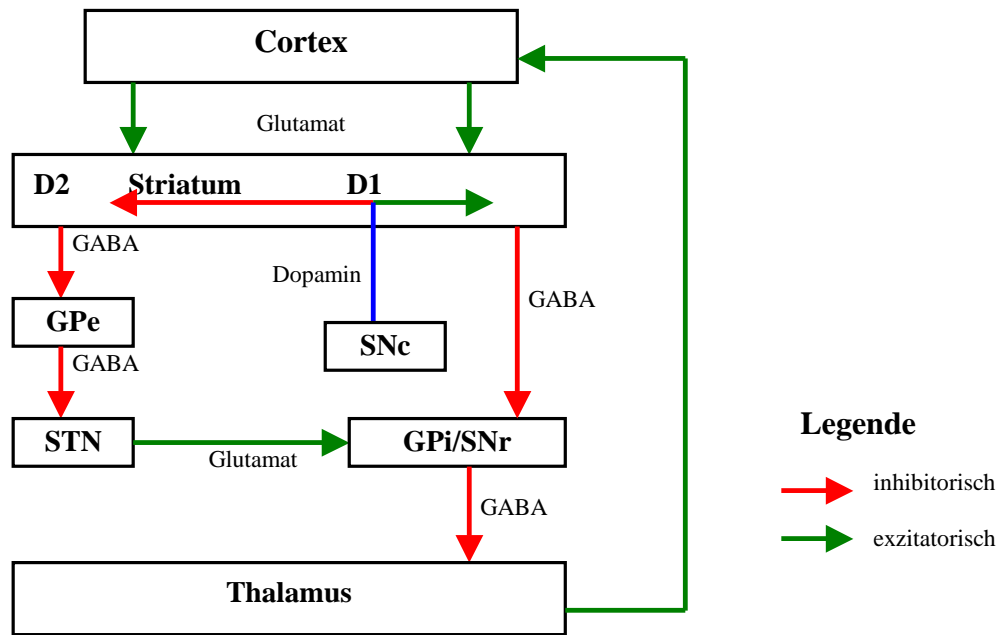


Abbildung 2: Funktionelle Basalganglien-Anatomie modifiziert nach *Alexander & Crutcher (1990)* unter normalen Bedingungen⁴. Dargestellt ist der doppelte Regelkreis zwischen der Eingangsstruktur Striatum und der Ausgangsstruktur Globus pallidus internus (Gpi) bestehend aus dem „direkten Weg“: Striatum→Gpi und dem „indirekten Weg“: Striatum→Globus pallidus externus (GPe)→Nucleus subthalamicus (STN)→Gpi unter Berücksichtigung der Neurotransmitter. Das Dopamin aus der Substantia nigra pars compacta (SNc) wirkt über D1- und D2-Rezeptoren modulierend auf beide Wege.

1.2.2 Neurotransmitter

Inhibition und Exzitation innerhalb des basalganglionären Netzwerkes sind an verschiedene Transmittersysteme gebunden. Zu den wichtigsten Überträgerstoffen in den Basalganglien zählen die Aminosäuren Glutamat (Glu) und GABA sowie Dopamin (DA), Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) und Acetylcholin (ACh). Die „Kommunikation“ der basalganglionären Neurone ist an das Zusammenwirken dieser Transmitter gebunden.

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Cerebrum. Im Striatum wird er vor allem aus Axonterminalen corticaler, thalamischer und subthalamischer Projektionsneurone freigesetzt. Die Wirkung wird über verschiedene Subtypen von Glu-Rezeptoren vermittelt, die als Nettoeffekt eine Depolarisation postsynaptischer Neurone zur Folge haben⁸⁹. Im Gegensatz dazu, handelt es sich bei GABA um einen Transmitter mit inhibitorischer Wirkung. Nach Bindung an den postsynaptischen Rezeptor wird die Leitfähigkeit eines membrangebundenen Chloridkanals erhöht, was zu einer Hyperpolarisation der Zielzelle führt⁶⁴. Im BG-Netzwerk sind sowohl die Projektionsneurone des Striatums als auch die Efferenzen des Pallidums und der SNr GABA-erg. ACh ist der Transmitter striataler Interneurone, der sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Wirkungen hervorruft und somit neben DA eine modulatorische Funktion in den Basalganglien übernimmt.

Dopamin wird in den Neuronen der SNc gebildet, deren Axone vor allem ins dorsale Striatum (Nucleus caudatus und Putamen), in geringem Umfang auch in den STN projizieren³⁹. Darüber hinaus finden sich dopaminerge Neurone in der ventralen tegmentalen Area (VTA), die zu Neuronen im ventralen Striatum (Nucleus accumbens, core und shell) und im präfrontalen Cortex projizieren. Über unterschiedliche Rezeptortypen übt DA sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Wirkungen auf die Zellen des Striatums aus. D₁-Rezeptoren vermitteln exzitatorische Effekte. Nach der Rezeptorbindung erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung über ein stimulierendes G-Protein, was zur Aktivierung der Adenylatcyclase und zur Steigerung der Konzentration des Second-Messengers zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) führt. In der Folge wird eine Proteinkinase aktiviert und über die Beeinflussung von Ionenkanälen die Leitfähigkeit für Glutamat erhöht, was den Effekt der cortico-striatalen Stimulation potenziert¹¹³. Bindet DA hingegen an D₂-Rezeptoren werden inhibitorische Wirkungen auf die nachgeschalteten Neurone übertragen, da diese DA-Rezeptorbindung über inhibitorische G-Proteine zu einer Inhibition der Adenylatcyclase und damit zu einer verringerten intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Die Leitfähigkeit von K⁺-Kanälen wird erhöht, was zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt⁹⁷. Als Folge der unterschiedlichen Wirkungen von DA auf die striatalen Neurone resultiert eine differente Modulation des „direkten“ und „indirekten“ Weges im Sinne einer fördernden Wirkung auf den „direkten Weg“ (gesteigerte Aktivität striataler GABA-erger Zellen) und einer hemmenden Wirkung auf den „indirekten Weg“ (verringerte Aktivität striataler GABA-erger Zellen)^{59;161}.

Serotonin ist ein weiterer wichtiger Co-Transmitter, insbesondere der limbischen Basalganglienanteile, dem ebenfalls eine modulatorische Funktion zugeschrieben wird und der vor allem an der Ausbildung emotionalen (affektiven), Belohnungs- und Lern-Verhaltens beteiligt ist¹³⁴.

1.2.3 Pathophysiologie der Basalganglien am Beispiel des Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson stellt eine klinisch, pathologisch und in Ansätzen auch genetisch definierte neurodegenerative Erkrankung mit progressivem Verlauf dar, bei der es charakteristischerweise zu einem Untergang dopaminergener Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNc) kommt^{74;76;77}, wodurch ein striataler Dopamin-Mangel resultiert. Darüber hinaus kommt es auch zum Verlust von Zellen in aminergen Hirnstammkernen (z.B. Raphe-Kerne), im Nucleus basalis Meynert (cholinerg), in bestimmten kortikalen und hypothalamischen Arealen sowie in Ganglien des sympathischen und parasympathischen Nervensystems⁹⁶, so dass der Morbus Parkinson eine Multi-System-Erkrankung darstellt^{26;27}. Zu den Hauptsymptomen

des Morbus Parkinson zählen Rigor, Tremor, Akinese, später auch posturale Instabilität sowie klinisch die L-Dopa-Responsivität⁵¹.

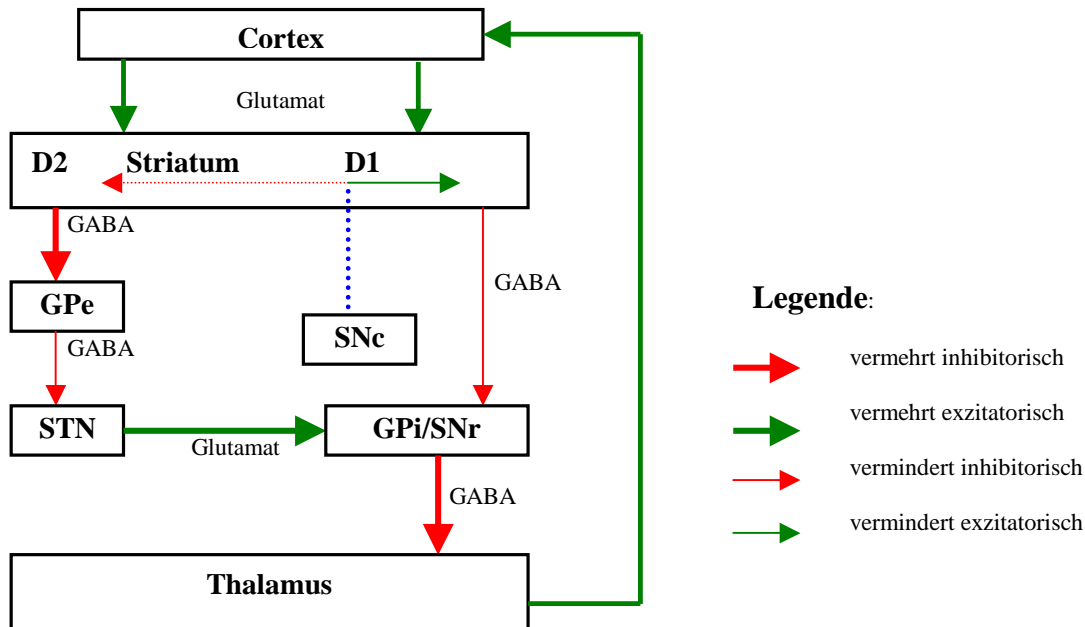


Abbildung 3: Funktionelle Basalganglien-Anatomie modifiziert nach *Alexander & Crutcher (1990)* unter Parkinson-Bedingungen⁴. Der striatale Verlust von Dopamin führt zu einer Verlagerung der Impulsgebung über den „indirekten Weg“: die vermehrte Inhibition des GPe führt zur Überaktivität des STN, der seinerseits den inhibitorischen Output des GPi zum Thalamus verstärkt. Die Folge ist eine reduzierte Aktivierung des Cortex.

Aufgrund des striatalen Dopamin-Mangels wird die dopaminerge Modulation des „direkten“ und „indirekten Weges“ über D₁- und D₂-Rezeptoren nachhaltig verändert (siehe Abbildung 3).

Durch die Reduktion der exzitatorischen Wirkung des Dopamins auf dem „direkten Weg“ und einer gleichzeitigen Verringerung der inhibitorischen Dopamin-Wirkung auf dem „indirekten Weg“ kommt es zu einem Ungleichgewicht des neuronal verschlüsselten Informationsflusses, in dessen Folge die Impulsgebung über den „indirekten Weg“ überwiegt. Es resultiert eine gesteigerte Inhibition des externen Pallidumsegmentes. Die normalerweise bestehende tonische Inhibition subthalamischer Zellen durch den GPe wird dadurch stark reduziert, was zu einer exzessiv erhöhten Aktivität der STN-Neurone führt. Diese gesteigerte Aktivität subthalamischer Zellen konnte sowohl tierexperimentell im MPTP-Modell des Primaten^{17;18;42} als auch klinisch mittels elektrophysiologischer Untersuchungen an Parkinson-Patienten nachgewiesen werden^{80;128}. In der Endkonsequenz führt die erhöhte STN-Aktivität zu einer Disinhibition der Ausgangsstrukturen der Basalganglien (GPi/ SNr) und somit zu einer gesteigerten GABA-erg vermittelten Inhibition thalamischer, und konsekutiv kortikaler Neurone des motorischen Cortex,

wodurch sich die Kardinalsymptome (insbesondere Bradykinese und Rigor) des Morbus Parkinson teilweise erklären lassen^{52;94}.

1.3 Wirkmechanismen der STN-HFS

1.3.1 STN-HFS in der Behandlung des Morbus Parkinson

Nach dem MPTP-Primatenmodell der Basalganglien führt der striatale Verlust an Dopamin zu einer ausgeprägten Überaktivität des STN und konsekutiv zu einer Inhibition thalamo-kortikaler Projektionsneurone. Konsequenterweise müsste eine strukturelle oder funktionelle Ausschaltung des überaktiven STN zu einer Reduktion dieser Inhibition führen. Diese Hypothese konnte auch für läSIONALE¹⁷ und stimulative Verfahren^{11;14} tierexperimentell überprüft werden.

Diese Erkenntnisse führten u.a. zu Beginn der 1990-er Jahre zur Einführung der STN-HFS in die Therapie des Morbus Parkinson. Heute stellt die STN-HFS das am häufigsten angewandte neurochirurgische Therapieverfahren in der Behandlung des Morbus Parkinson dar, was nicht zuletzt auf die im Vergleich zur Stimulation in anderen Kerngebieten (GPi oder Thalamus) stärker ausgeprägten therapeutischen Effekte im Hinblick auf die Zielsymptomatik des M. Parkinson zurückzuführen ist^{40;83}, wenngleich randomisierte vergleichende Studien nach wie vor fehlen. Zahlreiche klinische Studien mit inzwischen zum Teil mehrjährigen postinterventionellen Beobachtungszeiträumen haben die gute und anhaltende Wirkung der STN-HFS auf die Kardinalsymptome des Morbus Parkinson nachgewiesen^{90;127;136;158}.

Neben der Wirkung auf die motorischen Symptome konnte in klinischen Studien auch beobachtet werden, dass es unter STN-HFS mitunter zum Auftreten psychotroper Nebenwirkungen kommt (je nach Studie variieren die Angaben zwischen 15 und 40% bei Parkinson-Patienten¹⁵²). Diese umfassen das z. T. reversible Neu-Auftreten, bzw. die Aggravation bipolarer Störungen (Depression, (Hypo-) Manie) bis hin zu einem Suizidrisiko sowie Einzelfälle von exzessiver Spielsucht, sexueller Enthemmung und anhaltendem inadäquaten Lachen^{127;136;6;55;56}.

Inwieweit tatsächlich die HFS für das Auftreten dieser psychotropen Veränderungen verantwortlich ist oder ob die Symptome Ausdruck eines progredienten Krankheitsverlaufes, bzw. Ausdruck von begleitenden medikamentösen Therapiemodifikationen sind, wird derzeit kontrovers diskutiert^{79;151}, so sind z. B. Depressionen häufig bei Parkinson-Patienten zu beobachten, die keine therapeutische STN-HFS erhalten.

1.3.2 Klinische Beobachtungen im Kontext der Wirkmechanismen

Die exakten Wirkmechanismen der STN-HFS beim IPS sind bis heute nicht vollständig verstanden. Bemerkenswert scheint vor allem die Imitation der Pharmakowirkung von L-Dopa (oder anderer Dopaminergika) durch die kontinuierliche Stimulation. L-Dopa ist eine Dopamin-Vorstufe, die durch enzymatische Decarboxylierung in Dopamin umgewandelt wird. Es handelt sich um das wichtigste und am häufigsten verwendete Medikament zur Behandlung des Morbus Parkinson^{114;133}. Symptome, die mit L-Dopa erfolgreich behandelt werden können, zeigen regelmäßig unter STN-HFS eine deutliche Verbesserung, weshalb die L-Dopa-Responsivität als wichtiger Prädiktor für den späteren Erfolg einer Stimulationstherapie angesehen wird (Ausnahme Tremor)³⁵. Darüber hinaus kann bei der Mehrzahl der STN-stimulierten Patienten die tägliche Dosis der dopaminergen Medikation um durchschnittlich 50-65% gesenkt werden, manche Patienten können sogar ganz auf ihre Medikamente verzichten²⁹. Diese klinischen Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass die STN-HFS über eine Involvierung des dopaminergen Systems im Hinblick auf eine endogene DA-Produktion und/ oder -Freisetzung wirkt.

Diese Hypothese konnte in drei klinischen Studien mittels funktioneller Bildgebungsverfahren wie der Positronenemissionstomographie (PET) jedoch bisher nicht bestätigt werden^{1;73;147}. Mittels des Liganden-Bindungsverfahrens mit einem radioaktiv markierten DA-Rezeptor-Liganden ([¹¹C]Raclopride) konnte keine Abnahme der Bindung durch endogenes Dopamin angezeigt werden, obwohl in allen drei Studien eine klinisch wirkungsvolle STN-HFS vorlag. Diese in-vivo Ergebnisse widersprechen der Vorstellung einer STN-HFS assoziierten Dopamin-Freisetzung aus den verbleibenden nigralen Neuronen. Sie sollten jedoch aufgrund der geringen Sensitivität des Liganden-Bindungsverfahrens zurückhaltend diskutiert werden. Zusammenfassend steht die klinische Evidenz einer Beteiligung des dopaminergen Systems durch die STN-HFS weiterhin aus.

1.3.3 Experimentelle Daten zur Untersuchung von Wirkmechanismen der STN-HFS auf Transmitterebene im Striatum

Die oben genannten klinischen Beobachtungen einer L-Dopa-Reduktion nach STN-HFS veranlassten mehrere Untersuchungsgruppen, die Auswirkungen der STN-HFS auf die striatale dopaminerge Transmission tierexperimentell zu überprüfen.

Mittels des Verfahrens der Mikrodialyse, mit der Stoffkonzentrationen in extrazellulärer Flüssigkeit bestimmt werden können, konnte sowohl in gesunden Ratten als auch im Parkinson-Modell der Ratte unter STN-HFS eine erhöhte extrazelluläre striatale Konzentration entweder

von DA und/ oder seinen Hauptmetaboliten Dihydroxyphenylacetat (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) nachgewiesen werden ^{30;109;110;112;121}. Die Veränderungen der extrazellulären Stoffkonzentrationen unter STN-HFS wurden sowohl als Folge einer vermehrten DA-Freisetzung als auch durch eine Zunahme des DA-Metabolismus interpretiert ^{30;121}. Die Berliner Arbeitsgruppe zeigte in einer Mikrodialysestudie nach Vorbehandlung der gesunden Tiere mit dem DA-Wiederaufnahmehemmer Nomifensin, dass es unter STN-HFS zu einem gleichzeitigen Anstieg der extrazellulären striatalen Konzentration von DA und seinen Hauptmetaboliten DOPAC und HVA kommt ¹¹⁰. Nach Vorbehandlung der Tiere mit Pargylin, einem Hemmstoff der Monoaminoxidase (MAO), eines der beiden Dopamin-katabolisierenden Enzyme, konnte in der gleichen Studie ebenfalls eine Zunahme der extrazellulären striatalen DA-Konzentration festgestellt werden ¹¹⁰. Diese Ergebnisse würden also in Übereinstimmung mit dem postulierten dualen Mechanismus (vermehrte DA-Freisetzung und Zunahme des DA-Metabolismus) stehen.

Auch mittels zeitlich hochauflösender voltammetrischer Untersuchungen¹ konnte in gesunden Ratten gezeigt werden, dass es unter STN-HFS zu einem Anstieg der extrazellulären DA-Konzentration im Striatum kommt ⁹⁸.

Neben den kurzfristigen, bzw. unmittelbaren Stimulationswirkungen in Form einer vermehrten DA-Freisetzung und/ oder eines erhöhten DA-Metabolismus lassen sich auch längerfristige Effekte der STN-HFS nachweisen. So konnten *Meissner et al. (2003)* in naiven Ratten zeigen, dass es unter STN-HFS zu einer Aktivitätssteigerung der striatalen Tyrosinhydroxylase (TH) kommt. Da die TH der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dopamin-Synthese ist, könnte eine Aktivitätszunahme dieses Enzyms einen Trigger für Veränderungen in DA-Freisetzung und -Metabolismus darstellen ^{110;125}. Die Ergebnisse der tierexperimentellen Studien lassen sich also dahingehend zusammenfassen, dass eine akute STN-HFS den DA-Stoffwechsel im Striatum erhöht.

Wie bereits oben erwähnt, sind neben DA noch andere Transmittersysteme an der „basalganglionären Kommunikation“ beteiligt (Glutamat, GABA, Serotonin, Acetylcholin). Die Einflussnahme der STN-HFS auf die striatale Konzentration dieser Neurotransmitter wurde bisher weniger untersucht.

Die Grenobler Arbeitsgruppe zeigte mittels Mikrodialysetechnik, dass es in gesunden Ratten unter STN-HFS zu einer Erhöhung der striatalen, extrazellulären Konzentration der

¹Die Voltammetrie umfasst verschiedene elektroanalytische Methoden, zur qualitativen und quantitativen Analyse einer Probe, mit der man die chemische Zusammensetzung von Stoffgemischen anhand des spannungsabhängigen Stromverlaufs bestimmen kann. Grundlage der Voltammetrie sind Strom-Spannungs-Kurven. Bei der Messung der Stromstärke zwischen 2 Festkörperelektroden wird die Spannung mit der Zeit variiert.

Aminosäuren GABA und Glutamat kommt. Der Anstieg ließ sich sowohl auf der zur Stimulation ipsilateralen Seite als auch auf der kontralateralen Seite nachweisen³¹. Auch eine an sechs Parkinson-Patienten durchgeführte italienische Mikrodialysestudie aus Rom zeigte eine Beeinflussung der striatalen Aminosäure-Konzentration durch die STN-HFS. Unter klinisch wirksamer STN-HFS konnte eine erhöhte extrazelluläre Konzentrationen an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) im Putamen gemessen werden. cGMP galt in dieser Studie als Indikatorsubstanz der glutamatergen Transmission¹⁴⁵.

Untersuchungen, die die Auswirkungen der STN-HFS auf das serotoninerge System untersuchen, gibt es bislang nicht.

Wenngleich die oben angeführten experimentellen Studien zu einem Kenntniszugewinn über die Wirkmechanismen der STN-HFS beigetragen haben, so muss man einschränkend anmerken, dass die Ergebnisse oft nur auf kurzen Stimulationszeiten (Minuten bis wenige Stunden) beruhen und damit methodisch limitiert sind. In der klinischen Situation erfolgt die Stimulation kontinuierlich und über sehr viel längere Zeiträume (Jahre). Ein experimenteller Transfer dieser Situation war aufgrund nahezu fehlender technischer Voraussetzungen bzw. adäquater Stimulationsgeräte (inkl. akzessorischem Equipment) bisher nicht möglich. Dies erscheint umso wichtiger, als dass man verschiedene Wirkmechanismen unter akuter und chronischer STN-HFS vermuten kann^{15;30;31;91;129}. Bisher war eine experimentelle Langzeitstimulation an externalisierte Impulsgeber und zusätzliche Geräte gebunden, mit denen die Versuchstiere über Kabel verbunden waren¹⁰⁴. Durch diese externe Fixierung wird die Mobilität der Tiere eingeschränkt, ihre Körperhygiene behindert und durch die notwendige Einzelkäfighaltung das Sozialverhalten gestört. Die biologische, physiologische und verhaltensbiologische Integrität der Tiere wird also deutlich beeinträchtigt. Um diese methodischen Limitationen zu überwinden, wurde im Berliner Labor für experimentelle Basalganglienforschung der Charité ein vollständig implantierbares und von extern programmierbares Mikrostimulationssystem für Ratten etabliert¹²⁵. Die hier vorgelegte Arbeit ist die erste tierexperimentelle Studie, welche die Untersuchung von Langzeiteffekten der STN-HFS mit einem derartigen Gerät untersucht.

1.4 Eigene Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung neurochemischer Veränderungen im Striatum gesunder Ratten nach chronischer STN-HFS. In Analogie zu den Mikrodialysearbeiten mit akuter STN-HFS, welche eine Zunahme der DA-Freisetzung und des Metabolismus in gesunden Ratten zeigten, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der chronischen STN-

HFS auf die dopaminerge Transmission mittels Gehaltsbestimmung in striatalen Gewebshomogenaten untersucht werden.

Da neben DA noch weitere Transmittersysteme an der basalganglionären Kommunikation beteiligt sind, erfolgte unter Verwendung desselben experimentellen Ansatzes ebenfalls eine Gehaltsbestimmung der Aminosäuren Glutamat und GABA sowie von Serotonin und dessen Metabolit HIAA im dorsolateralen Striatum.

Neben der Untersuchung neurochemischer Veränderungen im dorsolateralen Striatum erfolgten die Untersuchungen auch im ventralen Striatum. Das ventrale Striatum als Teil der limbischen Basalganglienschleife ist an der Entwicklung von Stimmungsverhalten beteiligt. Dopamin und Serotonin gelten als zwei wichtige Transmitter in diesem Kerngebiet, ebenso Glutamat und GABA. Deshalb erfolgte auch eine Gehaltsbestimmung (Gewebshomogenate) dieser Neurotransmitter im ventralen Striatum nach chronischer STN-HFS.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 25 männliche Wistar-Ratten der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet, die zu Versuchsbeginn zwischen 270 – 350g wogen. Die in dieser Arbeit dargestellten Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes § 8 Absatz 1 durchgeführt und vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Tierversuchsnummer G 0 320/05 genehmigt. Die Zahl der Versuchstiere, die Dauer der operativen Eingriffe und die damit verbundenen Beanspruchungen der Tiere wurden so gering wie möglich gehalten.

2.2 Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden bis zum Zeitpunkt der Operation in standardisierten Käfigen in Gruppen von jeweils 5 Tieren gehalten, nach der Operation erfolgte die Unterbringung in ebenfalls standardisierten Einzelkäfigen.

Die Fütterung erfolgte mit Pellets (Altromin® 1324 Standard, Lage, Deutschland), die wie das Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung standen. Die Tiere unterlagen kontrollierten Haltungsbedingungen mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (Hellphase von 6:00-18:00 Uhr) und einer Raumtemperatur von 18°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50%.

2.3 Substanzen, Pufferlösungen und Laufmittel für die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

2.3.1 Verwendete Substanzen

Es folgt eine tabellarische Auflistung aller verwendeten Chemikalien und Substanzen und ihrer Hersteller, bzw. Bezugsquellen (Tabelle 1):

Substanz	Hersteller/ Bezugsquelle
2-Methylbutan Isopentan	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
3-Methoxytyramin (3-MT)	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
3,4-Dihydroxyphenylacetat (DOPAC)	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
4-Hydroxy-3-Methoxyphenylacetat (HVA)	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
5-Hydroxyindol-3-essigsäure (HIAA)	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
5-Hydroxytryptamin (5-HT)	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatrium-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Dopamin	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	VEB Jenapharm Laborchemie, Apolda, DDR
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Jung-Einbettmedium	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Kresylviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
m-Hydroxybenzylhydrazin	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Natriumcarbonat	VEB Jenapharm Laborchemie, Apolda, DDR
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-dihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Novaminsulfon	ratiopharm, Ulm, Deutschland
Pentobarbital-Natrium	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Technovit-Zwei-Komponenten-Kaltpolymerisat	Kulzer, Wehrheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Substanzen und ihrer Hersteller, bzw. Bezugsquellen

2.3.2 Pufferlösungen

Für die spätere Aminosäurenbestimmung wurde ein Teil der striatalen Gewebshomogenate neutralisiert mit Natriumborat-Puffer: Dinatriumtetraborat-Decahydrat (0,125M, pH 10,0).

Für die Färbung der Hirnscheiben nach Nissl war zunächst eine Post-Fixation des Gewebes notwendig, wozu als Puffer 0,1M Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS, pH 7,4) verwendet wurde. Zusammensetzung Dinatrium-hydrogenphosphat, Natrium-dihydrogenphosphat, Natriumchlorid.

Für die Nissl-Färbung war außerdem die Verwendung eines Azetatpuffers (20mM, pH 4,0) notwendig, Zusammensetzung: Essigsäure, destilliertes H₂O.

2.3.3 Laufmittel für die HPLC

Die neurochemische Analyse des striatalen Gewebes im Sinne einer Gehaltsbestimmung für Dopamin und Serotonin (einschließlich der Metabolite) erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High-Performance-Liquid-Chromatography = HPLC) und

elektrochemischer Detektion. Das dafür notwendige Laufmittel für die HPLC hatte folgende Zusammensetzung:

80mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,5mM EDTA-Di-Natriumsalz, 0,85mM Octansulfonsäure-Natriumsalz, 80ml 2-Propanol auf 2l Lösung. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Phosphorsäure auf 3,8 eingestellt.

Die Bestimmung der striatalen Gewebslevel der Aminosäuren erfolgte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion. Dazu wurden Laufmittel mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Laufmittel A: 50mM Natriumacetat-Trihydrat, 250µl Eisessig, 50ml Acetonitril auf 1l Lösung. Der pH-Wert wurde auf 5,75 eingestellt .

Laufmittel B: 750ml Acetonitril auf 1l Lösung.

Darüber hinaus wurde eine Derivatisierungslösung folgender Zusammensetzung verwendet: 10mg o-Phthaldialdehyd, 0,2 ml Methanol, 1,8 ml Natriumtetraborat-Lösung (0,125M), 20µl Mercaptoethanol (Lagerung bei 5°C)

2.4 Versuchsplanung

Die Ratten wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt, eine Verum- und eine Kontrollgruppe. Bei den Tieren der ersten Gruppe (STN-verum n=9) erfolgte die kontinuierliche Applikation der STN-HFS durch eine monopolare Stimulationselektrode. Bei den Tieren der Kontrollgruppe (STN-placebo n=8) blieb diese Elektrode ungeladet, während alle anderen operativen Pozeduren identisch waren. Nach einer postoperativen Erholungsphase von 2 Tagen begann der 14-tägige Beobachtungszeitraum mit Initiierung der HFS (bzw. Scheinstimulation). Am 16. postoperativen Tag erfolgte die Tötung der Tiere in tiefer Narkose, wobei bis zum Zeitpunkt der Dekapitation die Stimulation aufrechterhalten wurde. Die Gehirne wurden entnommen, schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. Diese Analyse umfasste die Untersuchung striataler Gewebeproben im Bereich des rostralen und medialen Anteils auf seinen Gehalt an Aminosäuren (Glutamat und GABA), Dopamin, Serotonin und deren Metabolite DOPAC, HVA und Hydroxyindolessigsäure (HIAA).

Ca. 7.	2 d	16 d	im weiteren
Lebenswoche	post implantationen	post implantationen	Verlauf
Implantation des IPG	Erholungsphase	Dekapitation, Explantation des IPG, Hirnentnahme und Konservierung	Analysen

2.5 Implantation des Mikrostimulationssystems

Das Mikrostimulationssystem bestand aus einem implantierbaren Impulsgenerator (IPG) und einer monopolen Semi-Mikroelektrode (Durchmesser: 120 μ m) aus aktiviertem Iridium. Die (leitende) Verbindung zwischen beiden Komponenten erfolgte mittels eines speziell angefertigten Kabelsystems, das auch die Gegenelektrode (Material: MP35N Legierung) inkorporierte (für Einzelheiten siehe auch *Harnack et al*, 2008⁶⁸). Bei Ratten der STN-verum-Gruppe erfolgte die Implantation des kompletten Mikrostimulationssystems (einschließlich IPG und Elektrode), wohingegen bei Tieren der Kontrollgruppe neben einer Iridium-Elektrode ein größen- und gewichtsadaptierter Dummy-Stimulator aus Kunststoff implantiert wurde (siehe Abbildung 4).

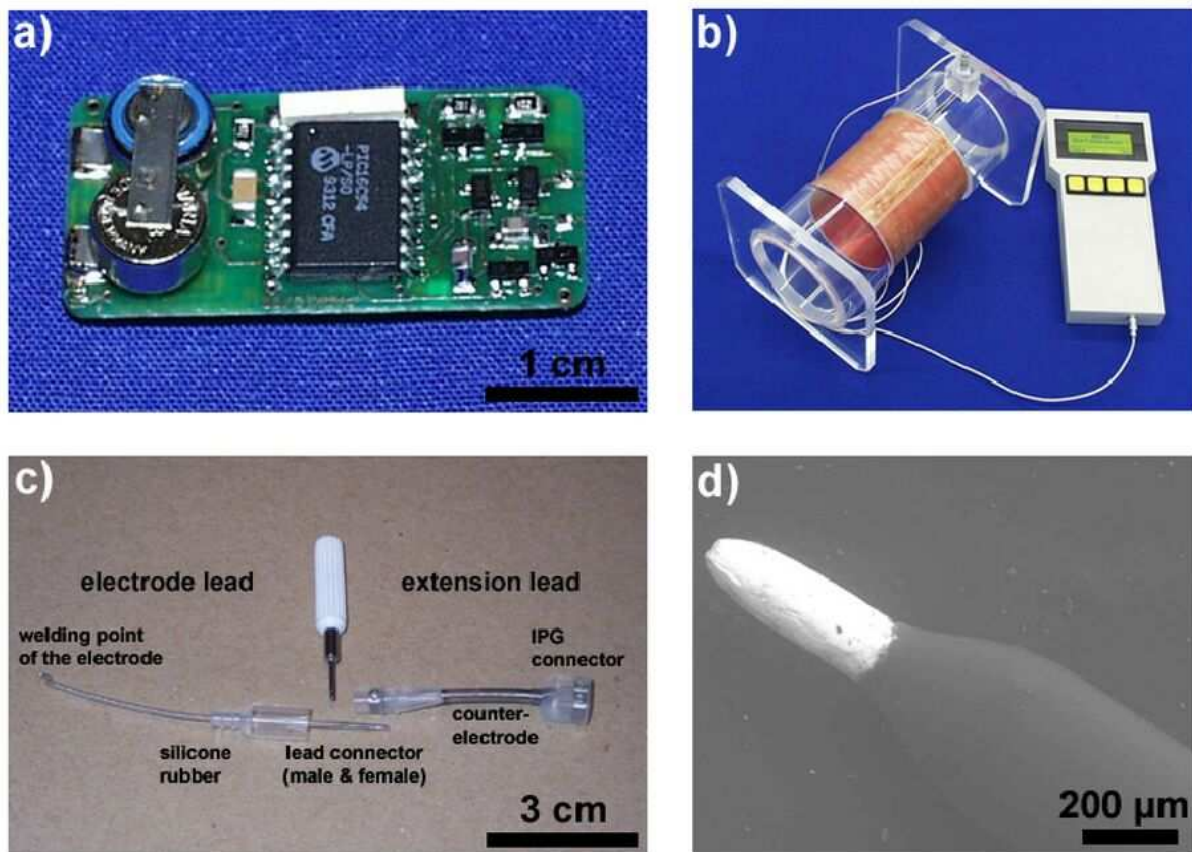


Abbildung 4: Der IPG (Abb. a) zeigt die Oberseite einer gedruckten Platine ist die Hauptkomponente des Systems. Der Mikrocontroller (schwarzes Bauelement in a)) ist mit einem Reed-Schalter verbunden (weißes Bauelement in a)), welcher durch ein elektromagnetisches Feld geschaltet werden kann. Dies ermöglicht die elektromagnetische Übermittlung von Stimulationsprotokollen und dadurch die Programmierung des IPG über einen externen Programmierer (Gerät rechts in Abb. b)). Das elektromagnetische Feld wird verstärkt durch eine Induktionsspule (Gerät links in Abb. b)), in welche die Ratte während des Programmierens gesetzt wird. Das zweiteilige Kabelsystem (Abb. c) besteht aus einem Elektroden- und einem Verlängerungsteil (electrode lead und extension lead), welche während der Implantationsoperation (über eine Stellschraube) verbunden und (mittels Silikonkleber) versiegelt werden. Die Gegenelektrode besteht aus einem gewickelten Draht, welcher in den Verlängerungsteil des Kabelsystems integriert ist. Die HFS wird durch monopolare Semi-Mikroelektroden aus aktiviertem Iridium appliziert (Abb. d) zeigt eine solche Elektrode). Die jeweiligen Maßstäbe sind angegeben. (modifiziert nach *Harnack et al.*, 2008⁶⁸)

Insgesamt lässt sich der operative Algorithmus der stereotaktischen Elektroden- und Stimulatorimplantation wie folgt beschreiben. Zunächst erfolgte die Kalibrierung der Elektrode auf den stereotaktischen Referenzpunkt Interaurallinie in Bezug auf die antero-posteriore (AP) Position des STN entsprechend den stereotaktischen Koordinaten des Atlas von *Paxinos und Watson*¹²² (STN von interaural: AP: +5,4mm). Auf eine Elektrodenkalibrierung auf die medio-laterale und dorso-ventrale Position des STN wurde aufgrund einer dadurch nicht weiter optimierbaren Treffergenauigkeit verzichtet (unveröffentlichte Daten aus dem eigenen Labor).

Nachdem die Ratten durch Pentobarbital-Natrium (intraperitoneale Applikation, Dosis: 60mg/kg Körpergewicht, Substanz gelöst in 0,9%-iger NaCl-Lösung) narkotisiert worden waren, erfolgte die Positionierung der zuvor im Bereich der potenziellen Inzisionsstellen rasierten Tiere im stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, USA). Nach Inzision (Längsschnitt) der Kopfhaut, Freipräparation der Kalotte und Darstellung des Bregmas wurde die Elektrode auf diesen (zweiten) Referenzpunkt kalibriert (STN vom Bregma: AP: -3,6mm; ML: 2,5mm; DV: -7,5mm). Nach arithmetischer Mittelung der AP-Position anhand der beiden Referenzpunkte (interaural und Bregma) wurde an der berechneten STN-Position entsprechend der zusätzlichen medio-lateralen (ML) Bregma-Koordinate ein Bohrloch gesetzt und die Elektrode auf die der dorso-ventralen (DV) Koordinate des STN in Bezug auf das Bregma langsam abgesenkt. Die Fixierung der Elektrode am Schädelknochen erfolgte über zwei zuvor an der Kalotte angebrachte Verankerungsschrauben mittels eines Zwei-Komponenten-Kaltpolymerisats (Technovit®5071, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland). Das zweiteilige Verbindungskabel zwischen Elektrode und IPG wurde durch einen subkutanen Tunnel entlang der Nackenregion verlegt. Nach wasserdichter Konnektion der beiden Kabelenden mittels Silikonflansch wurde der interne Pulsgenerator anschließend in eine Subkutanttasche am Rücken des Tieres eingenäht. Der Verschluss des Subkutangewebes und der Haut erfolgte mit Einzelknopfnähten (Subkutannaht mit Vicryl™, Polyglactin910, geflochten, 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland; Hautnaht mit Resolon®, monofil, Polyamid 6, RESORBA, Nürnberg, Deutschland). Am Kopf wurden vor Verschluss der Haut Gelatineschwämme (Gelaspon®, Chauvin ankerpharm GmbH, Berlin, Deutschland) eingelegt, um die Reizung der Haut durch den Technovit-Sockel zu reduzieren und die Granulationsbildung zu fördern (siehe Abbildung 5).

Die Implantation des Scheinstimulators erfolgte nach dem gleichen Prinzip, mit Ausnahme der subkutanen Tunnelung, da keine Kabelverbindung zwischen Elektrode und Scheinstimulator

notwendig war. Postoperativ erhielten die Tiere 100µl Novaminsulfon®-Tropfen (Metamizol-Na, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) zur Analgesie per os.

Nach durchschnittlich 48-stündiger Erholung von der Operation begann der 14-tägige Beobachtungszeitraum mit Initiierung der STN-HFS, wobei folgende Stimulationsparameter gewählt wurden: alternierende Impulse mit einer Amplitude zwischen 50 und 150µA (abhängig vom Verhaltenseffekt der Tiere im Sinne von Dyskinesien und Rotation, s. *Bergmann et al., 2004*¹⁹⁾) und einer Frequenz von 130Hz sowie einer Pulsweite von 52µs.



Abbildung 5: Ratte mit implantiertem Stimulationssystem. Unter der mit Einzelknopfnähten verschlossenen Wunde am Kopf befindet sich die Elektrode, der Impulsgenerator ist in eine Subkutantase am Rücken eingenäht. Das Verbindungskabel zwischen Elektrode und Impulsgenerator verläuft durch einen subkutanen Tunnel am Hals. Das Fell ist durch die Desinfektion mit Povidon-Jod-Lösung braun gefärbt.

Die Überwachung der Stimulation erfolgte in regelmäßigen Abständen (jeden fünften Tag) durch Ableitung eines artifiziellen Stromsignals im Körper der Ratte mittels eines eigens dafür konstruierten 130Hz-Filter-basierten 2-Kanal-Verstärkers unter Verwendung von EMG-Oberflächenelektroden, die der Ratte zur Messung an zwei Hautstellen angebracht wurden. Das detektierte Signal wurde mit einem Oszilloskop (4-Channel Oscilloscope, Hewlett Packard, Paolo Alto, Ca., USA) aufgezeichnet. Die Effektivität der Stimulation wurde auch biologisch getestet. Dazu erfolgte am 15. postoperativen Tag eine kurzzeitige (<10sec) Erhöhung der Stimulationsamplitude (300µA), was, die Integrität des Stimulations- bzw. Kabelsystems

vorausgesetzt, zu typischen Verhaltenseffekten wie einer kontralateralen Rotation oder einem sog. „paw-waving“ führte, was als Zeichen einer wirksamen STN-Stimulation angesehen wurde^{19;109}. Danach erfolgte eine sofortige Re-Programmierung der Stimulationsamplituden auf die Ausgangswerte (50-150µA), die bis zur Dekapitation nach weiteren 60 min beibehalten wurde. Für die Tötung wurden die Tiere mittels Chloralhydrat tief anästhesiert (intraperitoneale Applikation, Dosis 500mg/kg Körpergewicht in 0,9%-iger NaCl-Lösung). Nach der Dekapitation erfolgte die schnelle Retraktion der Elektrode und die Freipräparation der Hirne, die nachfolgend in Stickstoff-gekühltes Isopentan (ca. -40°C) überführt und für ca. 1 min schockgefroren wurden. Danach erfolgte eine Aufbewahrung bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung. Schliesslich wurde jeder Stimulator freipräpariert und die Implantathöhle im Hinblick auf abszedierende oder seröse Entzündungen untersucht.

2.6 Schnittprotokoll für die Gewinnung von Hirnscheiben und –schnitten

Um eine standardisierte Untersuchung der striatalen Gewebskonzentrationen der Neurotransmitter an definierten Bereichen des Striatums (rostraler und medialer Anteil) gewährleisten zu können, wurden die entsprechenden Hirngewebscheiben am Kryostat und unter Verwendung von Objektträger-fixierten Orientierungsschnitten gewonnen. Dazu wurde das native Gehirn mittels Wasser und Jung-Einbettmedium® (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland) auf einen sog. Kryo-Stempel aufgefroren und mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Cryostat 1800, Reichert-Jung, Deutschland) gemäß dem nachfolgenden Schnittprotokoll geschnitten. Die Hirnscheiben, die das rostrale und mediale Striatum umfassten, hatten jeweils eine Dicke von 1mm. Vor und hinter jeder Hirnscheibe wurden o.g. Orientierungsschnitte gewonnen, die ebenso wie die Hirnschnitte aus der Region des STN zur Dokumentation der Elektrodenlage eine Dicke von 20µm hatten.

Schnittprotokoll

Hirnscheibe 1 (1mm) AP: ca. +2,2 bis +1,2 rostrales Striatum (inkl. Nucl. accumbens)

Hirnscheibe 2 (1mm) AP: ca. +0,96 bis -0,04 mediales Striatum

2.7 Histologische Aufarbeitung

Die Orientierungsschnitte wurden zunächst für 24 Stunden postfixiert (4% Paraformaldehyd in 0,1M PBS), anschließend erfolgte die Färbung der Präparate nach *Nissl*. Dazu wurden die Schnitte zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten) dehydriert und

nachfolgend in einer absteigenden Alkoholreihe, die in Azetatpuffer endete, rehydriert. Danach erfolgte die Färbung mit der *Nissl*-Reagens (Kresylviolett [Merck®, Darmstadt, Deutschland], 1% in 20mM Azetatpuffer), gefolgt von einer Spülung mit destilliertem Wasser. Der Färbeprozess endete in einer aufsteigenden Alkoholreihe und einer 15-minütigen Spülung in Xylol. Die Präparate wurden anschließend mit dem Einbettungsmedium Entelan® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

2.8 Gewebepräparation

Innerhalb der Hirnscheiben wurden definierte Regionen des rostralen und medialen Striatums gewählt, aus denen Stanzpräparate gewonnen wurden. Dabei wurden in der Hirnscheibe 1 die Regionen dorsolaterales Striatum und Nucleus accumbens, in der Hirnscheibe 2 der äußere obere Quadrant des dorsolateralen Striatums als Stanzregionen definiert, so dass pro Tier insgesamt 6 Gewebestücke (drei auf der unbehandelten Seite und drei auf der behandelten Seite) entnommen wurden.

Die Präparation erfolgte in gefrorenem Zustand auf einer mit Trockeneis gekühlten festen Metallunterlage. Zur besseren Orientierung wurde zudem eine Stereolupe mit 4-facher Vergrößerung verwendet. Die Stanzkanüle hatte einen Innendurchmesser von 1mm, so dass die Stanzlinge aus dem rostralen und medialen Striatum ein Volumen von ca. 1mm³ aufwiesen (siehe Abbildung 6).

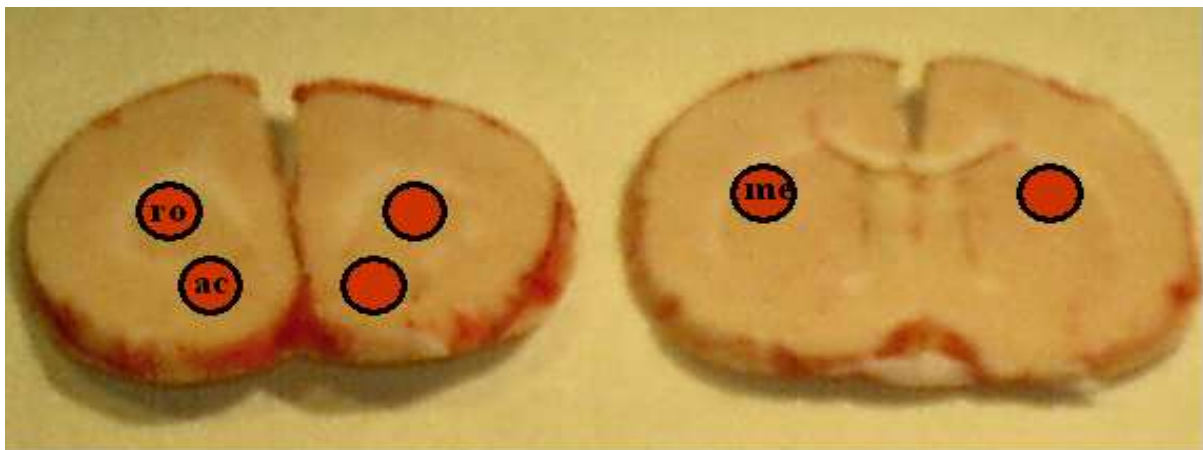


Abbildung 6: Hirnscheiben mit schematischer Markierung der Regionen, aus denen die Stanzpräparate gewonnen wurden. Links: Hirnscheibe 1 mit rostralem Striatum (ro), inkl. Nucleus accumbens (ac); Rechts: Hirnscheibe 2 mit medialem Striatum (me)

Die Gewebeproben wurden in mit 250µl 0,1M Perchlorsäure vorgelegte Eppendorf-Gefäße überführt und nachfolgend mittels eines Ultraschalldesintegrators (Vibra Cell™, Sonics&Materials Inc., Danbury, CT, USA) (3 Stöße à 10sec im 10-Sekunden-Intervall, bei

Kühlung im Eiswasser) homogenisiert. Danach wurden 100µl des Homogenats aus jeder Probe zur späteren Proteinbestimmung entnommen und bis dahin bei -80°C aufbewahrt.

Nach Zentrifugation des restlichen Homogenats (17.000U/min, 4°C, 10 min) wurden zunächst 20µl des perchlorsauren Überstandes in mit 20µl Natriumtetraboratpuffer vorgelegten Eppendorf-Gefäßen neutralisiert und später der Aminosäuren-Bestimmung zugeführt (Aufbewahrung bei -80°C). Weitere 100µl des Überstandes wurden umpipettiert und für die Gehaltsbestimmung der Catecholamine verwendet.

2.9 Gehaltsbestimmung der Catecholamine und Aminosäuren im Striatum mittels HPLC und elektrochemischer, bzw. Fluoreszenzdetektion

Die Gehaltsbestimmung der striatalen Gewebeproben an Dopamin und Serotonin (inklusive Metaboliten) sowie der Aminosäuren erfolgte mittels HPLC und elektrochemischer bzw. Fluoreszenzdetektion.

Die HPLC ist eine analytische Methode, mit deren Hilfe Stoffgemische in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt und anschließend die Konzentrationen der einzelnen Stoffe bestimmt werden können. Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe einer mobilen und einer stationären Phase. Das zu untersuchende Stoffgemisch wird zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase, mit hohem Druck (100-200 bar) durch eine Trennsäule gepumpt, die die stationäre Phase enthält. Aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen (u.a. gegeben durch Polarität, Molekülgröße, etc.) der einzelnen Komponenten des Stoffgemisches mit der stationären Phase verlassen die Bestandteile der Prüfsubstanz die Trennsäule zu verschiedenen Zeiten (entspricht den Retentionszeiten) und können so mit geeigneten Detektoren am Ende der Säule separat nachgewiesen werden.

Die Trennung der Catecholamine erfolgte an einer Normalphasesäule, an deren polarer Oberfläche polare Stoffgemischbestandteile länger retardiert werden als unpolare und deshalb später die Säule verlassen (längere Retentionszeiten). Zur Trennung wurden 50µl Probe über manuelle Probenaufgabeeventile (RH 7725, Rheodyne, Cotati, USA) auf die HPLC-Säule aufgetragen. Die chromatographische Trennung erfolgte an einer Säule des Typs ProntoSil 120-5-C 18-SH (Bischoff Analysetechnik und -geräte GmbH, Leonberg, Deutschland) (Korngröße 5µm, Länge 150mm, Durchmesser 3mm). Die mobile Phase wurde mit einer Pumpe des Typs Rheos 4000 (Flux Instruments, Basel, Schweiz) gefördert, wobei die Förderrate 550µl/min betrug, bei der sich ein mittlerer Druck von 133bar einstellte. Das an die Arbeitselektrode angelegte Potential betrug 0,8V gegen die Ag/AgCl-Referenzelektrode.

Die Detektion der Substanzen innerhalb der Probe erfolgte durch eine amperometrische, elektrochemische Messzelle (Elektroden Durchmesser 3mm) (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Typ 41000, München, Deutschland) bei einem Strommessbereich von 50nA für alle Proben. Die aufgezeichneten Chromatogramme wurden über die Berechnung der Peak-Flächen mit Hilfe einer entsprechenden Software (CSW 1.7-Chromatography Station for Windows, DataApex Ltd, Prag, Tschechien) ausgewertet.

Die Tageseichung und Kontrolle der Retentionszeiten erfolgte durch die dreimalige Messung von standardisierten Eichlösungen, die an jedem Messtag von der Aufbewahrungskonzentration 10^{-3}M auf die Arbeitskonzentration 10^{-6}M für DA und 10^{-7}M für DOPAC, HVA, Serotonin und HIAA verdünnt wurden.

Im Gegensatz zur Analyse der Catecholamine erfolgte die Auftrennung der Aminosäuren an einer „umgekehrten-Phase“-Säule (reversed-phase-HPLC). Dazu wurde eine unpolare stationäre Phase verwendet, an der die polaren Aminosäuren nur kurz zurückgehalten wurden und somit eine Auftrennung nach deutlich kürzeren Untersuchungszeiten (Retentionszeiten) möglich war, als es bei einer Untersuchung an einer Normalphasesäule der Fall gewesen wäre. Die anschließende Detektion erfolgte mittels Fluoreszenztechnik. Dazu wurden die im Verhältnis 1:1 mit Boratpuffer versehenen Überstände der zentrifugierten Gewebshomogenate zunächst mit Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. 18 μl dieser Probe wurden dann mit 18 μl Derivatisierungslösung versetzt, wodurch die Aminosäuren zu fluoreszenten Isoindolderivaten modifiziert wurden. Nach einer Reaktionszeit von 2min wurde die Reaktion durch Zufuhr von 9 μl 1M Essigsäure terminiert. Anschließend wurden 36 μl der Mischung auf die HPLC-Säule des Typs Prontosil 120-3-C18-ace-EPS (mit Vorsäule) (Bischoff Analysetechnik und -geräte GmbH, Leonberg, Deutschland) (Säule: Korngröße 3 μm , Länge 55mm, Durchmesser 3mm; Vorsäule: Länge 10mm, Durchmesser 3mm) mittels temperierbarem Probengeber (Shimadzu SIL-10ADVP, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) zur Trennung aufgetragen. Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,6ml/min und 40°C Säulentemperatur in einem linearen Gradientensystem. Dabei wurde der Laufmittelanteil B von 0% bei Start der Analyse auf 25% innerhalb von 25min erhöht. Danach schloss sich eine 5-minütige Spülphase der Säule mit 100% Laufmittel B und eine 12 Minuten dauernde Phase der Re-Konditionierung der Säule auf die Anfangsbedingungen mit 0% B an. Die Laufmittel wurden durch eine Pumpe vom Typ Beckman Coulter System Gold 126 Solvent Module (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA., USA) gefördert. Nach erfolgter Trennung wurden die Fluoreszenzderivate der Aminosäuren bei 330nm Exzitation und 450nm Emission detektiert (Shimadzu Spectrofluorometric Detector RF-10AXL, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Die

aufgezeichneten Chromatogramme wurden über Berechnung der Peakflächen mit Hilfe einer entsprechenden Software (Beckman Coulter 32-Karat, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA., USA) ausgewertet.

Durch die Chromatographie von Aminosäure-Standards in Wasser (Konzentration 10^{-6} M) wurde an jedem Messtag eine Tageseichkurve erstellt.

2.10 Proteinbestimmung nach Lowry

Der Gehalt an Dopamin und Serotonin und den Aminosäuren im Striatum wurde in Bezug zum Proteingehalt der jeweiligen striatalen Gewebprobe (also des jeweiligen Stanzlings) gemessen, weshalb eine entsprechende Bestimmung der Proteinkonzentration in diesen Proben notwendig war. Dazu wurde die Methode nach *Lowry (1951)* angewendet¹⁰³. Die Proteine wurden zunächst durch Zugabe von 1N Natronlauge (im Verhältnis 1:1) für 24 Stunden denaturiert. Danach erfolgte die Zufuhr von 2000µl *Lowry*-Reagenz (0,05ml 1% CuSO₄-Lösung, 0,05ml 2% KNa-Tartrat-Lösung, 5,0ml 2% Na₂CO₃ in 0,1M NaOH) zu 500µl der Probe. Dabei wurde chemisch die Bildung von Cu²⁺-Proteinkomplexen induziert. Anschließend wurde diesem Substanzgemisch 200µl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Zusammensetzung: Phosphomolybdän und -wolfram) hinzugefügt. Der damit initiierte Farbumschlag des Folinreagenzes von gelb nach blau (Reaktionsdauer 1h, Aufbewahrung bei Raumtemperatur unter Lichtschutz) war chemisch wiederum auf die Reduktion von Wolfram- und Molybdänmolekülen im Folinreagenz durch die Cu-Proteinkomplexe zurückzuführen. Die resultierende Blaufärbung wurde mittels Extensionsmessung an einem Spekol (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) quantifiziert. Nach dem LambertBeer'schen Gesetz:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$$

E_{λ} - Extinktion bei der Wellenlänge λ (hier $\lambda = 660\text{nm} \rightarrow d = 1$)

ϵ_{λ} - molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c - Konzentration

d - Schichtdicke

konnte die gemessene Extinktion als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und berechnet (Software: Graph Pad Prism), eine Eichkurve konstruiert und der molare Extinktionskoeffizient ϵ aus dem Anstieg der Geraden errechnet werden. Als Referenzwerte dienten eine Leerwertmessung mit Wasser (Extinktion = 0) sowie zur Eichung eine

Konzentrationsreihe bekannter Proteinkonzentrationen (Human-Serum-Albumin). Für die Messung der Extinktion am Spekol wurden alle Proben in Küvetten eingebracht.

2.11 Datenanalyse

Die Quantifizierung der striatalen Gewebsgehalte an Dopamin und Serotonin (einschließlich der Metabolite) erfolgte in drei Schritten:

1. Zunächst wurden die Werte der Peakflächen der Chromatogramme umgerechnet auf die Konzentration der Einzelsubstanzen [$\mu\text{mol/l}$] in den Proben. Das Bezugsverhältnis wurde so gewählt, dass 1ml Probenvolumen identisch war mit der absoluten Stoffmenge der Substanzen gemessen in nmol. Für die Bestimmung der Konzentration der Einzelsubstanzen in den Proben konnten die Peakflächen der jeweiligen Standards bekannter Konzentration (Dopamin $1\mu\text{M}$, Serotonin sowie serotoninerge und dopaminerge Metabolite jeweils $0,1\mu\text{M}$) verwendet werden, denn setzt man die Peakfläche einer Probe unbekannter Konzentration ins Verhältnis zur Peakfläche, die man durch die Messung eines Standards mit bekannter Konzentration erhalten hat, so lässt sich daraus die Stoffkonzentration in der Probe ermitteln. Für die Standards wurden jeweils die Mittelwerte von drei Eichmessungen pro Substanz herangezogen. Da die Messbedingungen im Hinblick auf Aufgabevolumen und Messbereich für Proben und Standard unterschiedlich waren, wurde für die Berechnung der Konzentration ein Korrekturfaktor eingeführt, der es erlaubte, die Probenmessbedingungen an die des Standards zu adaptieren. Dieser Korrekturfaktor (Messbereich [nA]/Messvolumen [μl]) wurde mit den Werten der Peakflächen aus den Proben multipliziert.

2. In einem zweiten Schritt wurden die berechneten Stoffmengen [nmol] in 1 ml Volumen ins Verhältnis zum Proteingehalt der jeweiligen Probe gesetzt, so dass sich für die einzelnen Substanzen eine Konzentration von nmol/g Protein ergab.

3. Schließlich wurden für das dorsolaterale Striatum die so erhaltenen Gehaltskonzentrationen des rostralen und medialen Anteils für die jeweils behandelte und nicht-behandelte Seite gemittelt.

Die Quantifizierung der striatalen Gewebsgehalte an den Aminosäuren (Glutamat und GABA) erfolgte in analoger Weise. Für die Aminosäuren wurde an jedem Messtag eine Tageseichkurve erstellt. Dazu wurde jeweils eine Zweifachbestimmung des Blindwertes (nur Wasser) und der Eichwerte (Glutamat und GABA) durchgeführt. Die Eichwerte hatten die Konzentrationen von $5\mu\text{M}$ (Glutamat) und $1\mu\text{M}$ (GABA) in Wasser. Die berechneten Stoffkonzentrationen wurden abschließend auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen, so dass sich die Endkonzentration von nmol/mg Protein ergab.

In allen untersuchten Regionen wurden zudem die Quotienten der Metaboliten zu dem jeweiligen Transmitter gebildet (d.h. die Ratio aus [DOPAC+HVA]/DA, bzw. HIAA/Serotonin).

2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Gehaltsmessungen erfolgte unter Verwendung des Programms Sigma Stat® (Version 2.03 von SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm mittleren Standardfehler (standard error of means, SEM) angegeben. Zu beachten sind die unterschiedlichen Einheiten ([nmol/g Protein] für DA, DOPAC, HVA, Serotonin und HIAA und [nmol/mg Protein] für Glutamat und GABA).

Da die einzelnen Gehaltskonzentrationen des rostralen und medialen Striatums der jeweiligen Seite (unbehandelt vs. behandelt) zusammengefasst wurden (s.o.), erfolgte zunächst ein entsprechender statistischer Vergleich innerhalb der beiden Versuchstiergruppen mittels one-way ANOVA. Dieser Test erlaubte zudem eine Aussage über die Normalverteilung der Daten.

Ein statistischer Vergleich zwischen den Versuchstiergruppen erfolgte mittels two-way ANOVA mit der „Stimulationsseite“ (unbehandelt vs. behandelt) und dem „Stimulationsmodus“ (STN-HFS vs. Schein-HFS) als abhängigem und der jeweiligen Gehaltskonzentration als unabhängigem Faktor. Bei statistisch signifikanten Unterschieden wurde anschließend ein post hoc t-Test korrigiert für multiple Vergleiche nach der Methode von Student-Newman-Keuls durchgeführt. Ein Wahrscheinlichkeitslevel von $p < 0.05$ wurde dabei als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Definition der Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Auswertung der Studie wurden nur Tiere eingeschlossen, bei denen histologisch der Nachweis der Elektrodenspitze im STN erbracht werden konnte. Außerdem durften keine Abweichungen im Schnittprotokoll im Hinblick auf die Schnittniveaus für das rostrale und das mediale Striatum (Toleranzbereich $AP \pm 10\%$) vorliegen (siehe Abbildungen 7a) und b)). Darüber hinaus waren bei allen Tieren der Verum-Gruppe die Funktionstüchtigkeit des Stimulators und der Stimulation (gemessen am artifiziellen Ableitungssignal, siehe Material & Methoden S. 24) Voraussetzungen für den Einschluss in die Studie. Schließlich wurden nur diejenigen Tiere für die Auswertung berücksichtigt, bei denen ein unkomplizierter postoperativer Verlauf ohne Nachweis von Infektionen im Bereich des gesamten Stimulationssystems oder abnormen Gewichtsverlust festzustellen war.

3.2 Histologische Verifikation von Elektrodenlage und Schnittebenen

Von insgesamt 25 Tieren wurden 17 Ratten in die Auswertung einbezogen (HFS: $n = 9$, Schein-HFS: $n = 8$). Diese 17 Tiere erfüllten alle oben genannten Einschlusskriterien. Bei 6 Tieren lag eine falsche Elektrodenlokalisierung vor. Bei zwei weiteren Tieren bestand histologisch eine Entzündungsreaktion im Bereich der Elektrodenspitze. Somit wurden insgesamt 8 Versuchstiere ausgeschlossen.

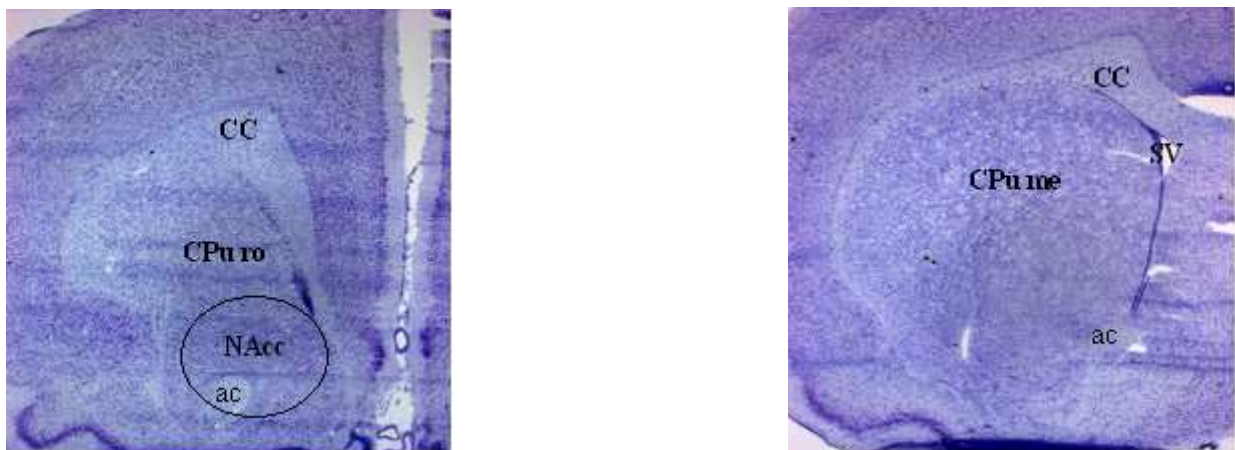


Abbildung 7a-b: Orientierungsschnitte zur Anfertigung der Hirnscheiben auf Höhe des a) rostralen Striatums einschließlich Nucl. accumbens und b) medialen Striatums.

a) Hirnscheibe auf Höhe des rostralen Striatums (AP: +2,1), rechts. Die anatomischen Strukturen sind wie folgt: CC = Corpus callosum, CPu ro = rostrales dorsolaterales Striatum, NAcc = Nucleus accumbens, ac = Commissura anterior.

b) Hirnscheibe auf Höhe des medialen Striatums. (AP: +0,86), rechts. Die anatomischen Strukturen sind wie folgt: CPu me = mediales dorsolaterales Striatum, SV = Seitenventrikel.

3.3 Neurochemische Analyse von Dopamin und Metaboliten

3.3.1 Dorsolaterales Striatum

In beiden Versuchstiergruppen (Schein-HFS und STN-HFS) waren keine statistisch signifikanten Unterschiede der Gewebsgehalte von Dopamin und den Hauptmetaboliten (DOPAC und HVA) in beiden Striatumanteilen (rostrales vs. mediales Striatum) und beiden Hirnhälften (nicht-behandelte und behandelte Seite) festzustellen (one-way ANOVA, siehe Tabelle 2). Aufgrund der Normalverteilung der Daten innerhalb der Versuchstiergruppen war eine Zusammenfassung der Werte für das rostrale und mediale Striatum jeder Hirnhälfte auch vor dem Hintergrund statistischer Voraussetzungen möglich (siehe auch Material & Methoden, S.30-31) (siehe Tabelle 2).

Substanz	STN-scheinstimuliert (STN-Schein-HFS)	STN-HFS
Dopamin	$F_{3,29} = 1.52; p = 0.23$	$F_{3,33} = 2,09; p = 0.12$
DOPAC	$F_{3,29} = 1.22; p = 0.32$	$F_{3,33} = 2,30; p = 0.10$
HVA	$F_{3,29} = 0.02; p = 0.99$	$F_{3,33} = 0,15; p = 0.93$

Tabelle 2: Darstellung der F- und *p*-Werte nach Vergleich der behandelten und nicht-behandelten Seite des rostralen und medialen Striatums in beiden Versuchsgruppen (one-way ANOVA).

Eine Übersicht der Gehaltsbestimmungen von Dopamin (DA), DOPAC und HVA sowie über die (DOPAC+HVA)/DA-Ratio als Maß für den Dopamin *turnover* jeweils für den dorsolateralen und den ventralen Striatumanteil ist in Tabelle 3 dargestellt.

		<i>STN-Scheinstimulation (STN-Schein-HFS)</i>		<i>STN-Stimulation (STN-HFS)</i>	
	Striatumanteil	<i>nicht-behandelte Seite</i>	<i>behandelte Seite</i>	<i>nicht-behandelte Seite</i>	<i>behandelte Seite</i>
Dopamin	<i>Dorsolateral</i>	711.6 ± 36.5 } √	715.5 ± 33.5 } √	814.1 ± 37.6* } √	844.6 ± 48.0*.# } √
	<i>Ventral</i>	477.3 ± 22.2	459.6 ± 18.9	529.4 ± 36.4	512.5 ± 31.2
DOPAC	<i>Dorsolateral</i>	86.3 ± 7.1	84.8 ± 6.5	88.0 ± 6.9	91.5 ± 8.0
	<i>Ventral</i>	108.8 ± 6.0	97.5 ± 4.0	113.1 ± 12.2	109.7 ± 7.7
HVA	<i>Dorsolateral</i>	78.0 ± 12.7	78.0 ± 11.5	113.4 ± 23.3	122.8 ± 28.0
	<i>Ventral</i>	77.6 ± 15.0	73.6 ± 12.2	113.4 ± 30.1	119.2 ± 27.4
DOPAC+HVA	<i>Dorsolateral</i>	164.2 ± 16.2	162.8 ± 12.9	201.4 ± 27.6	214.3 ± 33.4
	<i>Ventral</i>	186.4 ± 18.2	171.1 ± 36.4	226.5 ± 41.1	229.0 ± 32.2
(DOPAC+HVA) DA	<i>Dorsolateral</i>	0.23 ± 0.02 } ♦	0.23 ± 0.02 } ♦	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.03
	<i>Ventral</i>	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.02	0.41 ± 0.05	0.44 ± 0.05

Tabelle 3: Gewebsgehalte von Dopamin (DA) und der dopaminergen Hauptmetabolite DOPAC und HVA (in nmol/g Protein) in den untersuchten Striatumanteilen von naiven Ratten nach chronischer STN-HFS.

In beiden untersuchten Kerngebieten des Striatums führte die chronische STN-HFS zu einem erhöhten Gewebsgehalt von Dopamin in beiden Hirnhälften (nicht-behandelt und behandelt) im Vergleich zu den scheinstimulierten Kontrollen. Dieser Unterschied war im dorsolateralen Striatum abhängig vom Faktor „Stimulationsmodus“ (unabhängig vom Faktor „Stimulationsseite“) statistisch signifikant (two-way ANOVA und *post-hoc t*-Test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$) (*). Im Vergleich nur der behandelten Seiten beider Versuchsgruppen (STN-HFS und STN-Schein-HFS) zeigte sich ebenfalls eine signifikant höhere DA-Konzentration bei den HFS-Tieren (two-way ANOVA und *post-hoc t*-Test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$) (#). Auffallend war zudem ein signifikanter Unterschied ($F_{7,66}=20.49$, $p < 0.05$; one-way ANOVA und *post-hoc t*-Test nach Student-Newman-Keuls) des absoluten Dopamingehalts zwischen dorsolateralem und ventralem Striatum (√).

Die Gewebsgehalte der dopaminergen Hauptmetabolite DOPAC und HVA beider Striatumanteile und Hirnhälften (nicht-behandelt vs. behandelt) waren innerhalb der Kontrollgruppe und der Gruppe der stimulierten Tiere von vergleichbarer Dimension. Insbesondere fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Ratio Hauptmetabolite zu Dopamin ([DOPAC + HVA]/DA) als Maß für den DA-Umsatz war im Vergleich der Striatumanteile (dorsolateral vs. ventral) signifikant verändert (♦; $F_{7,66}=7.49$, $p < 0.05$; one-way ANOVA und *post-hoc t*-Test korrigiert für multiple Vergleiche entsprechend der Methode nach Student-Newman-Keuls).

Zusammengefasst führte die chronische STN-HFS im dorsolateralen Striatum zu einem erhöhten Gewebsgehalt von Dopamin in beiden Hirnhälften (nicht-behandelt und behandelt) im Vergleich zu den scheinstimulierten Kontrollen. Dieser Unterschied war abhängig vom Faktor „Stimulationsmodus“ statistisch signifikant, nicht jedoch vom Faktor „Stimulationsseite“ (two-way ANOVA und *post-hoc t*-test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$). Bei Betrachtung nur der behandelten Seiten beider Versuchsgruppen (Schein-HFS vs. STN-HFS) zeigte sich ebenfalls eine signifikant höhere DA-Konzentration in der Gruppe der STN-HFS-Tiere (two-way ANOVA und *post-hoc t*-test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$) (siehe Abbildung 8).

Bezüglich der dopaminergen Metabolite konnten keine statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gefunden werden (eine Übersicht der Werte gibt Tabelle 3). Allerdings fand sich ein Trend für erhöhte Gewebskonzentrationen an HVA in der Gruppe der stimulierten Tiere, insbesondere auf der behandelten Seite. In Abbildung 9 sind die Veränderungen der Metabolite im dorsolateralen Striatum graphisch dargestellt, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit die Werte für DOPAC und HVA zusammengefasst wurden.

Unter Berücksichtigung dieser Zusammenfassung wurden die Quotienten (Ratios) der dopaminergen Hauptmetabolite (DOPAC+HVA) zu Dopamin (DA) gebildet. Dabei fand sich eine leichte Erhöhung des (DOPAC+HVA)/DA-Quotienten in beiden Hirnhälften der chronisch STN-stimulierten Tiere. Diese Unterschiede waren nicht signifikant (siehe Tabelle 3 und Abbildung 10).

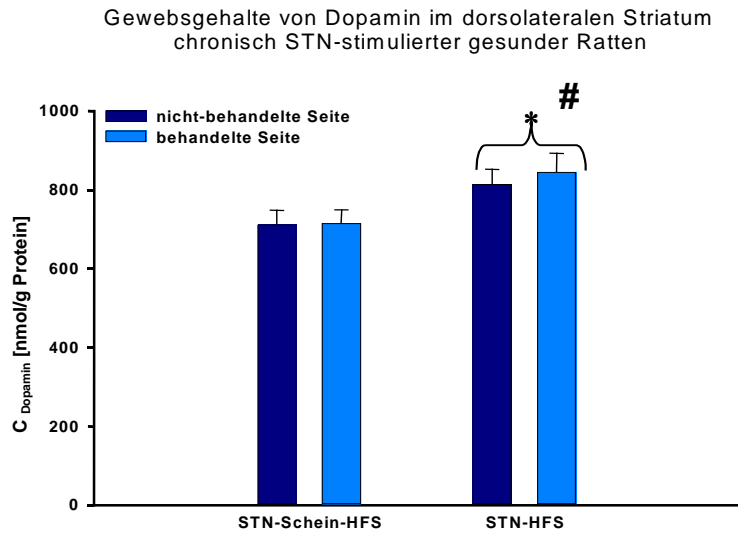


Abbildung 8

Summen-Gewebsgehalte von DOPAC und HVA im dorsolateralen Striatum chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

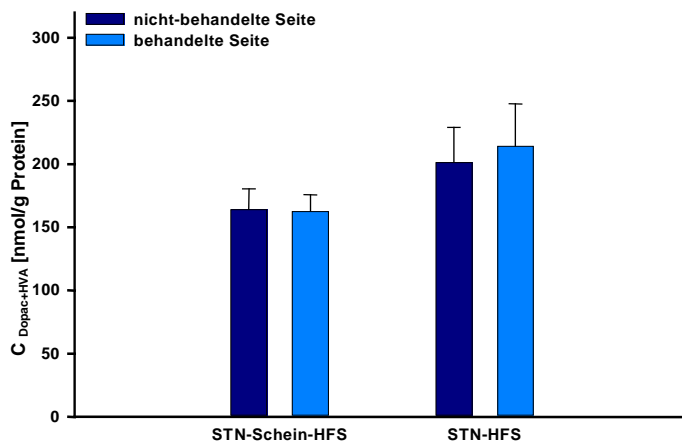


Abbildung 9

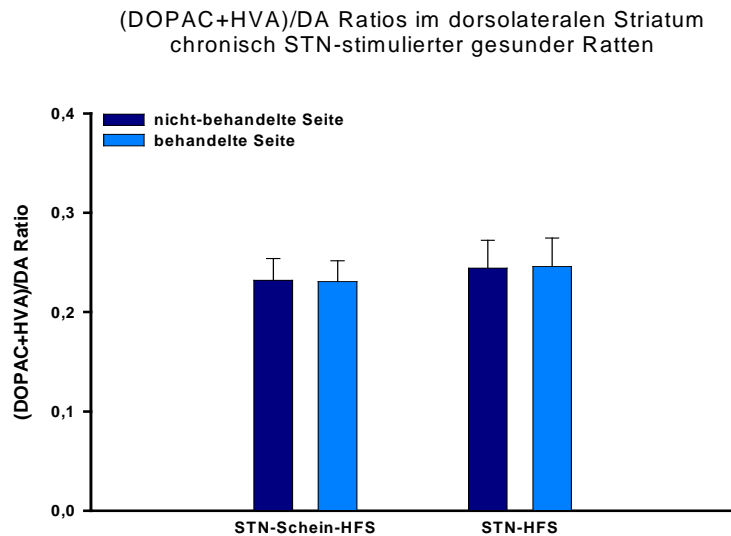


Abbildung10

Abb. 8-10: Graphische Darstellung der Gewebsgehalte von Dopamin und seinen Hauptmetaboliten DOPAC und HVA, sowie der Ratio (DOPAC+HVA)/DA im dorsolateralen Striatum bei scheinstimulierten Tieren und Tieren unter STN-HFS. (§ = signifikanter Unterschied des DA-Gewebsgehaltes auf der behandelten Seite der HFS-Tiere gegenüber der behandelten Seite in der Gruppe der STN-Schein-HFS Tiere (two-way ANOVA und post-hoc *t*-test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$); √ = signifikanter Unterschied des DA-Gewebsgehaltes in beiden Hirnhälften in der Gruppe der STN-HFS Tiere gegenüber den scheinstimulierten Kontrollen (two-way ANOVA und post-hoc *t*-test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$)).

3.3.2 Ventrales Striatum

Die chronische STN-HFS führte im ventralen Striatum ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der Gewebskonzentrationen von Dopamin in beiden Hirnhälften (siehe Tabelle 3 und Abbildung 11). Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (two-way ANOVA) und beschreiben daher lediglich einen Trend.

Auch im Hinblick auf die dopaminergen Metabolite konnten keine statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen unter Berücksichtigung der Faktoren „Stimulationsmodus“ und „Stimulationsseite“ gefunden werden (two-way ANOVA, siehe Tabelle 3). Interessanterweise waren die Gewebsgehalte an HVA für beide Kerngebiete (dorsolateral und ventral) im Hinblick auf die Faktoren „Stimulationsmodus“ und „Stimulationsseite“ von vergleichbarer Dimension, wohingegen die Gewebsgehalte von DOPAC in beiden Versuchsgruppen im Trend deutlich höher lagen im Vergleich zum dorsolateralen Striatum (Tabelle 3). In Abbildung 12 sind die Veränderungen der Metabolite (zusammengefasst als Summe aus DOPAC und HVA) im ventralen Striatum noch einmal graphisch dargestellt.

Unter Berücksichtigung dieser Zusammenfassung wurden auch für das ventrale Striatum die Ratios der dopaminergen Hauptmetabolite (DOPAC+HVA) zu Dopamin (DA) gebildet. Dabei fanden sich zwar keine signifikanten Unterschiede des (DOPAC+HVA)/DA-Quotienten zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abbildung 13), jedoch deutlich signifikante Unterschiede

zwischen den beiden untersuchten striatalen Kerngebieten (dorsolateral vs. ventral) (s. Tabelle 3 und Abbildung 14).

Gewebsgehalte von Dopamin im ventralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

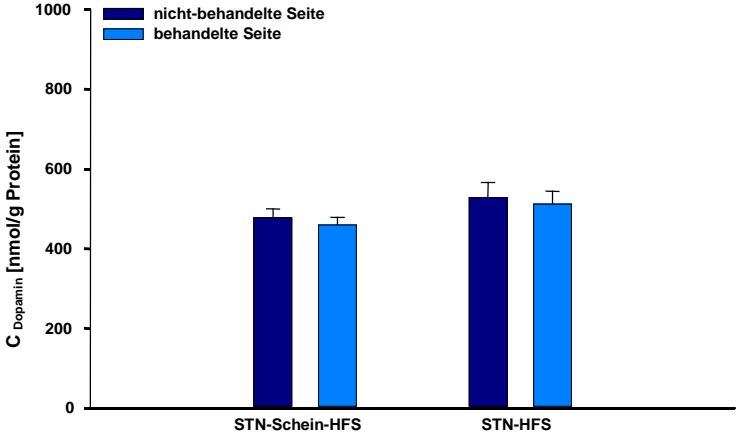


Abbildung 11

Summen-Gewebsgehalte von DOPAC und HVA im ventralen
Striatum chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

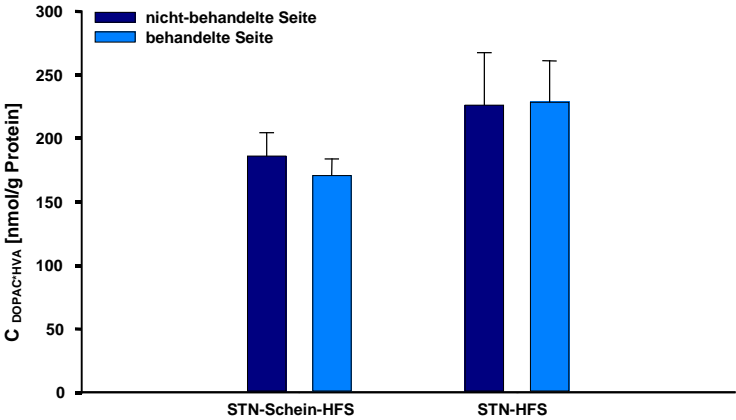


Abbildung 12

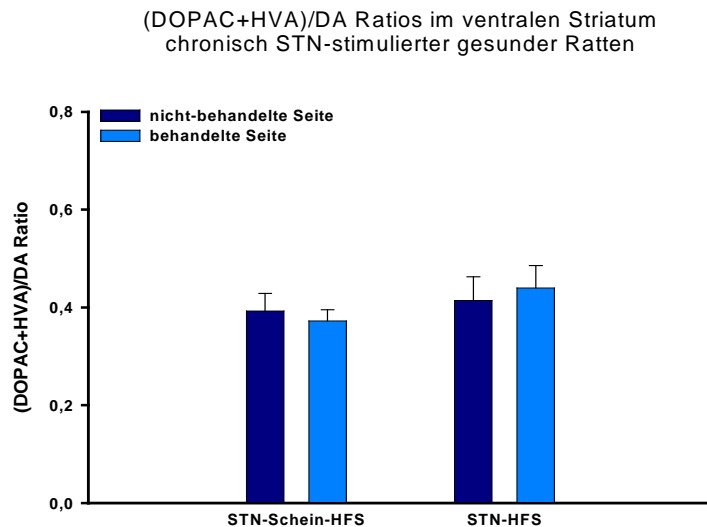


Abbildung 13

Abb. 11-13: Graphische Darstellung der Gewebsgehalte von Dopamin und seinen Hauptmetaboliten DOPAC und HVA, sowie der Ratio (DOPAC+HVA)/DA im ventralen Striatum bei scheinstimulierten Tieren und Tieren unter STN-HFS ($p < 0.05$).

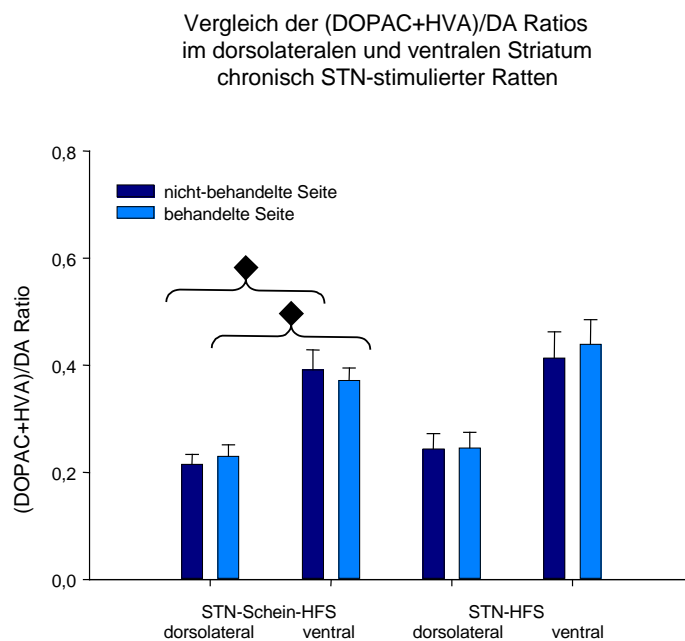


Abbildung 14

Abb. 14: Graphische Darstellung der Ratios aus (DOPAC+HVA)/DA im dorsolateralen und ventralen Striatum bei scheinstimulierten Tieren und Tieren unter STN-HFS. Markiert sind die signifikanten Unterschiede der Ratios zwischen den unterschiedlichen Striatumanteilen (dorsolateral und ventral) unabhängig von der untersuchten Seite in der Gruppe der Scheinstimulierten Tiere (\blacklozenge). Auch in der Gruppe der Tiere unter STN-HFS war die Ratio im ventralen Striatum deutlich höher als im dorsolateralen, jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($p < 0.05$).

3.3 Neurochemischen Analyse von Serotonin (5-HT) und HIAA

3.3.1 Dorsolaterales Striatum

In beiden Versuchstiergruppen (Schein-HFS und STN-HFS) waren keine statistisch signifikanten Unterschiede der Gewebsgehalte von Serotonin und dem Hauptmetaboliten (HIAA) in beiden

Striatumanteilen (rostrales vs. mediales Striatum) und beiden Hirnhälften (nicht-behandelte und behandelte Seite) festzustellen (one-way ANOVA, siehe Tabelle 4).

Aufgrund der Normalverteilung der Daten innerhalb der Versuchstiergruppen war eine Zusammenfassung der Werte für das rostrale und mediale Striatum jeder Hirnhälfte auch vor dem Hintergrund statistischer Voraussetzungen möglich (siehe auch Material & Methoden, S. 30-31).

Substanz	STN-scheinstimuliert (STN-Schein-HFS)	STN-HFS
Serotonin (5-HT)	$F_{3,23} = 0.04; p = 0.98$	$F_{3,31} = 0.24; p = 0.87$
HIAA	$F_{3,28} = 0.20; p = 0.90$	$F_{3,30} = 0,10; p = 0.96$

Tabelle 4: Darstellung der F- und p-Werte nach Vergleich der behandelten und nicht-behandelten Seite des rostralen und medialen Striatums in beiden Versuchsgruppen (one-way ANOVA).

Eine Übersicht der Gehaltsmessungen von Serotonin und dem Hauptmetaboliten HIAA sowie dessen Ratio als Maß für den Serotonin *turnover* gibt Tabelle 5.

	Kerngebiet	STN-Scheinstimulation (STN-Schein-HFS)		STN-Stimulation (STN-HFS)	
		nicht-behandelte Seite	behandelte Seite	nicht-behandelte Seite	behandelte Seite
5-HT	<i>dorsolaterales</i>	9.34 ± 1.15	9.06 ± 0.96	11.01 ± 1.25	10.22 ± 1.06
	<i>ventrales</i>	17.12 ± 2.47	18.14 ± 2.42	21.15 ± 5.52	16.09 ± 1.86
HIAA	<i>dorsolaterales</i>	15.00 ± 3.31	14.81 ± 3.36	15.42 ± 2.50	16.31 ± 2.65
	<i>ventrales</i>	26.07 ± 5.42	23.77 ± 5.41	21.74 ± 4.69	20.51 ± 3.66
HIAA/5-HT	<i>dorsolaterales</i>	1.55 ± 0.25	1.58 ± 0.26	1.37 ± 0.18	1.51 ± 0.14
	<i>ventrales</i>	1.48 ± 0.25	1.20 ± 0.16	1.09 ± 0.12	1.25 ± 0.13

Tabelle 5: Gewebsgehalte von Serotonin (5-HT) und dessen Hauptmetabolit HIAA (in nmol/g Protein) in den untersuchten Striatumanteilen (dorsolateral und ventral) von naiven Ratten nach chronischer STN-HFS.

In beiden untersuchten Kerngebieten des Striatums führte die chronische STN-HFS zu keiner signifikanten Änderung des Gewebsgehalt von Serotonin in beiden Hirnhälften (nicht-behandelt und behandelt) im Vergleich zu den scheinstimulierten Kontrollen. Im Vergleich der beiden Kerngebiete (dorsolateral und ventral) lag der Gewebsgehalt für 5-HT im ventralen Striatum für beide Gruppen und unabhängig von der untersuchten Seite über dem im dorsolateralen Striatum. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Die Gewebsgehalte von HIAA zeigten im Vergleich der Versuchsgruppen (Schein-HFS und STN-HFS) im dorsolateralen Striatum keine Unterschiede, unabhängig von der untersuchten Seite (behandelt vs. nicht-behandelt). Im ventralen Striatum war dagegen auf beiden untersuchten Seiten ein verminderter Gewebsgehalt an HIAA in der Gruppe der stimulierten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen, jedoch nicht statistisch signifikant. Insgesamt war der Gehalt an HIAA im ventralen Striatum höher als im dorsolateralen Striatum.

Die Werte der Ratios (HIAA/5-HT) waren im ventralen Striatum unterhalb derer des dorsolateralen Striatums und im Trend in der Gruppe der stimulierten Tiere bihemisphäriell in beiden Kerngebieten geringer im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe.

Zusammengefasst führte die chronische STN-HFS im dorsolateralen Striatum zu keiner Veränderung des Gewebsgehalts von Serotonin in beiden Hirnhälften (nicht-behandelt vs. behandelt) im Vergleich zu den scheinstimulierten Kontrollen. Die Gehalte waren in beiden

Versuchsgruppen und unabhängig von der untersuchten Seite von vergleichbarer Dimension (siehe Tabelle 5).

Auch die Gewebsgehalte des 5-HT-Hauptmetaboliten HIAA wurden durch die chronische STN-Stimulation nicht verändert.

Entsprechend diesen Ergebnissen zeigten auch die Ratios des Hauptmetaboliten (HIAA) zu Serotonin (5-HT), die als Maß für den Serotonin *turnover* gelten, keine Unterschiede im Vergleich der Versuchsgruppen und der untersuchten Seiten (siehe Tabelle 5).

3.3.2 Ventrales Striatum

Die chronische STN-HFS führte im ventralen Striatum ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Gewebsgehalte von 5-HT im Vergleich zu den scheinstimulierten Kontrolltieren. Auffallend war jedoch ein mit 16.09 ± 1.86 nmol/g Protein auf der zur HFS ipsilateralen Seite deutlich geringerer Gewebsgehalt von Serotonin als auf der kontralateralen Seite (21.15 ± 5.52 nmol/g Protein) (siehe Tabelle 5 und Abbildung 15).

Die chronische STN-Stimulation führte bei den stimulierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Abnahme der Gewebskonzentration des 5-HT-Hauptmetaboliten HIAA unabhängig von der untersuchten Seite. Die Unterschiede zu den analogen Striatumseiten der scheinstimulierten Kontrolltiere waren jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 5 und Abbildung 16).

Daraus resultiert eine unter chronischer Stimulation geringe Abnahme der HIAA/5-HT-Ratio in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe, welche jedoch nicht signifikant war (siehe Tabelle 5 und Abbildung 17).

Im Vergleich der Kerngebiete (dorsolateral vs. ventral) waren die Gehalte an 5-HT und HIAA im ventralen Striatum deutlich höher als im dorsolateralen Striatum unabhängig von der Versuchsgruppe und der untersuchten Seite (siehe Tabelle 5). Daraus resultiert, dass die HIAA/5-HT-Ratio im ventralen Striatum unabhängig von der Versuchsgruppe und der untersuchten Seite geringer war als im dorsolateralen Striatum, jedoch ohne Signifikanz (siehe Tabelle 5).

Gewebsgehalte von 5-HT im ventralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

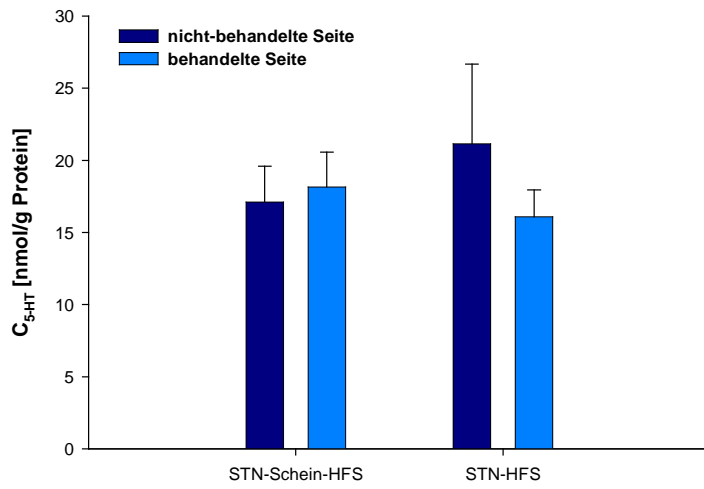


Abbildung 15

Gewebsgehalte von HIAA im ventralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

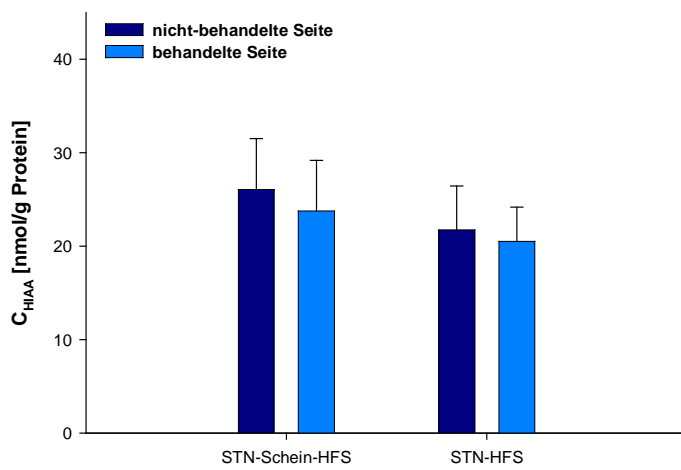


Abbildung 16

HIAA/5-HT Ratios im ventralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

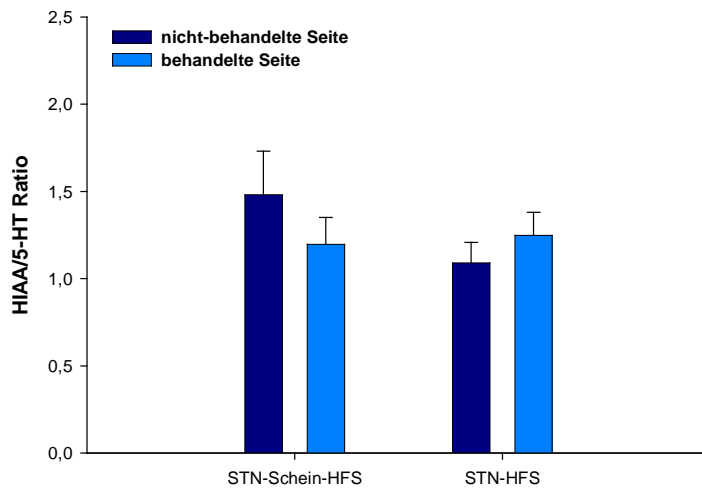


Abbildung 17

Abb. 15-17: Graphische Darstellung der Gewebsgehalte von Serotonin und seinem Hauptmetaboliten HIAA, sowie der Ratio HIAA/5-HT im ventralen Striatum bei scheinstimulierten Tieren und Tieren unter STN-HFS ($p < 0.05$).

3.4 Neurochemischen Analyse der Aminosäuren Glutamat und GABA

3.4.1 Dorsolaterales Striatum

In beiden Versuchstiergruppen (Schein-HFS und STN-HFS) waren keine statistisch signifikanten Unterschiede der Gewebsgehalte von Glutamat und GABA in beiden Striatumanteilen (rostrales vs. mediales Striatum) und beiden Hirnhälften (nicht-behandelte und behandelte Seite) festzustellen (one-way ANOVA, siehe Tabelle 6). Aufgrund der Normalverteilung der Daten innerhalb der Versuchstiergruppen war eine Zusammenfassung der Werte für das rostrale und mediale Striatum jeder Hirnhälfte auch vor dem Hintergrund statistischer Voraussetzungen möglich (siehe auch Material & Methoden, S. 30-31).

Substanz	STN-scheinstimuliert (STN-Schein-HFS)	STN-HFS
Glutamat	$F_{3,29} = 2.52$; $p = 0.08$	$F_{3,31} = 0.22$; $p = 0.88$
GABA	$F_{3,29} = 1.38$; $p = 0.27$	$F_{3,31} = 0,04$; $p = 0.99$

Tabelle 6: Darstellung der F- und p -Werte nach Vergleich der behandelten und nicht-behandelten Seite des rostralen und medialen Striatums in beiden Versuchsgruppen (one-way ANOVA).

Eine Übersicht der Gehaltsmessungen von Glutamat und GABA in den untersuchten Kerngebieten des Striatums gibt Tabelle 7. Die signifikanten Unterschiede der Neurotransmitter zwischen den Kerngebieten (dorsolateral vs. ventral) und zwischen den Versuchsgruppen (STN-HFS und STN-Schein-HFS) sind symbolisch hervorgehoben (\checkmark , *).

		<i>STN-Scheinstimulation (STN-Schein-HFS)</i>		<i>STN-Stimulation (STN-HFS)</i>	
	Kerngebiet	<i>nicht-behandelte Seite</i>	<i>behandelte Seite</i>	<i>nicht-behandelte Seite</i>	<i>behandelte Seite</i>
Glutamat	<i>Dorsolaterales</i>	76.58 ± 2.15	76.71 ± 3.45	88.58 ± 5.86	82.29 ± 6.84
	<i>ventrales</i>	75.75 ± 3.43	71.51 ± 2.83	87.52 ± 5.72 *	81.59 ± 6.19 *
GABA	<i>dorsolaterales</i>	10.61 ± 0.69	11.20 ± 0.68	11.85 ± 1.31 }v	11.41 ± 1.27 }v
	<i>ventrales</i>	16.84 ± 1.36	16.07 ± 1.53	18.51 ± 2.30 }v	17.58 ± 2.06 }v

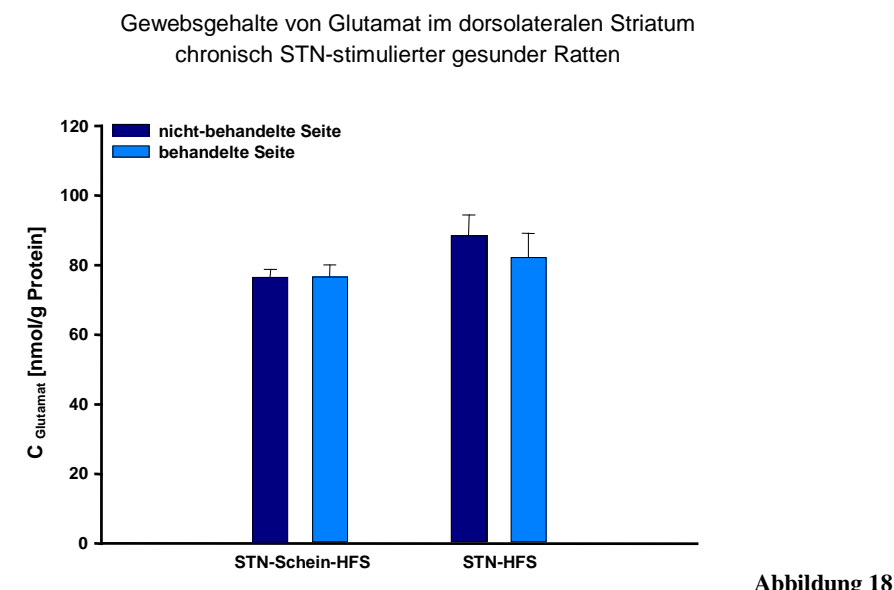
Tabelle 7: Gewebsgehalte von Glutamat und GABA (in nmol/mg Protein) in den untersuchten Striatumanteilen (dorsolateral und ventral) von naiven Ratten nach chronischer STN-HFS.

Die Gewebsgehalte von Glutamat beider Striatumanteile (dorsolateral und ventral) und Striatumseiten (nicht-behandelt und behandelt) waren jeweils für die Kontrollgruppe und die Gruppe der stimulierten Tiere von vergleichbarer Dimension. Allerdings führte die chronische STN-HFS bihemisphäriell zu einer Erhöhung der striatalen Gewebslevel von Glutamat, die im ventralen Striatum gegenüber der scheinstimulierten Kontrolle sogar signifikant war (two-way ANOVA und *post-hoc t*-Test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$) (*).

Die Gewebsgehalte von GABA waren bezogen auf die Striatumseiten (nicht-behandelt und behandelt) innerhalb der beiden Versuchstiergruppen von vergleichbarer Dimension. Im Vergleich der Kerngebiete des Striatums (dorsolateral vs. ventral) fanden sich pro Gruppe und Striatumseite jedoch tendenzielle bzw. signifikant höhere Gewebsgehalte für das ventrale Striatum (v; $F_{7,64} = 4.66$, $p < 0.05$; one-way ANOVA und *post-hoc t*-Test nach Student-Newman-Keuls). Die Unterschiede zwischen den Gruppen (scheinstimuliert vs. STN-HFS) waren aber nicht signifikant.

Zusammengefasst führte die chronische STN-HFS im dorsolateralen Striatum zu einem im Trend deutlich erhöhten Gewebsgehalt von Glutamat in beiden Hirnhälften (nicht-behandelt und behandelt) im Vergleich zu den scheinstimulierten Kontrollen; diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (two-way ANOVA, siehe auch Tabelle 7 und Abbildung 18).

Im Gegensatz dazu hatte die chronische STN-HFS keinen Einfluss auf die Gewebskonzentration der Aminosäure GABA; die Gewebsgehalte zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe waren unabhängig von der untersuchten Seite (behandelt vs. nicht-behandelt) von vergleichbarer Dimension (two-way ANOVA, siehe Tabelle 7 und Abbildung 19).



Gewebsgehalte von GABA im dorsolateralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

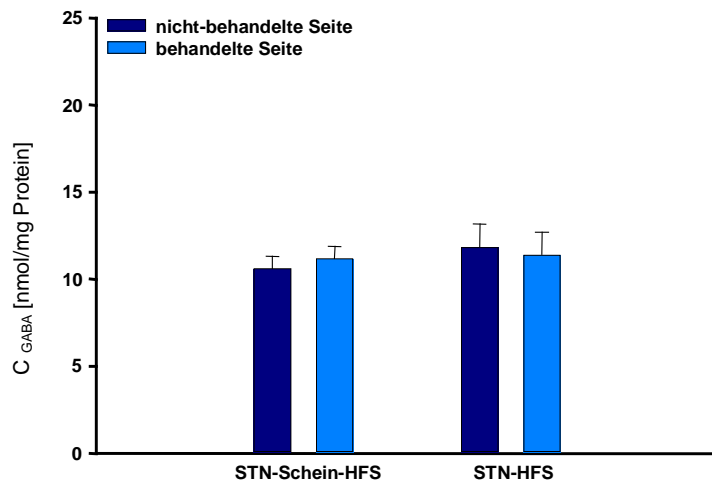


Abbildung 19

Abb. 18-19: Graphische Darstellung der Gewebsgehalte von Glutamat und GABA im dorsolateralen Striatum bei scheinstimulierten Tieren und Tieren unter STN-HFS ($p < 0.05$).

3.4.2 Ventrales Striatum

In Analogie zu den Verhältnissen im dorsolateralen Striatum führte die chronische STN-HFS auch im ventralen Striatum zu einer deutlichen bihemisphäriellen Erhöhung der Gewebskonzentration von Glutamat. Diese Unterschiede waren gegenüber der Kontrollgruppe abhängig vom Faktor „Stimulationsmodus“ statistisch signifikant (two-way ANOVA) (siehe Tabelle 7 und Abbildung 20).

Wie im dorsolateralen Striatum war die Gewebskonzentration der Aminosäure GABA auch im ventralen Striatum durch die STN-HFS unverändert, so dass die Gewebsgehalte in der Kontroll- und der Behandlungsgruppe annähernd gleich groß waren (two-way ANOVA) (Tabelle 7 und Abbildung 21).

Gewebsgehalte von Glutamat im ventralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

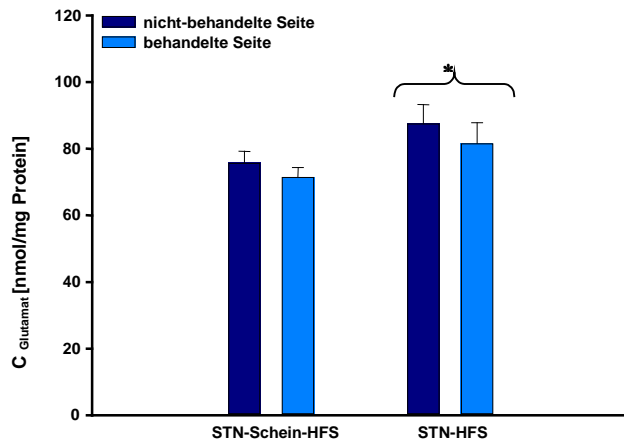


Abbildung 20

Gewebsgehalte von GABA im ventralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

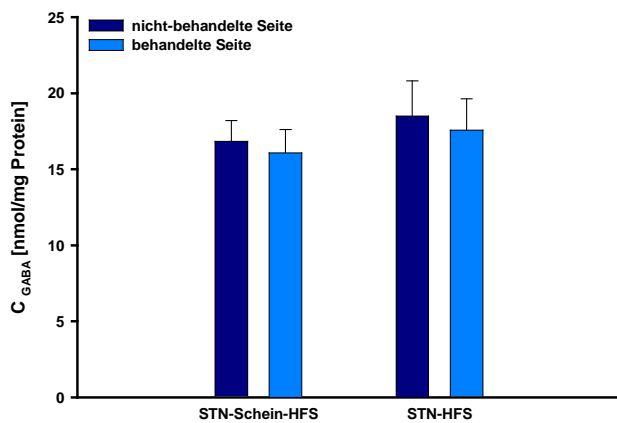


Abbildung 21

Abb. 20-21: Graphische Darstellung der Gewebsgehalte von Glutamat und GABA im ventralen Striatum bei scheinstimulierten Tieren und Tieren unter STN-HFS. (* = signifikanter Unterschied des Glutamat-Gewebsgehaltes in beiden Hirnhälften in der Gruppe der STN-HFS Tiere gegenüber den scheinstimulierten Kontrollen (two-way ANOVA und post-hoc *t*-test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$)).

Im Vergleich der Kerngebiete (dorsolaterales vs. ventrales Striatum) waren die Gewebsgehalte an GABA in der Gruppe der scheinstimulierten Tiere bihemisphärisch ventral tendenziell höher als dorsolateral und in der Gruppe der stimulierten Tiere sogar signifikant höher gegenüber dem dorsolateralen Striatum ($F_{7,64} = 4.66$, $p < 0.05$; one-way ANOVA und *post-hoc t*-Test nach Student-Newman-Keuls) (siehe Tabelle 7 und Abbildung 22).

Gewebsgehalte von GABA im dorsolateralen und ventralen Striatum
chronisch STN-stimulierter gesunder Ratten

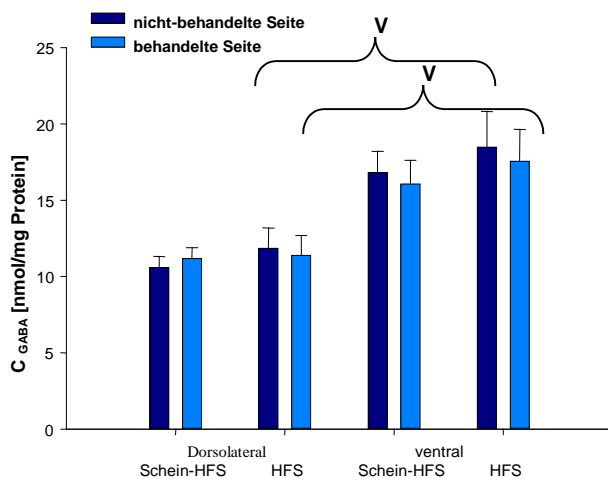


Abbildung 22

Abb. 22: Graphische Darstellung der Gewebsgehalte von GABA im dorsolateralen und ventralen Striatum bei scheinstimulierten Tieren und Tieren unter STN-HFS (V = signifikanter Unterschied des GABA-Gewebsgehaltes im ventralen Striatum gegenüber dem dorsolateralen Striatum in beiden Hirnhälften nach chronischer STN-HFS (one-way ANOVA und post-hoc *t*-test nach Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$)).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der chronischen STN-HFS auf die striatalen Gewebsgehalte von DA und Serotonin (einschließlich ihrer Metabolite) sowie der Aminosäuren Glutamat und GABA in gesunden männlichen Wistar-Ratten untersucht. Dazu wurden in definierten Hirnscheiben Gewebszylinder aus dem dorsolateralen und ventralen Striatum entnommen und die gewonnenen Gewebshomogenate einer neurochemischen Analyse mittels HPLC unterzogen. Die Applikation der Stimulation wurde mit einem speziellen, weltweit erstmals eingesetzten voll implantierbaren Mikrostimulationssystem für Ratten durchgeführt.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Studie konnte eine bihemisphärielle Erhöhung der Gewebskonzentration von DA im dorsolateralen und ventralen Striatum im Vergleich zu den scheinstimulierten Kontrolltieren festgestellt werden, die für den dorsolateralen Striatumanteil signifikant war. Darüber hinaus fand sich nach STN-HFS in beiden Striatumanteilen und bihemisphärisch eine tendenzielle Erhöhung der Gewebskonzentration der dopaminergen Hauptmetabolite DOPAC und HVA.

Die Gewebskonzentration von Serotonin wurde durch die chronische STN-HFS im dorsolateralen Striatum nicht beeinflusst, im ventralen Striatum zeigte sich eine leichte Reduktion der Gewebekonzentration insbesondere im zur Stimulation ipsilateralen Nucl. accumbens. Die Gewebekonzentration des Serotonin-Metaboliten HIAA wurde im ventralen Striatum durch die chronische STN-HFS verringert, der Gewebespiegel in der Gruppe der stimulierten Tiere war ca. 16% geringer als in der Gruppe der nicht behandelten Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu ließen sich keine Unterschiede der Gewebskonzentrationen von HIAA für das dorsolaterale Striatum feststellen.

Die chronische STN-HFS führte sowohl im dorsolateralen als auch im ventralen Striatum zu einer bihemisphäriellen Erhöhung der Glutamat-Gewebskonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe und war im ventralen Striatum sogar signifikant erhöht. Die striatalen Gewebskonzentrationen von GABA wurden durch die STN-HFS nicht verändert.

Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse eine Einflussnahme der chronischen STN-Stimulation auf den striatalen Transmitterhaushalt, wobei die Änderung der Gewebskonzentrationen als Ausdruck einer veränderten Neurotransmission angesehen werden kann. Diese beinhaltet verschiedene Mechanismen wie Transmitterfreisetzung und –wiederaufnahme sowie Metabolismus und Neusynthese der Transmitter. Aufgrund des gewählten experimentellen Ansatzes ist eine genaue Differenzierung im Hinblick auf die o.g.

Mechanismen der Neurotransmission nicht möglich. Dennoch lassen sich indirekt Rückschlüsse auf mögliche Wirkmechanismen ableiten, die nachfolgend kritisch diskutiert werden sollen.

4.1 Gesteigerte dopaminerge Transmission nach chronischer STN-HFS

Die nach chronischer HFS des STN bihemisphäriell gesteigerten Gesamtkonzentrationen von DA und seinen Hauptmetaboliten DOPAC und HVA in striatalem Gewebe sind ein Indiz dafür, dass es unter längerfristiger Stimulation zu einer gesteigerten striatalen bilateralen dopaminergen Transmission kommt. Diese Beobachtungen sind prinzipiell in Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorhergehender Studien in naiven Ratten, die nach akuter STN-HFS ebenfalls einen Anstieg der Dopamin-Konzentration (bzw. der dopaminergen Metabolite) nachweisen konnten ^{30;98;110;121;165}.

Allerdings ist eine direkte Vergleichbarkeit zwischen dieser und den genannten Studien aufgrund der Unterschiede im methodischen Untersuchungsansatz nicht ohne weiteres möglich. Der Großteil der bisherigen Befunde beruht auf Mikrodialyseuntersuchungen ^{30;110;121;165} bzw. der voltammetrischen Messung der Veränderungen der extrazellulären striatalen Stoffkonzentrationen ⁹⁸. In der vorliegenden Studie wurde eine Gehaltsbestimmung in striatalen Gewebshomogenaten, bestehend aus Extrazellularflüssigkeit, Glia- und Nervenzellen, durchgeführt. Eine differenzierte Beurteilung der dopaminergen Transmission in den einzelnen Kompartimenten (intra- und extrazellulär sowie neuronal und glial) ist somit aufgrund des gewählten experimentellen Ansatzes nicht möglich.

Die erhöhten striatalen Gewebskonzentrationen von Dopamin und seinen Hauptmetaboliten DOPAC und HVA nach STN-HFS sind hypothetisch durch folgende, teilweise komplementäre Mechanismen erklärbar: 1. gesteigerte Aktionspotential-vermittelte DA-Freisetzung aus Speichervesikeln dopaminerger Neurone via Exozytose, 2a) Steigerung der DA-Neusynthese über eine Aktivitätserhöhung der TH, des Schrittmacherenzym der Dopamin-Synthese und 2b) damit einhergehender Zunahme des Dopamin-Abbaus (i.S.e. gesteigerten Umsatzes), 3. Neusynthese von TH-Zellen.

4.1.1 Extraneuronaler Pool und gesteigerte Aktionspotenzial-vermittelte DA-Freisetzung

Der extraneuronale Pool beinhaltet neben der Extrazellulärflüssigkeit (insbesondere dem synaptischen Spalt) auch das Neuropil und die Gliazellen. Würden die Konzentrationsunterschiede von Dopamin in den Gehaltsmessungen nach STN-HFS auf Änderungen im extraneuronalen Pool zurückzuführen sein, so wäre dies nur mit einer vermehrten Freisetzung von DA in den synaptischen Spalt, bzw. eine nachfolgende Diffusion in

den Extrazellulärraum erklärbar. Es wird zwar von einigen Autoren angenommen, dass auch Gliazellen in der Lage sind, DA aufzunehmen und zu metabolisieren, jedoch sind die Mengen so gering, dass sie in der Gesamtheit des extraneuronalen Pools vermutlich zu vernachlässigen sind⁸⁷.

Interessanterweise konnte in einer Mikrodialysestudie mit pharmakologischer Manipulation der dopaminergen Synapse mittels Applikation eines DA-Reuptake-Inhibitors (Nomifensin) ein Anstieg der extrazellulären striatalen DA-Konzentration nach STN-HFS nachgewiesen werden¹¹⁰. Da Nomifensin neben dem Reuptake von DA auch die Transporter-vermittelte (also Exozytose-unabhängige) DA-Freisetzung blockiert, wurde postuliert, dass der DA-Anstieg auf eine vermehrte Freisetzung aus Speichervesikeln via Exozytose zurückzuführen sei. Grundsätzlich sollte eine vermehrte DA-Freisetzung via Exozytose an eine Erhöhung der Aktivität dopaminergener Neurone der SNc gebunden sein⁸². Demzufolge müsste die STN-HFS zu einer gesteigerten Aktivität der nigralen Neurone führen, was in einigen elektrophysiologischen Studien mittels intra- und extrazellulären Ableitungen der Zellaktivität von SNc-Zellen unter akuter STN-HFS interessanterweise auch gezeigt werden konnte^{13;99;111;149}.

Eine durch STN-HFS induzierte Aktivitätssteigerung nigraler Zellen wäre dann durch folgende drei Mechanismen/ Hypothesen vorstellbar:

1. Geht man von einer inhibitorischen Wirkung der Stimulation auf die Zellen des STN aus (Inhibitionshypothese), so könnte der Anstieg der striatalen DA-Konzentration durch eine Disinhibition nigraler Zellen über die Relaisstation STN→SNr→SNc bedingt sein. Durch die Inhibition der STN-Zellen würde sich die glutamaterge Stimulation der Zellen in der SNr und damit die SNr-Zellaktivität verringern. Die Folge wäre ein reduzierter GABA-erger Output zur SNc, wodurch es zur Disinhibition dopaminergener Zellen mit gesteigerter Aktivität und damit zu einer vermehrten striatalen Freisetzung von DA kommen könnte. Dieser Mechanismus erscheint plausibel vor dem Hintergrund einer massiven inhibitorischen Kontrolle von SNc-Neuronen durch GABA-erge Axonkollaterale aus der SNr⁶⁵. Die Aktivität dieser Neurone ist nach akuter STN-HFS (ähnlich wie die Aktivität von STN- und GPi-Neuronen) reduziert^{12;16;22;111;149}.

Die Inhibition von STN-Zellen durch die HFS wird auch von mehreren Untersuchungsgruppen als Erklärungsansatz für eine unter STN-HFS beobachtete Neuroprotektion dopaminergener Zellen in der SNc herangezogen. *Maesawa et al.* konnten im 6-OHDA-Modell der Ratte nach 14-tägiger Stimulation des STN mittels eines externalisierten Gerätes eine höhere dopaminerge Zelldichte in der SNc feststellen als in der Gruppe der Kontrolltiere, welche keine Stimulation erhalten hatten¹⁰⁴. Auch im MPTP-Modell des nicht-menschlichen Primaten wurde nach STN-HFS eine höhere Anzahl dopaminergener Zellen in der SNc nachgewiesen als bei Tieren, die keiner

Stimulation ausgesetzt waren²⁸. Die Autoren nehmen an, dass die Stimulation zu einer Inhibition der STN-Zellen führt, wodurch der subthalamische glutamaterge Input zur SNc reduziert wird und sich somit die exzitatorisch toxische Wirkung des Glutamats auf die Zellen der SNc verringert, was ein Überleben der Zellen zur Folge hat.

2. Der Hypothese einer inhibitorischen Wirkung nach STN-HFS stehen die Ergebnisse anderer Studien gegenüber, die einen stimulationsbedingten exzitatorischen Effekt auf die STN-Zellen postulieren. In einer elektrophysiologischen in-vitro Studie an Hirnscheiben gesunder Ratten konnten *Lee et al. (2004)* zeigen, dass die STN-HFS exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) generiert und die Aktionspotential-Frequenz in den Zellen des STN erhöht⁹⁹. Übereinstimmend dazu konnten *Hashimoto et al. (2003)* in einer in-vivo Studie im MPTP-Modell des Primaten eine Erregung subthalamofugaler Fasern und eine Zunahme der mittleren Entladungsrate in STN-Zielstrukturen (GPi und GPe) unter STN-HFS feststellen⁶⁹. Korrespondierend zu diesen Beobachtungen erbrachte eine neurochemische Untersuchung in gesunden Ratten den Nachweis erhöhter Glutamat-Konzentrationen in SNr und GPi, zwei Zielstrukturen des STN¹⁶⁴. Zusätzlich konnte eine erhöhte GABA-Konzentration in der SNr gemessen werden¹⁶⁴. Eine Zunahme der Aktivität nigraler dopaminerger Zellen als Voraussetzung einer gesteigerten DA-Freisetzung im Striatum ließe sich in diesem Kontext über einen polysynaptischen Weg und die kombinierte Wirkung von Glutamat und GABA auf SNr-Zellen erklären. Die exzitatorische Wirkung der Stimulation würde zu einem erhöhten Glutamat-Input in die SNr und den GPi führen. Die durch das Glutamat aktivierten Zellen des GPi könnten über ihre direkte Verbindung zur SNr eine GABA-erg vermittelte Inhibition auf SNr-Zellen ausüben. Der GABA-erge Einfluss auf die SNr-Zellen überwiegt vermutlich deutlich den glutamatergen Einfluss (90% vs. 10%)¹²⁰. Außerdem konnte in ultrastrukturellen Studien gezeigt werden, dass die STN-Projektionen zur SNr an distalen Dendriten enden, wohingegen die afferenten GPi-Bahnen zur SNr vor allem Synapsen mit dem Zellsoma bilden⁶¹. Diese strategische Position ermöglicht es den pallidalen Fasern, modulierend auf die Aktivität der Zellen in der SNr einzuwirken. Der Nettoeffekt der kombinierten Wirkung von Glutamat und GABA in der SNr wäre somit inhibitorisch, wodurch es zu einer Disinhibition der Zellen in der SNc und somit zu einer gesteigerten Freisetzung von DA im Striatum kommen könnte.

Unter der Annahme einer exzitatorischen Wirkung der Stimulation auf die STN-Zellen gewinnt die direkte Verbindung zwischen STN und SNc an Bedeutung in Bezug auf eine Aktivierung nigraler dopaminerger Zellen und eine Steigerung der DA-Freisetzung. Diese exzitatorische subthalamo-nigrale Faserbahn, die durch elektrophysiologische und neuroanatomische Untersuchungen gesichert scheint^{67;126} (Übersicht bei *Joel et Weiner, 1997*⁸⁴), macht eine

Beeinflussung nigraler Neurone prinzipiell möglich und konnte auch experimentell belegt werden ^{13;37;164}. Die Signalweiterleitung erfolgt über Synapsen zwischen den Axonterminalen der STN-Neurone und Dendriten dopaminerger Zellen der SNc, die bis in die SNr hineinreichen. Die Grenobler Arbeitsgruppe konnte in einer elektrophysiologischen Studie eine erhöhte Feuerungsrate von SNc-Neuronen unter akuter STN-HFS nachweisen ¹³. In einer weiteren elektrophysiologischen Studie konnte nach pharmakologischer Stimulation des STN eine Zunahme von burst-Entladungen in SNc-Neuronen gezeigt werden ³⁷. Da diese burst-Entladungen durch die Applikation eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten unterdrückt werden konnten, wurde postuliert, dass Glutamat aus den Axonterminalen der STN-Neurone für die stimulationsbedingte Aktivitätszunahme verantwortlich war. Der Nachweis erhöhter Glutamat-Konzentrationen nach STN-HFS in der SNr, wo die axo-dendritischen Synapsen zwischen STN- und SNc-Neuronen gebildet werden, unterstützt diese Annahme ¹⁶⁴.

Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse unterstützt die Hypothese, dass eine stimulationsbedingte Erhöhung der Nervenzellaktivität in der SNc verantwortlich sein könnte für die gesteigerte striatale DA-Freisetzung.

3. Die gesteigerte Freisetzung von striatalem DA könnte darüber hinaus auch unter Einbeziehung anderer cerebraler Strukturen, die außerhalb der Basalganglien liegen, vermittelt werden. Glutamat kann die Freisetzung von DA aus striatalen Axonterminalen dopaminerger Neurone über präsynaptische NMDA-Rezeptoren modulieren und so zu einer nicht-exozytotischen DA-Freisetzung führen ^{36;107}. Der stärkste Glutamat-erge Input ins Striatum erfolgt aus dem Cortex und Thalamus ¹¹⁹. Unter Berücksichtigung des cortico-basalganglionär-thalamo-corticalen Regelkreises könnte eine Aktivitätszunahme in Zellen thalamischer Kerne und des Cortex zu einer vermehrten Ausschüttung von Glutamat und damit einer gesteigerten Freisetzung von DA im Striatum führen. *Benazzouz et al. (2000)* konnten unter STN-HFS eine Zunahme der Aktivität thalamocorticaler Projektionsneurone in der Ratte feststellen ¹². Darüber hinaus zeigten klinische Studien zur Messung des regionalen cerebralen Blutflusses (rCBF) mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Single-Photon-Emission-Computed-Tomographie (SPECT) eine Zunahme des rCBF unter STN-HFS im supplementär-motorischen, prämotorischen und anterioren cingulären Cortex ^{34;138}. Eine Zunahme des rCBF gilt bei diesen Untersuchungen als Zeichen einer gesteigerten neuronalen Aktivität. Die erhöhte striatale Gewebskonzentration von DA ließe sich also auch durch eine erhöhte Aktivität thalamischer und corticaler Zellen unter STN-HFS erklären.

Ob eine gesteigerte exozytotische (oder nicht-exozytotische) DA-Freisetzung tatsächlich ein Mechanismus ist, der zur erhöhten DA-Gewebskonzentration unter chronischer STN-HFS

beiträgt, kann aufgrund des methodischen Ansatzes dieser Arbeit nicht sicher differenziert werden. Insbesondere im Hinblick auf die in dieser Arbeit nachgewiesenen bilateralen Veränderungen könnte sie aber eine wichtige Rolle spielen (s. unten, Kapitel 4.1.3).

4.1.2 Intraneuronaler (präsynaptischer) Speicherpool mit Steigerung der DA-Neusynthese

Die Neusynthese von DA und die anschließende Speicherung erfolgt in drei unterschiedlichen Kompartimenten, die in den Axonterminalen der Neurone lokalisiert sind und untereinander kommunizieren^{7,92}. Man unterscheidet das zytoplasmatische Kompartiment sowie den vesikulären Kurz- und Langzeitspeicher. Im präsynaptischen Zytoplasma erfolgen die DA-Synthese und der enzymatische Abbau⁸⁷, 24% des intrazellulären DA sind hierin enthalten⁹². Über vesikuläre DA-Transporter (vDAT) kann DA in die vesikulären Speicher aufgenommen und dort bis zur Freisetzung gespeichert werden. Die intravesikuläre Konzentration wird mit ca. 0,5mol/l konstant gehalten⁷.

Die in dieser Arbeit beobachteten Erhöhungen der striatalen Gewebkonzentrationen von DA und den Hauptmetaboliten DOPAC und HVA könnten auch durch eine stimulationsbedingte DA-Neusynthese und einen stimulationsbedingt veränderten DA-Metabolismus hervorgerufen sein, entsprechend der Hypothese, dass eine Erhöhung des DA-Metabolismus und damit der Konzentrationen von DOPAC und HVA an eine intraneuronale Dopamin-Neusynthese gebunden ist⁸². Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse einer Mikrodialysestudie nach akuter STN-HFS mit Messung der striatalen Extrazellulärkonzentrationen von DA und Metaboliten nach pharmakologischer Manipulation der dopaminergen Synapse¹¹⁰. Zum Beispiel konnte in gesunden Ratten gezeigt werden, dass unter akuter STN-HFS trotz einer Vorbehandlung der Tiere mit dem Dopaminspeicherentleerer Reserpin dennoch eine Erhöhung der Konzentration des DA-Metaboliten DOPAC zu beobachten ist. Da unter diesen Bedingungen angenommen werden musste, dass kein DA mittels Exozytose freigesetzt, wieder aufgenommen und metabolisiert werden kann, schlussfolgerten die Autoren, dass die erhöhten Konzentrationen der DA-Metabolite auf den vermehrten Abbau eines intrazellulär mittels des Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) neu synthetisierten Dopamins zurückzuführen seien. Konsequenterweise erfolgte in derselben Studie (in allerdings nicht vorbehandelten Tieren) auch eine Bestimmung der TH-Aktivität, gemessen am enzymatischen Umsatz von L-Tyrosin zu L-Dopa, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Dopaminsynthese. Die Untersuchung der Enzymaktivität zeigte eine auf der zur Stimulation ipsilateralen Seite erhöhte Konzentration an L-Dopa im Vergleich zur kontralateralen Seite, was als Zeichen einer erhöhten Enzymaktivität

und damit Neusynthese gewertet wurde¹¹⁰. Dieses Ergebnis konnte in einer Folgestudie weiter präzisiert werden, in dem bei Tieren nach akuter STN-HFS (Dauer 2h) im Vergleich zur scheinstimulierten Kontrollgruppe mittels Western Blotting ein erhöhter Phosphorylierungsgrad der TH gemessen werden konnte¹²⁵.

Es ist also vorstellbar, dass die in der vorliegenden Studie gemessenen erhöhten striatalen Gewebekonzentrationen von DA nach chronischer STN-HFS Ausdruck einer Aktivitätssteigerung der TH und damit einer erhöhten DA-Neusynthese sind. Diese Annahme wird unterstützt durch einige Pilotexperimente eines an wenigen Versuchstieren durchgeführten enzymatischen TH-Assays mit Nachweis erhöhter Konzentrationen von L-Dopa (noch unveröffentlichte Daten).

Darüber hinaus konnte unter chronischer STN-HFS eine Erhöhung der striatalen Gewebekonzentrationen der DA-Metabolite DOPAC und HVA gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass es auch zu einer Erhöhung des Metabolismus kommt, möglicherweise durch eine gesteigerte TH-Aktivität^{110;112}.

Die erhöhten Gewebekonzentrationen der DA-Metabolite bei den stimulierten Tieren könnten jedoch auch durch einen erhöhten DA-Metabolismus nach zuvor gesteigerter DA-Freisetzung erklärt werden (s. Kapitel 4.1.1). Der im Vergleich der beiden Metabolitenkonzentrationen auffallende höhere Anstieg der HVA-Konzentration unter STN-HFS könnte durch ein höheres Substratangebot bedingt sein. HVA entsteht zum einen Catechol-o-Methyl-Transferase (COMT) –vermittelt direkt aus DA und zum anderen durch die Weitermetabolisierung von DOPAC, welches wiederum als Hauptabbauprodukt von DA, vermittelt über die Monoaminoxidase B (MAO B), entsteht⁸⁷. Aufgrund der höheren DA-Konzentrationen bei den Tieren unter STN-HFS würde somit zum einen mehr DA für die direkte Umwandlung in HVA, aber auch mehr DOPAC durch die MAO B-Reaktion zur Verfügung stehen.

Betrachtet man das Verhältnis von Metaboliten zu Substrat (= Ratio, [DOPAC+HVA]/DA), so fällt auf, dass sie bei den stimulierten Tieren nur geringgradig erhöht ist gegenüber der Ratio in der Kontrollgruppe. Die Konzentration der Metabolite ist also in etwa gleich großem Maße gestiegen wie die DA-Konzentration selbst. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Aktivität der abbauenden Enzyme abhängig ist vom Substratangebot, dass also ein Konzentrationsanstieg des Substrates (vermehrte Freisetzung oder gesteigerte Synthese) eine Zunahme der Enzymaktivität bedingt und umgekehrt.

Es wird also darauf ankommen, dass zukünftige Studien mittels enzymatischer Assays klären, inwieweit die chronische STN-HFS die Aktivität der im DA-Stoffwechsel an Synthese und Abbau beteiligten Enzyme beeinflusst.

Die intraneuronalen Speicherkompartimente werden in einen Kurzzeit- und einen Langzeitspeicher unterteilt. Zwischen den Speichern und dem Zytoplasma erfolgt ein permanenter Konzentrationsausgleich von DA. Der Kurzzeitspeicher umfasst die membranständigen Vesikel, aus denen DA exozytotisch freigesetzt wird, der Langzeitspeicher umfasst die membran-fernliegenden Vesikel und dient als Reservepool⁸⁵. Aufgrund des methodischen Ansatzes dieser Arbeit ist eine differenzierte Beurteilung der Speicherkompartimente nicht möglich. Interessant ist aber die Untersuchung der Frage, ob unter den Bedingungen der chronischen STN-HFS und einer erhöhten DA-Synthese auch die intraneuronalen Speicherkapazitäten für DA vergrößert und die DA-Speicher (insbesondere der Langzeitspeicher) „aufgefüllt“ werden. Auch dieser Aspekt sollte in zukünftigen Studien (mittels Mikrodialyse oder Voltammetrie) untersucht werden.

4.1.3 Neusynthese von dopaminergen Zellen in der SNc

Eine weitere Hypothese, die die in der vorliegenden Arbeit beobachteten höheren striatalen Gewebsgehalte von DA und seinen Hauptmetaboliten DOPAC und HVA nach chronischer STN-HFS erklären könnten, ist die stimulationsbedingte Neusynthese dopaminergen Zellen in der SNc.

Lie et al. (2002) konnten zeigen, dass die Substantia nigra (SN) ausgewachsener Ratten teilungsfähige Vorläuferzellen enthält, aus denen sich sowohl reife Gliazellen als auch Neurone entwickeln können¹⁰⁰. Eine neurogene Differenzierung erfolgte jedoch nicht in der SN selbst, sondern erst nach Transplantation der Zellen in den Hippocampus der Ratten. *Lie et al.* schlussfolgerten daraus, dass die neurogene Differenzierung abhängig ist von Umgebungsfaktoren und proneurogenen Signalen, die in der SN gesunder Tiere nicht vorhanden sind oder inhibiert werden.

Auch *Steiner et al.* (2006) konnten in der Substantia nigra von Ratten proliferationsfähige Zellpopulationen nachweisen, welche sich in Vorläuferzellen von reifen Gliazellen differenzieren können¹⁴⁶. Eine Stimulation der Tiere, im Sinne einer Anreicherung der Umgebung durch Verbesserung der Haltungsbedingungen (z. B. größere Käfige) und physisches Training (regelmäßige Laufbandübungen), führte zu einer Steigerung der zellulären Proliferationsrate sowohl in gesunden Tieren als auch im 6-OHDA-Modell der Ratte. Auch nach dieser Stimulation der Tiere konnte jedoch nur eine vermehrte Neusynthese glialer Vorläuferzellen nachgewiesen werden; die Stimulation führte nicht zur Induktion einer Neurogenese. *Steiner et al.* (2006) erklärten dies, wie auch schon *Lie et al.* (2002), damit, dass im Gegensatz zu anderen Hirnarealen, in denen Neurogenese stattfindet (z. B. Hippocampus), in

der Substantia nigra eine Inhibition neurogener Faktoren vorliegt, die durch physiologische Stimuli offensichtlich nicht inhibiert werden können.

Eine Untersuchungsgruppe vom Karolinska-Institut aus Stockholm konnte mittlerweile in einer immunhistochemischen Studie neusynthetisierte Neurone in der Substantia nigra von Ratten nachweisen, welche sogar teilweise Marker dopaminerger Neurone (TH-Immunopositivität) aufwiesen¹⁶⁸. Jedoch werden diese Ergebnisse sehr kontrovers diskutiert, da die Arbeit methodische Mängel aufweist und die Ergebnisse bislang nicht reproduziert werden konnten^{25;54}. Ob eine neuronale Neusynthese in der Substantia nigra tatsächlich möglich ist, muss also in weiteren Studien untersucht werden. Die Wirkung der STN-HFS, wie sie in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, könnte aber darin bestehen, dass sie durch ihr Eingreifen in das neuronale Netzwerk der Basalganglien einen Stimulus darstellt, der die Inhibition neurogener Faktoren aufhebt und dadurch eine Neusynthese von Neuronen erlaubt. Die erhöhten Gewebsgehalte von Dopamin wären dann durch eine gesteigerte Neusynthese dopaminerger Neurone zu erklären.

4.1.4 Bihemisphärielle Effekte nach unilateraler STN-HFS

Eine interessante Beobachtung der vorliegenden Studie war der Nachweis bihemisphäriell erhöhter Gewebskonzentrationen von DA und Metaboliten, also auch im zur Stimulation kontralateralen Striatum, was eine Bilateralität der Effekte suggeriert.

Bilaterale Effekte nach unilateraler STN-HFS konnten in anderen Studien bereits nachgewiesen werden^{30;31;38;62;102;131;140}. *Shi et al (2006)* berichteten in einer Verhaltensstudie an Ratten über inhibitorische Zellantworten in Neuronen des STN beider Hemisphären unter einseitiger STN-HFS¹⁴⁰ und vermuteten, dass ihre Ergebnisse das neurophysiologische Korrelat klinischer Untersuchungen an Parkinson-Patienten wären, bei denen bei nur einseitig durchgeführter STN-HFS bilaterale Verbesserungen der motorischen Funktionen beobachtet werden konnten^{38;62;102}. Eine weitere experimentelle Arbeit, die metabolische Effekte der STN-HFS untersuchte, konnte bilaterale Einflüsse nach einseitiger Stimulation feststellen¹³¹. *Salin et al. (2002)* zeigten in Zellen beider Nuclei subthalamici in gesunden Ratten erniedrigte Konzentrationen an Cytochrom-Oxidase-Subunit-I-mRNA, die als Marker der zellulären metabolischen Aktivität angesehen wird¹³¹. Es wurde geschlossen, dass direkte Verbindungen zwischen den STN beider Seiten das neuroanatomische Substrat dieser Beobachtung darstellten. Auch Mikrodialyse-Studien zur Untersuchung der neurochemischen Veränderungen unter akuter STN-HFS konnten in gesunden Ratten unter unilateraler Stimulation einen Anstieg sowohl der extrazellulären DA-Konzentration als auch der beiden Aminosäuren Glutamat und GABA in

beiden Striata nachweisen^{30;31}. Die Autoren erklärten dies mit kontralateralen Gleichgewichtseffekten im dopaminergen System, die vermutlich über interhemisphärische nigro-thalamo-corticale Verbindungen vermittelt werden.

Die von *Nieoullon et al. (1977)* zuerst beschriebenen Gleichgewichtseffekte im nigrostriatalen dopaminergen System in der Katze könnten auch zur Interpretation für die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse angewendet werden¹¹⁸. In der o.g. Studie kam es nach unilateraler Applikation von DA über eine stereotaktisch in die SNc implantierte Kanüle zu einer massiven Zunahme der DA-Freisetzung im kontralateralen Striatum. Unter der Vorstellung einer durch die Stimulation gesteigerten Aktivität der TH könnte die daraus resultierende erhöhte DA-Konzentration im ipsilateralen Striatum die Wirkung des mittels Kanüle zugeführten Dopamins imitieren: um die Unterschiede in der DA-Konzentration beider Striata zu egalisieren, wird DA auf der zur Stimulation kontralateralen Seite vermehrt freigesetzt. Dieser Effekt könnte entweder über kreuzende nigro-thalamo-corticale Bahnen vermittelt werden¹¹⁹ oder über den Anteil der nigrostriatalen Faserbahnen, die direkt ins kontralaterale Striatum projizieren (ca. 5%,^{115;137}). Kreuzende Verbindungen dieser Art konnten mittels Labelingverfahren sowohl in der Katze⁸¹ als auch in der Ratte⁶⁰ nachgewiesen werden, so dass eine Übertragung der Ergebnisse von *Nieoullon et al.* auf die Ratte möglich ist.

4.1.5 Veränderungen der dopaminergen Transmission im Kontext der verschiedenen Striatumanteile (dorsolateral vs. ventral)

Der STN besitzt neben seinem motorischen Anteil, welcher im lateralen STN lokalisiert ist, auch einen limbischen Anteil¹²⁰. Dieser umfasst den medialen STN und ist über zahlreiche efferente und afferente Projektionen mit anderen „Stationen“ der limbischen Basalganglienschleife verbunden⁸⁴. Parallel zu den Untersuchungen im dorsolateralen Striatum wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht, ob die chronische STN-HFS auch zu Veränderungen der neurochemischen Transmission im ventralen Striatum (mit Nucl. accumbens) führt, welches den striatalen Anteil der limbischen Basalganglienschleife darstellt.

Obwohl die stereotaktischen Koordinaten für den STN, bzw. für die Stimulationselektrode den lateralen STN berücksichtigen und ausschliesslich Tiere mit orthotoper Elektrodenlokalisation verwendet wurden, ist auch eine Beeinflussung von Neuronen im medialen STN möglich, da die Stromausbreitung um die Elektrode nicht an anatomische Grenzen gebunden ist. Somit dürfte bei monopolarer Stimulationsmodus eine Beeinflussung von Neuronen im Umkreis von mehreren 10 µm um die Elektrode herum möglich sein, auch wenn mit zunehmendem Abstand der

Neurone von der Elektrode die Stimulationswirkung abnimmt ¹²³. Dies muss bei der Beurteilung der Ergebnisse aus dem ventralen Striatum berücksichtigt werden.

Dopamin stellt einen wesentlichen Transmitter in der limbischen Basalganglienschleife dar und ist vor allem an der Ausbildung von Belohnungs-, aber auch Suchtverhalten beteiligt ^{32;71}. DA wird aus Axonterminalen von Projektionsneuronen der Ventralen Tegmentalen Area (VTA) ins ventrale Striatum (Nucleus accumbens) freigesetzt.

Als Ergebnis dieser Arbeit konnte im ventralen Striatum, genau wie im dorsolateralen Striatum, ein bihemisphärieller Anstieg der Gewebkonzentrationen von DA und seinen Hauptmetaboliten nach chronischer STN-HFS gezeigt werden, was eine Beeinflussung der dopaminergen Transmission auch im ventralen Striatum unterstreicht. Der prozentuale Anstieg war jedoch deutlich geringer ausgeprägt als im dorsolateralen Striatum (10% vs. 16%) und nicht signifikant. Die Mechanismen, die der Konzentrationszunahme zugrunde liegen könnten, entsprechen prinzipiell denen im dorsolateralen Striatum, das heißt entweder eine erhöhte exozytische Freisetzung des Transmitters und/ oder eine Steigerung der Syntheseleistung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Enzymreaktion mit der TH. Die Ratio aus Metaboliten zu Substrat ([DOPAC+HVA]/DA) zeigte genau wie im dorsolateralen Striatum nur einen geringen Unterschied zwischen der Gruppe der stimulierten und scheinstimulierten Tiere. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass einhergehend mit der Konzentrationszunahme von DA (durch vermehrte Freisetzung und/ oder gesteigerte Neusynthese) auch die Aktivität der abbauenden Enzyme erhöht wurde (i.S.e. gesteigerten Umsatzes). Eine genauere Beurteilung der einzelnen Mechanismen ist aber anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich.

Wie oben bereits erwähnt, könnte die geringere Einflussnahme der Stimulation auf die Gewebkonzentration von DA (und Metaboliten) im ventralen Striatum im Vergleich zum dorsolateralen Striatum durch die Elektrodenplatzierung im (vordergründig motorischen) STN bedingt sein, aber auch durch neuroanatomische Verschaltungen erklärt werden. Die VTA-Neurone erhalten exzitatorische (glutamaterge) Afferenzen aus dem Cortex und stehen gleichzeitig unter dem starken inhibitorischen (GABA-ergen) Einfluss aus striatalen Zellen, auf denen wiederum glutamaterge corticale Afferenzen enden. Der Erhöhung der metabolischen und elektrischen Aktivität der VTA-Neurone und der Steigerung der dopaminergen Transmission im Striatum durch einen corticalen Stimulus folgt in diesem Regelkreis unmittelbar ein gesteigerter GABA-erger Input in die VTA im Sinne eines feedback-Mechanismus ⁴⁸. Eine der STN-HFS folgende Aktivierung corticaler Zellen würde somit, bedingt durch die Verschaltungen im Regelkreis, nur eine geringe Erhöhung der dopaminergen Transmission bewirken, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbar ist.

Die geringere DA-Konzentrationszunahme im ventralen Striatum unter STN-HFS ließe sich auch anhand der direkten Verbindung STN→VTA erklären¹²⁰. Geht man von einer exzitatorischen Wirkung der HFS auf die Zellen des STN aus, so würden die VTA-Neurone durch die glutamaterge Stimulation initial aktiviert werden und die DA-Freisetzung im ventralen Striatum zunächst deutlich zunehmen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte DA-Konzentration im Striatum über die Aktivierung präsynaptischer D₁-Rezeptoren zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat aus corticalen Axonterminalen führt^{58;166;167}. Die dadurch bedingte Aktivierung striataler Neurone würde wiederum den GABA-ergen Einfluss auf VTA-Zellen erhöhen und ihre (metabolische/ elektrische) Aktivität verringern. Die DA-Freisetzung im ventralen Striatum würde dadurch, wiederum einem Feedback-Mechanismus folgend, reduziert. Im Vergleich der Striatumanteile (dorsolateral vs. ventral) zeigte sich im dorsolateralen Striatum eine signifikant höhere DA-Gewebskonzentration als im ventralen Striatum unabhängig von der Stimulation und der untersuchten Seite. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Ergebnissen anderer Studien zur Untersuchung des DA-Gehaltes und -Stoffwechsels in unterschiedlichen Hirnstrukturen. *Bertler and Rosengren* konnten bereits 1959 zeigen, dass bei unterschiedlichen Spezies die höchsten DA-Konzentrationen im Nucleus caudatus und dem Putamen vorliegen (ca. 80% des Gesamt-DA im ZNS)²¹. Weitere post mortem-Studien an menschlichen Gehirnen konnten mittels Fluorimetrischer Detektion in Homogenaten von Hirngewebe einen DA-Gehalt von 5-7µg/g Hirngewebe im Nucleus caudatus und Putamen und von 2.5µg/g Hirngewebe im Nucleus accumbens^{20;50;132;159} nachweisen. Auch bei Ratten konnte nachgewiesen werden, dass die DA-Konzentration im ventralen Striatum deutlich geringer ist als die im dorsolateralen Striatum¹³⁷, und dass die DA-erge Innervation des ventralen Striatums über die VTA schwächer ausgeprägt ist als der DA-Impuls aus der SNc in das dorsolaterale Striatum⁶⁶. Für die Ratio aus HVA/DA konnten im Nucleus accumbens signifikant höhere Werte nachgewiesen werden als im Nucleus caudatus¹⁵⁹. Auch wenn ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Studien mit der hier vorliegenden Studie aufgrund unterschiedlicher Spezies der Untersuchungstiere (Mensch vs. Ratte) und verschiedener Untersuchungsmethoden (Gehaltsbestimmung /g Hirngewebe mittels Fluorimetrischer Detektion vs. Gehaltsbestimmung /g Protein mittels Elektrochemischer Detektion) nur eingeschränkt möglich ist, kann anhand der Daten gezeigt werden, dass deutliche Unterschiede hinsichtlich des Dopamingehaltes und vermutlich DA-Metabolismus im dorsolateralen und ventralen Striatum bestehen.

4.2 Beeinflussung der serotonergen Transmission nach chronischer STN-HFS

Neben DA ist auch Serotonin ein wichtiger Neurotransmitter in den Basalganglien, vor allem in der limbischen Basalganglienschleife. Serotonin wird aus Projektionsneuronen des dorsalen Raphe-Kerns (DRN) ins dorsolaterale und ventrale Striatum freigesetzt¹²⁰ und ist vor allem an der Entwicklung von Stimmungsverhalten und der Motivationsbildung beteiligt.

Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet, wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese über die Tryptophanhydroxylase (TRH) vermittelt wird⁸⁷. Die Freisetzung des Transmitters erfolgt exozytotisch aus Speichervesikeln, die in den Axonterminalen der Raphe-Neurone lokalisiert sind. Nach erfolgter Freisetzung wird Serotonin über spezifische Transportermoleküle wieder in die präsynaptische Zellmembran aufgenommen und anschließend entweder in die Speichervesikel transportiert oder über die Monoaminoxidase A (MAO A) metabolisiert zu Hydroxy-Indolessigsäure (HIAA)^{87:89}. Eine Aufnahme in Gliazellen erfolgt nicht^{2;87}.

Die Untersuchung der Gewebskonzentration von Serotonin im dorsolateralen und ventralen Striatum nach chronischer STN-HFS sollte zur Beantwortung der Frage herangezogen werden, inwieweit andere striatale Transmittersysteme, neben DA, durch die chronische STN-HFS beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die chronische STN-HFS im ventralen Striatum zu einer bihemisphäriellen Reduktion der striatalen Gewebskonzentration des 5-HT-Hauptmetaboliten HIAA führt und gleichzeitig die Gewebskonzentration von Serotonin geringfügig verringert, dies jedoch nur ipsilateral zur Stimulation. Auch die Ratio aus Metabolit zu Ausgangssubstanz (HIAA/Serotonin) im ventralen Striatum wurde durch die chronische STN-HFS bihemisphäriell gesenkt. Im dorsolateralen Striatum hatte die chronische STN-HFS praktisch keinen Einfluss auf die Gewebskonzentrationen von Serotonin und HIAA.

Der Einfluss der STN-HFS auf die striatale serotonerge Transmission wurde bislang in experimentellen Studien wenig untersucht, der Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeiten ist deshalb kaum möglich. Eine Mikrodialyse-Studie konnte nach kurzfristiger STN-HFS keine Änderung der extrazellulären HIAA-Konzentration im dorsolateralen Striatum feststellen¹²¹, was mit den Ergebnissen der Untersuchungen im dorsolateralen Striatum der hier vorliegenden Arbeit prinzipiell übereinstimmt.

Die unterschiedlichen Veränderungen der Serotonin-Gewebskonzentration im ventralen und dorsolateralen Striatum unter chronischer STN-HFS könnten durch eine differenzierte Wirkung der chronischen STN-HFS auf verschiedene DRN-Zellpopulationen erklärt werden (s. unten, Kapitel 4.2.2).

4.2.1 Verringerte serotoninerge Transmission nach chronischer STN-HFS im ventralen Striatum

Die Veränderungen der Gewebkonzentrationen von Serotonin und HIAA im ventralen Striatum nach chronischer STN-HFS könnten durch folgende Mechanismen erklärt werden: 1. Verringerung der exozytotischen Freisetzung und damit einhergehender reduzierter metabolischer Abbau und 2. verringerte Synthese.

4.2.1.1. Verringerte exozytotische Freisetzung und reduzierter metabolischer Abbau

Die Freisetzung von Serotonin erfolgt Aktionspotential-gebunden via Exozytose aus präsynaptischen Speichervesikeln, die in den Axonterminalen der DRN-Neurone lokalisiert sind. Eine verringerte Freisetzung des Neurotransmitters wäre somit mit einer Inhibition der DRN-Neurone unter STN-HFS verbunden. In einer elektrophysiologischen Studie konnten *Temel et al.* nachweisen, dass es unter akuter STN-HFS zu einer Abnahme der Entladungsfrequenz von serotoninerger Neuronen und damit einer Inhibition im DRN kommt ¹⁵². Da der Nachweis einer direkten efferenten Verbindung zwischen STN und dorsalem Raphe-Kern bislang fehlt ¹²⁴, nahmen sie an, dass die Stimulationswirkung über einen polysynaptischen Weg vermittelt wird unter Einbeziehung z.B. der SNr. Die SNr ist eine wichtige Zielstruktur des STN ⁸⁴ und weist GABA-erge Efferenzen zum DRN auf ^{124;143}. Unter kurzfristiger STN-HFS konnte bereits eine vermehrte Aktivität nigraler Neurone festgestellt werden ¹⁰⁸. Die damit verbundene vermehrte GABA-Freisetzung führt zu einer Inhibition von DRN-Neuronen, diese Inhibition des DRN könnte auch unter chronischer STN-HFS für eine verminderte Serotonin-Freisetzung ins ventrale Striatum verantwortlich sein.

Die in dieser Arbeit nach chronischer STN-HFS gemessenen, ipsilateral zur Stimulation nur geringfügig und kontralateral nicht verringerten Serotonin-Konzentrationen im ventralen Striatum widersprechen diesen Erklärungsansätzen nicht, da es sich hierbei um Gewebkonzentrationen handelt und eine Unterscheidung in intra- und extrazellulären Pool aufgrund des methodischen Ansatzes der Arbeit nicht möglich ist. Infolge einer verringerten Freisetzung wären auch die Wiederaufnahme und der enzymatische intraneuronale Abbau reduziert, wodurch sich die Abnahme der Gewebkonzentration der HIAA erklären ließe. Die verringerten Ratios wären dann Ausdruck eines verminderten Serotonin-Turnovers nach chronischer STN-HFS.

Darüber hinaus steht die striatale Freisetzung von Serotonin aus Zellen des dorsalen Raphe-Kerns auch unter der Regulation von DA, ein Mechanismus, der ebenfalls zur Abnahme der

Gewebskonzentration (von Serotonin und HIAA) unter chronischer STN-HFS beitragen könnte. *Hery et al. (1980)* konnten in Katzen nach unilateraler, stereotaktischer Applikation von DA in die SNc eine bihemisphärisch verringerte Serotonin-Freisetzung im Striatum nachweisen⁷². Sie vermuteten, dass durch die DA-Freisetzung aus Dendriten nigro-striataler Zellen die Aktivität von nigralen Projektionsneuronen zum Raphe-Kern verringert wird und damit keine Aktivierung von serotoninerger Projektionsneuronen ins Striatum stattfindet. Sie konnten jedoch nicht ausschließen, dass die verringerte Serotonin-Freisetzung auch vermittelt wurde durch die Bindung von DA an seine auf den striatalen Axonterminalen der Raphe-Kern-Neurone lokalisierten Rezeptoren. In diesem Fall könnten die in der vorliegenden Arbeit gemessenen bihemisphärisch erhöhten Gewebkonzentrationen von DA im ventralen Striatum auch eine Rolle bei der Vermittlung einer verminderten Serotonin-Freisetzung aus DRN-Neuronen spielen. Zusammenfassend könnte eine reduzierte Freisetzung von Serotonin als Folge der STN-HFS also durchaus für die verringerten Gewebgehalte der HIAA und den reduzierten Serotonin-Turnover verantwortlich sein. Welche Mechanismen genau der verminderten Freisetzung zugrunde liegen, muss in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

4.2.1.2. Verringerte Synthese und Reduktion des metabolischen Abbaus

Serotonin entsteht mittels der Enzyme Tryptophanhydroxylase (TRH) und Aminosäuredecarboxylase (AADC) aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Serotonin-Synthese wird über die TRH vermittelt. Die Syntheseleistung der TRH kann wie bei der TH über zwei Mechanismen gesteigert werden. Eine kurzfristige Zunahme der Aktivität wird durch eine Proteinkinase-vermittelte Phosphorylierung erzielt, besteht längerfristig ein erhöhter Bedarf an Serotonin, so wird über eine vermehrte Genexpression die Enzymprotein-Synthese gesteigert⁸⁷. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene erniedrigte Gewebkonzentration der HIAA bei leicht erniedrigter Gewebkonzentration von Serotonin in der Gruppe der stimulierten Tiere könnte durch eine Inhibition der TRH oder der Aktivierungsmechanismen der TRH (Phosphorylierung, Genexpression) und konsekutiver Abnahme des 5-HT-Metabolismus bedingt sein. Durch die Stimulation könnten, vermittelt über polysynaptische Verbindungen zwischen STN und Raphe-Kern, in den Raphe-Kern-Neuronen Signalmechanismen aktiviert werden, die zur Hemmung der Proteinkinase (keine Phosphorylierung der TRH) oder der Genexpression führen. Setzt man voraus, dass der Abbau von Serotonin an die Synthese gekoppelt ist, so ließe sich die in dieser Studie gemessene erniedrigte Konzentration der HIAA auf die verringerte Syntheseleistung der

TRH zurückführen. Studien, die als Folge der STN-HFS die Aktivierung oben genannter inhibitorischer Mechanismen feststellten, fehlen bislang.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse des Serotonin-Stoffwechsels unter STN-HFS muss methodisch berücksichtigt werden, dass es sich bei der HIAA um eine Substanz mit hochgradiger post mortem- und Perchlorsäure-Instabilität handelt, wodurch die Konzentrationen, die nach der Tötung der Tiere und Konservierung der Proben in Perchlorsäure gemessen werden, nicht die tatsächlichen Konzentrationen widerspiegeln könnten⁷⁵. Dieser intrinsische Fehler erscheint jedoch vernachlässigbar, da die Proben der STN-HFS- und der Placebo-Gruppe nach dem gleichen Protokoll verarbeitet wurden. Außerdem betrug die Zeit zwischen der Tötung der Tiere und der Schockfrostung der Proben in Isopentan nur wenige Minuten, und die perchlorsäurehaltigen Proben verblieben bis zur HPLC-Messung in gefrorenen Zustand. Darüber hinaus konnten bei der Untersuchung der Gewebekonzentration der HIAA im dorsolateralen Striatum (s. Ergebnisse) und bei der o.g. Mikrodialysestudie, bei der die Proben ebenfalls in Perchlorsäure gelöst wurden, keine Konzentrationsunterschiede beobachtet werden¹²¹.

4.2.2 Veränderungen der serotoninerger Transmission im Kontext der verschiedenen Striatumanteile (dorsolateral vs. ventral)

Im Vergleich der Striatumanteile (dorsolateral vs. ventral) fällt auf, dass die Gewebekonzentrationen von Serotonin und HIAA im ventralen Striatum deutlich höher sind als im dorsolateralen, während die Werte der Ratio aus Metabolit zu Ausgangssubstanz (HIAA/5-HT) im dorsolateralen Striatum über denen des ventralen Striatums liegen (s. Tabelle 5). Diese Ergebnisse stimmen überein mit früheren Untersuchungen der striatalen Serotonin-Konzentration in Ratten mittels HPLC und elektrochemischer Detektion^{9;163} und sind vermutlich zurückzuführen auf die höhere serotoninerge Innervationsdichte im ventralen Striatum im Vergleich zum dorsolateralen Striatum¹⁴⁴. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnten *Soghomonian et al. (1987)* nachweisen, dass das ventrale Striatum 2-3 Mal mehr serotoninerge Varikositäten aufweist als das dorsolaterale (dorsolateral: ca. 1,5Mio/ mm³ Gewebe und ventral: bis zu 4,8Mio/ mm³ Gewebe)¹⁴⁴. Dies unterstreicht die wichtige Funktion von Serotonin als Transmitter in der limbischen Basalganglienschleife.

Darüber hinaus zeigt der Vergleich der Ergebnisse aus dem dorsolateralen und dem ventralen Striatum, dass die chronische STN-HFS lediglich im ventralen Striatum zu einer Veränderung der serotoninerger Transmission führte (s. Tabelle 5). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die serotoninergeren Projektionen zum dorsolateralen und ventralen Striatum aus getrennten Neuronenpopulationen des dorsalen Raphe-Kerns hervorgehen. *Kirby et al. (1995)* zeigten, dass

durch dieselbe Stress-Exposition („Schwimm-Stress“) die 5-HT-Konzentration in zwei verschiedenen Hirnarealen unterschiedlich beeinflusst wird (Anstieg im Striatum und Abfall im lateralen Septum)⁸⁸ und *Waselus et al. (2006)* konnten mittels retrograder Tracer-Transport-Technik nachweisen, dass die Projektionen ihren Ursprung in unterschiedlichen Anteilen des dorsalen Raphe-Kerns hatten¹⁶⁰. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass die 5-HT-Freisetzung aus dem dorsalen Raphe-Kern mehreren Regulations- und Kontrollmechanismen unterliegt, welche sich innerhalb des Kerns unterscheiden². Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dorsolateralem und ventralem Striatum bezogen auf den Serotonin-Stoffwechsel unter chronischer STN-HFS könnten also erklärt werden durch den Ursprung der serotoninerger Projektionen in verschiedenen Anteilen des dorsalen Raphe-Kerns, welche bedingt durch unterschiedliche Kontroll- und Regulationsmechanismen durch die HFS differenziert aktiviert und inhibiert werden.

Die Veränderungen vor allem des serotoninerger Transmitterhaushaltes im ventralen Striatum und damit in der limbischen Basalganglienschleife könnten als neurochemisches Korrelat dienen für die klinische Beobachtung eines vermehrten Auftretens psychotroper Nebenwirkungen bei Patienten unter STN-HFS (s.u.).

4.3 Differenzierte Beeinflussung der Glutamat- und GABA-Transmission durch chronische STN-HFS

Zur Untersuchung weiterer neurochemischer Veränderungen im Striatum nach chronischer STN-HFS erfolgte die Gehaltsbestimmung der beiden Aminosäuren Glutamat und GABA im dorsolateralen und ventralen Striatum. Projektionsneurone aus dem Cortex (ipsi- und kontralateral), dem Thalamus und dem Nucleus subthalamicus setzen Glutamat im Striatum frei, wohingegen der größte Teil der GABA aus striatalen Interneuronen stammt¹¹⁹.

Die chronische STN-HFS führte im dorsolateralen und ventralen Striatum zu einer bilateralen Erhöhung der Gewebkonzentration von Glutamat, wobei der Unterschied im ventralen Striatum signifikant war. Die Gewebkonzentrationen von GABA blieben hingegen in beiden Striatumanteilen unverändert.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Veränderungen der Gewebkonzentration von Glutamat stimmen teilweise überein mit den Ergebnissen zweier anderer Studien, welche mittels Mikrodialyse die Veränderungen der Aminosäure-Freisetzung im Striatum nach akuter STN-HFS untersuchten^{31;145}. Dabei wurde von *Bruet et al. (2003)* unter kurzfristiger STN-HFS ein signifikanter bilateraler Anstieg der extrazellulären striatalen Konzentration von Glutamat in gesunden Ratten und im Parkinson-Modell der Ratte nachgewiesen³¹. *Stefani et al. (2006)*

konnten nach akuter STN-HFS bei Parkinson-Patienten eine erhöhte extrazelluläre, striatale Konzentration des Second Messengers zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) nachweisen, was als Indikator für eine erhöhte glutamaterge Transmission angesehen wurde. Aufgrund einer gleichzeitig im Thalamus gemessenen erniedrigten extrazellulären GABA-Konzentration erklärten sie den striatalen Konzentrationsanstieg von Glutamat mit einer Disinhibition thalamo-corticaler Neurone durch die STN-HFS¹⁴⁵, was auch von *Bruet et al. (2003)* als ein möglicher Mechanismus für die Konzentrationsveränderungen von Glutamat angeführt wurde. Allerdings wären die veränderten Glutamatkonzentrationen im Striatum auch durch eine direkte stimulationsbedingte Aktivierung von subthalamo-kortikalen und in der Folge kortiko-striatalen Verbindungen zu erklären³¹.

Eine Disinhibition thalamo-kortikaler Neurone, bzw. eine Aktivitätszunahme subthalamokortikaler Projektionsneurone wurden bereits als Erklärungsmöglichkeiten für die in dieser Arbeit gemessenen erhöhten striatalen DA-Konzentrationen genannt und könnten somit auch den Veränderungen der Glutamat-Konzentration unter chronischer STN-HFS zugrunde liegen, was jedoch aufgrund des methodischen Ansatzes der Arbeit nicht bewiesen werden kann (s. unten). Die Bilateralität der Konzentrationszunahme wäre in beiden Fällen durch kreuzende kortiko-striatale¹¹⁹ oder kortiko-kortikale^{30;120} Faserbahnen zu erklären.

Im Gegensatz zu Glutamat wurde die Gewebskonzentration von GABA durch die chronische STN-HFS weder im dorsolateralen noch im ventralen Striatum verändert. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen der Mikrodialysestudie von *Bruet et al. (2003)*, welche unter kurzfristiger STN-HFS einen signifikanten bilateralen Anstieg der extrazellulären GABA-Konzentration im Striatum gesunder und Parkinson-Modell-Ratten nachweisen konnten³¹.

Die abweichenden Ergebnisse sind am ehesten durch die Anwendung verschiedener methodischer Verfahren erklärt (extrazelluläre Konzentration mittels Mikrodialyse vs. Gehaltsbestimmung in Gewebshomogenaten). Die Aminosäuren GABA und auch Glutamat dienen in der Zelle nicht nur als Neurotransmitter, sondern sind auch in andere Stoffwechselprozesse der Zelle (z.B. Glukose-Metabolismus, Fettsäure- und Proteinsynthese) integriert⁴⁷. Die intrazelluläre Speicherung erfolgt in funktionell getrennten Pools, wobei z.B. der Neurotransmitterspeicher von Glutamat nur 30% der intrazellulären Gesamtkonzentration umfasst^{43;47}, der größere Teil des Glutamats also zum metabolischen Pool gehört. Die intraneuronale Aminosäuren-Konzentration liegt deutlich über der Konzentration im Extrazellulärraum, für GABA ca. 200 mal höher⁴³. Darüber hinaus erfolgt die Aufnahme und Speicherung der Aminosäuren - im Gegensatz zu der von DA und Serotonin - auch in Gliazellen⁸⁷. Die im Rahmen der Probenaufbereitung durchgeführte Gewebshomogenisierung führt zu

einer Durchmischung aller Speicherpools, so dass unter Berücksichtigung der o.g. Aspekte eine durch die Stimulation bedingte Konzentrationszunahme im Neurotransmitterpool unter Umständen nicht mehr nachweisbar sein kann (GABA). Gleichfalls ist eine beobachtete Konzentrationszunahme (Glutamat) nicht ohne weiteres auf eine stimulationsbedingte vermehrte exozytotische Freisetzung zurückzuführen.

In diesem Kontext sind auch die Ergebnisse der Studien von *Bruet et al. (2003)* und *Stefani et al. (2006)* diskussionswürdig, da die in ihren Arbeiten mit Hilfe der Mikrodialyse nachgewiesenen Konzentrationsveränderungen der Aminosäuren GABA und Glutamat nicht notwendigerweise mit einer exozytotischen Freisetzung korrelieren. *Timmerman und Westerink (1997)* beschreiben die Neurotransmission durch GABA und Glutamat als einen streng auf das synaptische Kompartiment begrenzten Vorgang¹⁵⁵. Diese Autoren argumentieren daher, dass Konzentrationsänderungen, die mit einer im Extrazellulärraum platzierten Mikrodialysesonde registriert werden, nicht auf Veränderungen im synaptischen Spalt und damit nicht auf eine echte gesteigerte Neurotransmission zurückgeführt werden können. Vielmehr gehen sie davon aus, dass es sich um nicht-exozytotisch oder aus Gliazellen freigesetzte Aminosäuren handelt¹⁵⁵.

Ob die STN-HFS (akut oder chronisch) tatsächlich zu einer Beeinflussung der Neurotransmission mittels GABA und Glutamat führt, kann anhand der Ergebnisse der bislang vorliegenden Studien nicht abschließend beurteilt werden. Sollten die in der hier vorliegenden Arbeit gemessenen unveränderten GABA-Konzentrationen tatsächlich unveränderte Konzentrationen im Neurotransmitterpool widerspiegeln, so könnten die Unterschiede der Ergebnisse im Vergleich zur Arbeit von *Bruet et al. (2003)* auch Ausdruck einer unterschiedlichen Wirkung der kurzfristigen und chronischen STN-HFS sein (1 Stunde vs. 14 Tage STN-HFS). Neuronale Netzwerke können nach längerfristiger Exposition gegenüber bestimmten Stimulationsmustern ihre Eigenschaften verändern^{15;139}. Im Rahmen der synaptischen Plastizität könnte die Stimulation zu einer Long-Term-Potentiation (LTP), das heißt einer langdauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung der striatalen Zellen führen. Durch eine Sensitivierung der postsynaptischen Membran für GABA, könnten so mit gleichen Transmitter-Konzentrationen stärkere Wirkungen erzielt werden^{23;86}. Zukünftige elektrophysiologische Studien sollten untersuchen, inwieweit solche Adaptationsvorgänge an der Vermittlung der Wirkung der chronischen Stimulation beteiligt sind.

4.4 Klinische Relevanz der Studie

Obwohl die Hochfrequenzstimulation des STN ein etabliertes Verfahren in der Behandlung des fortgeschrittenen Morbus Parkinson darstellt und wegen ihrer hohen Effektivität in der

Behandlung motorischer Krankheitserscheinungen als vielversprechende und sinnvolle therapeutische Alternative angesehen wird, sind die Wirkmechanismen der HFS teilweise noch unverstanden. Aufgrund der klinischen Beobachtung einer Verbesserung der L-Dopa-responsiven Symptome und einer Dosisreduktion der dopaminergen Medikation unter STN-HFS wurde vermutet, dass die Stimulation unter anderem zu einer Aktivierung des dopaminergen Systems führt. Für die kurzfristige Stimulation konnte diese Vermutung tierexperimentell untermauert werden, indem sowohl in gesunden Ratten als auch im Parkinson-Modell der Ratte eine erhöhte striatale Konzentration von DA und seinen Hauptmetaboliten unter STN-HFS nachgewiesen wurde. Da in der klinischen Situation die Stimulation über längere Zeiträume (mehrere Jahre) angewendet wird, sollte diese Arbeit untersuchen, ob auch unter den Bedingungen der chronischen Stimulation eine Steigerung der dopaminergen Transmission an der Wirkungsvermittlung beteiligt ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach 14-tägiger unilateraler Stimulation die Gewebskonzentrationen von DA und seinen Hauptmetaboliten im dorsolateralen Striatum bilateral erhöht sind, was sowohl mit einer vermehrten Freisetzung als auch mit einer gesteigerten Synthese erklärbar ist.

Auch wenn eine Übertragung auf die humane pathologische Situation nicht vorbehaltlos möglich ist, kann unter Berücksichtigung der o.g. klinischen Beobachtungen und den Ergebnissen einer Mikrodialysestudie von *Castaneda et al. (1990)* eine Beeinflussung des dopaminergen Systems unter chronischer STN-HFS auch beim Patienten angenommen werden³³. So konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre basale DA-Konzentration bei Ratten erst bei einer mehr als 95%-igen Läsion der SNc deutlich abfällt im Vergleich zur DA-Konzentration bei gesunden Ratten³³. Dies lässt darauf schließen, dass selbst in den beeinträchtigsten DA-Systemen, wie man sie im Spätstadium des Morbus Parkinson findet, DA-Reserven vorhanden sind, auf die die Stimulation wirken kann. Zwar konnte in PET-Studien an Parkinson-Patienten unter STN-HFS keine Aktivierung des dopaminergen Systems nachgewiesen werden^{73;147}. Dies ließe sich jedoch dadurch erklären, dass die stimulationsbedingten Konzentrationsänderungen in Größenbereichen liegen, die unterhalb der Detektierbarkeit des PET liegen.

Aufgrund der Tatsache, dass der STN neben motorischen auch limbische Anteile besitzt, wurde auch der Einfluss der chronischen Stimulation auf die serotoninerge und dopaminerge Transmission im ventralen Striatum untersucht, welches als Teil der limbischen Basalganglienschleife an der Entwicklung von Stimmungs-, Sucht- und Belohnungsverhalten sowie Motivation wesentlich beteiligt ist. Durch die klinische Beobachtung eines Auftretens psychotroper Nebenwirkungen (Stimmungsinstabilität, Depression, Suizidalität, Manie, Sucht) bei Patienten unter STN-HFS^{45;56;127;136} existierte bereits die Vermutung, dass die Effekte der

Stimulation nicht nur auf die motorische Basalganglienschleife begrenzt bleiben⁵⁷. Als Ergebnis dieser Studie konnte eine bihemisphäriell erniedrigte Gewebskonzentration des Serotonin-Hauptmetaboliten HIAA und eine ipsilateral zur Stimulation verringerte Serotonin-Gewebskonzentration, sowie eine erhöhte Gewebskonzentration von DA und seinen Metaboliten DOPAC und HVA im ventralen Striatum nachgewiesen werden. Die Resultate für das serotoninerge System sind sowohl durch eine verminderte Freisetzung als auch durch eine reduzierte Synthese zu erklären, die Ergebnisse für DA durch eine vermehrte Freisetzung bzw. durch eine gesteigerte Synthese.

Besonders im Hinblick auf das Auftreten von Stimmungsschwankungen, Depressionen, Suizidalität, Impulsivität⁵³ und aggressivem Verhalten bei Patienten unter STN-HFS und die im Rahmen des Morbus Parkinson ohnehin auftretende Degeneration auch serotoninerger Neurone⁹⁶ gewinnen die Ergebnisse des Serotonin-Stoffwechsels an Bedeutung. Mehrere Studien konnten zeigen, dass oben genannte Verhaltensänderungen und -auffälligkeiten durch eine verringerte Funktion serotoninerger Neurone im Mittelhirn und einen damit verbundenen Serotonin-Mangel im limbischen System ausgelöst werden können^{70;142}. Bei Patienten im akuten Stadium einer Depression konnte eine um bis zu 50% erniedrigte Serotonin-Konzentration im Blut im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen werden²⁴. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer erniedrigten HIAA-Konzentration im Liquor ein erhöhtes Suizidrisiko haben¹⁰⁶. In einer elektrophysiologischen Studie an naiven Ratten wurde nachgewiesen, dass unter akuter STN-HFS die neuronale Aktivität (i.S.v. Frequenz) von serotoninerger Zellen im DRN abnimmt und gleichzeitig Verhaltensänderungen auftreten, die mit einem Serotonin-Mangel assoziiert sind¹⁵². Nach Vorbehandlung der Tiere mit Citalopram, einem selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor (SSRI), traten in der gleichen Studie keine Verhaltensänderungen unter akuter STN-HFS auf, was eine Serotonin-Abhängigkeit der Symptome nahe legt. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen verringerten Gewebskonzentrationen von Serotonin und HIAA im ventralen Striatum könnten also ein neurochemisches, tierexperimentelles Korrelat darstellen für die bei 15-40% der Patienten^{153;154} unter klinischer STN-HFS auftretenden Verhaltensänderungen. Eine durch die Degeneration von Zellen im Serotonin-System bei Morbus Parkinson-Patienten bestehende Prädisposition für die Entwicklung einer Depression oder anderer Verhaltensänderungen könnte durch die Stimulation verstärkt oder der Ausbruch einer Depression beschleunigt werden.

Den Berichten über Stimmungsverschlechterung, Depression und Suizidalität auf der einen Seite stehen Untersuchungsergebnisse gegenüber, die eine deutliche Verbesserung der Stimmungslage der Patienten unter Stimulation zeigten^{130;136}. Des Weiteren wird vom Auftreten hypomanischer

und manischer Zustände, sowie Suchtverhalten unter STN-HFS berichtet ¹³⁶. Diese Beobachtungen könnten sich durch die erhöhten Gewebekonzentrationen von DA im ventralen Striatum erklären lassen, dem eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Belohnungsverhalten und der Entwicklung von Süchten zugesprochen wird ^{32;71}.

Ob die chronische Stimulation des STN auch die Aminosäuren-abhängige Neurotransmission im Striatum beeinflusst, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. Darüber hinaus bleibt unklar, welche klinischen Auswirkungen veränderte Glutamat- und GABA-Freisetzungen zur Folge hätten. Die Durchführung weiterer Studien ist notwendig, um diese Fragen weiter zu klären.

5. Zusammenfassung

Die Hochfrequenzstimulation ist ein neuromodulatives Therapieverfahren, das in der Behandlung von Bewegungsstörungen wie dem M. Parkinson und zunehmend auch neuropsychiatrischen Erkrankungen Anwendung findet.

Dabei wird durch die Applikation elektrischer Impulse über im Gehirn implantierte Elektroden die pathologisch veränderte Signalübertragung im basalganglionären neuronalen Netzwerk moduliert. In der Therapie des M. Parkinson hat sich die HFS des STN mittlerweile zu dem am häufigsten angewandten neurochirurgischen Therapieverfahren entwickelt^{40;83}. Die genaueren Wirkmechanismen der STN-HFS sind jedoch nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Die klinische Beobachtung der deutlichen Verbesserung v.a. L-Dopa-responsiver Symptome¹²⁸ und die mögliche Reduktion der L-Dopa-Medikation bei STN-HF-stimulierten Patienten lassen vermuten, dass die STN-HFS die kontinuierliche pharmakologische Stimulation durch DA imitieren kann und über eine Einflussnahme auf Transmitterebene wirkt. Tierexperimentell konnte dies für die kurzfristige Stimulation (über h) bereits gezeigt werden, und zwar sowohl für gesunde Ratten als auch im Parkinson-Modell der Ratte^{30;109;110;112}. Die hier vorliegende Studie sollte überprüfen, ob auch unter den Bedingungen der chronischen Stimulation (14d) eine Veränderung des Dopamin- und anderer Transmitterhaushalte an der Wirkungsvermittlung der STN-HFS beteiligt ist.

Dazu wurde eine 14-tägige chronische unilaterale STN-Stimulation mittels eines vollständig implantierbaren Mikrostimulationssystems in gesunden Ratten durchgeführt. Anschließend erfolgte die Gehaltsbestimmung der wichtigsten Neurotransmitter im Striatum (Dopamin, Serotonin, Glutamat und GABA) und ihrer Metabolite (HVA, DOPAC und HIAA) in entsprechenden Gewebeproben mittels HPLC und Elektrochemischer bzw. Fluoreszenz-Detektion.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die langfristige HFS des STN in gesunden Ratten sowohl im dorsolateralen als auch im ventralen Striatum zu einer **bihemisphäriellen** Erhöhung der DA-Gewebskonzentration führt, welche im dorsolateralen Striatum signifikant war. Die DA-Metabolite zeigten in beiden Striatumanteilen einen tendenziellen bihemisphäriellen Anstieg der Gewebskonzentration.

Darüber hinaus konnte erstmalig gezeigt werden, dass neben dem dopaminergen System auch das serotoninerge System durch die chronische STN-HFS maßgeblich beeinflusst wird; nach 14-tägiger STN-HFS zeigte sich im ventralen Striatum eine deutliche bihemisphärielle Abnahme der

Gewebskonzentration des Serotonin-Hauptmetaboliten HIAA, sowie eine verringerte Gewebskonzentration von Serotonin ipsilateral zur Stimulation.

Die Veränderungen im dopaminergen System lassen sich sowohl mit einer vermehrten Freisetzung als auch mit einer gesteigerten Synthese erklären, im Fall des serotoninergen Systems entsprechend mit einer verminderten Freisetzung bzw. einer reduzierten Synthese. Ob beide Mechanismen, entweder jeweils einzeln oder in Kombination, den Beobachtungen zugrunde liegen, konnte im Rahmen des gewählten experimentellen Ansatzes nicht geklärt werden, wird jedoch ausführlich diskutiert.

Die nach unilateraler Stimulation nachweisbaren bilateralen Veränderungen der Transmitterkonzentrationen im striatalen Gewebe könnten durch kreuzende Faserbahnen zwischen den Basalganglien erklärt werden und damit das neurochemische Korrelat für die klinische Beobachtung einer bilateralen Verbesserung von Parkinson-Symptomen nach unilateraler STN-HFS darstellen^{38;62;102}.

Die chronische HFS des STN beeinflusst sowohl das dopaminerge als auch das serotoninerge System. Die guten klinischen Erfolge der STN-HFS in Bezug auf die Behandlung motorischer Symptome bei Parkinson-Patienten wären hierdurch teilweise erklärbar (Verbesserung aller L-Dopa-responsiven Symptome).

Jedoch ist auch die klinische Beobachtung eines Auftretens psychotroper Nebenwirkungen unter STN-HFS mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie teilweise erklärbar. Ob diese Verhaltensänderungen unter STN-HFS tatsächlich auf stimulationsabhängige Veränderungen in den Transmittersystemen zurückgeführt werden können oder ob es sich dabei um Folgen des Fortschreitens der Parkinson-Krankheit an sich handelt, muss in zukünftigen Studien untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen jedoch die Induktion neurochemischer Veränderungen unter chronischer STN-HFS und stellen daher einen wichtigen Erkenntnisgewinn über die Wirkmechanismen der HFS dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Abosch A, Kapur S, Lang AE, Hussey D, Sime E, Miyasaki JM, Houle S, Lozano AM: Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease does not produce striatal dopamine release. *Neurosurgery* 2003; **53**: 1095-1102.
2. Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F: Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* 2002; **39**: 154-180.
3. Albin RL, Young Ab, Penney JB: The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends in Neuroscience* 1989; **12**: 366-375.
4. Alexander GE, Crutcher MD: Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neuroscience* 1990; **14**: 55-59.
5. Alexander GE, deLong MR, Strick PL: Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 1986; **9**: 357-381.
6. Appleby BS, Duggan PS, Regenber A, Rabins PV: Psychiatric and neuropsychiatric adverse events associated with deep brain stimulation: A meta-analysis of ten years' experience. *Mov Disord* 2007; **22**: 1722-1728.
7. Arbuthnott GW, Fairbrother IS, Butcher SP: Dopamine release and metabolism in the rat striatum: an analysis by in-vivo brain microdialysis. *Pharmacol.Ther* 1991; **3**: 281-293.
8. Baron MS, Vitek JL, Bakay RAE, Green J, Kaneoke Y, Hashimoto T, Turner RS, Woodard JL, Cole SA, McDonald WM, deLong MR: Treatment of advanced Parkinson's disease by GPi pallidotomy: 1-year results of a pilot study. *Ann of Neurology* 1996; **40**: 355-366.
9. Beal MF, Martin JB: Topographical dopamine and serotonin distribution and turnover in rat striatum. *Brain Research* 1985; **358**: 10-15.
10. Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J: Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson's disease. *Appl Neurophysiol* 1987; **50**: 344-346.
11. Benazzouz A, Boraud T, Feger J, Burbaud P, Bioulac B, Gross C: Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment. *Mov Disord* 1996; **11**: 627-632.
12. Benazzouz A, Gao DM, Ni G, Piallat B, Bouali-Benazzouz R, Benbid AL: Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat. *Neuroscience* 2000; **99**: 289-295.

13. Benazzouz A, Gao DM, Ni Z, Benabid AL: High frequency stimulation of the STN influences the activity of dopamine neurons in the rat. *Neuro Report* 2000; **11**: 1593-1596.
14. Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B: Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *European Journal of Neuroscience* 1993; **5**: 382-389.
15. Benazzouz A, Hallett M.: Mechanism of action of deep brain stimulation. *Neurology* 2000; **55**: 13-16.
16. Benazzouz A, Piallat B, Pollak P, Benabid AL: Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. *Neuroscience Letters* 1995; **189**: 77-80.
17. Bergman H, Wichmann T, deLong MR: Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 1990; **249**: 1436-1438.
18. Bergman H, Wichmann T, Karmon B, deLong MR: The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 1994; **72**: 507-520.
19. Bergmann O, Winter C, Meissner W, Harnack D, Kupsch A, Morgenstern R, Reum T: Subthalamic high-frequency stimulation induced rotations are differentially mediated by D1 and D2 receptors. *Neuropharmacology* 2004; **46**: 974-983.
20. Bertler A: Occurrence and localization of catecholamines in the human brain. *Acta Physiol.Scand.* 1961; **51**: 97-107.
21. Bertler A, Rosengren E : Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia* 1959; **15**: 10-11.
22. Beurrier C, Bioulac B, Audin J, Hammond C: High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 2001; **85**: 1351-1356.
23. Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE: Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 2001; **8**: 229-242.
24. Blöschl L. Depressive Störungen. In: Baumann U, Perez M, eds. Lehrbuch der klinischen Psychologie. Huber, Bern, 1998.
25. Borta A, Höglinger GU: Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 2006; **100**: 587-595.
26. Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U: Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 2002; **249**: 1-5.

27. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur EN, Braak E: Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; **24**: 197-211.
28. Bradley AW, Keyoumars A, Heise CE, Foote K, Torres N, Mitrofanis J, Benabid AL: Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Brain* 2007; **130**: 2129-2145.
29. Breit S, Schulz JB, Benabid AL: Deep brain stimulation. *Cell Tissue Res* 2004; **318**: 275-288.
30. Bruet N, Windels F, Bertrand A, Feuerstein C, Poupard A, Savasta M: High frequency stimulation of the subthalamic nucleus increases the extracellular contents of striatal dopamine in normal and partially dopaminergic denervated rats. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2001; **60**: 15-24.
31. Bruet N, Windels F, Carcenac C, Feuerstein C, Bertrand A, Poupard A, Savasta M: Neurochemical mechanisms induced by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus: increases of extracellular striatal glutamate and GABA in normal and hemiparkinsonian rats. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2003; **62**: 1228-1240.
32. Carelli RM: The nucleus accumbens and reward: neurophysiological investigations in behaving animals. *Behav Cogn Neurosci Rev* 2002; **1**: 281-296.
33. Castaneda E, Whishaw IQ, Robinson TE: Changes in striatal dopamine neurotransmission assessed with microdialysis following recovery from a bilateral 6-OHDA lesion: variation as a function of lesion size. *J Neuroscience* 1990; **10**: 1847-1854.
34. Ceballos-Baumann AO, Boecker H, Bartenstein P, von Falkenhayn I, Riescher H, Conrad B, Moringlane JR, Alesch F: A Positron Emission Tomographic study of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1999; **56**: 997-1003.
35. Charles PD, Van Blercom N, Krack P, Lee SL, Xie J, Besson G, Benabid AL: Predictors of effective bilateral subthalamic nucleus stimulation for PD. *Neurology* 2002; **59**: 932-934.
36. Cheramy A, Barbeito L, Godeheu G, Desce JM, Pittaluga A, Galli T, Artaud F, Glowinski J: Respective contributions of neuronal activity and presynaptic mechanisms in the control of the in vivo release of dopamine. *J Neural Transm Suppl* 1990; **29**: 183-193.
37. Chergui K, Akaoka H, Charléty PJ, Saunier CF, Buda M, Chouvet G: Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurones via NMDA receptors. *Neuroreport* 1994; **5**: 1185-1188.
38. Chung SJ, Jeon SB, Im JH, Kim SR, Lee MC: Bilateral improvement after unilateral subthalamic nucleus stimulation in a patient with advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005; **20**: S71-S72.
39. Cragg SJ, Baufreton J, Xue Y, Bolam JP, Bevan MD: Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus. *European Journal of Neuroscience* 2004; **20**: 1788-1802.

40. Deep brain stimulation for Parkinson's disease study group: Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus or the pars interna of the globus pallidus in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; **345**: 956-963.
41. Delgado JMR. *Gehirnschrittmacher. Direktinformation durch Elektroden*. Ullstein, Frankfurt am Main, 1971.
42. deLong MR: Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neuroscience* 1990; **13**: 281-285.
43. DeLorcy TN, Olsen RW. GABA and glycine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds. *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York, 1994; 389-400.
44. Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deuschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenzl S, Mehdorn HM, Moringlane JR, Oertel WH, Pinski MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier VM, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J: A randomised trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2006; **355**: 896-908.
45. Diamond A, Jankovic J: The effect of deep brain stimulation on quality of life in movement disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; **76**: 1188-1193.
46. Diederich NJ, Alesch F : Neurochirurgische Verfahren zur Behandlung des Morbus Parkinson. *Nervenarzt* 1997; **68**: 466-476.
47. Dingledine R, McBain CJ. Excitatory amino acid transmitters. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds. *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York, 1994; 367-388.
48. Doherty M, Gratton A: Differential involvement of ventral tegmental GABA (A) and GABA (B) receptors in the regulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress. *Brain Research* 2007; **1150**: 62-68.
49. During MJ, Kaplitt MG, Stern MB, Eidelberg D: Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson's disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 1589-1591.
50. Ehringer H, Hornykiewicz O: Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.* 1960; **38**: 1236-1239.
51. Fahn S: Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **991**: 1-14.
52. Fogelson N, Kühn AA , Silberstein P, Limousin P, Hariz MI, Trottenberg T, Kupsch A, Brown P: Frequency dependent effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 2005; **382**: 5-9.

53. Frank MJ, Samantha J, Moustafa AA, Sherman SJ: Hold your horses: Impulsivity, deep brain stimulation, and medication in parkinsonism. *Science* 2007; **318**: 1309-1312.
54. Frielingsdorf H, Schwarz K, Brundin P, Mohapel P: No evidence for new dopaminergic neurons in the adult mammalian substantia nigra. *PNAS* 2004; **101**: 10177-10182.
55. Funkiewiez A, Ardouin C, Caputo E, Krack P, Fraix V, Klingler H, Chabardes S, Foote K, Benabid AL, Pollak P: Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood, and behaviour in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; **75**: 834-839.
56. Funkiewiez A, Ardouin C, Cools R, Krack P, Fraix V, Batir A, Chabardes S, Benabid AL, Robbins TW, Pollak P: Effects of levodopa and subthalamic nucleus stimulation on cognitive and affective functioning in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; **21**: 1656-1662.
57. Funkiewiez A, Ardouin C, Krack P, Fraix V, Van Blercom N, Xie J, Moro E, Benabid AL, Pollak: Acute psychotropic effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation and levodopa in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; **18**: 524-530.
58. Garcia-Munoz M, Young SJ, Groves PM: Terminal excitability of corticostriatal pathway. I. Regulation by dopamine receptor stimulation. *Brain Research* 1991; **14**: 195-206.
59. Gerfen CR: Dopamine receptor function in the basal ganglia. *Clin Neuropharmacol* 1995; **18**: 162-177.
60. Gerfen CR, Staines WA, Arbuthnott GW, Fibige HC: Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 1982; **207**: 283-303.
61. Gerfen CR, Wilson JW. The basal ganglia. In: Swanson LW, Björklund A, Hökfelt T, eds. Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 12. Integrated systems of the CNS Part III. Elsevier Sciences, 1996; 371-468.
62. Germano IM, Gracies JM, Weisz DJ, Tse W, Koller WC, Olanow CW: Unilateral stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: A double-blind 12-months evaluation study. *J Neurosurg* 2004; **101**: 36-42.
63. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan DJ, Mc Carter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P: Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Nat Med* 2003; **9**: 589-595.
64. Goetz T, Arslan A, Wisden W, Wulff P: GABA(A) receptors: structure and function in the basal ganglia. *Prog Brain Res* 2007; **160**: 21-41.
65. Grace AA, Bunney BS: Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: Indirect mediation through reticulata inhibitory neurons. *Eur J Pharmacol* 1979; **59**: 211-218.

66. Haber SN.: The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanatomy* 2003; **26**: 317-330.
67. Hammond C, Deniau JM, Rizk A, Feger J: Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. *Brain Research* 1978; **151** : 235-244.
68. Harnack D, Meissner W, Paulat R, Hilgenfeld H, Müller WD, Winter C, Morgenstern R, Kupsch A: Continuous high-frequency stimulation in freely moving rats: development of an implantable microstimulation system. *J Neurosci Methods* 2008; **167**: 278-291.
69. Hashimoto T, Elder CM, Okun MS, Patrick SK, Vitek JL: Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J Neuroscience* 2003; **23**: 1916-1923.
70. Hautzinger M, de Jong-Meyer R. Depressionen. In: Reinecker H, ed. Lehrbuch der Klinischen Psychologie und Psychotherapie. Hogrefe, Göttingen, 2003.
71. Heien M, Wightman RM: Phasic dopamine signaling during behavior, reward, and disease states. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006; **5**: 99-108.
72. Hery F, Soubrie P, Bourgoin S, Motastruc JL, Artaud F, Glowinski J: Dopamine released from dendrites in the substantia nigra controls the nigral and striatal release of serotonin. *Brain Research* 1980; **193**: 143-151.
73. Hilker R, Voges J, Ghaemi M, Lehrke R, Rudolf J, Koulousakis A, Herholz K, Wienhard K, Sturm V, Heiss WD: Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus does not increase the striatal dopamine concentration in parkinsonian humans. *Mov Disord* 2003; **18**: 41-48.
74. Hornykiewicz O: Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 1998; **51**: 2-9.
75. Hornykiewicz O: Chemical neuroanatomy of the basal ganglia - normal and in Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2001; **22**: 3-12.
76. Hornykiewicz O: The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl* 2006; **70**: 9-15.
77. Hornykiewicz O, Kish SJ: Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1986; **45**: 19-34.
78. Hosobuchi y, Adams JE, Rutkin B: Chronic thalamic stimulation for the control of facial anesthesia dolorosa. *Arch Neurol* 1973; **29**: 158-161.
79. Houeto JL, Mesnage V, Mallet L, Pillon B, Gargiulo M, du Moncel ST, Bonnet AM, Pidoux B, Dormont D, Cornu P, Agid Y: Behavioural disorders, Parkinson's disease and subthalamic stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; **72**: 701-707.

80. Hutchison WD, Allan RJ, Opitz H, Levy R, Dostrovsky JO, Lang AE, Lozano AM: Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Ann Neurology* 1998; **44**: 622-628.
81. Ilinsky IA, Kultas-Ilinsky K, Rosina A, Haddy M: Quantitative evaluation of crossed and uncrossed projections from basal ganglia and cerebellum to the cat thalamus. *Neuroscience* 1987; **21**: 207-227.
82. Imperato A, Di Chiara G: Dopamine release and metabolism in awake rats after systemic neuroleptics as studied by trans-striatal dialysis. *J Neuroscience* 1985; **5**: 297-306.
83. Jahanshahi M, Ardouin C, Brown R, Rothwell J, Obeso JA, Albanese A, Rodriguez-Oroz MC, Moro E, Benabid AL, Pollak P, Limousin-Dowsey P: The impact of deep brain stimulation on executive function in Parkinson's disease. *Brain* 2000; **123**: 1142-1154.
84. Joel D, Weiner I: The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. *Brain Research Reviews* 1997; **23**: 62-78.
85. Justice JB, Nicolaysen LC, Michael AC: Modeling the dopaminergic nerve terminal. *J Neurosci Methods* 1988; **3**: 239-252.
86. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Neurowissenschaften - eine Einführung*, 1. edn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996.
87. Kaufman S. Neurotransmitters. In: Squire LR, Bloom FE, Mc Connell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, eds. *Fundamental Neurosciences*. Academic Press, San Diego, 2003; 165-200.
88. Kirby LG, Allen AR, Lucki I: Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-HT and HIAA. *Brain Research* 1995; **682**: 189-196.
89. Kopin IJ. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, eds. *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York, 2003; 899-933.
90. Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin P, Benazzouz A, Le Bas JF, Benabid AL, Pollak P: Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; **349**: 1925-1934.
91. Krack P, Pollak P, Limousin P, Hoffmann D, Xie J, Benazzouz A, Benabid AL: Subthalamic nucleus or internal pallidal stimulation in young onset Parkinson's disease. *Brain* 1998; **121**: 451-457.
92. Kristensen HK, Lau YY, Ewing AG: Capillary electrophoresis of single cells: observation of two compartments of neurotransmitter vesicles. *J Neurosci Methods* 1993; **2**: 183-188.
93. Kupsch A, Benecke R, Müller J, Trottenberg T, Schneider GH, Poewe W, Eisner W, Wolters A, Müller JU, Deuschl G, Pinski MO, Skogseid IM, Roeste GK, Vollmer-Haase J, Brentrup A, Krause M, Tronnier VM,

- Schnitzler A, Voges J, Nikkhah G, Vesper J, Naumann M, Volkmann J: Pallidal deep-brain stimulation in primary generalized or segmental dystonia. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1978-1990.
94. Kühn AA, Tsui A, Aziz T, Ray N, Brücke C, Kupsch A, Schneider GH, Brown P: Pathological synchronisation in the subthalamic nucleus of patients with Parkinson's disease relates to both bradykinesia and rigidity. *Exp Neurol* 2009; **215**: 380-387.
 95. Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI: Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosurg* 1992; **76**: 53-61.
 96. Lang AE, Lozano AM: Parkinson's disease. First of two parts. *The New England J Med* 1998; **339**: 1044-1053.
 97. Laux G, Dietmaier O. Neurobiochemische Grundlagen. Praktische Psychopharmakotherapie. Elsevier GmbH, München, 2006; 33-46.
 98. Lee KH, Blaha CD, Harris BT, Cooper S, Hitti FL, Leiter JC, Roberts DW, Kim U: Dopamine efflux in the rat striatum evoked by electrical stimulation of the subthalamic nucleus: potential mechanism of action in Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience* 2006; **23**: 1005-1014.
 99. Lee KH, Chang SY, Roberts DW, Kim U: Neurotransmitter release from high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosurg* 2004; **101**: 511-517.
 100. Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH: The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neuroscience* 2002; **22**: 6639-6649.
 101. Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL: Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England J Med* 1998; **339**: 1105-1111.
 102. Linazasoro G, Van BN, Lasa A: Unilateral subthalamic deep brain stimulation in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; **18**: 713-716.
 103. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-275.
 104. Maesawa S, Kaneoke Y, Kajita Y, Usui N, Misawa N, Nakayama A, Yoshida J: Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. *J Neurosurg* 2004; **100**: 679-687.
 105. Mallet L, Polosan M, Jaafari N, Baup N, Welter ML, Fontaine D, du Montcel ST, Yelnik J, Chéreau I, Arbus C, Raoul S, Aouizerate B, Damier P, Chabardes S, Czernecki V, Ardouin C, Krebs MO, Bardinet E, Chaynes P, Burbaud P, Cornu P, Derost P, Bougerol T, Bataille B, Mattei V, Dormont D, Devaux B, Vérin M, Houeto JL, Pollak P, Benabid AL, Agid Y, Krack P, Millt B, Pelissolo A: Subthalamic nucleus stimulation in severe obsessive-compulsive disorder. *N Engl J Med* 2008; **359**: 2121-2134.

106. Mann JJ, Currier D: A review of prospective studies of biologic predictors of suicidal behaviour in mood disorders. *Arch Suicide Res* 2007; **11**: 3-16.
107. Martinez-Fong D, Rosales MG, Gongora-Alfaro JL, Hernandez S, Aceves J: NMDA-receptor mediates dopamine release in the striatum of unanaesthetized rats as measured by brain microdialysis. *Brain Research* 1992; **595**: 309-315.
108. Maurice N, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM: Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neuroscience* 2003; **23**: 9929-9936.
109. Meissner W, Harnack D, Paul G, Reum T, Sohr R, Morgenstern R, Kupsch A: Deep brain stimulation of subthalamic neurons increases striatal dopamine metabolism and induces contralateral circling in freely moving 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience Letters* 2002; **328**: 105-108.
110. Meissner W, Harnack D, Reese R, Paul G, Reum T, Ansorge M, Kusserow H, Winter C, Morgenstern R, Kupsch A: High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus enhances striatal dopamine release and metabolism in rats. *Journal of Neurochemistry* 2003; **85**: 601-609.
111. Meissner W, Leblois A, Hansel D, Bioulac B, Gross C, Benazzouz A, Boraud T: Subthalamic high-frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain* 2005; **128**: 2372-2382.
112. Meissner W, Reum T, Paul G, Harnack D, Sohr R, Morgenstern R, Kupsch A: Striatal dopaminergic metabolism is increased by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neuroscience Letters* 2001; **303**: 165-168.
113. Mink JW. The Basal Ganglia. In: Squire LR, Bloom FE, Mc Connell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, eds. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, **San Diego**, 2003; 815-839.
114. Miyasaki JM, Suchowersky WMO, Weiner WJ, Lang AE: Practice parameter: Initiation of treatment for Parkinson's disease: An evidence-based review: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2006; **58**: 11-17.
115. MOrgan S, Huston JP: The interhemispheric projection from the substantia nigra to the caudate-putamen as depicted by the anterograde transport of [3H]leucine. *Behav Brain Res* 1990; **38**: 155-162.
116. Mundinger F, Neumuller H: Programmed stimulation for control of chronic pain and motor diseases. *Appl Neurophysiol* 1982; **45**: 102-111.
117. Mundinger F, Riechert T: Die stereotaktischen Hirnoperationen zur Behandlung extrapyramidaler Bewegungsstörungen (Parkinsonismus und Hyperkinesien) und ihre Resultate. *Fortschr Neurol Psychiatrie* 1963; **31**: 1-65.

118. Nieoullon A, Cheramy A, Glowinski J: Interdependence of the nigrostriatal dopaminergic systems on the two sides of the brain in the rat. *Science* 1977; **198**: 416-418.
119. Parent A, Hazrati LN: Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews* 1995; **20**: 91-127.
120. Parent A, Hazrati LN: Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Research Reviews* 1995; **20**: 128-154.
121. Paul G, Reum T, Meissner W, Marbrurger A, Sohr R, Morgenstern R, Kupsch A: High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus influences striatal dopaminergic metabolism in the naive rat. *Neuro Report* 2000; **11**: 441-444.
122. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York, 1986.
123. Perlmutter JS, Mink JW: Deep Brain Stimulation. *S. Annu Rev Neurosci* 2006; **29**: 229-257.
124. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH: Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 1998; **82**: 443-468.
125. Reese R, Winter C, Nadjar A, Harnack D, Morgenstern R, Kupsch A, Bezard E, Meissner W: Subthalamic stimulation increases striatal tyrosine hydroxylase phosphorylation. *Neuroreport* 2008; **19**: 179-182.
126. Ricardo JA: Efferent connections of the subthalamic region in the rat I. The subthalamic nucleus of Luys. *Brain Research* 1980; **202**: 257-271.
127. Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA, Lang AE, Houeto JL, Pollak P, Rehncrona S, Kulisevsky J, Albanese A, Volkmann J, Hariz MI, Quinn NP, Speelman JD, Guridi J, Zamarbide I, Gironell A, Molet J, Pascual-Sedano B, Pidoux B, Bonnet AM, Agid Y, Xie J, Benabid AL, Lozano AM, Saint-Cyr J, Romito L, Contarino MF, Scerrati M, Fraix V, Van Blercom N: Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain* 2005; **128**: 2240-2249.
128. Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Guridi J, Mewes K, Chockkman V, Vitek JL, deLong MR, Obeso JA: The subthalamic nucleus in Parkinson's disease: somatotropic organization and physiological characteristics. *Brain* 2001; **124**: 1777-1790.
129. Russmann H, Ghika J, Combremont P, Villemure JG, Bogousslavsky J, Burkhard PR, Vingerhoets FJ: L-DOPA-induced dyskinesia improvement after STN-DBS depends upon medication reduction. *Neurology* 2004; **63**: 153-155.
130. Saint-Cyr J, Trépanier LL, Kumar R, Lozano AM, Lang AE: Neuropsychological consequences of chronic bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Brain* 2000; **123**: 2091-2108.

131. Salin P, Manrique C, Forni C, Kerkerian-Le Geoff L: High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus selectively reverses dopamine denervation-induced cellular defects in the output structures of the basal ganglia in the rat. *J Neuroscience* 2002; **22**: 5137-5148.
132. Sano I, Gamo T, Kakimoto Y, Taniguchi K, Takesada M, Nishinuma K: Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochem.Biophys.Acta* 1959; **32**: 586-587.
133. Schapira AHV: Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; **76**: 1472-1478.
134. Schultz W: Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 1997; **7**: 191-197.
135. Schuurman PR, Bosch DA, Bossuyt PM, Bonsel GJ, van Someren EJ, de Bie RM, Nerkus MP, Speelman JD: A comparison of continuous thalamic stimulation and thalamotomy for suppression of severe tremor. *N Engl J Med* 2000; **342**: 461-468.
136. Schüpbach WMM, Chastan N, Welter ML, Houeto JL, Mesnage V, Bonnet AM, Czernecki V, Maltete D, Hartmann A, Mallet L, Pidoux B, Dormont D, Navarro S, Cornu P, Mallet A, Agid Y: Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: a 5 year follow-up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; **76**: 1640-1644.
137. Schwarting RKW, Huston JP: Unilateral 6-Hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Progress in Neurobiology* 1996; **49**: 215-266.
138. Sestini S, Scotto di Luzio S, Ammannati F, De Cristofaro MT, Passeri A, Martini S, Pupi A: Changes in regional cerebral blood flow caused by deep-brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *J Nucl Med* 2002; **43**: 725-732.
139. Shen KZ, Zhu ZT, Munhall A, Johnson SW: Synaptic plasticity in rat subthalamic nucleus induced by high-frequency stimulation. *Synapse* 2003; **50**: 314-319.
140. Basal ganglia neural responses during behaviorally effective deep brain stimulation of the STN in rats performing a treadmill locomotion test. *Synapse* **59**, 445-457. 2006.
141. Siegfried J: Sensory thalamic neurostimulation for chronic pain. *Pacing Clin Electrophysiol* 1987; **10**: 209-212.
142. Smith KA, Fairburn CG, Cowen PJ: Relapse of depression after rapid depletion of tryptophan. *Lancet* 2008; **349**: 915-919.
143. Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP: Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 1998; **86**: 353-387.

144. Soghomonian JJ, Doucet G, Descarries L: Serotonin innervation in adult rat neostriatum. I. Quantified regional distribution. *Brain Research* 1987; **425**: 85-100.
145. Stefani A, Fedele E, Galati S, Raiteri S, Pepicelli O, Brusa L, Pierantozzi M, Peppe A, Pisani A, Gattoni G, Hainsworth AH, Bernardi G, Stanzione P, Mazzone P: Deep brain stimulation in Parkinson's disease patients: biochemical evidence. *J Neural Transm Suppl* 2006; **70**: 401-408.
146. Steiner B, Winter C, Hosmann K, Siebert E, Kempermann G, Petrus DS, Kupsch A: Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2006; **199**: 291-300.
147. Strafella A, Sadikot AF, Dagher A: Subthalamic deep brain stimulation does not induce striatal dopamine release in Parkinson's disease. *Neuroreport* 2003; **14**: 1287-1289.
148. Svännilson E, Torvik A, Lowe R, Leksell L: Treatment of parkinsonism by stereotactic thalamotomies in the pallidal region. A clinical review of 81 cases. *Acta Psychiatr Scand* 1960; **35**: 358-377.
149. Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C, Benazzouz A: Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus tames neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J* 2003; **17**: 1820-1830.
150. Taira T, Hori T: Stereotactic ventrooralis thalamotomy for task-specific focal hand dystonia (writer's cramp). *Stereotact Funct Neurosurg* 2003; **80**: 88-91.
151. Tandberg E, Larsen JP, Aarsland D, Cummings JL: The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study. *Arch Neurol* 1996; **53**: 175-179.
152. Temel Y, Boothman LJ, Blokland A, Magill PJ, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V, Sharp T: Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *PNAS* 2007; **104**: 17087-17092.
153. Temel Y, Kessels A, Tan S, Topdaq A, Boon P, Visser-Vandewalle V: Behavioural changes after bilateral subthalamic stimulation in advanced Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat.Disord.* 2006; **12**: 265-272.
154. Thobois S, Mertens P, Guenot M, Hermier M, Mollion H, Bouvard M, Chazot G, Broussolle E, Sindou M: Subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease: clinical evaluation of 18 patients. *J Neurol* 2002; **249**: 529-534.
155. Timmerman W, Westerink BHC: Brain microdialysis of GABA and glutamate: What does it signify? *Synapse* 1997; **27**: 242-261.
156. Umemura A, Jaggi JL, Hurtig HI, Siderowf A, Colcher A, Stern MB, Baltuch GH: Deep brain stimulation for movement disorders: morbidity and mortality in 109 patients. *J Neurosurg* 2003; **98**: 779-784.

157. Velasco F, Velasco M, Ogarrio C, Fanghanel G: Electrical stimulation of the centromedian thalamic nucleus in the treatment of convulsive seizures: a preliminary report. *Epilepsia* 1987; **28**: 421-430.
158. Visser-Vandewalle V, Temel Y, van der Linden C, Celik H, Ackermans L, et al: Long-term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation in advanced Parkinson's disease: a four year follow-up study. *Parkinsonism Relat.Disord.* 2005; **11**: 157-165.
159. Walsh FX, Langlais PJ, Bird ED: Dopamine and homovanillic acid concentrations in striatal and limbic regions of human brain. *Ann of Neurology* 1982; **12**: 52-55.
160. Waselus M, Galvez JP, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ: Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *J Chem Neuroanatomy* 2006; **31**: 233-242.
161. Wichmann T, deLong MR : Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **991**: 199-213.
162. Wichmann T, deLong MR : Deep brain stimulation for neurologic and neuropsychiatric disorders. *Neuron* 2007; **52**: 197-204.
163. Widman R, Sperk G: Topographical distribution of amines and major amine metabolites in the rat striatum. *Brain Research* 1986; **367**: 244-249.
164. Windels F, Bruet N, Poupard A, Urbain N, Chouvet G, Feuerstein C, Savasta M: Effects of high-frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in normal rats. *European Journal of Neuroscience* 2000; **12**: 4141-4146.
165. Winter C, Lemke C, Sohr R, Meissner W, Harnack D, Juckel G, Morgenstern R, Kupsch A: High frequency stimulation of the subthalamic nucleus modulates neurotransmission in limbic brain regions of the rat. *Exp Brain Res* 2008; **185**: 497-507.
166. Yamamoto BK, Davy S: Dopaminergic modulation of glutamate release in the striatum as measured by microdialysis. *J Neurochem* 1992; **58**: 1736-1742.
167. Yung KKL, Bolam JP: Localization of D1 and D2 receptors in the rat neostriatum: Synaptic interaction with glutamate- and GABA-containing axonal terminals. *Synapse* 2000; **38**: 413-420.
168. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM: Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 7925-7930.

7. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Andreas Kupsch, Oberarzt an der Klinik für Neurologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, für die Unterstützung meiner Dissertation in der Klinik für Neurologie.

Besonderen Dank möchte ich Dr. Daniel Harnack aussprechen für alle Diskussionen und Ideen, die der Grundstein dieser Arbeit sind. Durch seine engagierte und umfangreiche wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung, insbesondere bei den schwierigen Operationen, wurde diese Arbeit erst möglich.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Reinhard Sohr bedanken für die Einweisung in die Benutzung der Analysegeräte, seine großzügige Hilfe bei allen technischen Problemen, ferner für das Messen der Aminosäure-Konzentrationen und für kurzweilige Gespräche während unendlich langer Analysestunden.

Ich möchte mich gerne auch bei Renate Winter und Christiane Kölske bedanken. Durch ihr technisches Wissen und ihre effektive Arbeit, insbesondere das Anfertigen der Hirnschnitte und die Proteinbestimmung in den Proben, wurde die Durchführung der Arbeit sehr erleichtert.

Mein spezieller Dank geht an Julia Jira, welche mir als liebe Kollegin stets mit guten Tipps und Ratschlägen unterstützend zur Seite stand.

Dank gilt auch Prof. Dr. Rudolf Morgenstern, stellvertretender Direktor des Instituts für Pharmakologie Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, der die Laborräume, in denen alle Operationen, Versuche und Messungen stattgefunden haben, zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke meiner Familie und meinem Freund Christian für ihre uneingeschränkte Unterstützung und nachhaltige Motivation.

8. Erklärung zur Selbständigkeit

„Ich, Christina van Delden, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss der chronischen unilateralen Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus auf die neurochemische Transmission im Striatum naiver Ratten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Christina van Delden

9. Lebenslauf

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