

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

DISSERTATION

**Die Rolle der dopaminergen  
Degeneration in VTA und SNc in der  
Entwicklung depressiven Verhaltens im  
Tiermodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Anke von Rumohr  
aus Frankenthal

Gutachter:       1.   Prof. Dr. med. A. Kupsch  
                      2.   Prof. Dr. med. M. Bajbouj  
                      3.   Prof. Dr. med. A. Storch

Datum der Promotion:       14.3.2008

## **Meiner Familie und Ebi**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
1.1	Übersicht.....	11
1.2	<b>Das idiopathische Parkinson-Syndrom.....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Pathophysiologie des IPS .....	12
1.2.2	Therapieansätze des IPS.....	15
1.3	<b>Depression im Rahmen affektiver Störungen.....</b>	<b>16</b>
1.3.1	Pathophysiologie der Depression im Rahmen affektiver Störungen .....	16
1.3.2	Therapieansätze der Depression im Rahmen affektiver Störungen .....	17
1.4	<b>Depressive Symptome bei Parkinsonpatienten .....</b>	<b>17</b>
1.4.1	Pathophysiologie depressiver Symptome bei Parkinsonpatienten .....	20
1.4.2	Therapieansätze der depressiven Symptome bei Parkinsonpatienten.....	21
1.5	<b>Notwendigkeit von Tierversuchen .....</b>	<b>23</b>
1.6	<b>Tierexperimentelle Modelle des IPS .....</b>	<b>23</b>
1.6.1	Das 6-OHDA-Modell des Nagers .....	23
1.7	<b>Tierexperimentelle Modelle der Depression .....</b>	<b>24</b>
1.7.1	Das Learned- Helplessness- Modell mit Skinner-Box.....	25
1.8	<b>Wissenschaftliche Fragestellung.....</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
2.1	<b>Tiere .....</b>	<b>27</b>
2.1.1	Versuchstiere .....	27
2.1.2	Haltungsbedingungen.....	27
2.2	<b>Material .....</b>	<b>27</b>
2.2.1	Verwendete Substanzen.....	27
2.2.2	Pufferlösungen .....	28
2.3	<b>Versuchsaufbau.....</b>	<b>28</b>
2.4	<b>Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.4.1	Operationsmethoden .....	29
2.4.2	Das Learned- Helplessness- Modell.....	32
<b>4</b>		

2.4.3	Rotationsverhalten .....	34
2.4.4	Transkardiale Perfusion.....	36
2.4.5	Aufarbeitung Paraformaldehyd- fixierter Gehirne .....	36
<b>2.5</b>	<b>Histologie/ Immunzytochemie.....</b>	<b>36</b>
2.5.1	Kresylviolett- Färbung nach Nissl.....	36
2.5.2	Tyrosinhydroxylase- Immunreaktion.....	37
2.5.3	Stereologische Auszählung.....	39
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Gruppeneinteilung .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Rotationsverhalten.....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Einfluss der VTA-Läsion auf das Rotationsverhalten.....	43
3.2.2	Einfluss der SNc-Läsion auf das Rotationsverhalten.....	44
<b>3.3</b>	<b>LH-Verhalten .....</b>	<b>45</b>
3.3.1	Kontrollgruppe.....	46
3.3.2	Einfluss der VTA-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der mittleren Latenz .....	46
3.3.3	Einfluss der SNc-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der mittleren Latenz.....	47
3.3.4	Einfluss der VTA-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der Anzahl des Tastendrucks	48
3.3.5	Einfluss der SNc-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der Anzahl des Tastendrucks..	50
3.3.6	Einfluss der VTA-Läsion auf LH-Verhalten.....	51
3.3.7	Einfluss der SNc-Läsion auf LH-Verhalten .....	52
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Kritische Betrachtung der Tiermodelle.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Kritische Betrachtung der stereologischen Gruppeneinteilung.....</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Kritische Betrachtung der Rotationsverhaltens-Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>Kritische Betrachtung der LH-Verhaltens-Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
4.4.1	Beurteilung des LH-Verhaltens .....	60
4.4.2	Einfluss der VTA-Läsion auf die Entwicklung von LH-Verhalten .....	60
4.4.3	Einfluss der SNc-Läsion auf die Entwicklung von LH-Verhalten.....	61
<b>4.5</b>	<b>Modulation des LH-Verhaltens durch Neuropharmaka .....</b>	<b>62</b>
4.5.1	Einfluss einer Therapie auf LH-Verhalten, gemessen an der mittleren Latenz.....	62

4.5.2	Einfluss einer Therapie auf LH-Verhalten.....	63
4.6	Klinische Relevanz.....	65
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	67
	LITERATURVERZEICHNIS .....	68
	DANKSAGUNG.....	80
	LEBENS LAUF.....	81
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	82

## Abkürzungsverzeichnis

<b>6-OHDA</b>	6-Hydroxydopamin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AD</b>	Antidepressiva
<b>AK</b>	Antikörper
<b>BDI</b>	Beck-Depressions-Inventar
<b>COMT</b>	Catechol-O-Methyltransferase
<b>CV</b>	cresyl violet (Kresylviolett)
<b>DA</b>	Dopamin
<b>Enk</b>	Enkephalin
<b>EKT</b>	Elektrokrampftherapie
<b>GABA</b>	Gammaaminobuttersäure
<b>Glu</b>	Glutamat
<b>GPI</b>	Globus pallidus internus
<b>GPe</b>	Globus pallidus externus
<b>HAMD</b>	Hamilton-Depressions-Skala
<b>ICD</b>	International Classification of Diseases
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>IPS</b>	idiopathisches Parkinson-Syndrom
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LH</b>	learned helplessness = erlernte Hilflosigkeit
<b>L-Dopa</b>	Levodopa
<b>MAO-B</b>	Monoaminoxidase-B

<b>MP</b>	Morbus Parkinson
<b>n</b>	Anzahl der Tiere
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>Nucl.</b>	Nucleus
<b>OT</b>	Objektträger
<b>PET</b>	Positronenemissionstomographie
<b>ROI</b>	region of interest
<b>sc</b>	subkutan
<b>SDM</b>	standard deviation of means = Standardabweichung des Mittelwertes
<b>SEM</b>	standard error of means = Standardfehler des Mittelwertes
<b>SHAPS</b>	Snaith-Hamilton-Pleasure-Scale
<b>SNe</b>	Substantia nigra pars compacta
<b>SNr</b>	Substantia nigra pars reticulata
<b>SSRI</b>	Serotonin-selektive Wiederaufnahmehemmer
<b>STN</b>	Nucleus subthalamicus
<b>TH</b>	Tyrosinhydroxylase
<b>VTA</b>	Area tegmentalis anterior = ventrales Tegmentum
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem



## **Abstract (englisch)**

The Idiopathic Parkinson Syndrome is one of the most frequent neurological diseases. Up to 40% of Parkinson patients suffer from depression, which represents the most frequent psychiatric symptom. The pathophysiological mechanisms underlying Parkinson's disease associated depression are not well understood yet. Purpose of this study was to gain insights into pathomechanisms of Parkinson's disease associated depression. In this study, the impact of selective dopaminergic degeneration on the development of depressive behaviour in rats was investigated. The Learned-helplessness model was used as an animal model of depression. By intracerebral 6-hydroxydopamine application a selective degeneration of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and the substantia nigra pars compacta of rats was induced. The influence of the dopaminergic degeneration on the development of LH behaviour was examined. According to post mortem stereological analysis, animals were assigned to different experimental groups according to the degree of the dopaminergic degeneration in the SNc or VTA, respectively. Dopaminergic degenerations within the VTA as well as the SNc increase the probability of LH-behaviour. Our hypothesis of the dopaminergic system, especially the VTA and the SNc, playing a key role in the development of Parkinson's disease associated depression could be confirmed experimentally in an animal model for the first time.

**Key Words:** Morbus Parkinson, Depression, Dopamine, Learned Helplessness, Substantia nigra pars compacta, Ventral Tegmental Area, Rat

## **Abstract (deutsch)**

Beim idiopathischen Parkinson-Syndrom handelt es sich um eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Häufigstes psychiatrisches Symptom sind depressive Störungen, die bei durchschnittlich 40% der Parkinson-Patienten auftreten. Die pathophysiologischen Mechanismen der Parkinson assoziierten Depression sind bislang noch nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit war es, das ungenügende Verständnis dieser Pathomechanismen zu erweitern. In dieser Studie wurde der Einfluss einer selektiven dopaminergen Degeneration auf die Entwicklung von depressivem Verhalten bei Ratten untersucht. Als Tiermodell der Depression wurde das Learned-helplessness-Modell verwendet. Mittels 6-Hydroxydopamin wurde eine Degeneration dopaminergener Neurone im ventralen Tegmentum (VTA) und der Substantia nigra pars compacta (SNc) der Ratte herbeigeführt und die Effekte dieses Neuronenverlustes auf die Entwicklung von LH-Verhalten der Tiere untersucht. Post mortem erfolgte mittels stereologischer Auszählung eine Gruppeneinteilung entsprechend dem Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc einerseits und in der VTA andererseits. Sowohl eine dopaminerge Degeneration in der VTA, als auch eine nigrale Degeneration erhöhen das Auftreten von LH-Verhalten. Die Hypothese, dass das dopaminerge System, insbesondere die VTA und die SNc, einen entscheidenden Einfluss bei der Entwicklung der Parkinson assoziierten Depression spielt, konnte erstmals tierexperimentell bestätigt werden.

**Schlüsselwörter:** Morbus Parkinson, Depression, Dopamin, Learned-helplessness, Substantia nigra pars compacta, Ventrales Tegmentum, Ratte

# **1 Einleitung**

## **1.1 Übersicht**

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) gehört mit einer Prävalenz von 100-200/100.000 Einwohnern in Deutschland zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Neben der motorischen Hauptsymptomatik fällt der Depression als häufigstem psychiatrischen Symptom und Frühsymptom eine herausragende Bedeutung zu. Ziel dieser Arbeit war es, einen Teil zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Parkinson-assoziierten Depression beizutragen. Beim IPS kommt es zu einem Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc), aber auch in anderen Bereichen wie dem mesocorticolimbischen System. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass insbesondere der extranigrale dopaminerge Neuronenuntergang entscheidend zur Entwicklung depressiver Störungen beiträgt. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des dopaminergen Systems bei der Manifestation depressiven Verhaltens im Tiermodell an der Ratte untersucht. Anhand des Learned-Helplessness-Tiermodells (LH-Modell) wurde die Auswirkung der selektiven Degeneration dopaminerger Neurone in der Area tegmentalis anterior = ventrales Tegmentum (VTA) und SNc auf die Entwicklung von depressivem Verhalten untersucht. Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen könnte klinische Relevanz erlangen durch Entwicklung neuer Therapiestrategien.

In der folgenden Einleitung wird zunächst eine Übersicht über den aktuellen Wissensstand und über die Theorien zur Pathophysiologie und zu Behandlungsmöglichkeiten des IPS, depressiver Störungen und insbesondere der Parkinsonassoziierten Depression dargestellt, die in einem inhaltlichen Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen. Anschließend wird die Entwicklung des experimentellen Designs und die Auswahl der Tiermodelle erläutert. Die Einleitung endet mit der Herleitung der Fragestellungen und Hypothesen dieser Arbeit.

## **1.2 Das idiopathische Parkinson-Syndrom**

Im Jahre 1817 beschrieb der britische Arzt James Parkinson erstmals unter dem Namen „shaking palsy“ die Symptomentrias Tremor, Rigor und Akinese als einheitliches Krankheitsbild (Parkinson 1817). Der Neurologe Charcot führte im Jahre 1884 die Bezeichnung Morbus Parkinson (MP) ein (Goetz 1986). Beim MP - Synonym, Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) - handelt es sich um ein Syndrom, welches heutzutage anhand der diagnostischen Kriterien der London Brain Bank definiert wird.

Zur Diagnose müssen zwei der drei folgenden Kriterien vorliegen: Bradykinese und zusätzlich entweder Tremor oder Rigor. Fakultative Begleitsymptome umfassen sensorische Symptome wie Dysästhesien und Schmerzen.

Bei bis zu 60% der Patienten findet sich zusätzlich mindestens ein psychiatrisches Symptom wie Depressionen, dementielle Erkrankungen und Schlafstörungen (Aarsland et al. 1999). Hiervon bilden depressive Störungen die häufigsten neuropsychiatrischen Störungen (Cummings 1992) und sie können die Erstmanifestation einer Parkinson-Erkrankung darstellen beziehungsweise dem Parkinsonsyndrom vorangehen (Haltenhof et al. 1994, Leentjens et al. 2003).

Das idiopathische Parkinson-Syndrom zählt zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. In Europa liegt die Prävalenz in der Altersgruppe der über 65-Jährigen bei 2-3%, bei den über 80-Jährigen steigt die Prävalenz auf bis zu 10% an (von Campenhausen et al. 2005). Aufgrund der gesteigerten Lebenserwartung ist mit einer zunehmenden Anzahl von Patienten zu rechnen.

Ein klinisches Staging der Erkrankung erfolgt gemäß der Stadienbestimmung nach Hoehn und Yahr (Hoehn und Yahr 1967) und der Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), einer standardisierten Skala klinischer Befunde.

### **1.2.1 Pathophysiologie des IPS**

Beim IPS handelt es sich um eine degenerative Basalganglienerkrankung ungeklärter Ätiologie mit einem Untergang dopaminerger Neurone in der SNc. Diskutiert werden genetische (Gasser 1998) und Umweltfaktoren (Tanner und Langston 1990), die die Degeneration dopaminerger Neurone in der SNc verursachen können. Modelle der funktionellen Anatomie der Basalganglien basieren auf Daten aus Tierexperimenten, humanen anatomischen post-mortem Studien und neurochemischen Daten. Funktionell sind die Basalganglien in neuronale Netzwerke eingebunden, welche auch Thalamus und Cortex miteinschließen (Alexander et al. 1986). Der Informationsfluss innerhalb dieser Netzwerke beeinflusst motorische, affektive und kognitive Vorgänge.

Am besten untersucht ist die motorische Komponente (Alexander et al. 1990). In der folgenden Abbildung (Abb.1) ist ein stark vereinfachtes Modell der komplex verschalteten motorischen Schleife nach Alexander et al. 1990 dargestellt. Sie erhält glutamaterg erregende kortikale Zuströme aus dem prämotorischen und assoziativen Kortex. Als Eintrittspforte der Basalganglien dient das Striatum (Putamen und Nucl. caudatus). Das Striatum kann auf einem direkten Weg, oder indirekt über Zwischenschaltung des Nucl. subthalamicus (STN), die Aktivität des internen

Pallidumsegments (GPI), der Austrittspforte zum motorischen Thalamus, modifizieren. Der GPI wirkt über GABA hemmend auf den Thalamus, dieser wiederum schließt die Informationsschleife durch seine glutamaterg erregenden Efferenzen zum Cortex. Somit wird der hemmende Einfluss des GPI über den direkten Weg gehemmt, was insgesamt die Erregung des Cortex und damit die Motorik fördert. Über den indirekten Weg wird der hemmende Einfluss des GPI gefördert, was insgesamt den Informationsfluss zum Cortex hemmt. Über den direkten Weg bewirken GABAerge Impulse mit dem Kotransmitter Substanz P vom Striatum aus eine Hemmung des Ausgangskernes GPI. Der indirekte Weg verläuft vom Striatum mit dem Transmitter GABA und dem Kotransmitter Enkephalin über den Globus pallidus externus (GPe) (GABA) zum STN (GABA) und von dort über aktivierende (glutamaterge) Efferenzen zu den Ausgangskernen.

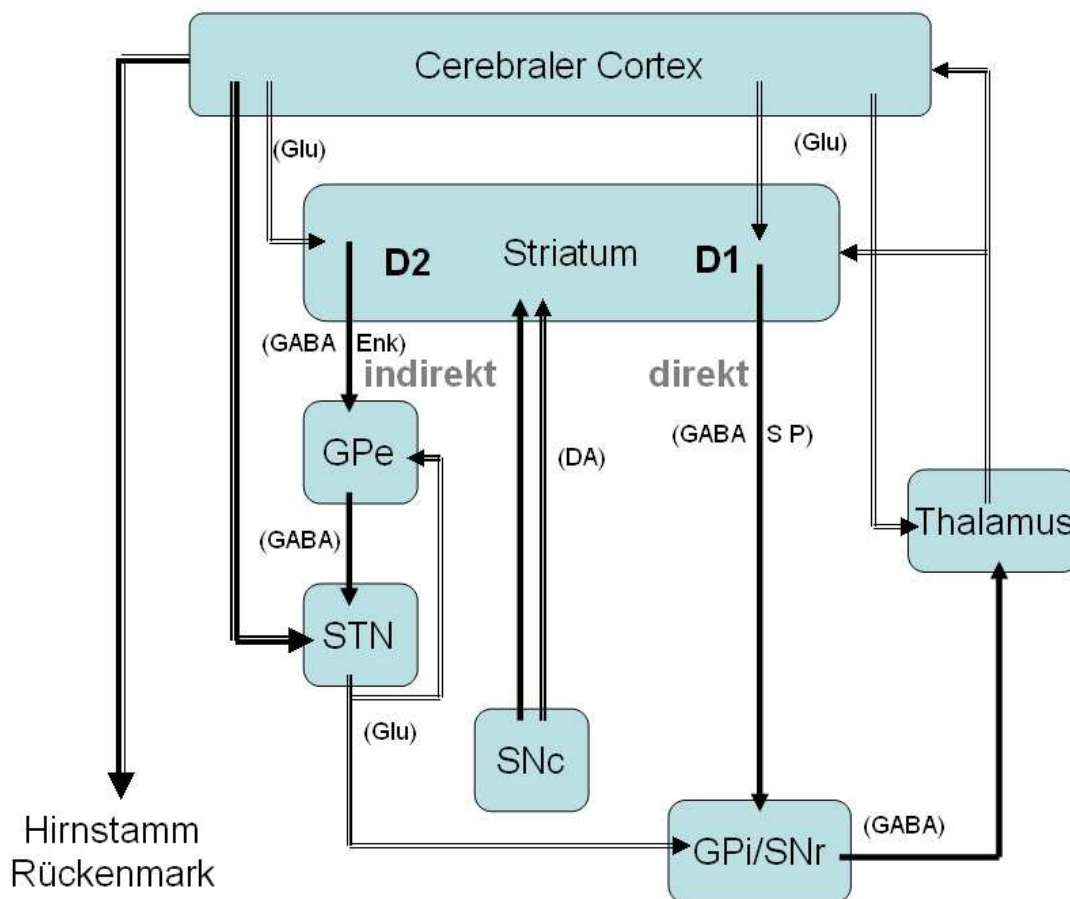


Abb. 1 Schematische Darstellung der motorischen Schleife nach Alexander et al. 1990. Glu = Glutamat, GABA = Gammaaminobuttersäure, Enk = Enkephalin, S P = Substanz P. Schwarze Pfeile inhibitorische Verbindungen, weiße Pfeile exzitatorische Verbindungen.

Im Striatum befinden sich als weitere neuronale Zellpopulation cholinerge Interneurone, die ebenfalls die Aktivität der Projektionsneurone regulieren.

Die Aktivität der beiden Wege wird kontrolliert durch dopaminerge Projektionen aus der SNc. Das Striatum besitzt zwei Arten von Dopaminrezeptoren (D1- und D2-Rezeptoren), über die es modulierend auf beide Wege wirkt (Contreras-Vidal und Stelmach 1995). Die Neurone des direkten Weges werden primär über postsynaptische D1-Rezeptoren aktiviert, die Neurone des indirekten Weges werden primär über postsynaptische D2-Rezeptoren gehemmt. Folglich führt Dopaminmangel zu einer verstärkten Transmission über den indirekten, den die Motorik hemmenden Weg, und verminderter Transmission über den direkten, den die Motorik fördernden Weg (Abb.2).

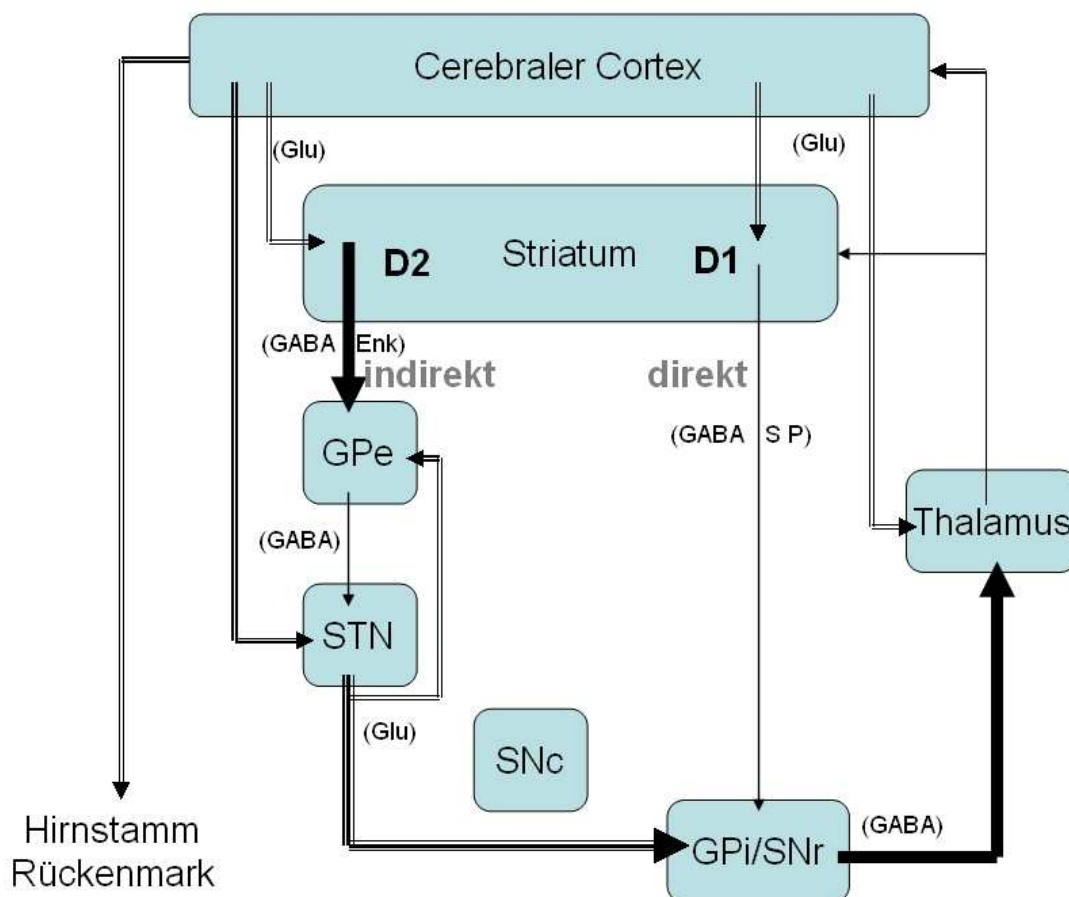


Abb. 2 Schematische Darstellung der pathologischen motorischen Schleife, modifiziert nach Alexander et al. 1990 und Bezard et al. 1998.

Somit entsteht das typische hypokinetisch-rigide Syndrom im Rahmen des IPS, welches durch Untergang von dopaminergen Neuronen in der SNc hervorgerufen wird (Wichmann et al. 1996). Mehr als 50-60% der Perikaryen in der SNc und 70-80% der striatalen Nervenendigungen müssen zugrunde gehen, bevor es zur klinischen Manifestation des Morbus Parkinson kommt (Bezard et al. 1998; Agid 1991). Zudem sind andere Gehirnregionen betroffen einschließlich des ventralen Tegmentums (VTA), des Locus coeruleus, des dorsalen Raphe-Kerns, des Nucleus basalis Meynert und Anteile des Hypothalamus (Jellinger 1991).

### **1.2.2 Therapieansätze des IPS**

Es gibt keine kurative Therapie des Morbus Parkinson. Zur symptomatischen Behandlung werden pharmakologische, operative, physiotherapeutische und psychosoziale Maßnahmen eingesetzt.

Die medikamentöse Therapie nimmt den höchsten Stellenwert ein. Den pathophysiologischen Mechanismen entsprechend werden Pharmaka verwendet, die in das dopaminerge oder cholinerge System eingreifen und zu einer Wiederherstellung des Transmittergleichgewichtes führen:

1. Dopaminerge Substitution
  1. Dopaminvorstufe L-Dopa
  2. Dopaminagonisten
  3. Dopaminabbau-Hemmer (COMT-Hemmer, MAO-B-Hemmer)
2. Anticholinergika
3. Glutamatantagonisten

Das wirksamste Pharmakon ist die Dopamin-Vorstufe L-Dopa. Diese kann in das ZNS aufgenommen werden und wird nach Decarboxylierung in den verbliebenen nigrostriatalen dopaminergen Zellen als Dopamin an den Synapsen freigesetzt. Zumindest initial führt L-Dopa zu einem gravierenden Rückgang der motorischen Defizite und kann die Lebenserwartung durch Vermeidung krankheitsbedingter Komplikationen signifikant steigern. Nach einer Latenz von 5 Jahren kommt es jedoch bei ungefähr 40% der Patienten zu Wirkungsfluktuationen mit On-Off-Phasen und End-of-dose-Akinesie (Ahlskog and Muenter 2001, Jankovic 2000).

Bei Versagen der medikamentösen Therapie ist der Einsatz invasiver Verfahren zu

erwägen. Stereotaktische Läsions-Operationen werden heute nur noch in Ausnahmefällen durchgeführt. Weit nebenwirkungsärmer ist die stereotaktische Implantation von Stimulationssonden (DBS = Deep brain stimulation) in den STN oder GPi. Am Tiermodell der Ratte gibt es Hinweise darauf, dass durch die DBS sowohl die Dopaminfreisetzung als auch der Dopaminmetabolismus erhöht werden (Meissner et al. 2004). Hierdurch kann eine Reduktion aller Kardinalsymptome erreicht werden. Der Vorteil der Tiefenhirnstimulation liegt in der Reversibilität und der individuellen Anpassung der Stimulationsstärke (Kupsch und Earl 1999). Im experimentellen Stadium, aber eine mögliche zukünftige Therapieoption, ist die Transplantation dopaminerger Zellen.

### **1.3 Depression im Rahmen affektiver Störungen**

In Deutschland leiden 5-10% der Bevölkerung an Depressionen. Zwischen 8-20% der Menschen erkranken im Laufe ihres Lebens mindestens einmal an einer schweren Depression vom Typ Major Depression (Weissman und Myers 1978, Wittchen 1994). Neben einer gedrückten Stimmung ist die depressive Episode begleitet von emotionalen, kognitiven, körperlichen und verhaltensbezogenen Symptomen. Nach der ICD-10 (World Health Organisation, 1992) zählen hierzu unter anderem Interessenverlust, Konzentrationsstörungen, Schlafprobleme, Appetitlosigkeit und Suizidgedanken. Die Diagnose einer Depression wird primär klinisch gestellt auf der Grundlage eines umfangreichen psychopathologischen Befundes, unterstützt durch Selbst- und Fremdbeurteilungsskalen (Beck and Steer 1987, Hamilton 1960).

#### **1.3.1 Pathophysiologie der Depression im Rahmen affektiver Störungen**

Die Ätiopathogenese von Depressionen ist multifaktoriell bedingt. Es gibt verschiedene Erklärungsmodelle zur Genese, bei denen genetische, psychosoziale, psychodynamische und neurobiologische Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Im Folgenden werden vorwiegend die biologischen Faktoren diskutiert.

Eine Hypothese zur Entstehung von Depressionen ist die Monoamindefizithypothese (Schildkraut 1965). Heute ist die verminderte Aktivität der Neurotransmittersysteme unter Beteiligung von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin in vielen Studien belegt (Agren et al. 1991, Amsterdam und Mozley 1992, O'Keane und Dinan 1991). So konnten bei depressiven Patienten strukturelle und funktionelle Auffälligkeiten der Raphekerne (Stockmeier et al. 1998), aber auch präfrontaler Strukturen (George et al. 1993, Goodwin 1997), der Basalganglien (Mendez et al. 1989) und des Gyrus cinguli (Ebert und Ebmeier



1996) gefunden werden. Auch tierexperimentell gibt es zahlreiche Hinweise auf die Bedeutung des präfrontalen Kortex und seiner Projektionen zu den Raphekernen und des Hippocampus in der Pathophysiologie der Depression (Juckel et al. 1999). Diesen Hypothesen entsprechen die Depressionsmodelle von Drevets und Raichle (1992) und Mayberg (1997), nach denen bei Depressionen ein komplexes neuronales Netz geschädigt ist unter Beteiligung limbisch-thalamo-cortikaler und limbisch-striato-pallido-thalamischer Schleifen (Soares und Mann 1997).

Aldenhoff (2000) entwickelte ein psychobiologisches Modell der Depressionsgenese, nach dem ein biologisches oder psychologisches Trauma eine "biologische Narbe" hinterlässt und zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber depressogenen Situationen führt. Der Mensch reagiert mit einer andauernden psychobiologischen Stressantwort, die dem Kontrollverlust in der Theorie der erlernten Hilflosigkeit Seligmans (1974) entspricht, und die schließlich zu einer klinisch manifesten Depression führt. Sapolsky (1996) beschreibt, dass chronisches Erleben von Streß zu strukturellen Veränderungen des Gehirns führen kann.

### **1.3.2 Therapieansätze der Depression im Rahmen affektiver Störungen**

Unipolare Depressionen werden durch supportive Psychotherapie und pharmakologisch mit Antidepressiva (AD) behandelt. Dabei stützt sich die Pharmakotherapie auf psychotherapeutische Behandlungsstrategien.

AD bewirken eine Konzentrationserhöhung der Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin im synaptischen Spalt und werden nach ihren Wirkmechanismen in folgende Gruppen eingeteilt:

1. Nicht-selektive Monoamin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (NSMRI)
2. Serotonin-selektive Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI)
3. Noradrenalinselektive Wiederaufnahme-Inhibitoren (NSRI)
4. Selektive Noradrenalin-Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren
5. Monoaminoxidasehemmer (MAO-Hemmer).

Weitere biologische Therapieverfahren sind die Schlafentzugsbehandlung und die Lichttherapie sowie als Ultima ratio die Elektrokrampftherapie. In mehreren Studien konnte die Wirksamkeit verschiedener psychotherapeutischer Interventionsstrategien belegt werden (Zogg 2000).

## **1.4 Depressive Symptome bei Parkinsonpatienten**

Bereits 1817 wurde von James Parkinson die Verbindung zwischen Depression und dem

IPS bei einem Patienten beschrieben, obwohl er selbst einen Zusammenhang ausschloss (Parkinson 1817). In späteren Arbeiten über den Morbus Parkinson wird regelmäßig auch von depressiven Verstimmungen berichtet (Lemke 2002). Die Häufigkeitsangaben variieren zum Teil erheblich von 4-70% (Hoehn und Yahr 1967, Bieliauskas und Glantz 1989), wobei die niedrigen Werte aus Studien vor Einführung standardisierter Skalen zur Einordnung der Depression stammen (Slaughter et al. 2001). In neueren Untersuchungen aus den letzten 15 Jahren wird von Häufigkeiten zwischen 35-60% berichtet (Tandberg et al. 1996, Anguenot et al. 2002, Kostic et al. 1994). Ursachen der Unterschiede liegen in der Patientenselektion, der Art der Diagnostik und der Schwelle für die Identifizierung von Depressionen. Die durchschnittliche mittlere Häufigkeit liegt bei ungefähr 45% (Lemke 2004). Bei depressiven Störungen handelt es sich um die häufigsten neuropsychiatrischen Komorbiditäten von Parkinson-Patienten (Aarsland et al. 1999). Bei einer Prävalenz des Morbus Parkinson von 0,2% in Deutschland sind bis zu 100.000 dieser Patienten an Depressionen erkrankt. Eine deutliche Bevorzugung des weiblichen Geschlechts - wie bei der unipolaren Depression - konnte nicht gezeigt werden (Ehmann et al. 1990).

Häufig werden die depressiven Störungen irrtümlich als Reaktion auf die zunehmenden motorischen Defizite eingeordnet. Eine Korrelation zwischen der Schwere der Depression und der motorischen Ausfälle besteht jedoch nicht. In einigen Arbeiten werden höhere Depressionswerte im Stadium 1 und 4 nach Hoehn und Yahr (1967) beschrieben (Starkstein et al. 1990a). Andere Studien zeigen keinen Zusammenhang zwischen Krankheitsstadien und depressiver Symptomatik. Huber et al. konnten darlegen, dass depressive Symptome wie Stimmungsschwankungen und Selbstvorwürfe bereits in den frühen Stadien des IPS auftreten und nicht linear mit dem Fortschreiten der Erkrankung zunehmen (Huber et al. 1990).

Gegen eine erlebnisreaktive Verursachung der Depressionen spricht auch, dass depressive Störungen vielfach als Erstmanifestation des IPS auftreten (Haltenhof et al. 1994). In retrospektiven Studien gab es weitere Hinweise darauf, dass affektive Symptome bei Parkinson-Patienten viele Jahre vor der Manifestation motorischer Zeichen erkennbar werden (Shiba et al. 2000).

Ein weiteres Argument für eigengesetzlich auftretende affektive Störungen ist, dass die Inzidenz von Depressionen bei vergleichbar schweren chronischen Erkrankungen mit motorischer Beeinträchtigung eindeutig geringer ausgeprägt ist (Ehmann et al. 1990). Verglichen mit an Morbus Parkinson erkrankten Patienten zeigten sich chronisch erkrankte Kontrollpatienten mit motorischen Behinderungen, zum Beispiel nach einem

apoplektischen Insult, deutlich weniger depressiv (Robins 1976).

Die Schwierigkeit in der Diagnostik von Depressionen im Rahmen des IPS besteht zum einen darin, dass es gemeinsame überlappende Symptome zwischen beiden Erkrankungen gibt. Zum anderen ist die depressive Symptomatik bei Parkinson-Patienten und Nicht-Parkinsonpatienten nicht einheitlich.

Parkinson-Symptome, die auch im Rahmen von Depressionen auftreten können, sind Bradykinese, psychomotorische Verlangsamung und mimische Starre. Zudem gibt es allgemeine sich überlappende Symptome, wie Konzentrationsstörungen, Schlafstörungen und Erschöpfbarkeit (Starkstein et al. 1990b). Daher werden zur Diagnose einer depressiven Störung bei Parkinson-Patienten vorwiegend subjektiv erlebte depressive Kognitionen und Ideen einbezogen.

Symptome depressiver Episoden, die sowohl bei Parkinson- als auch bei Nicht-Parkinson-Patienten vorkommen, sind Interessenverlust, psychomotorische Verlangsamung, Konzentrationsschwierigkeiten, Energieverlust, Irritabilität und Dysphorie. Im Vergleich zu Depressionen im Rahmen affektiver Störungen kommt es bei depressiven Parkinson-Patienten häufiger zu Dysphorie, Pessimismus, Gereiztheit, Apathie, Irritabilität, gesundheitlicher Besorgtheit, Gedächtnisbeeinträchtigung, und Suizidgedanken, seltener zu Suizidverhalten, Schuldgefühlen, Versagensgefühle, Wahn, Halluzinationen und selbstbestrafender Ideenbildung (Brown et al. 1988, Gotham et al. 1986). Bei depressiven Parkinson-Patienten treten Angstgefühle gehäuft auf (Henderson 1992).

Zur Quantifizierung einer depressiven Störung bei Parkinson-Patienten werden wie bei der unipolaren Depression das Beck-Depressions-Inventar (BDI), die Hamilton-Depressions-Skala (HAMD) und der Fragebogen zur Lebensfreude Snaith-Hamilton-Pleasure-Scale (SHAPS) eingesetzt (Miyasaki et al. 2006, Snaith et al. 1995, Reichmann et al. 2003). Das BDI erfasst diverse motorische Symptome und Stimmungsveränderungen, die auch bei nicht-depressiven Parkinson-Patienten auftreten können. Levin et al. konnten jedoch 1988 mittels einer Analyse der Häufung sich überschneidender Symptome im BDI ein vermehrtes Auftreten der überschneidenden Symptome bei Depressionen nachweisen, seltener dagegen ein gehäuftes Auftreten bei alleiniger motorischer Beeinträchtigung ohne begleitende Depression (Levin et al. 1988). Diese Analyse spricht für die Reliabilität und Validität des BDI in der Diagnostik der Depression im Rahmen des IPS.

Die depressive Symptomatik hat einen großen Einfluss auf die Lebensqualität von Parkinson-Patienten. Hobson et al. stellten in einer Untersuchung an Parkinson-Patienten

fest, dass die Reduktion der Lebensqualität mit höherem Alter, Schwere der Krankheit, kognitiver Einschränkung und Schwere der Depression assoziiert ist (Hobsen et al. 1999). Durch depressive Episoden wird die Lebensqualität unabhängig von der motorischen Symptomatik reduziert und sie wird eher durch die depressiv gefärbte, subjektive Wahrnehmung der Behinderung als durch die tatsächliche motorische Behinderung beeinflusst (Karlsen et al. 1999).

#### **1.4.1 Pathophysiologie depressiver Symptome bei Parkinsonpatienten**

Depressive Störungen beim IPS werden in erster Linie als primäre Konsequenz neurodegenerativer Veränderungen und weniger als Reaktion auf psychologische und Umweltfaktoren angesehen (Tandberg et al. 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass ein Ungleichgewicht mehrerer Transmittersysteme eine wichtige Rolle spielt (Remy et al. 2005, Yamamoto 2001, Mayeux et al. 1988, Chan-Palay und Asan 1989).

Das dopaminerge Transmittersystem scheint eine entscheidende Rolle bei der Genese von Depressionen zu spielen (Brown und Gershon 1993). In fortgeschrittenen Krankheitsstadien des IPS kommt es zu Wirkungsfluktuationen der L-Dopa Therapie. Auch die Stimmung und Angstsymptomatik ist Schwankungen unterworfen. Nissenbaum et al. stellten bei 68,7% der Patienten eine Verstärkung der depressiven Symptomatik während der Off-Phasen fest (Nissenbaum et al. 1987). Das parallele Auftreten von abrupten Stimmungsschwankungen und Dopamin-vermittelten motorischen Fluktuationen legt die Vermutung nahe, dass Dopamin bei dem Auftreten von depressiven Symptomen eine Rolle spielt (Menza et al. 1990, Lees 1989). Beim IPS wird neben der nigrostriatalen Degeneration eine Funktionseinschränkung des mesocorticolimbischen Weges beschrieben (Javoy-Agid et al. 1980, Price et al. 1978). Dieses dopaminerge Bahnensystem hat seinen Ursprung in der VTA (Uhl et al. 1985) und projiziert bei Primaten in kortikale limbische Areale wie den Gyrus cinguli, den Hippocampus, den entorhinalen und orbitofrontalen Kortex sowie subkortikale limbische Areale wie das Corpus amygdaloideum (Porrino und Goldman-Rakic 1982) und insbesondere den Nucl. Accumbens (Fallon und Moore 1978). Es gibt Hinweise darauf, dass das mesocorticolimbische Bahnensystem in der Pathophysiologie von Depressionen beim IPS maßgeblich beteiligt ist (Ring et al. 1994). In histopathologischen Untersuchungen wurde bei Patienten mit depressiven Symptomen, Demenz und Parkinson-Syndrom ein Verlust pigmentierter Neurone in der VTA beschrieben (Torack und Morris 1988). Dopaminerge Nervenendigungen in der VTA scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Euphorie zu spielen und es wird vermutet, dass eine Degeneration dieser dopaminergen

Nervenendigungen in der VTA die Entwicklung von Depressionen bei Parkinson-Patienten begünstigen kann (Cantello et al. 1989). Bei Personen mit depressiven Störungen beim IPS und bei Personen mit unipolarer Depression konnte im Gegensatz zu nicht-depressiven Parkinson-Patienten in PET-Studien ein Hypometabolismus im Gyrus cinguli und dem orbito- und mediofrontalen Kortex dargestellt werden (Ring et al. 1994, Jagust et al. 1992). In neuropsychologischen Untersuchungen wurde bei depressiven im Unterschied zu nicht-depressiven Parkinson-Patienten eine stärkere Dysfunktion des Frontallappens beobachtet (Starkstein et al. 1989). Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung des dopaminergen Bahnensystems liefert eine Studie, bei der Patienten das Amphetamin-ähnliche Psychostimulanz Methylphenidat, das auf dopaminerge Rezeptoren wirkt, verabreicht wurde. Im Gegensatz zu nicht-depressiven zeigte sich bei depressiven Parkinson-Patienten keine Stimmungsaufhellung (Cantello et al. 1989).

Neben dem mesocorticolimbischen Bahnensystem wird eine Beteiligung der Basalganglien bei der Modulation von Stimmung vermutet. Zwei Parkinson-Patienten entwickelten während der Tiefenhirnstimulation des STN komische Vorstellungen mit ansteckendem Lachen (Krack et al. 2001).

Auch Veränderungen des serotonergen Transmittersystems werden als Ursache für Depressionen beim IPS angenommen. In vielen Gehirnarealen von Parkinson-Patienten ist der Serotoningehalt erniedrigt (Guttman et al. 2007). Jellinger beschreibt, dass es außer im nigrostriatalen dopaminergen System auch in anderen Systemen zu einem Neuronenverlust kommt, unter anderem im Hauptort der Serotoninproduktion, dem Raphekern (Jellinger 1991). In einer Studie konnten bei depressiven Parkinson-Patienten mittels transkranieller Sonographie strukturelle Veränderungen im Raphekern nachgewiesen werden (Becker et al. 1997). Bei depressiven wurden, verglichen mit nicht-depressiven Parkinson-Patienten, stärker erniedrigte Werte des Serotoninmetaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure gemessen (Mayeux et al. 1988). Mit diesen Ergebnissen vereinbar ist die Responsivität depressiver Symptome bei Morbus Parkinson auf dopaminerge und serotonerge Pharmaka (Barone et al. 2006, Hauser und Zesiewicz 1997).

#### **1.4.2 Therapieansätze der depressiven Symptome bei Parkinsonpatienten**

Es gibt nur wenige prospektive, kontrollierte, doppelblind durchgeführte Studien zur Pharmakotherapie der Parkinson-assoziierten Depression (Lemke und Reiff 2001). Bei der Behandlung depressiver Symptome von Parkinson-Patienten stehen Antidepressiva (AD) im Vordergrund. Auch durch Substitution des Dopaminmangels können

antidepressive Effekte erreicht werden. Antidepressiv behandelt werden sollte, wenn bei therapeutischer Verbesserung von Akinese und Rigor eine depressive Symptomatik bestehen bleibt, die den Patienten in seinem Alltag einschränkt.

Die Basis einer Therapie mit AD bilden Trizyklische AD (Miyasaki et al. 2006, Andersen et al. 1980) und Serotonin-selektive Wiederaufnahmehemmer (SSRI) (McCance-Katz et al. 1992, Simons 1996, Hauser and Zesiewicz 1997). Ein Nachteil beim Einsatz Trizyklischer AD liegt im Auftreten anticholinergischer Nebenwirkungen, die sich zwar positiv auf die motorischen Defizite auswirken, jedoch durch ihren sedierenden Effekt kognitive Funktionen einschränken können. Bei älteren Menschen können Trizyklische AD zu Harnverhalt und Hypotonie mit Sturzgefahr führen, weshalb SSRI vorzuziehen sind. In einigen Fallberichten wird jedoch eine Verstärkung extrapyramidaler Symptome durch SSRI beschrieben (Ceravolo et al. 2000, Tesei et al. 2000).

Durch Einsatz von Pharmaka, die in das dopaminerge System eingreifen, kann nicht nur eine Verbesserung der motorischen, sondern auch der depressiven Symptomatik erreicht werden. Zu einem therapeutischen Effekt von L-Dopa auf Depressionen im Rahmen des IPS gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. In einigen Studien wird eine Verbesserung der Depressionen bei Parkinson-Patienten durch L-Dopa beschrieben (Maricle et al. 1995). In anderen Studien konnte keine Wirksamkeit von L-Dopa auf Depressionen beim IPS nachgewiesen werden (Shaw et al. 1980). Dopaminagonisten können eine Alternative zu Antidepressiva sein in der Behandlung von Depressionen beim IPS (Barone et al. 2006, Reichmann et al. 2003, Buchwald et al. 2007). In einer tierexperimentellen Studie konnten nicht nur antidepressive Effekte durch Dopaminagonisten gezeigt werden, sondern umgekehrt konnten durch Dopaminantagonisten die antidepressiven Effekte von Dopaminagonisten und trizyklischen Antidepressiva aufgehoben werden (Takamori et al. 2001b). Der MAO-A-Hemmer Moclobemid und wahrscheinlich der MAO-B-Hemmer Selegilin besitzen antidepressive Effekte (Stein und Ballering 1997).

An kleinen Patientenkollektiven mit dem IPS wurde bei Versagen einer antidepressiven Pharmakotherapie erfolgreich die Elektrokrampftherapie (EKT) eingesetzt (Moellentine et al. 1998). Der genaue antidepressive Wirkmechanismus ist nicht geklärt. Eine Hypothese ist, dass die EKT zu einer vermehrten Dopaminfreisetzung führt (Faber and Trimble 1991).

Die Behandlung von Depressionen im Rahmen des IPS ist oft schwierig. Eine erfolgreiche Therapie kann zu einer starken Verbesserung der Lebensqualität führen.

## **1.5 Notwendigkeit von Tierversuchen**

Ein Tiermodell kann die Ätiologie und Klinik der Krankheiten des Menschen, und insbesondere die humane Psychopathologie nicht exakt imitieren. Einzelne Aspekte der humanen Pathophysiologie können jedoch gut abgebildet werden, was in den folgenden Absätzen erläutert wird. Mit Hilfe eines Tiermodelles kann man Hypothesen über die Funktion des ZNS und die Ursache psychiatrischer Erkrankungen überprüfen und medikamentös bedingte Verhaltensänderungen untersuchen. Vorteile von Tierversuchen sind, dass die experimentellen Rahmenbedingungen besser kontrolliert werden können. Zudem können Studien durchgeführt werden, die aus ethischen Standpunkten am Menschen nicht zu rechtfertigen sind.

## **1.6 Tierexperimentelle Modelle des IPS**

Idiopathisch auftretende Parkinsonsyndrome sind bei Tieren bislang nicht bekannt, so dass die Erkrankung in Modellen simuliert wird. In bisherigen genetischen Tiermodellen konnte der nigrostriatale Funktionsverlust gezeigt, jedoch nicht der Verlust dopaminergener Neurone im Mittelhirn und die umfassende Symptomatik des IPS reproduziert werden (Hwang et al. 2005, Fleming et al. 2005). Die Entdeckung von Genen, die mit familiären Formen des IPS assoziiert sind hat in der jüngsten Vergangenheit zur Entwicklung neuer genetischer Tiermodelle an der Maus geführt, die zukünftig eine Alternative für Modelle mit neurotoxischen Substanzen darstellen können (Fleming et al. 2005).

In den bislang häufig verwendeten validen Tiermodellen des IPS wird entweder durch Pharmaka (z. B. Reserpin) eine vorübergehende Verschlechterung der dopaminergen Transmission der nigrostriatalen Projektionen verursacht oder eine selektive Destruktion dopaminergener Neurone durch neurotoxische Substanzen, z.B. 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), durchgeführt (Ungerstedt 1968). Da die reversiblen pharmakologischen Modelle nicht den degenerativen Prozess des IPS reproduzieren, wurde in dieser Arbeit ein bekanntes valides Rattenmodell mit einer neurotoxischen Substanz ausgewählt: das 6-OHDA-Modell.

### **1.6.1 Das 6-OHDA-Modell des Nagers**

Das Neurotoxin 6-OHDA führt zu einer selektiven Degeneration katecholaminerger Neurone. Weil die Substanz die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, erfolgt die Applikation mittels intrazerebraler Injektion (Ungerstedt 1968). Das Ausmaß der dopaminergen Läsion wird durch Lage, Dosis und Geschwindigkeit der 6-OHDA-

Applikation variiert. Dadurch können nicht nur komplette, sondern auch partielle Läsionen des nigrostriatalen Systems mit erhaltener dopaminergener Restfunktion erzeugt werden, die die humanpathologische Situation genauer imitieren (Kirik et al. 1998). Die direkte 6-OHDA-Injektion in die SNc und VTA führt zwar zu einer Degeneration dopaminergener Neurone in diesen Kerngebieten, hat jedoch den Nachteil, dass durch die Injektionskanüle Artefakte in der SNc und VTA entstehen und nicht der langsam progrediente degenerative Prozess des IPS imitiert wird. Vorzuziehen ist eine 6-OHDA-Injektion in das Striatum und das nigrostriatale Projektionen enthaltende mediale Vorderhirnbündel. Durch retrograden Transport des 6-OHDA in zur Injektionsregion projizierende dopaminerge Neurone erfolgt ebenfalls eine Degeneration der SNc und VTA. Der Hauptteil der dopaminergen Neurone degeneriert in den ersten beiden Wochen, es findet aber eine Progredienz über 8 bis 16 Wochen statt, was den langsam progredienten degenerativen Prozess bei Parkinson-Patienten imitiert (Sauer und Oertel 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden Menge und Ort der Substanzapplikation und somit das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc und VTA variiert, um den Einfluss der Degeneration dopaminergener Neurone in der SNc und VTA auf die Entwicklung von depressivem Verhalten getrennt untersuchen zu können.

Die Selektivität von 6-OHDA für katecholaminerge Neurone ist bedingt durch seine Strukturähnlichkeit mit Katecholaminen. Über spezifische membranständige Transporter wird das Neurotoxin in katecholaminerge Neurone aufgenommen (Bezard et al 1998). Dort erfolgt aufgrund seiner instabilen Struktur die Autooxidation von 6-OHDA mit nachfolgender Bildung zytotoxischer Produkte wie 6-Hydroxydopaminquinon, Wasserstoffperoxid, Superoxidationen und Hydroxyl-Radikalen (Sachs und Jonsson 1975). Dies führt zu einer selektiven verzögerten Zerstörung katecholaminergener Neurone. Die Läsion dopaminergener Zellen wird nur in einer Hemisphäre durchgeführt, da eine bilaterale Injektion zu einer starken motorischen Beeinträchtigung der Tiere führt (Ungerstedt 1968). Ein weiterer Vorteil der einseitigen Läsion ist, dass sie unter pharmakologischer Provokation zu lateralisierten Verhaltensveränderungen führt, wodurch eine zusätzliche Erfolgskontrolle möglich ist. Zudem besteht die Möglichkeit der späteren histologischen Vergleichbarkeit mit der intakten kontralateralen Seite, wodurch der 6-OHDA-induzierte Neuronenverlust quantifiziert werden kann.

## **1.7 Tierexperimentelle Modelle der Depression**

Die meisten validen Tiermodelle der Depression basieren auf Verhaltensdefiziten, die durch Stressoren ausgelöst werden und durch antidepressive Therapie behandelt werden



können Takamori et al. 2001a). Im Forced-swim-Test (Porsolt et al.1977) wird das Tier gezwungen zu schwimmen und die Zeit bis zur Immobilität gemessen. In dieser Arbeit wurde nicht der Forced-swim-Test eingesetzt, da nach Injektion von 6-OHDA von einer motorischen Beeinträchtigung der Ratten auszugehen ist. Zudem konnte bei einigen Antidepressiva im Forced-swim-Test kein antidepressiver Effekt nachgewiesen werden (Takamori et al. 2001a). Ein weiteres valides Tiermodell der Depression ist die olfaktorische Bulbektomie (Leonard und Tuite 1981).

In den folgenden Experimenten wurde das LH (learned-helplessness)-Verhalten von Ratten in der Skinner-Box untersucht (Vollmayr und Henn 2001). Bei Modellen zur erlernten Hilflosigkeit handelt es sich um valide und häufig angewendete Tierexperimente. Das LH-Modell konnte – im Gegensatz zu vielen anderen Tiermodellen der Depression – am Menschen reproduziert werden (Telner und Singhal 1984). Eine Herausforderung bei der Entwicklung von Tiermodellen psychiatrischer Erkrankungen ist es, Kennzeichen der psychiatrischen Störung zu definieren. Beim LH-Modell sind an den Tieren Effekte zu beobachten, die auch bei an depressiven Störungen erkrankten Patienten feststellbar sind, u. a. verminderte motorische Aktivität, Appetitverlust und Immunsuppression (Thiebot et al. 1992). Zudem erwies sich das LH-Modell bei einer Vielzahl von gebrauchstüblichen Antidepressiva als geeignet für die Untersuchung antidepressiver Effekte (Takamori et al. 2001a).

### **1.7.1 Das Learned- Helplessness- Modell mit Skinner-Box**

Das LH-Modell wurde erstmals 1967 von Overmier und Seligman beschrieben. Es basiert auf der Theorie, dass erlernte Hilflosigkeit ein pathogenetischer Faktor in der Manifestation der Depression ist. Erlernte Hilflosigkeit bezieht sich auf Verhaltensveränderungen, die nach Exposition mit nicht kontrollierbaren Stressfaktoren auftreten (Maier und Watkins 2005).

In einer Skinner-Box werden die Versuchstiere unausweichlichem elektrischen Schock ausgesetzt. In einer anschließenden Untersuchung besteht die Möglichkeit, den Schocksituationen auszuweichen. Ein Defizit im Vermeidungsverhalten zeigt eine erlernte Hilflosigkeit an und gilt als depressives Verhalten. Durch Verwendung einer Skinner-Box mit elektrifizierbaren Wänden und Boden wird eine hohe Validität, Reproduzierbarkeit und Aussagekraft erreicht (Vollmayr und Henn 2001). Das Ausmaß des LH-Verhaltens wird gemessen durch die Latenz und Häufigkeit, mit denen die Schocksituation vermieden wird.

## **1.8 Wissenschaftliche Fragestellung**

Diese Einleitung hat einen Überblick zu Theorien der pathophysiologischen Mechanismen der Parkinson-assoziierten Depression gegeben und Wissenslücken aufgezeigt. Aufgrund der hohen Prävalenz dieser Erkrankung, die mit einer schweren Beeinträchtigung der Lebensqualität einhergeht, besteht ein großes klinisches Interesse an der Entwicklung neuer Therapiestrategien und Möglichkeiten diese zu testen. Bisherige Studien der humanen Situation in vivo und post mortem, sowie tierexperimentelle Arbeiten weisen auf eine entscheidende Rolle des dopaminergen Transmittersystems bei der Genese von Depressionen hin. Neben der nigrostriatalen Degeneration scheint eine Funktionseinschränkung des mesocorticolimbischen Weges von Bedeutung zu sein. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des dopaminergen Systems in der SNc und VTA bei der Manifestation von LH-Verhalten der Ratte zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden folgende Hypothesen aufgestellt und experimentell überprüft:

- Hat eine selektive dopaminerge Läsion in der VTA einen Einfluss auf die Entwicklung von LH-Verhalten?
- Spielt auch schon der alleinige Untergang dopaminergener Neurone in der SNc eine Rolle bei der Manifestation depressiven Verhaltens?

## **2 Tiere, Material und Methoden**

### **2.1 Tiere**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Für die Experimente wurden junge männliche Wistar Ratten (n = 57) des Versuchstier-Zuchtunternehmens Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) verwendet. Zu Beginn der Experimente betrug das durchschnittliche Gewicht der Tiere 250g, am Ende der Versuchszeit hatten die Tiere im Mittel ein Gewicht von 400g erreicht.

Die Durchführung der Tierversuche nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde von der Senatsverwaltung für Gesundheit Berlin unter der Tierversuchsnummer 115/03 am 1.3.2005 genehmigt.

#### **2.1.2 Haltungsbedingungen**

Die Ratten wurden im Tierstall des Institutes für Pharmakologie der Charité in Fünfergruppen in standardisierten Käfigen und unter konstanten Bedingungen gehalten. Die Temperatur der Räumlichkeiten betrug 18°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50%. Es wurde ein kontinuierlicher 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Helligkeitsphase von 6:00 bis 18:00 Uhr eingehalten. Alle Experimente wurden während der Tagesphase durchgeführt. Wasser und Futter (Altromin® 1324 Standard [Altromin, Lage, Deutschland] in pelletierter Form) waren jederzeit unbegrenzt verfügbar. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase wurden die Tiere in den Versuch eingeschlossen.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Verwendete Substanzen**

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidindihydrochlorid	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
6-Hydroxydopamin	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Antikörper (Ziege, anti-Maus)	SIGMA Chemie, St. Louis, USA
Ascorbinsäure	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland

Avidin-Biotin-Komplex	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
d-Amphetaminsulfat	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Entellan®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kresylviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
Monoklonaler AK (Maus, anti-Ratten-TH)	SIGMA Chemie, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Pentobarbital	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Ferak, Berlin, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

---

### 2.2.2 Pufferlösungen

**PBS** (phosphate buffer solution): 0,1 molare PBS mit einem pH-Wert von 7,4, Zusammensetzung für einen Liter: 9g Natriumchlorid, 2,63g Natriumdihydrogenphosphat, 29,1g Dinatriumhydrogenphosphat und Aquadest.

**PBST** (phosphate buffer solution triton): PBS-Lösung mit einem 10%-igen Tritonanteil.

**Antifreeze**: Zusammensetzung für einen Liter: 1,795g Natriumdihydrogenphosphat, 5,45g Dinatriumhydrogenphosphat, 300ml Ethylenglykol, 300ml Glycerol und 300ml Aquadest.

## 2.3 Versuchsaufbau

Die Ratten wurden in fünf Gruppen (G1-G5) eingeteilt. Mit den Tieren der ersten Gruppe (G1) wurden in Zusammenarbeit mit Thomas Lee standardisierte Kriterien für LH-Verhalten in der Skinner-Box erarbeitet. Die Gruppe (G2) (n=8) war eine Kontrollgruppe, bei der eine Sham-Operation mit intrastriatler NaCl-Injektion durchgeführt wurde. In den Gruppen G3-G5 (n=49) wurde in einer stereotaktischen Operation an unterschiedlichen Koordinaten eine 6-OHDA-Injektion durchgeführt mit dem Ziel, in gruppenspezifisch unterschiedlichem Ausmaß eine retrograde Degeneration der dopaminergen Zellen in der SNc und der VTA herbeizuführen. Im Vorfeld der

Verhaltensuntersuchungen wurden die Tiere im vorsichtigen Spiel *gehandelt*, um sie an Untersucherhand und -geruch zu gewöhnen. Nach einem Zeitraum von sechs Wochen war der Großteil des retrograden 6-OHDA-Transportes in die Zellkörper und deren Degeneration abgeschlossen und die Konditionierung der Tiere wurde durchgeführt. Am Tag darauf wurden die Ratten auf LH-Verhalten untersucht. Nach einer weiteren Woche erfolgte die Überprüfung des Rotationsverhaltens zur funktionellen Validierung der einseitigen Läsion im nigrostriatalen dopaminergen System. Im Anschluss an die Experimente wurden nach transkardialer Perfusion die Gehirne entnommen und für histologische Untersuchungen weiterverarbeitet. In Kresylviolett-gefärbten Schnitten wurde die Lage des Injektionskanals kontrolliert, in anderen Schnitten wurden die dopaminergen Zellen mittels Tyrosinhydroxylase (TH)- Immunreaktion visualisiert und bilateral stereologisch ausgezählt. Anhand der stereologischen Auswertung erfolgte die endgültige Einteilung in post mortem Gruppen entsprechend dem Ausmaß der Degeneration in der SNc und VTA.

Wochen	G2-5
0	Ankunft der Tiere
1	Sham-Operation (G2) 6-OHDA-Operation (G3-5)
7	Konditionierung 1.LH-Test nach einem Tag
8	Rotationsverhalten Transkardiale Perfusion Histologische Aufarbeitung der Gehirne

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Operationsmethoden

Präoperativ wurden die Ratten anästhesiert durch intraperitoneale Injektion einer Lösung von Pentobarbital (50 mg/kg KG gelöst in 10 ml 0,9%-iger NaCl). Dadurch wurde eine Narkosedauer von 1-1,5 Stunden erreicht, so dass bei einem Operationszeitraum von höchstens 40 Minuten eine ausreichend lange Anästhesie garantiert war. Die Tiere der Gruppen G3-G5 erhielten 2µl eines 6-OHDA-Injektionsgemisches (0,9%-ige NaCl mit

0,1% Ascorbinsäure) an je nach Gruppe ein, vier oder zwei Punkten in unterschiedliche zerebrale Strukturen.

Das 6-OHDA-Modell ist ein etabliertes Tiermodell des IPS (Ungerstedt 1968). Mittels linksseitiger intrazerebraler Injektion von 6-OHDA wurden selektiv dopaminerge Neurone in der linken Gehirnhälfte zerstört. Die stereotaktischen Koordinaten für die Operation wurden dem Rattenhirnatlas nach Paxinos und Watson (1986) entnommen. In drei Versuchstiergruppen wurden Menge und Ort der Substanzapplikation und somit das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc und VTA variiert.

Nach Rasur der Kopfhaut wurden die narkotisierten Ratten in einem stereotaktischen Operationsrahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) durch Interauralstifte und einen Incisorstift fixiert. Hierauf folgte die Desinfektion und Inzision der Kopfhaut zur Freilegung des Periosts. Nach Darstellung des Bregmas als Bezugspunkt wurde entsprechend der anteriorposterioren und mediolateralen Koordinaten die Trepanation des Schädelknochens mit einem Dentalbohrer (Durchmesser 1,0 mm) durchgeführt. An der Dura mater wurde die Kalibrierung für die dorsoventrale Koordinate vorgenommen. Anschließend wurde die an einem stereotaktischen Arm befestigte Edelstahlinjektionskanüle (Außendurchmesser 0.25mm) gemäß der dorsoventralen Werte in das Gehirn abgesenkt. Mittels einer Hamilton-Mikroliterspritze des Typs CR 400-20 (Hamilton Company, Reno, USA), die über einen Polyethylenschlauch mit der Injektionskanüle verbunden war, erfolgte die 1/10 mikrolitergenaue 6-OHDA-Applikation (bzw. NaCl-Applikation bei der Kontrollgruppe G2) mit einer Geschwindigkeit von 1µl/min in die zerebrale Zielstruktur. Nach der Applikation wurde die Injektionskanüle für weitere fünf Minuten im Gehirn belassen, um ein Zurückfließen der Substanz zu vermeiden und die Diffusion in die Gewebe zu fördern. Es folgte die Säuberung der Wunde und der Verschluss der Kopfhaut mit drei Einzelkopfnähten. Postoperativ erhielten die Tiere zur Analgesie 50µl Novaminsulfon (Metamizol-Na, Ratiopharm, Deutschland) per os und wurden zur Vorbeugung einer Unterkühlung auf einer Wärmeplatte gelagert. Bei den Tieren der Kontrollgruppe G2 wurde eine Sham-Operation mit intrastriatler Injektion von 2µl NaCl an zwei verschiedenen Punkten durchgeführt.

In den folgenden vier Tabellen sind die Koordinaten der Sham-Operation bzw. der 6-OHDA-Applikation der drei Versuchstiergruppen bezogen auf das Bregma nach Paxinos & Watson (1986) dargestellt.

**Kotrollgruppe G2: Intrastriatiale Zwei-Punkt-Läsion (n=8)**

Jeweils 2µl 0,9%-iger NaCl

	Punkt 1	Punkt 2
Anteriorposterior	+1,3 mm	-0,4 mm
Mediolateral	-2,6 mm	-4,2 mm
Dorsoventral	-5,0 mm	-5,0 mm
Incisorstift	-3,3 mm	

**G3: Präterminale Läsion im ventrolateralen Putamen (n=21)**

20µg 6-OHDA gelöst in 2µl 0,9%-iger NaCl mit 0,1%-igem Ascorbatanteil

	Punkt 1
Anteriorposterior	-1,2 mm
Mediolateral	-3,9 mm
Dorsoventral	-5,0 mm
Incisorstift	0,0 mm

**G4: Intrastriatiale Vier-Punkt-Läsion (n=19)**

Jeweils 7µg 6-OHDA gelöst in 2µl 0,9%-iger NaCl mit 0,1%-igem Ascorbatanteil

	Punkt 1	Punkt 2	Punkt 3	Punkt 4
Anteriorposterior	+1,3 mm	+0,4 mm	-0,4 mm	-1,3 mm
Mediolateral	-2,6 mm	-3,0 mm	-4,2 mm	-4,5 mm
Dorsoventral	-5,0 mm	-5,0 mm	-5,0 mm	-5,0 mm
Incisorstift	0,0 mm			

### **G5: Zwei-Punkt-Läsion im medialen Vorderhirnbündel (n=9)**

Jeweils 6,5µg 6-OHDA gelöst in 2µl 0,9%-iger NaCl mit 0,1%-igem Ascorbatanteil

	Punkt 1	Punkt 2
Anteriorposterior	-4,4 mm	-4,0 mm
Mediolateral	-1,2 mm	-0,8 mm
Dorsoventral	-7,8 mm	-8,0 mm
Incisorstift	-2,4 mm	+3,4 mm

#### **2.4.2 Das Learned- Helplessness- Modell**

Das LH-Modell dient der Quantifizierung depressiven Verhaltens im Tiermodell. Während im Vorfeld der Verhaltensuntersuchungen durch *handling* eine Gewöhnung der Ratten an die Untersucherhand stattfand, wurde unmittelbar vor den Verhaltensexperimenten jegliches *handling* vermieden und es erfolgte mit Unterstützung von Abdomen und Thorax eine vorsichtige Platzierung der Tiere in die Kammer. Während der Experimente war der Raum nur schwach beleuchtet.

In einem operanten Verhaltenssystem (Typ 259900, TSE, Bad Homburg, Deutschland) (Abb.3) bestehend aus einer operanten Konditionierungskammer, einem Stromgenerator und einem Pentium-Computer zur Kontrolle und Aufzeichnung der Versuche erfolgte die Konditionierung und Testung der Ratten. Zur Konditionierung wurden die Tiere in einer Kammer (35×30×21,5cm) mit Wänden aus elektrifizierbarem Stahl, einem Boden aus Stahlstangen (Durchmesser 6mm, Abstand 2cm) und einer Decke aus Plexiglas über eine Dauer von 40 Minuten intermittierend alle 5 bis 15 Sekunden unvermeidbaren Stromstößen mit einer Intensität von 0,8 mA und einer Phasendauer von 200 ms ausgesetzt. Die Gesamtdauer der Stromexposition betrug 20 Minuten.





Abb. 3 Operantes Verhaltenssystem der Firma TSE, Bad Homburg, Deutschland.

Nach 24 Stunden wurden die Tiere auf LH-Verhalten getestet und hierzu erneut in die nun mit einer Taste (3,5×3,5cm) und einem Signallicht (weiß, 12 Watt, 4cm oberhalb des Hebels) ausgestattete Kammer gesetzt. Die Stromexposition war begleitet vom Aufleuchten der Signallampe, was das Auffinden der Taste erleichtern, sowie die Differenz zu der unvermeidbaren Stromexposition verdeutlichen sollte. Über 20 Minuten wurden die Ratten 15 Stromphasen von 60 Sekunden mit einer Phasendauer von 200 ms und einer Intensität von 0,8 mA ausgesetzt. Durch Druck auf die Taste konnte die Stromexposition unmittelbar beendet werden (Abb.4). Um die nächste Stromphase nach einer Pause von 24 Sekunden beenden zu können, war ein kurzzeitiges Freilassen des Hebels erforderlich. Ein Computer, der über eine Kontrolleinheit mit der Skinnerbox verbunden war, registrierte für jede Stromphase, ob und nach welcher Zeit das jeweilige Tier die Stromexposition beendete. Bereits untersuchte Tiere wurden in separaten Käfigen untergebracht, um das Verhalten noch zu untersuchender Tiere nicht zu beeinflussen.

Aufgrund der Vorarbeiten von T.L. mit Tieren der Gruppe 1 wurden definierte Kriterien für LH-Verhalten erarbeitet, die sich an den von Vollmayr modifizierten Verhaltens-Fehler- und Verhaltens-Defizit-Kriterien orientierten (Vollmayr und Henn 2001). Die Verhaltens-Fehler-Kriterien definieren Ratten als hilflos, die in der Mehrzahl der

Versuche kein Fluchtverhalten zeigen, die Verhaltens-Defizit-Kriterien definieren Ratten als hilflos, bei denen das Fluchtverhalten verlangsamt ist (Musty et al. 1990). Demnach wurden Ratten als Nicht-LH-Tiere definiert, die neun mal oder häufiger in weniger als 22 Sekunden die Stromphase durch Drücken des Hebels erfolgreich abbrechen.



Abb. 4 Versuchsanordnung mit Versuchstier in der Konditionierungskammer. Beendigung der Stromexposition durch Betätigung des Hebels.

### 2.4.3 Rotationsverhalten

Um bereits in vivo das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc und der VTA quantifizieren zu können, wurde nach Abschluss der LH-Verhaltensuntersuchungen das Rotationsverhalten der Ratten nach intraperitonealer Injektion von Amphetamin untersucht.

Die unilaterale Destruktion dopaminergener Neurone bewirkt ein Ungleichgewicht des Neurotransmitters Dopamin zwischen den beiden Gehirnhemisphären. Die systemische Applikation des indirekten Dopaminagonisten Amphetamin hemmt die DA-Rückaufnahme aus dem synaptischen Spalt in die intakten dopaminergen Neurone insbesondere der nicht-lädierten Hemisphäre. Daher besteht auf der gesunden Seite eine erhöhte DA-Konzentration mit vermehrter Stimulation postsynaptischer DA-Rezeptoren. Auf der lädierten Seite befinden sich zwar durch Hochregulation mehr DA-Rezeptoren, durch Untergang dopaminergener Neurone existiert aber weniger DA zur Stimulation dieser Rezeptoren. Bei Ratten manifestiert sich diese asymmetrische Stimulation des nigrostriatalen Systems in einem Rotationsverhalten in Richtung der lädierten Seite (Ungerstedt und Arbuthnott 1970). Auch bei partiellen einseitigen Läsionen mit nur 50%-

igem Verlust der nigrostriatalen Neurone entwickelt sich das Rotationsverhalten unter Amphetaminapplikation (Hefti et al. 1980). Richtung und Anzahl der Rotationen pro Minute werden mit einer speziellen Apparatur (Rotameter) gemessen. Die Dauer, Geschwindigkeit und Anzahl der Rotationen korreliert mit der Amphetamindosis. Abhängig von der Amphetaminmenge wird das Maximum der Rotationsgeschwindigkeit 30-60 Minuten nach Applikation erreicht und nach ungefähr vier Stunden sind keine Rotationen mehr zu beobachten. Bei gleicher Dosis sind Rückschlüsse auf das Ausmaß der 6-OHDA-Läsion möglich. Nicht-operierte und sham-operierte Kontrolltiere entwickeln unter Amphetamin-Behandlung eine gesteigerte motorische Aktivität, die sich aber nicht in Rotationen äußert.

Zunächst erfolgte die intraperitoneale Applikation von 2,725 mg/kg KG d-Amphetaminsulfat gelöst in 0,9%-iger NaCl, Injektionsvolumen 0,5ml/kg KG. 15 Minuten später wurden die Ratten für eine Dauer von 60 Minuten einzeln in mit einem Bewegungssensor ausgestattete Rotameterhalbschalen (TSE, Bad Homburg, Deutschland) (Abb. 5a) gesetzt zur Registrierung der Rotationsbewegungen der Tiere (Abb. 5b). Rotationssensor und Tier waren unter Gewährleistung der Bewegungsfreiheit der Ratte über einen semiflexiblen Stahldraht verbunden. Gemessen wurden die Anzahl und Richtung der Rotationen mit einem Drehwinkel  $\geq 180$  Grad pro Minute. Anhand eines Computerprogrammes erfolgte die Berechnung des Netto-Rotations-Asymmetrie-Scores (rechts/links).



Abb. 5 a Übersichtsaufnahme eines Versuchstiers im Rotameter. b Detailaufnahme des substanzinduzierten Rotationsverhaltens.

#### **2.4.4 Transkardiale Perfusion**

Nach den letzten Verhaltensuntersuchungen wurden die Tiere unter einer tiefen Chloralhydrat-Narkose (500 mg/ kg KG in 0,9% NaCl-Lösung, i.p.) thorakotomiert und es erfolgte eine Inzision des rechten Vorhofes und des Apex des linken Ventrikels. Durch letzteren wurde eine Perfusionskanüle von der Herzspitze bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Anschließend wurden 100 ml körperwarme Pufferlösung PBS infundiert, während das Blut den Rattenkörper durch die Inzision im rechten Vorhof verließ. Nachdem der Blutkreislauf fast komplett durch Pufferlösung gespült und ersetzt war, erfolgte die Infusion einer 4%-igen kalten Lösung des Fixationsmittels Paraformaldehyd. Nach Schädelöffnung wurden die festen Gehirne entnommen und über Nacht in Paraformaldehyd nachfixiert.

#### **2.4.5 Aufarbeitung Paraformaldehyd- fixierter Gehirne**

Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne in der Folge 24 h lang durch Lagerung in 20%-iger Saccharoselösung bei 4°C dehydriert. Daraufhin wurden sie bei -80°C eingefroren und anschließend mittels eines Gefriermikrotoms bei -20°C in transversale Scheiben geschnitten. In den Regionen der Injektionskanäle im Gebiet des Striatums (anterioposterior = AP 2,2 bis -3,3mm bezogen auf Bregma) wurden Schnitte mit einer Dicke von 30 µm angefertigt und jeder zweite auf einen Objektträger aufgezogen. Im Bereich der Substantia nigra (AP -4,52 bis -6,7mm) und der VTA (AP -5,0 bis -6,8mm) wurden 40µm dicke Hirnscheiben hergestellt und in mit Antifreeze gefüllten 24-Loch-Mikrotiterplatten bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

### **2.5 Histologie/ Immunzytochemie**

#### **2.5.1 Kresylviolett- Färbung nach Nissl**

Mit der Kresylviolett (Nissl)- Färbung wurde die Lage des Injektionskanals dargestellt (Abb. 6). Nur Tiere, bei denen die Injektion korrekt in die zerebrale Zielstruktur erfolgt war, wurden in die Auswertung miteinbezogen.

Die 30µm dicken Schnitte auf den Objektträgern wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe und zuletzt im Lösungsmittel Xylol schonend dehydriert und entfettet. Da der Farbstoff eine "wässrige" Lösung ist, folgte erst nach einer absteigenden Alkoholreihe

die 1,5 min lange Färbung mit dem Nissl-Reagenz (Kresylviolett [Merck®, Darmstadt, Deutschland] 1%-ig in Aqua dest.; pH 3,6). Nach einer Spülung in Aqua dest. und erneuter Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte in Xylol für 15 min geklärt. Anschließend wurden die Schnitte zur Konservierung eingedeckelt mit dem Einschlussmittel Entellan [Merck®, Darmstadt, Deutschland] und einem Deckglas.

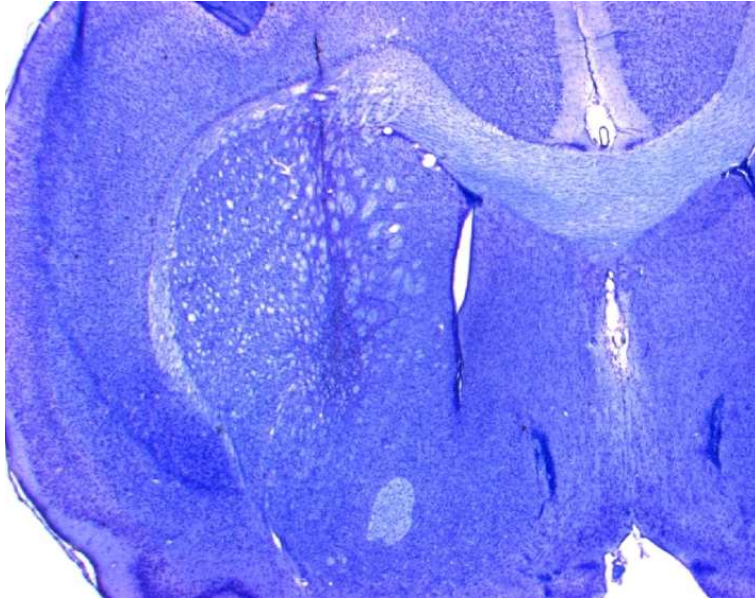


Abb. 6 Kresylviolettgefärbter Schnitt mit Darstellung des Injektionskanals.

### 2.5.2 Tyrosinhydroxylase- Immunreaktion

Tyrosinhydroxylase (TH) ist das Schrittmacherenzym der Katecholaminsynthese (Nagatsu et al. 2000) und wird im Zellkörper und in den Axontermini von catecholaminergen Nervenzellen gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die überlebenden dopaminergen Zellen in der SNc und in der VTA durch eine TH-Immunreaktion visualisiert (Abb. 7) und anschließend durch Auszählung quantifiziert.

Nach Permeabilisierung der Zellmembranen durch Triton wurde ein in Mäusen produzierter monoklonaler AK gegen Ratten-Tyrosinhydroxylase zugefügt (Konzentration 1:500 in PBS). Es folgte ein Waschgang mit dem Ziel nur gebundene Antikörper zurückzuhalten. Nach einer Inkubation mit dem - gegen den Fc-Teil von Maus-AK gerichteten - biotinylierten Zweitantikörper (Konzentration 1:200 in PBS) wurde der AB-Komplex zugefügt, ein Komplex aus Avidin und biotinassoziierter Peroxidase. Avidin besitzt eine hohe Affinität zu Biotin und bindet dieses an 4 Stellen, so dass Brücken zwischen biotinyliertem Zweitantikörper und peroxidaseassozierten Biotinmolekülen

entstehen. Anschließend wurde DAB (Diaminobenzidin) , ein Substrat des Enzyms Peroxidase, hinzugefügt und man startete die Färbereaktion durch den Zusatz von 0,01%-igem Wasserstoffperoxid. Peroxidase katalysiert die Polymerisation des farblosen Monomers DAB zum braunen Polymer.

Von den 40 µm dicken Schnitten eines Gehirns wurde im Bereich der SNc und der VTA jeder 6. Schnitt ausgewählt. Die gewählten Schnitte wurden in 10er Gruppen freischwimmend in 24-Loch-Mikrotiterplatten nach dem TH-Färbeprotokoll gefärbt:

- 30 min Waschen in PBS
- 1.AK (Maus anti-Ratten-TH) verdünnt auf 1:10000 mit PBST, 250µl/ Loch, 72h bei 4°C
- 30 min Waschen in PBS
- 2. AK (Ziege anti-Maus) verdünnt auf 1:200 in PBST; 250µl/ Loch, 60 min bei 37°C
- 30 min Waschen in PBS
- AB-Komplex verdünnt auf 1:200 mit PBS, 250µl/ Loch, 60 min bei 37°C
- 30 min Waschen mit PBS
- DAB und Wasserstoffperoxid, 3 min
- 3 mal Waschen mit Aquadest

Die frei flottierenden Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und anschließend mit Entellan eingedeckelt.



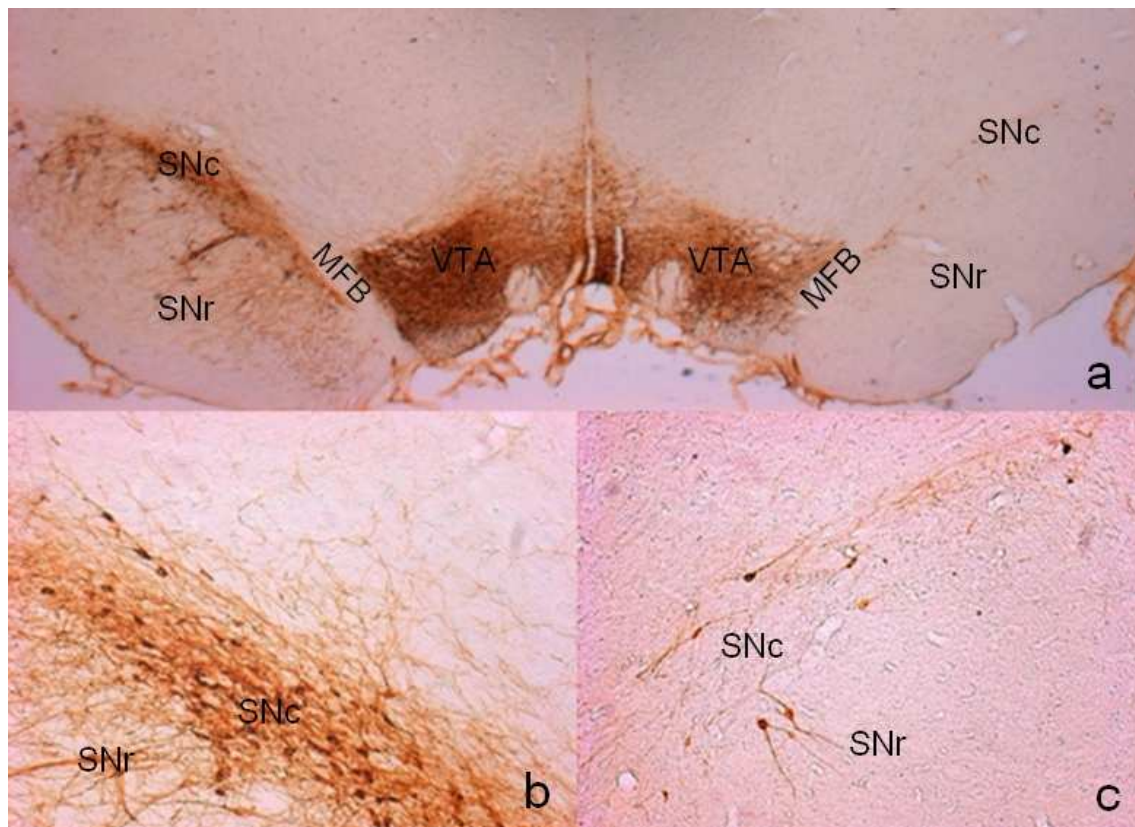


Abb. 7 Repräsentative Ausschnitte eines Mittelhirns nach TH Immunfärbung und linksstriataler 6-OHDA-Applikation. a Übersichtsvergrößerung auf Höhe des medialen Vorderhirnbündels b Ausschnittsvergrößerung der intakten SN c Ausschnittsvergrößerung der 6-OHDA-lädierten SN

### 2.5.3 Stereologische Auszählung

Die Auszählung der durch TH-Immunreaktion aufbereiteten Präparate erfolgte unabhängig und doppelt blind durch zwei Personen (C.W., D.P.) unter Verwendung einer Hitachi HV-C20A Video Camera, die an ein Leica DM-RXE Mikroskops angeschlossen war. Pro Tier wurden acht Gehirnschnitte aus dem Bereich der SNc und der VTA stereologisch auf TH-positive Zellen untersucht (Steiner et al. 2006). Als Referenz für die Grenzen der SNc und VTA wurde der Rattenhirnatlas von Paxinos und Watson (1986) verwendet. Die Gesamtzahl der TH-positiven Zellen wurde erfasst mit der Optical Fractionator Methode unter Verwendung des semiautomatischen Stereologiesystems StereoInvestigator (MicroBrightfield, Colchester, VT, USA). Zunächst wurde die *region of interest* (ROI), die SNc und VTA, in jedem Schnitt bei niedriger Vergrößerung (10x Objektiv) umfahren. Nach der Definition der ROI wurde randomisiert durch die Software

innerhalb dieser Stichprobenfläche ein Punkt ausgewählt, von dem ausgehend ein dreidimensionales quadratisches Gitternetz gelegt wurde (entsprechend der Maße von Schmitz und Hof 2005), dessen Seiten X und Y 2000  $\mu\text{m}$  und dessen Fläche 40 000  $\mu\text{m}^2$  betragen. Die durchschnittliche Schnittdicke betrug nach dem Färben 20  $\mu\text{m}$ . An den Schnittpunkten des Gitternetzes lagen Zählrahmen mit einer definierten Kantenlänge X und Y 100  $\mu\text{m}$ , Fläche (XY) 10 000  $\mu\text{m}^2$ , Dicke (Z) 10  $\mu\text{m}$  und Volumen 100 000  $\mu\text{m}^3$ . Das Zählen der TH-positiven Zellen innerhalb der Zählrahmen wurde mit einem 40x Objektiv durchgeführt. Nicht gezählt wurden Zellen, die die obere oder laterale Grenze des Zählrahmens überschritten. Der nach Gundersen und Jensen (1987) berechnete Fehlerkoeffizient lag zwischen 0,05 und 0,1. Als Referenz für das Ausmaß der Degeneration diente die nicht lädierte Seite, für die der Anteil dopaminergener Neurone mit 100% festgelegt wurde. Das Ausmaß der Degeneration auf der lädierten Seite wurde als Prozent von den 100% der nicht lädierten Seite ermittelt. Anhand der stereologischen Auszählung erfolgte die post mortem Einteilung der Tiere in Gruppen entsprechend dem Ausmaß der Degeneration in der SNc und VTA.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm Sigma Stat® (SPSS, USA) verwendet. Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde für alle Daten als statistisch signifikant angenommen. Die Ergebnisse werden ausgedrückt als Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of means = Standardfehler des Mittelwertes); n bezieht sich auf die Anzahl der Tiere. Für alle Ergebnisse der Verhaltensexperimente und histologischen Auswertungen wurde für Gruppenvergleiche zur Varianzanalyse der ANOVA-Test angewendet, bei Abweichungen zwischen den Mittelwerten wurde der Post-hoc-t-Test nach Fischer für unabhängige Stichproben durchgeführt. Für wiederholte statistische Analysen wurde P (0,05) nach Bonferroni angepasst.



### **3 Ergebnisse**

Die Erläuterung der Ergebnisse ist in drei Abschnitte unterteilt. Zunächst wird die Gruppeneinteilung anhand der stereologischen Ergebnisse erörtert, im zweiten Abschnitt werden die Auswirkungen der dopaminergen Degeneration in der SNc und VTA auf das Ausmaß des Rotationsverhaltens dargestellt. Im dritten Abschnitt wird der Einfluss des dopaminergen Zellverlustes in der SNc und VTA auf die Entwicklung von LH-Verhalten demonstriert.

#### **3.1 Gruppeneinteilung**

Die stereologische Auswertung der überlebenden TH-Zellen diente der Überprüfung des angestrebten Läsionserfolges und der Einteilung in post mortem Gruppen gemäß dem Ausmaß der Degeneration in der SNc und VTA. Als Referenz für das Ausmaß der Degeneration diente die nicht lädierte Seite, für die der Anteil dopaminergener Neurone mit 100% festgelegt wurde. Das Ausmaß der Degeneration auf der lädierten Seite wurde als Prozent von den 100% der nicht lädierten Seite ermittelt. Es zeigte sich, dass bei allen mit 6-OHDA behandelten Tieren zugleich eine Degeneration in der SNc und VTA vorhanden war, allerdings in unterschiedlichem Maße. Es erfolgte dann die Einteilung entweder nach der Läsion der VTA oder der SNc. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Anzahl  $n$  der Tiere in den einzelnen VTA- bzw. SNc-Gruppen ungefähr gleich groß war und dass die Läsionen des jeweils anderen Gebietes sich nicht signifikant unterschieden, um die Effekte der VTA- und SNc-Läsion getrennt voneinander beurteilen zu können. Auf diese Weise konnte die Größe der Begleitläsionen von jeweils der VTA oder der SNc angeglichen und als Kovariable gewertet werden. Durch diese Einteilung wurden die Daten aller Tiere zweimal analysiert, weswegen der P-Wert auf  $P = 0,025$  nach Bonferroni angepasst wurde.

Als Kriterium für die Bildung neuer Gruppen wurde das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA gewählt, unabhängig davon, welche 6-OHDA-Operation an den Tieren durchgeführt worden war. Es entstanden zwei neue Gruppen mit  $n=25$  (VTA1) und  $n=26$  (VTA2) Tieren und einer 29%-igen ( $\pm 2\%$ ) (VTA1) und 47%-igen ( $\pm 1\%$ ) (VTA2) Degeneration dopaminergener Zellen in der VTA, die sich zwischen den einzelnen Gruppen signifikant unterschieden ( $F(2,56) = 189,98$ ;  $P < 0,001$ ). Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc waren innerhalb der Gruppen etwa gleich stark ausgeprägt (VTA1 71%  $\pm 4\%$  and VTA2 70%  $\pm 5\%$ ) und unterschieden sich nicht signifikant ( $P > 0,05$ ); zu den Kontrollgruppen gab es signifikante Unterschiede

(F(2,56)=47m,77; P<0,001).

Gruppe	n	dopaminerge Degeneration VTA	dopaminerge Degeneration SNc
VTA1	25	29% ±2%	71% ±4%
VTA2	24	47% ±1%	70% ±5%

Eine weitere Gruppeneinteilung der 6-OHDA-operierten Ratten berücksichtigte als Kriterium das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc, unabhängig davon, welche Operation an den Tieren durchgeführt worden war. Es entstanden drei neue Gruppen mit n=19 (SNc1), n=16 (SNc2) und n=14 (SNc3) Tieren und einer 45%-igen (±3%) (SNc1), 75%-igen (±2%) (SNc2) und 98%-igen (±1%) (SNc3) Degeneration dopaminergere Zellen in der SNc. Zwischen den drei Gruppen war das unterschiedliche Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc signifikant (F(3,56) = 29.33, P<0.001), innerhalb der einzelnen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (P>0.05). Innerhalb dieser Gruppen war das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA Schwankungen unterworfen, die aber in jeder Gruppe in etwa gleich stark ausgeprägt waren (SNc1 35% ±3%, SNc2 41% ±23% and SNc3 38% ±3%) und sich nicht signifikant unterschieden (P>0.05), jedoch im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikante Unterschiede zeigten (F(3,56)=29.33, P<0.001).

Gruppe	n	dopaminerge Degeneration SNc	dopaminerge Degeneration VTA
SNc1	19	45% ±3%	35% ±3%
SNc2	16	75% ±2%	41% ±23%
SNc3	14	98% ±1%	38% ±3%

Den 6-OHDA-operierten Tieren wird die sham-operierte Kontrollgruppe mit n=8 Tieren gegenübergestellt. Auch in diesen Tieren wurden die Zellen in der VTA und SNc ausgezählt. Im Vergleich zu den operierten Gruppen wurden in den Kontrollgruppen im Mittel in der VTA 0% (±2%) degenerierte Zellen gezählt und in der SNc -2% ±2%.

Gruppe	n	dopaminerge Degeneration VTA	dopaminerge Degeneration SNc
Kontrolle	8	0% ±2%	-2% ±2%

## 3.2 Rotationsverhalten

Das Rotationsmodell nach Ungerstedt (Ungerstedt 1970) dient der Validierung des Ausmaßes der 6-OHDA-Läsion in der SNc. Wie schon im Kapitel Material und Methoden ausführlich erläutert, werden Verhaltenseffekte quantifiziert, die durch einseitige Läsionen oder Stimulationen des nigrostriatalen dopaminergen Neuronensystems verursacht und durch Amphetaminapplikation verstärkt werden. Je größer das Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc ist, um so häufiger rotieren die Tiere pro Minute.

Die Rotationsbewegungen der Ratten wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten registriert und die mittlere Anzahl der Rotationen pro Minute berechnet. Bei den 6-OHDA-operierten Tieren manifestierte sich die asymmetrische Stimulation des nigrostriatalen Systems durch Amphetamin in einem Rotationsverhalten in Richtung der lädierten Seite. Sham-operierte Kontrolltiere entwickelten unter der Amphetamin-Behandlung eine gesteigerte motorische Aktivität, die sich aber nicht in Rotationen mit Richtungspräferenz äußerte.

In den folgenden beiden Abschnitten wird der Einfluss der Degeneration dopaminergere Zellen in der SNc und der VTA auf die mittlere Anzahl der Rotationen pro Minute dargestellt.

### 3.2.1 Einfluss der VTA-Läsion auf das Rotationsverhalten

Das folgende Balkendiagramm (Abb. 8) stellt die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminergere Zellen in der VTA in die zwei Gruppen VTA1 (29%) und VTA2 (47%)] und die sham-operierte Kontrollgruppe dar. Die einzelnen Balken zeigen die mittlere Anzahl der Rotationen pro Minute. Die Tiere der Kontrollgruppe rotierten im Mittel 1,3 mal pro Minute  $\pm 0,51$  SEM. Im Vergleich zu der sham-operierten Kontrollgruppe wiesen alle Gruppen 6-OHDA-operierter Tiere eine signifikante Steigerung in der Anzahl der Rotationen pro Minute auf. In der Gruppe VTA1 zeigten die Ratten im Mittel 7,7 Rotationen pro Minute  $\pm 1,11$  SEM, in der Gruppe VTA2 im Mittel 8,2 Rotationen pro Minute  $\pm 1,22$  SEM.

Das unterschiedliche Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA in den beiden Gruppen VTA1 und 2 hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Stärke des Rotationsverhaltens ( $F(2,56) = 4,66$ ;  $P=0,014$ ). Dass das Rotationsverhalten dennoch statistisch signifikant stärker ausgeprägt ist im Vergleich zu der Kontrollgruppe, ist am

ehesten auf die Koläsion der SNc zurückzuführen.

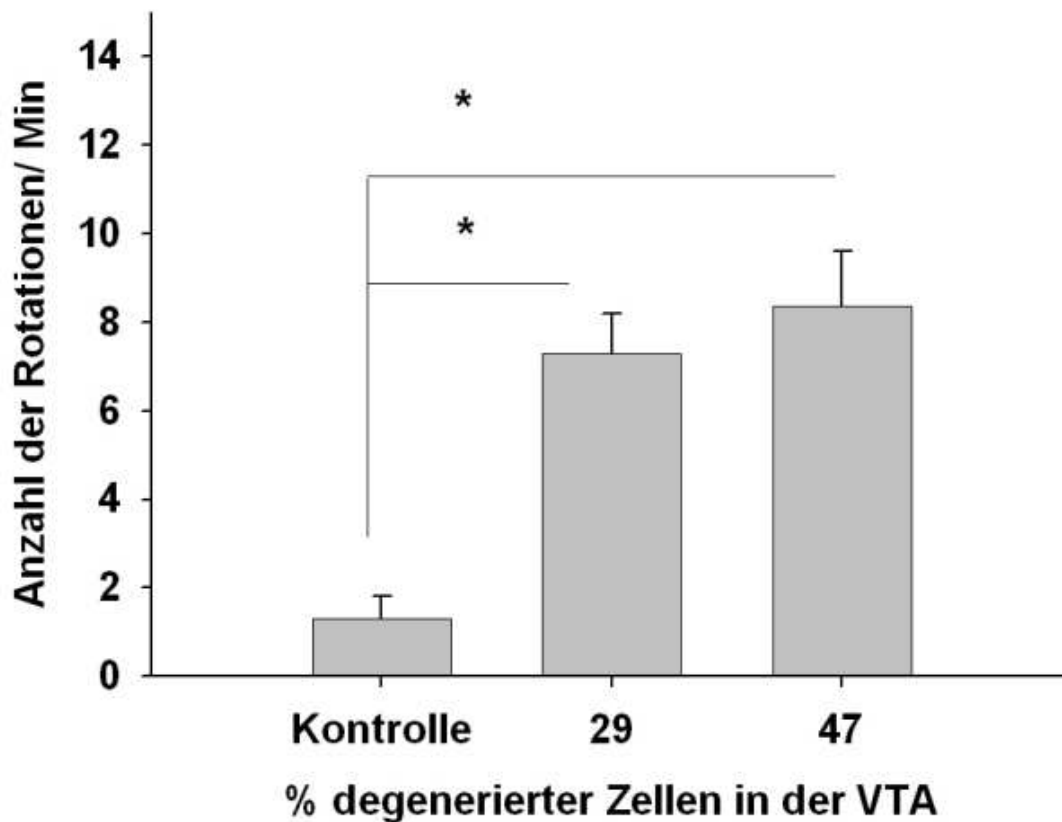


Abb. 8 **Einfluss der VTA-Läsion auf die Anzahl der Rotationen pro Minute**  
Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , t-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc (Kontrollgruppe  $-2\% \pm 2\%$ , VTA1  $71\% \pm 4\%$  and VTA2  $70\% \pm 5\%$ ).

### 3.2.2 Einfluss der SNc-Läsion auf das Rotationsverhalten

Das folgende Balkendiagramm (Abb. 9) stellt die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminergener Zellen in der SNc in die drei Gruppen SNc1 (45%), SNc2 (75%) und SNc3 (98%)] und die sham-operierte Kontrollgruppe dar. Die einzelnen Balken zeigen die mittlere Anzahl der Rotationen pro Minute. Wie im vorherigen Abschnitt 3.2.1 beschrieben rotierten die Tiere der Kontrollgruppe im Mittel 1,3 mal pro Minute  $\pm 0,51$  SEM. Im Vergleich zu der sham-operierten Kontrollgruppe wiesen alle Gruppen 6-OHDA-operierter Tiere eine signifikante Steigerung in der Anzahl der Rotationen pro Minute auf ( $F(3,56) = 18,66$ ;  $P < 0,001$ ). In der Gruppe SNc1 zeigten

die Ratten im Mittel 4,8 Rotationen pro Minute  $\pm$  0,74 SEM, in der Gruppe SNc2 im Mittel 7,8 Rotationen pro Minute  $\pm$  1,24 SEM. Im Vergleich zu SNc1 und SNc2 rotierten die Tiere der Gruppe SNc3 mit 13,8 Drehungen pro Minute  $\pm$  1,22 SEM signifikant häufiger.

Je stärker also die dopaminerge Läsion in der SNc ausgeprägt ist, desto häufiger rotieren die Ratten pro Minute.

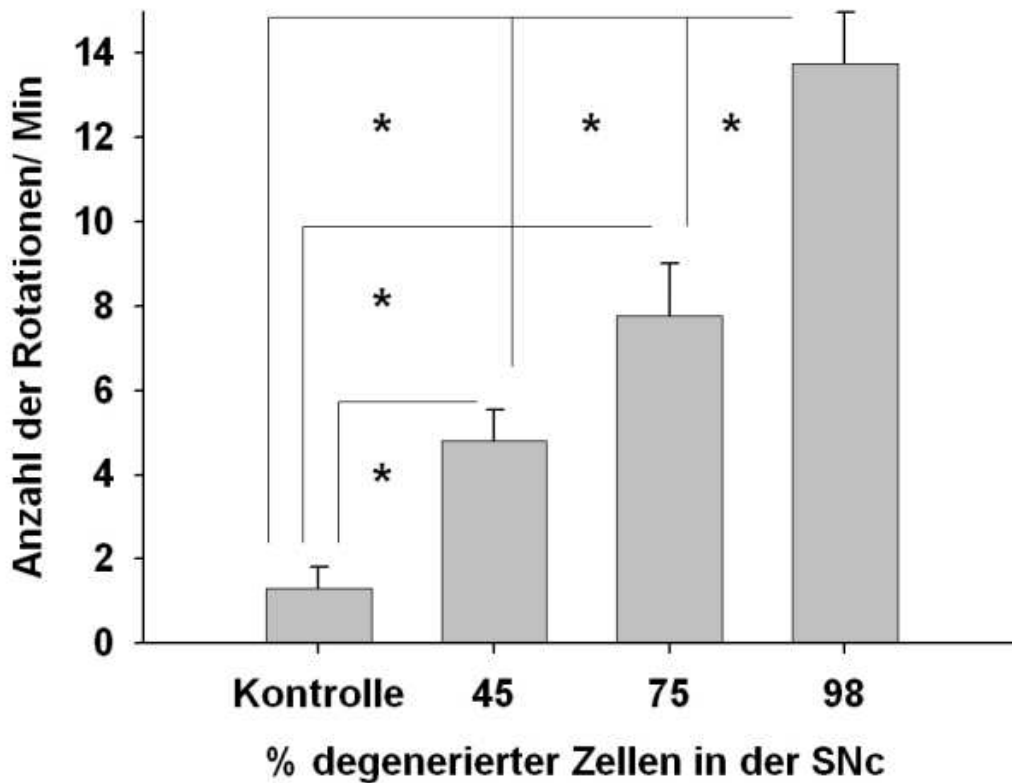


Abb. 9 Einfluss der SNc-Läsion auf die Anzahl der Rotationen pro Minute

Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \*P < 0.05, t-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA (Kontrollgruppe -2%  $\pm$ 2%, SNc1 35%  $\pm$ 3%, SNc2 41%  $\pm$ 23% and SNc3 38%  $\pm$ 3%).

### 3.3 LH-Verhalten

Jeder Test auf LH-Verhalten bestand aus 15 Phasen, je mit einer Stromexpositionsdauer von 60 Sekunden. Aufgrund der in Vorversuchen erarbeiteten Kriterien wurde LH-Verhalten für Ratten definiert, die seltener als 9 mal erfolgreich die Stromphasen durch

Tastendruck beendeten. Als Misserfolg wurde auch gewertet, wenn die Ratten bis zum Tastendruck 22 Sekunden oder mehr benötigten.

In den folgenden Abschnitten wird das LH-Verhalten einmal ausgedrückt durch die mittlere Latenz, nach der die Tiere die Stromexposition beendeten (Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3), zum weiteren durch die Anzahl des Tastendrucks, durch den die Stromphasen erfolgreich beendet wurde (Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5) und drittens unter Berücksichtigung sowohl der Latenz als auch der Häufigkeit anhand der definierten Kriterien für LH-Verhalten (Abschnitt 3.3.6 und 3.1.7).

### **3.3.1 Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe beendete die Stromexposition mit einer mittleren Latenz von 11 Sekunden  $\pm$  1,5 Sekunden am schnellsten (siehe folgende Abb.10). Kein Tier der Kontrollgruppe erfüllte die Kriterien für LH-Verhalten.

### **3.3.2 Einfluss der VTA-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der mittleren Latenz**

Das folgende Balkendiagramm (Abb. 10) zeigt auf der x-Achse die sham-operierte Kontrollgruppe und die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminerger Zellen in der VTA in die zwei Gruppen VTA1 (29%) und VTA2 (47%) mit einer jeweils konstanten Koläsion in der SNc]. Die einzelnen Balken stellen die mittlere Latenz in Sekunden dar, nach der die Tiere die Stromexposition durch Druck auf die Taste beendeten. Bei der Gruppe VTA1 liegt die mittlere Latenz mit 20,5 Sekunden  $\pm$  1,23 SEM signifikant höher verglichen mit der Kontrollgruppe. Im Vergleich zu den ersten beiden Gruppen liegt die mittlere Latenz, mit der die Gruppe VTA2 die Stromexposition mittels Tastendruck beendete, mit 27 Sekunden  $\pm$  1,28 SEM signifikant höher ( $F(2,854) = 25,57$ ;  $P < 0,001$ ).

Je stärker also die dopaminerge Läsion in der VTA ausgeprägt ist, desto stärker ist die mittlere Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde.

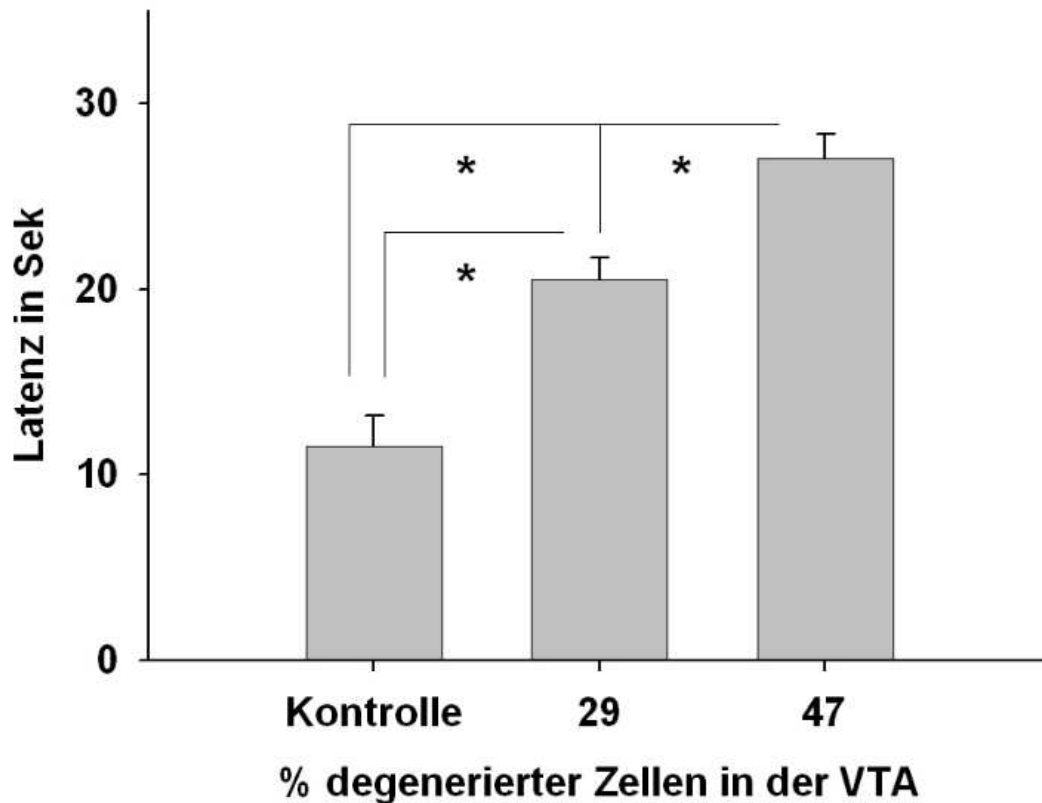


Abb. 10 Einfluss der VTA-Läsion auf das LH-verhalten, gemessen an der mittleren Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde

Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , t-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc (Kontrollgruppe  $-2\% \pm 2\%$ , VTA1  $71\% \pm 4\%$  and VTA2  $70\% \pm 5\%$ ).

### 3.3.3 Einfluss der SNc-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der mittleren Latenz

Im folgenden Balkendiagramm (Abb. 11) sind die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminergere Zellen in der SNc in die drei Gruppen SNc1 (45%), SNc2 (75%) und SNc3 (98%)] mit einer jeweils konstanten Koläsion in der VTA und die sham-operierte Kontrollgruppe dargestellt. Die einzelnen Balken zeigen die mittlere Latenz in Sekunden, nach der die Tiere die Stromexposition durch Druck auf die Taste beendeten. Wie im vorherigen Abschnitt 3.3.2 beschrieben, liegt die mittlere Latenz der Kontrollgruppe bei 11 Sekunden  $\pm$  1,5 Sekunden. Die Gruppe SNc1 benötigte im Mittel 14,8 Sekunden  $\pm$  1,21 SEM und zeigt damit keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und SNc1 liegt die mittlere Latenz, mit der

die Gruppe SNc2 die Stromexposition mittels Tastendruck beendete, mit 23,4 Sekunden  $\pm$  1,47 SEM signifikant höher. Eine weitere signifikante Steigerung der Latenz verglichen mit der Kontrollgruppe, der Gruppe SNc1 und der Gruppe SNc2 zeigt die Gruppe SNc3 mit 30,8 Sekunden  $\pm$  1,80 SEM ( $F(3,854) = 26,91$ ;  $P < 0,001$ ).

Je stärker also die dopaminerge Läsion in der SNc ausgeprägt ist, desto stärker ist die mittlere Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde.

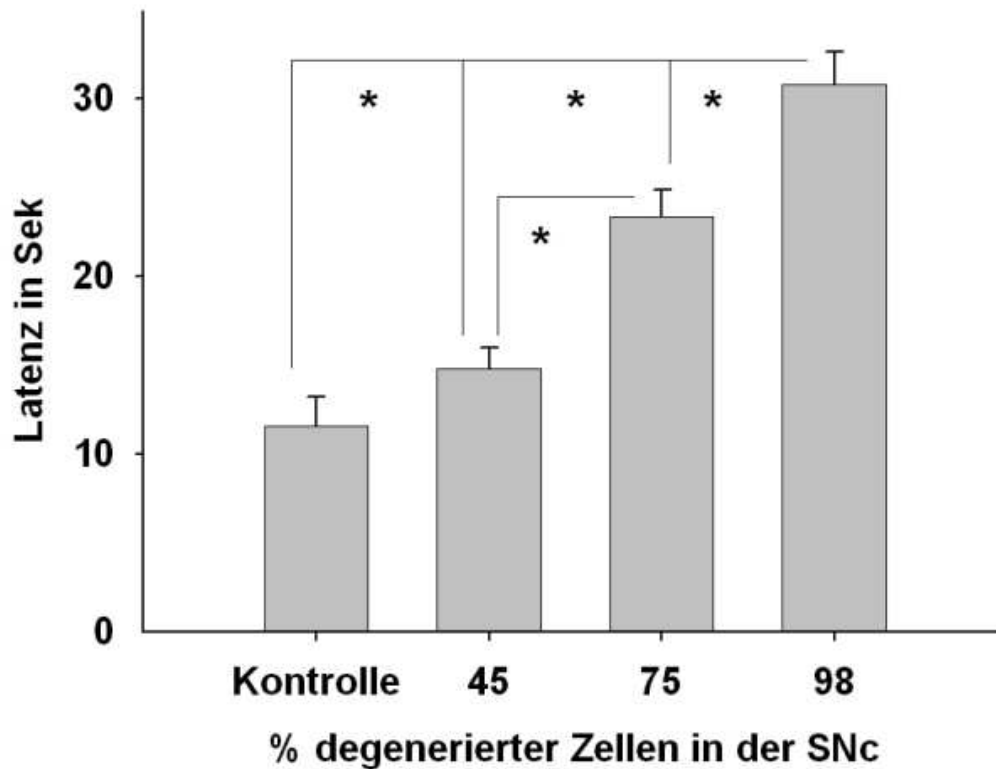


Abb. 11 Einfluss der SNc-Läsion auf das LH-verhalten, gemessen an der mittleren Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde

Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0,05$ , t-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA (Kontrollgruppe -2%  $\pm$ 2%, SNc1 35%  $\pm$ 3%, SNc2 41%  $\pm$ 23% and SNc3 38%  $\pm$ 3%).

### 3.3.4 Einfluss der VTA-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der Anzahl des Tastendrucks

Im nachfolgenden Balkendiagramm (Abb. 12) sind die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminerner Zellen in der VTA in die



zwei Gruppen VTA1 (29%) und VTA2 (47%)] und die sham-operierte Kontrollgruppe dargestellt. Die einzelnen Balken zeigen, wie oft die Ratten die 15 Stromphasen erfolgreich durch Tastendruck beendeten. Die Kontrollgruppe drückte die Taste im Mittel 13,9 mal  $\pm$  0,35 SEM. Die Gruppe VTA1 beendete im Mittel 11,96 Stromphasen  $\pm$  0,64 SEM durch Tastendruck. Die Tiere der Gruppe VTA2 drückten im Mittel 11,2 mal  $\pm$  0,79 SEM die Taste.

Je stärker also die dopaminerge Läsion in der VTA ausgeprägt ist, desto häufiger beendeten die Ratten die 15 Stromphasen erfolgreich durch Tastendruck. Durch den Tastendruck als Maß für das LH-Verhalten wird dieser Effekt jedoch nicht entsprechend deutlich ausgedrückt wie durch die mittlere Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde.

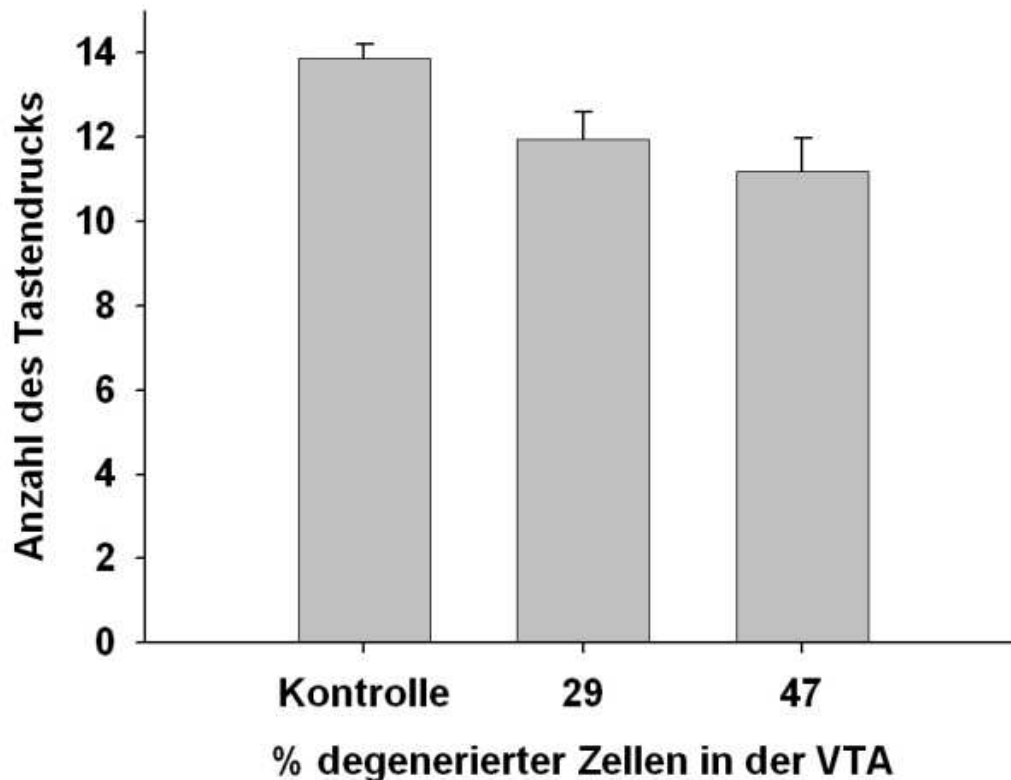


Abb. 12 Einfluss der VTA-Läsion auf das LH-verhalten, gemessen an der mittleren Anzahl des Tastendrucks, durch den die Stromphasen erfolgreich beendet wurden. Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \*P < 0.05, t-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc (Kontrollgruppe -2%  $\pm$ 2%, VTA1 71%  $\pm$ 4% and VTA2 70%  $\pm$ 5%).

### **3.3.5 Einfluss der SNc-Läsion auf LH-Verhalten, gemessen an der Anzahl des Tastendrucks**

Im folgenden Balkendiagramm (Abb. 13) sind die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminergere Zellen in der SNc in die drei Gruppen SNc1 (45%), SNc2 (75%) und SNc3 (98%)] und die sham-operierte Kontrollgruppe dargestellt. Die einzelnen Balken zeigen, wie oft die Ratten die 15 Stromphasen erfolgreich durch Tastendruck beendeten. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, drückte die Kontrollgruppe die Taste im Mittel 13,9 mal  $\pm$  0,35 SEM. Die Gruppe SNc1 beendete im Mittel 13,31 Stromphasen  $\pm$  0,45 SEM durch Tastendruck. Die Tiere der Gruppe SNc2 drückten im Mittel 10,9 mal  $\pm$  0,9 SEM die Taste und die Gruppe SNc3 10 mal  $\pm$  0,94 SEM.

Je stärker also die dopaminerge Läsion in der SNc ausgeprägt ist, desto häufiger beendeten die Ratten die 15 Stromphasen erfolgreich durch Tastendruck. Wie im vorherigen Abschnitt so gilt auch hier, dass durch den Tastendruck als Maß für das LH-Verhalten der Effekt nicht entsprechend deutlich ausgedrückt wird wie durch die mittlere Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde.

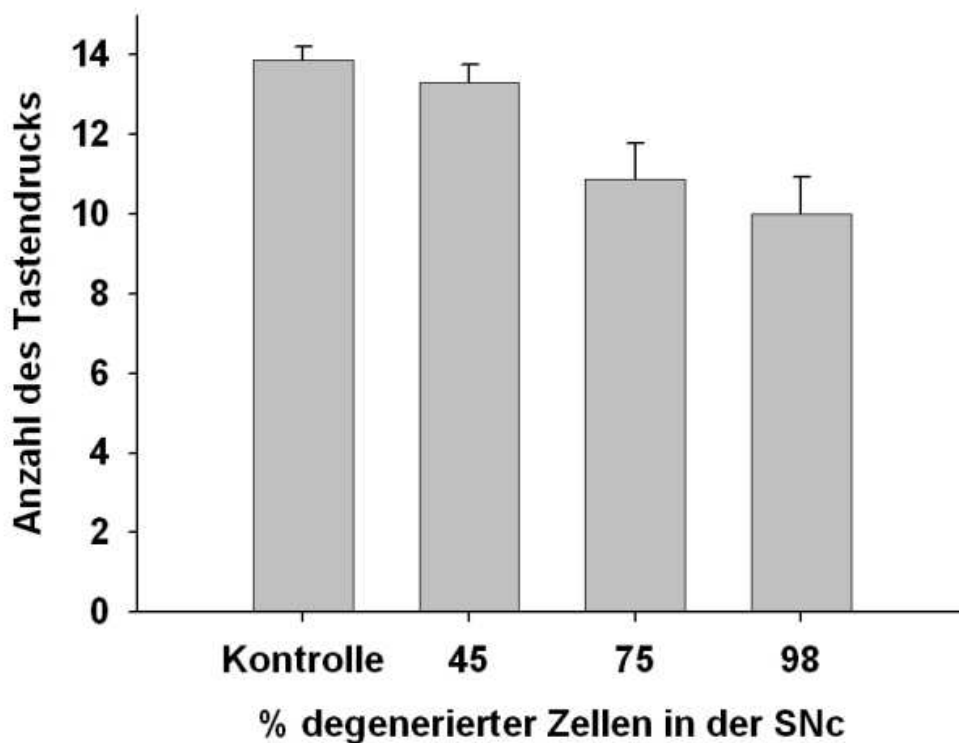


Abb. 13 Einfluss der SNc-Läsion auf das LH-verhalten, gemessen an der mittleren Anzahl des Tastendrucks, durch den die Stromphasen erfolgreich beendet wurden. Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , t-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA (Kontrollgruppe  $-2\% \pm 2\%$ , SNc1  $35\% \pm 3\%$ , SNc2  $41\% \pm 23\%$  and SNc3  $38\% \pm 3\%$ ).

### 3.3.6 Einfluss der VTA-Läsion auf LH-Verhalten

Das folgende Balkendiagramm (Abb. 14) stellt die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminergener Zellen in der VTA in die zwei Gruppen VTA1 (29%) und VTA2 (47%)] und die sham-operierte Kontrollgruppe dar. Die einzelnen Balken zeigen die Anzahl der Ratten mit LH-Verhalten in % (die seltener als 9 mal erfolgreich die Stromphasen durch Tastendruck beendeten, wobei ein Tastendruck nach  $\geq 22$  Sekunden als Misserfolg gewertet wurde). In der Kontrollgruppe war bei den Ratten kein LH-Verhalten festzustellen, die Tiere beendeten folglich jede Stromphase durch Tastendruck nach einer Latenz  $< 22$  Sekunden. Im Vergleich zu der sham-operierten Kontrollgruppe wiesen alle Gruppen 6-OHDA-operierter Tiere eine signifikante Steigerung im Auftreten von LH-Verhalten auf ( $X^2 = 11,12$ ;  $P < 0,004$ ). In

der Gruppe VTA1 zeigten 38,5% der Ratten LH-Verhalten. Im Vergleich zu VTA1 trat LH-Verhalten bei der Gruppe VTA2 mit 63% signifikant häufiger auf.

Je stärker also die dopaminerge Läsion in der VTA ausgeprägt war, desto mehr Ratten zeigten LH-Verhalten.

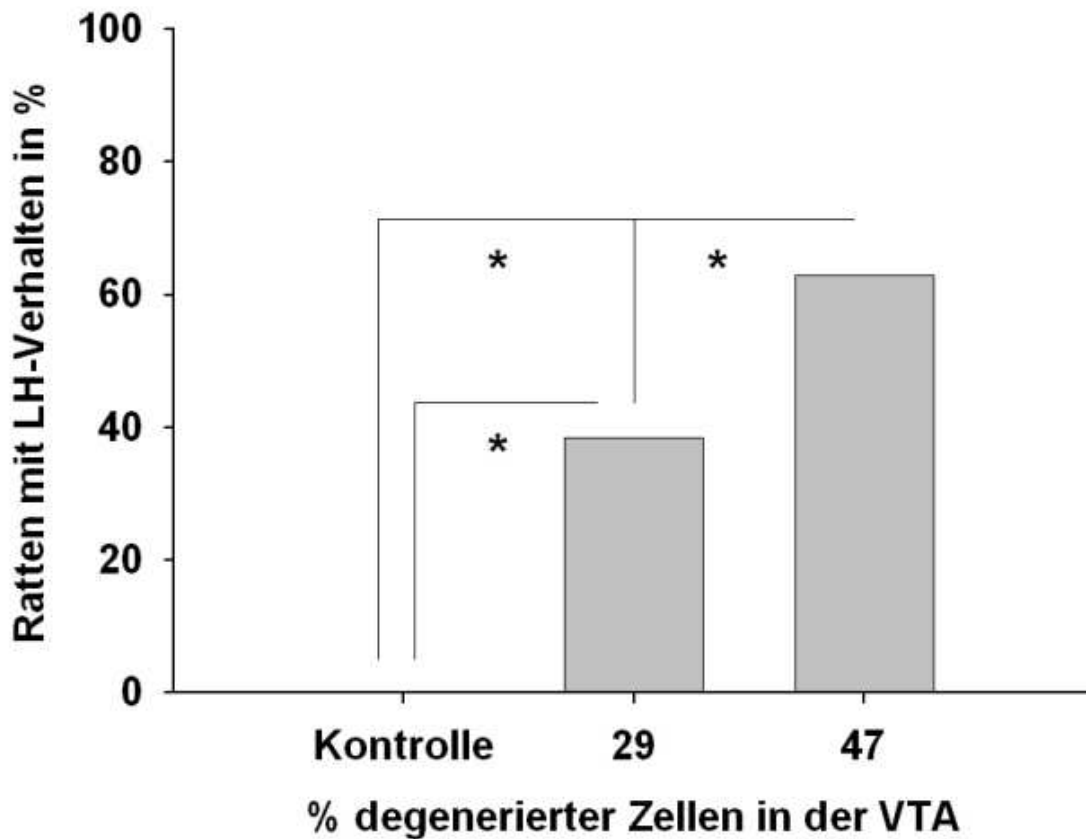


Abb. 14 **Einfluss der VTA-Läsion auf den Anteil der Ratten mit LH-Verhalten**  
 Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \*P < 0.05, X-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc (Kontrollgruppe -2%  $\pm$ 2%, VTA1 71%  $\pm$ 4% and VTA2 70%  $\pm$ 5%).

### 3.3.7 Einfluss der SNc-Läsion auf LH-Verhalten

Das folgende Balkendiagramm (Abb. 15) stellt die 6-OHDA-lädierten Ratten [aufgeteilt nach dem Ausmaß der Degeneration dopaminergere Zellen in der SNc in die drei Gruppen SNc1 (45%), SNc2 (75%) und SNc3 (98%)] und die sham-operierte Kontrollgruppe dar. Die einzelnen Balken zeigen die Anzahl der Ratten mit LH-Verhalten in % (die seltener

als 9 mal erfolgreich die Stromphasen durch Tastendruck beendeten, wobei ein Tastendruck nach  $\geq 22$  Sekunden als Misserfolg gewertet wurde). Wie im Abschnitt 3.3.6 schon beschrieben, war bei den Ratten der Kontrollgruppe kein LH-Verhalten festzustellen. Im Vergleich zu der sham-operierten Kontrollgruppe wiesen alle Gruppen 6-OHDA-operierter Tiere eine signifikante Steigerung im Auftreten von LH-Verhalten auf ( $X^2 = 21,89$ ;  $P < 0,001$ ). In der Gruppe SNc1 zeigten 15,8% der Ratten LH-Verhalten, verglichen damit war bei der Gruppe SNc2 mit 52,6% eine signifikante Steigerung im Auftreten von LH-Verhalten festzustellen. Im Vergleich zu SNc1 und SNc2 trat LH-Verhalten bei der Gruppe SNc3 mit 84,6% signifikant häufiger auf.

Je stärker also die dopaminerge Läsion in der SNc ausgeprägt war, desto mehr Ratten zeigten LH-Verhalten.

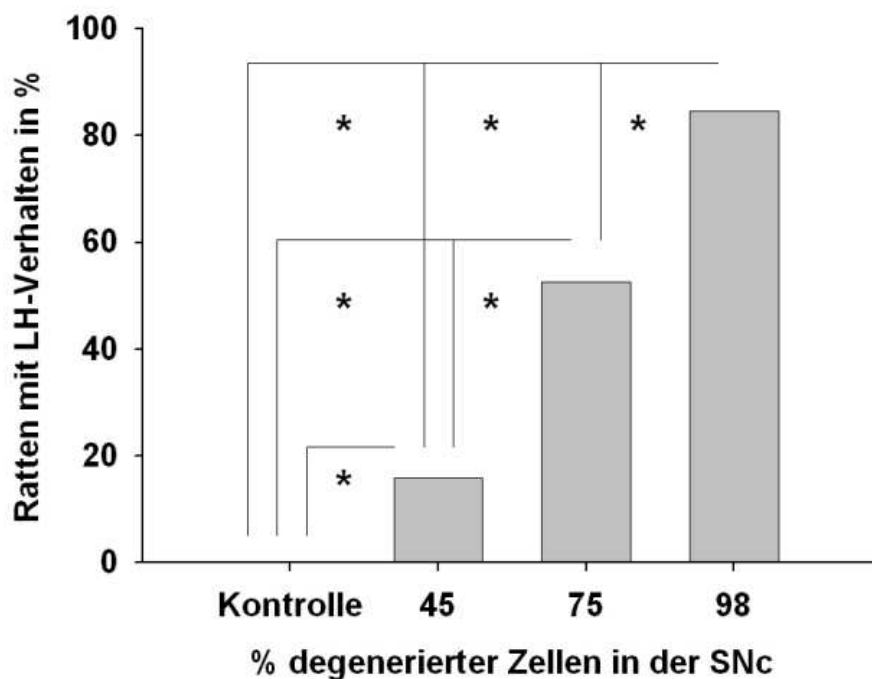


Abb. 15 **Einfluss der SNc-Läsion auf den Anteil der Ratten mit LH-Verhalten**  
 Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , X-Test. Schwankungen im Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA (Kontrollgruppe  $-2\% \pm 2\%$ , SNc1  $35\% \pm 3\%$ , SNc2  $41\% \pm 23\%$  and SNc3  $38\% \pm 3\%$ ).

## **4 Diskussion**

In dieser experimentellen Studie wurde die Bedeutung des dopaminergen Systems bei der Manifestation depressiven Verhaltens im Tiermodell an der Ratte untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, anhand des Learned-Helplessness-Tiermodells (LH-Modell) die Auswirkung der selektiven Degeneration dopaminergener Neurone in der VTA und SNc auf die Entwicklung depressiven Verhaltens zu untersuchen. Zentrale Frage dieser Arbeit war, ob auch schon eine alleinige Degeneration der SNc die Manifestation von LH-Verhalten bewirken kann.

Als Ergebnis konnte erstmalig gezeigt werden, dass die selektive dopaminerge Läsion in der VTA einen Einfluss auf die Entwicklung von LH-Verhalten der Ratte hat. Zudem konnte zum ersten Mal dargelegt werden, dass auch die selektive nigrale Degeneration die Entwicklung von LH-Verhalten beeinflusst. Die Ergebnisse stellen dar, dass die Wahrscheinlichkeit, LH-Verhalten zu entwickeln, mit dem zunehmenden Ausmaß der selektiven dopaminergen Läsion in diesen Kerngebieten steigt. Überträgt man diese Beobachtungen auf den Menschen, lassen sie möglicherweise darauf schließen, dass an der Manifestation depressiver Symptome im Rahmen des IPS degenerative Prozesse nicht nur in der VTA, sondern auch in der SNc beteiligt sein können.

In der folgenden Diskussion erfolgt zunächst eine kritische Auseinandersetzung über die Auswahl der Tiermodelle und die Gruppeneinteilung anhand der Stereologie. Dann werden die Ergebnisse dieser Arbeit unter besonderer Berücksichtigung der aktuellen wissenschaftlichen Literatur diskutiert, angefangen mit den Resultaten des Rotationsverhaltens und darauf mit den zentralen Ergebnissen dieser Studie, dem Einfluss einer dopaminergen Degeneration in der VTA und SNc auf die Entwicklung von LH-Verhalten. Schließlich wird eine Folgestudie mit Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit des LH-Verhaltens durch Pharmaka vorgestellt. Die Diskussion endet mit einer Darlegung der klinischen Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit.

### **4.1 Kritische Betrachtung der Tiermodelle**

Ein Tiermodell kann nicht unreflektiert auf die Ätiologie und Klinik der Krankheiten des Menschen, und insbesondere die humane Psychopathologie übertragen werden. In dieser Arbeit wird bei Ratten der Einfluss einer dopaminergen Degeneration in der VTA und SNc auf die Entwicklung von depressivem Verhalten untersucht. Die Studie versucht, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der parkinsonassoziierten Depression zu leisten. Sowohl bei hilflosen Tieren als auch bei depressiven Patienten

wurden ähnliche pathophysiologische Mechanismen gefunden, u.a. ein Hypometabolismus in Projektionen der VTA zum Striatum (Shumake und Gonzalez-Lima 2003). Eine Analogie zwischen dem medialen präfrontalen Kortex der Ratte und dem von Primaten, den Menschen eingeschlossen, ist bereits etabliert (Juckel et al. 1999). Diese Tatsache kann darauf hinweisen, dass es auch zwischen anderen Kerngebieten und Bahnensystemen Analogien zwischen Mensch und Ratte gibt.

Idiopathisch auftretende Parkinsonsyndrome sind bei Tieren nicht bekannt, so dass die Erkrankung in Modellen, wie dem 6-OHDA-Modell, simuliert wird. Dasselbe wurde in dieser Studie jedoch nicht angewendet, um Symptome des IPS zu untersuchen, sondern um eine selektive dopaminerge Degeneration im nigrostriatelen System zu erreichen und deren Auswirkungen auf depressives Verhalten bei Ratten zu untersuchen.

Inwiefern ist das LH-Modell als Tiermodell der Depression geeignet? Tiermodelle für psychiatrische Erkrankungen können nicht exakt die humane Psychopathologie simulieren, da sie nicht alle Aspekte des spezifisch humanen Verhaltens berücksichtigen. Sie können jedoch in einigen Aspekten mit psychiatrischen Erkrankungen übereinstimmen und man kann an ihnen durch Medikamente verursachte Verhaltensveränderungen und Hypothesen zur Pathophysiologie von psychiatrischen Erkrankungen untersuchen (Thiebot 1992). Im LH-Modell von Overmier und Seligman wird die erlernte Hilflosigkeit als ein pathogenetischer Faktor in der Manifestation der Depression angesehen (Overmier und Seligman 1967). Das LH-Modell für Ratten, bei dem über die Pfoten eine Stromapplikation stattfindet, ist sehr gut charakterisiert und besitzt eine hohe Validität als Modell für Depressionen (Henn 2005). Es ist das am besten untersuchte und validierte Tiermodell der Depression (Vollmayr und Henn 2001). Zudem besteht eine hohe Validität bezüglich einer Reduktion des LH-Verhaltens durch antidepressive Pharmakotherapie (Hitzemann 2000). Das LH-Modell konnte – im Gegensatz zu vielen anderen Tiermodellen der Depression – am Menschen reproduziert werden (Telner und Singhal 1984).

Ein weiterer Kritikpunkt am LH-Modell ist die Befürchtung, durch die LH-Verhaltenstestung nicht hilflose Tiere zu selektieren, sondern Tiere mit eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten. Ratten, die gelernt hatten, die Stromexposition zu vermeiden, können aber dennoch hilfloses Verhalten entwickeln (Vollmayr 2001). Kognitive Defizite korrelieren nicht mit LH-Verhalten (Vollmayr et al. 2004). Gegen einen entscheidenden Einfluss der kognitiven Fähigkeiten sprechen auch die Ergebnisse einer Folgestudie dieser Arbeit, in der LH-Verhalten sowie substanzinduziertes Rotationsverhalten von

Ratten durch Behandlung mit SSRI signifikant reduziert werden konnte (Winter et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden erstmalig Ratten mit einer selektiven dopaminergen Degeneration in der VTA und SNc im LH-Modell untersucht. Kritiker mögen einwenden, dass die Ratten durch die 6-OHDA-Operation motorisch beeinträchtigt sind und durch diese verminderte Mobilität seltener durch Druck auf die Taste die Stromapplikation beenden. Tatsächlich führt eine bilaterale Läsion dopaminergener Zellen zu einer hohen Mortalität und einer starken motorischen Beeinträchtigung der Tiere mit Akinesie, Aphagie und Adipsie (Ungerstedt 1968). Nach einer unilateralen Injektion von 6-OHDA zeigen die Ratten jedoch ein normales Verhalten (Winter et al. 2007). Die folgende Abbildung (Abb. 16) zeigt die Ergebnisse eines Zusatzexperiments über den Einfluss einer 6-OHDA-Applikation auf das motorische Verhalten von Ratten. Das motorische Verhalten der Tiere wurden 28 Tage nach 6-OHDA bzw. Sham-Operation auf einem offenen Feld einer Größe von 1 x 1 Metern untersucht. Gemessen wurde die Distanz in Metern, die die Ratten innerhalb von 10 Minuten zurücklegten. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied in der zurückgelegten Distanz.



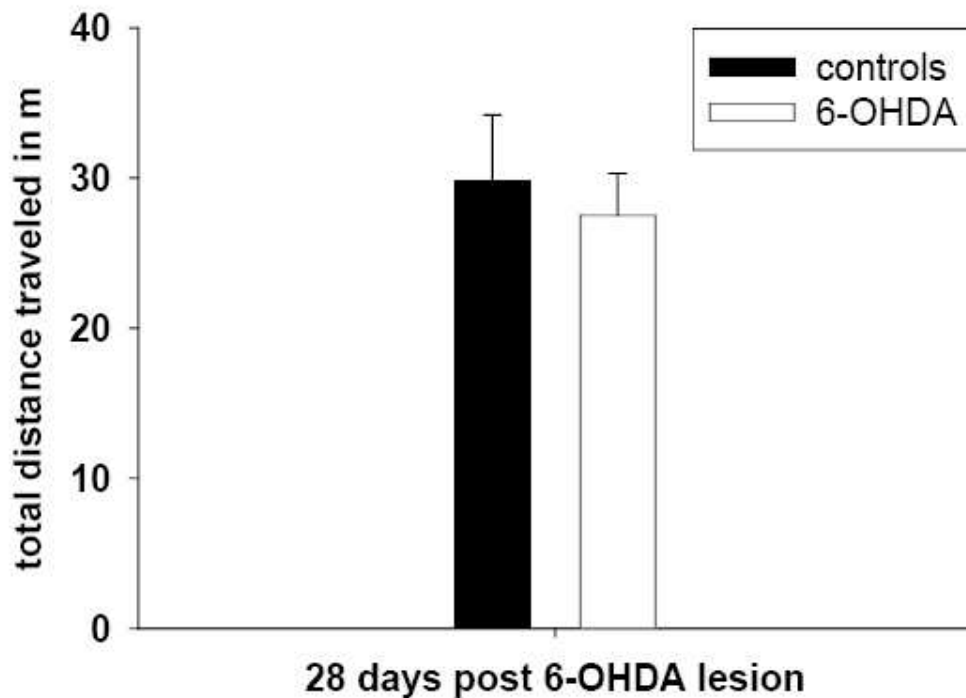


Abb. 16 **Einfluss einer 6-OHDA-Applikation auf das motorische Verhalten der Ratten.** Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , X-Test. Die Fortbewegung wird gemessen in Metern, die auf einem offenen Feld einer Größe von 1 x 1 m innerhalb von 10 Minuten zurückgelegt wurden. Die Kontroll- und die 6-OHDA-Gruppe bestehen jeweils aus  $n = 10$  Tieren.

Aus diesem Grund wurde die 6-OHDA-Injektion in dieser Studie nur in einer Hemisphäre durchgeführt, wie die meisten Studien zur Ätiologie und Pharmakotherapie des IPS (Kiric et al. 1998). Darüberhinaus treten depressive Symptome im Rahmen des IPS beim Menschen häufig als Frühsymptom der Erkrankung auf (Leentjens et al. 2003) und die motorischen Symptome sind zu Beginn in der Regel asymmetrisch ausgeprägt (Lang und Lozano 1998). Ein Schwachpunkt dieser Studie ist, dass das motorische Verhalten nicht separat überprüft wurde. Jedoch beeinträchtigen Bewegungsdefizite nicht das LH-Verhalten (Jackson et al. 1980, Vollmayr et al. 2004). Auch in dieser Studie war das Auftreten von depressivem Verhalten nicht von der Frequenz des Tastendrucks als Maß der Fortbewegungsfähigkeit abhängig. Unter alleiniger Beobachtung unterschieden

sich die 6-OHDA-behandelten Tiere sowohl unter Standardbedingungen im Käfig als auch während der Experimente in ihrem Verhalten nicht von sham-operierten Ratten und zeigten keine motorischen Defizite. Erst durch Applikation von Pharmaka mit Einfluss auf die dopaminerge Transmission zeigten die Tiere asymmetrisches Verhalten.

#### **4.2 Kritische Betrachtung der stereologischen Gruppeneinteilung**

Die endgültige Gruppeneinteilung erfolgte anhand der stereologischen Auswertung. Abhängig vom Ausmaß der dopaminergen Degeneration jeweils entweder in der SNc oder in der VTA wurden post mortem Gruppen gebildet. Wie in anderen Arbeiten beschrieben (Kirik et al. 1998), kam es auch in dieser Studie aufgrund der anatomischen Nähe der beiden Kerngebiete bei sämtlichen verwendeten Läsionsmodellen immer zu einer Koläsion des jeweiligen anderen Gebietes. Um die Effekte auf das Verhalten dennoch getrennt beurteilen zu können, wurde bei der Gruppeneinteilung das Ausmaß der Koläsionen angeglichen, so dass kein signifikanter Unterschied vorlag. Dadurch konnte die Begleitläsion als Kovariable gewertet werden.

Da in dieser Studie keine isolierte Läsion eines Kerngebietes gelang, ist die Aussagekraft der Ergebnisse begrenzt. Mittels einer Korrelationsanalyse konnte jedoch eine positive Korrelation zwischen der mittleren Latenz, nach der die Tiere die Stromexposition beendeten, und sowohl dem Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA, als auch der SNc dargestellt werden. Dies weist darauf hin, dass eine Degeneration dopaminergere Zellen in beiden Kerngebieten unabhängig voneinander Verhaltensänderungen bewirkt. Der Einfluss der 6-OHDA-Läsion in der VTA ist jedoch nur eingeschränkt beurteilbar, da die erreichte Degeneration ein Ausmaß von 50-60% nicht überschritt.

#### **4.3 Kritische Betrachtung der Rotationsverhaltens-Ergebnisse**

Zur Validierung des Ausmaßes der 6-OHDA-Läsion in der SNc in vivo und der Gruppeneinteilung wurde das substanzinduzierte Rotationsverhalten untersucht. Abhängig von der Stärke der dopaminergen Läsion in der SNc rotierten die Ratten unter Amphetamin im Durchschnitt zwischen 4 bis 14 mal pro Minute nach links. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Befunden von Ungerstedt und Kirik (Ungerstedt und Arbuthnott 1970, Kirik et al. 1998). Die systemische Applikation des indirekten Dopaminagonisten Amphetamin hemmt die DA-Rückaufnahme aus dem synaptischen Spalt in die intakten dopaminergen Neurone insbesondere der nicht-lädierten Hemisphäre, so dass auf der gesunden Seite eine erhöhte DA-Konzentration mit vermehrter

Stimulation postsynaptischer DA-Rezeptoren besteht. Durch asymmetrische Stimulation des nigrostriatalen Neuronensystems erfolgt ein Rotationsverhalten in Richtung der lädierten Seite. Das Rotationsverhalten der Ratten nach links lässt darauf schließen, dass das linke dopaminerge System durch 6-OHDA lädiert wurde und dass das rechte dopaminerge System intakt ist. Die Stärke des Rotationsverhaltens lässt Rückschlüsse auf die Präzision und das Ausmaß der dopaminergen Degeneration zu (Ungerstedt und Arbuthnott 1970).

Entgegen früherer Studien (Koob et al. 1981, Olds et al. 2006) zeigte das unterschiedliche Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA keinen Einfluss auf die Stärke des substanzinduzierten Rotationsverhaltens, wahrscheinlich aufgrund einer unterschiedlichen Methodik und der Selektivität der VTA und SNc-Läsion. Dass das Rotationsverhalten in den VTA-Gruppen dennoch statistisch signifikant stärker ausgeprägt ist verglichen mit der Kontrollgruppe, ist auf die Koläsion der SNc zurückzuführen. Der divergierende Einfluss der VTA und SNc-Läsion auf das Rotationsverhalten unterstützt die Hypothese, dass die beiden Kerngebiete unterschiedliche Bahnsysteme beeinflussen und dass die dopaminerge Degeneration in der VTA die motorische Schleife nicht beeinträchtigt. Möglicherweise führt eine dopaminerge Degeneration in der VTA über spezifische Pathomechanismen zur Entwicklung von depressivem Verhalten, unabhängig von Funktionsstörungen in der motorischen Schleife (Winter et al. 2007).

#### **4.4 Kritische Betrachtung der LH-Verhaltens-Ergebnisse**

In dieser Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass sowohl die VTA, als auch die SNc eine wichtige Rolle in der Manifestation depressiven Verhaltens bei Ratten spielen. Es wird vermutet, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen einer unilateralen nigralen dopaminergen Degeneration und dem Auftreten von depressiven Symptomen. Ob dieses Ergebnis auf die humane Situation und eine bilaterale dopaminerge Degeneration übertragen werden kann, werden Folgestudien zeigen. Da Depressionen oft als erstes Symptom des IPS auftreten (Leentjens et al. 2003), kann zu diesem Zeitpunkt die Erkrankung noch auf eine Körperhälfte beschränkt sein, so dass Depressionen bei asymmetrisch erkrankten Gehirnen auftreten können (Narushima et al. 2003).

Im Folgenden werden zunächst Maßnahmen zur Beurteilung des LH-Verhaltens besprochen und dann sowohl die Beteiligung der dopaminergen Degeneration in der VTA als auch in der SNc an der Entwicklung der Parkinson assoziierten Depression einzeln diskutiert.

#### **4.4.1 Beurteilung des LH-Verhaltens**

Im Ergebnisteil wurde das LH-Verhalten nach drei verschiedenen Kriterien beurteilt: erstens durch die mittlere Latenz, nach der die Tiere die Stromexposition beendeten, zweitens durch die Häufigkeit, mit der die Stromexposition beendet wurde und drittens unter Berücksichtigung sowohl der Latenz als auch der Häufigkeit anhand der definierten Kriterien für LH-Verhalten. Diese drei Betrachtungsweisen des LH-Verhaltens erwiesen sich als unterschiedlich geeignet. Als geeignet zur Darstellung des hilflosen Verhaltens erwies sich die Beurteilung des LH-Verhaltens anhand der mittleren Latenz und anhand der definierten Kriterien für LH-Verhalten. Wurde jedoch nur die Häufigkeit des Tastendrucks berücksichtigt, wurden auch Tiere als nicht hilflos bewertet, die die Taste erst gegen Ende der Stromphase betätigten. Solch eine späte Reaktion ist aber als hilflos zu werten. Um diese Tiere auszuschließen, wurden Kriterien zur Definition von LH-Verhalten erarbeitet, die sich an den von Vollmayr modifizierten Verhaltens-Fehler- und Verhaltens-Defizit-Kriterien orientierten (Vollmayr und Henn 2001). Die Verhaltens-Fehler-Kriterien definieren Ratten als hilflos, die in der Mehrzahl der Versuche kein Fluchtverhalten zeigen, die Verhaltens-Defizit-Kriterien definieren Ratten als hilflos, bei denen das Fluchtverhalten verlangsamt ist (Musty et al. 1990). Unter Berücksichtigung beider Kriterien und deren Modifikation nach Vollmayr wurden für die Ratten folgende Cut-off-Kriterien definiert: LH-Verhalten zeigten Ratten, die seltener als 9 mal erfolgreich die Stromphasen durch Tastendruck beendeten und die bis zum Tastendruck 22 Sekunden oder mehr benötigten. Die Cut-off-Kriterien müssen für jeden Rattenstamm und jedes Labor unter den Bedingungen vor Ort neu definiert werden. Während die Tiere der Kontrollgruppe nach einer wesentlich geringeren Latenzzeit die Taste drückten, waren die Unterschiede in der Häufigkeit des Tastendrucks zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant. Die geringen Unterschiede der operierten Tiere und der Kontrollgruppe bezüglich der Häufigkeit des Tastendrucks sind ein weiteres Argument gegen eine motorische Beeinträchtigung der operierten Tiere. Entgegen früherer Studien (Vollmayr und Henn 2001) zeigten die Tiere der Kontrollgruppe kein LH-Verhalten, was auf verschiedene Rattenstämme und die laborspezifischen Cut-off-Kriterien zurückzuführen ist. Um dennoch mögliche Effekte einer pharmakologischen Applikation auch bei der Kontrollgruppe zu beurteilen, kann die Latenz, nach der die Tiere die Stromexposition beendeten, herangezogen werden.

#### **4.4.2 Einfluss der VTA-Läsion auf die Entwicklung von LH-Verhalten**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der Zunahme der Anzahl degenerierter

Neurone in der VTA die Wahrscheinlichkeit LH-Verhalten zu entwickeln, ansteigt. Durch die Gruppeneinteilung wurde das Ausmaß der Koläsion in der SNc angeglichen, so dass die Begleitleäsion als Kovariable gewertet werden konnte und die Effekte der VTA - Läsion unabhängig von der SNc-Läsion beurteilt werden konnten. Mittels einer Korrelationsanalyse konnte eine positive Korrelation zwischen der mittleren Latenz, nach der die Tiere die Stromexposition beendeten, und dem Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der VTA nachgewiesen werden.

Für einen entscheidenden Einfluss der VTA an der Entwicklung von Depressionen im Rahmen des IPS weisen zahlreiche Befunde der wissenschaftlichen Literatur (Brown und Gershon 1993, Nissenbaum et al. 1987, Menza et al. 1990). Bei Parkinson-Patienten mit depressiven Symptomen wurde in post mortem Untersuchungen ein Verlust dopaminergener Neurone in der VTA beschrieben (Jellinger 1999). Zudem wird beim IPS eine Funktionseinschränkung des dopaminergen mesocorticolimbischen Weges beschrieben (Ring et al. 1994, Liebermann 2006), der seinen Ursprung in der VTA hat und unter anderem in subkortikale limbische Areale wie den Nucl. accumbens und das Corpus amygdaloideum projiziert. Chronischer Stress, wie er z.B. beim LH-Modell verursacht wird, führt zu vermindertem Fluchtverhalten. Dieses Verhaltensdefizit ist von verminderten extrazellulären Dopaminspiegeln im Nucl. accumbens begleitet (Gambarana 1999, Scott 1996).

#### **4.4.3 Einfluss der SNc-Läsion auf die Entwicklung von LH-Verhalten**

Die Ergebnisse legen erstmalig dar, dass die Zunahme der dopaminergen Degeneration in der SNc die Wahrscheinlichkeit, LH-Verhalten zu entwickeln, erhöht. Das Ausmaß der Koläsion in der VTA wurde durch die Gruppeneinteilung angeglichen, so dass die Begleitleäsion als Kovariable gewertet werden und die Effekte der SNc-Läsion unabhängig von der VTA-Läsion beurteilt werden konnten. Mittels einer Korrelationsanalyse konnte eine positive Korrelation zwischen der mittleren Latenz, nach der die Tiere die Stromexposition beendeten, und dem Ausmaß der dopaminergen Degeneration in der SNc nachgewiesen werden. Bislang weisen weder klinische noch experimentelle Studien auf eine Beteiligung der SNc in der Manifestation depressiven Verhaltens von Parkinson-Patienten. In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass unabhängig von einer Koläsion in der VTA das Ausmaß einer unilateralen dopaminergen Läsion in der SNc mit der Stärke von depressivem Verhalten bei Ratten korreliert.

## **4.5 Modulation des LH-Verhaltens durch Neuropharmaka**

Nach erfolgter Etablierung des in dieser Arbeit vorgestellten Tiermodells wurden in einer Folgestudie (CW, JK, AvR) weiterführende Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit des LH-Verhaltens durch Pharmaka, die die monoaminerge Transmission beeinflussen (Citalopram und L-Dopa), durchgeführt. Die 6-OHDA-operierten Ratten wurden in drei Gruppen P1, P2 und P3 mit je 19 Tieren eingeteilt. Alle drei Tiergruppen wurden nach dem ersten LH-Test nach einer Woche ein zweites Mal getestet. Gruppe P1 erhielt vor der zweiten LH-Testung NaCl, Gruppe P2 den SSRI Citalopram und Gruppe P3 L-Dopa.

### **4.5.1 Einfluss einer Therapie auf LH-Verhalten, gemessen an der mittleren Latenz**

Im folgenden Balkendiagramm (Abb. 17) sind die drei Gruppen P1(NaCl), P2 (SSRI) und P3 (L-Dopa) dargestellt. Die Ausgangswerte des 1. LH-Testes werden für alle Gruppen mit einer mittleren Latenz von 100% dargestellt. Die einzelnen Balken zeigen die mittlere Latenz in Prozent im 2. LH-Test im Vergleich zu den Basiswerten des 1. LH-Testes. Die systemische Applikation von NaCl, SSRI und L-Dopa hatte einen jeweils unterschiedlichen Effekt auf die Latenz, nach der die Tiere die Stromexposition durch Druck auf die Taste beendeten ( $F(2,734) = 16,68; P < 0,001$ ). Vor dem zweiten LH-Test mit NaCl oder L-Dopa behandelte Tiere zeigten keine signifikante Veränderung in der Latenz verglichen mit dem ersten LH-Test (P1:  $P = 0,36$ ; P3:  $P = 0,32$ ). Mit dem SSRI Citalopram behandelte Tiere zeigten eine signifikante Abnahme der Latenz um  $> 40\%$  ( $P < 0,001$ ).

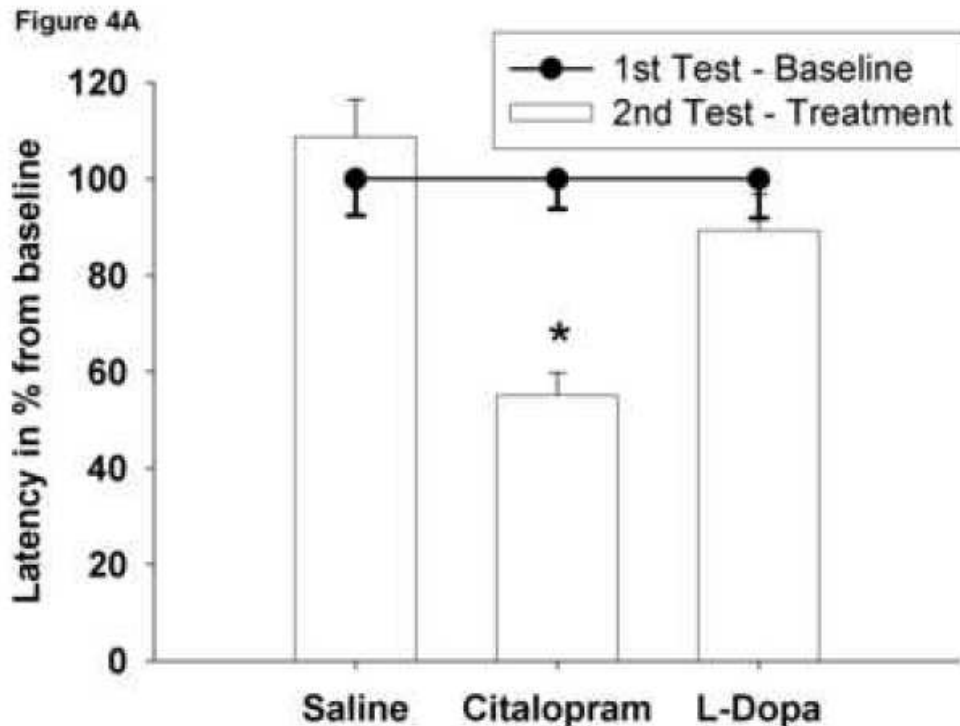


Abb. 17 Einfluss einer Behandlung vor dem 2. LH-Test auf das LH-Verhalten im Vergleich zum Ausgangswert des 1. LH-Test, gemessen an der mittleren Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde

Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , t-Test.

#### 4.5.2 Einfluss einer Therapie auf LH-Verhalten

Im folgenden Balkendiagramm (Abb. 18) sind die drei Gruppen P1 (NaCl), P2 (SSRI) und P3 (L-Dopa) dargestellt. Die Ausgangswerte des 1. LH-Testes werden für alle Gruppen mit einem LH-Verhalten von 100% dargestellt. Die einzelnen Balken zeigen die Anzahl der Ratten mit LH-Verhalten in % im 2. LH-Test im Vergleich zu den Basiswerten des 1. LH-Testes. Die systemische Applikation von NaCl, SSRI und L-Dopa hatte einen jeweils unterschiedlichen Effekt auf die Anzahl der Ratten mit LH-Verhalten in % (die seltener als 9 mal erfolgreich die Stromphasen durch Tastendruck beendeten, wobei ein Tastendruck nach  $\geq 22$  Sekunden als Misserfolg gewertet wurde) ( $X^2 = 21,89$ ;  $P < 0,001$ ). Vor dem zweiten LH-Test mit NaCl behandelte Tiere zeigten keine Abnahme im Auftreten von LH-Verhalten verglichen mit dem ersten LH-Test (2. LH-Test = 100% vom 1. LH-Test). Mit dem SSRI Citalopram behandelte Tiere wiesen eine signifikante Abnahme im Auftreten von LH-Verhalten von  $> 50\%$  auf ( $z = 3,27$ ;  $P = 0,001$ ). Im

Gegensatz zur Darstellung der Latenz in Prozent, wurde bei der Beurteilung des LH-Verhaltens auch bei der Behandlung mit L-Dopa im 2. LH-Test eine signifikante Abnahme des LH-Verhaltens sichtbar ( $z = 2,29$ ;  $P = 0,02$ ).

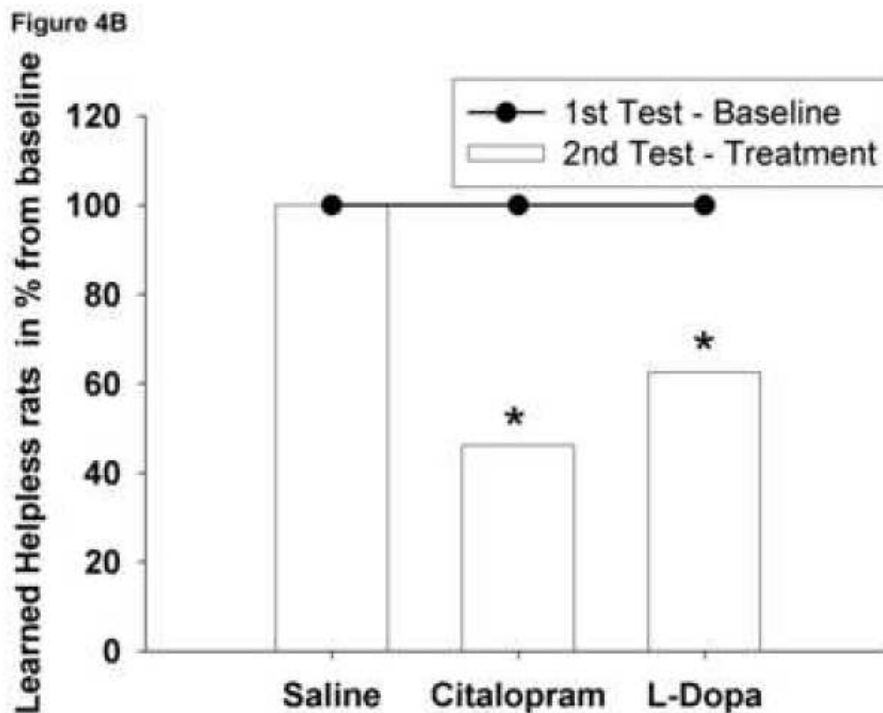


Abb. 18 Einfluss einer Behandlung vor dem 2. LH-Test auf den Anteil der Ratten mit LH-Verhalten im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert des 1. LH-Test  
 Daten als Mittelwert und Fehlerbalken als  $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$ , t-Test.

In der Folgestudie konnte gezeigt werden, dass sich das Tiermodell der Parkinson assoziierten Depression eignet, um die Wirkung antidepressiver Pharmaka auf LH-Verhalten zu untersuchen. Dies entspricht der weit verbreiteten Meinung, dass das LH-Modell eine hohe Validität bezüglich einer Reduktion des LH-Verhaltens durch antidepressive Pharmakotherapie besitzt (Hitzemann 2000). Als Ergebnis der Folgestudie zeigten sowohl die systemisch mit dem SSRI Citalopram, als auch die mit L-Dopa behandelten Tiere eine signifikante Abnahme von Depressionen ähnlichem Verhalten, dass durch dopaminerge Läsionen im nigrostriatalen und mesolimbischen System hervorgerufen worden war. Dies stimmt mit der aktuellen wissenschaftlichen Literatur überein, in der eine klinisch relevante Wirksamkeit von SSRI auf die depressive Symptomatik mehrfach belegt wurde (McCance-Katz et al. 1992, Simons 1996, Hauser



and Zesiewicz 1997). In einer Studie an Ratten fanden sich Hinweise, dass antidepressive Pharmaka wie z. B. der SSRI Fluoxetin das dopaminerge System beeinflussen. Im Nucl. accumbens der Ratten wurde eine erhöhte Expression des postsynaptischen Dopamin D2-Rezeptors registriert (Ainsworth 1998). Antidepressive Pharmaka verbessern ein in Ratten durch chronischen Stress verursachtes vermindertes Fluchtverhalten und heben einen ursprünglich erniedrigten extrazellulären Dopaminspiegel im Nucl. accumbens auf normal hohe Werte an (Gambarana 1999). Die therapeutische Wirksamkeit von SSRI hängt möglicherweise mit der Bedeutung des serotonergen Systems in den pathophysiologischen Mechanismen der Parkinson assoziierten Depression mit einer reduzierten serotonergen Aktivität im dorsalen Raphekern zusammen. (Chan-Palay und Asan 1989). Zudem wurde eine allgemein erniedrigte Aktivität des cerebralen serotonergen Systems beschrieben (Mayeux 1990).

Auch für Pharmaka, die in das dopaminerge System eingreifen, wird eine Verbesserung der depressiven Symptomatik beschrieben. In einer Studie an Parkinson-Patienten konnte durch L-Dopa eine Verbesserung der Depressionen erreicht werden (Maricle et al. 1995). Trotz der Bedeutung, die der verminderte Dopamingehalt in der Pathophysiologie von Depressionen spielt, zeigte sich in mehreren anderen Studien hingegen, dass L-Dopa und Dopaminagonisten nicht konsistent zu einer Reduktion der depressiven Symptomatik führen (Allain et al. 2000). Während in dieser experimentellen Arbeit mit Citalopram behandelte Tiere sowohl eine Abnahme der Latenz, nach der die Stromexposition beendet wurde, als auch eine Abnahme von LH-Verhalten aufwiesen, konnte durch L-Dopa-Therapie lediglich eine Abnahme von LH-Verhalten gezeigt werden, was vermutlich auf eine höhere Sensitivität und Spezifität der kombinierten Verhaltens-Fehler- und Verhaltens-Defizit-Kriterien im Vergleich zur Latenz zurückzuführen ist (Winter et al. 2007).

## **4.6 Klinische Relevanz**

Depressive Verstimmungen stellen das häufigste psychiatrische Symptom und Frühsymptom des Idiopathischen Parkinson Syndroms, einer der häufigsten neurologischen Erkrankungen, dar. Durch die depressive Symptomatik wird die Lebensqualität von Parkinsonpatienten sogar stärker eingeschränkt als durch die motorische Beeinträchtigung (Karlsen 1999). Dennoch sind die pathophysiologischen Mechanismen von Depressionen im Rahmen des IPS noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer dopaminergen Läsion in der SNc und VTA auf die Entwicklung von depressivem Verhalten im Tiermodell untersucht. Die Ergebnisse

dieser Studie zeigen, dass sowohl die Degeneration dopaminerger Zellen in der SNc als auch in der VTA an der Entwicklung depressiven Verhaltens von Ratten beteiligt ist. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, die Pathophysiologie der Parkinson assoziierten Depression besser zu verstehen. Ferner zeigt eine Folgestudie, dass das in dieser Arbeit etablierte Tiermodell die Durchführung pharmakologischer Studien erlaubt und somit zur Entwicklung effektiver Therapieformen beitragen kann.

## **5 Zusammenfassung**

Beim idiopathischen Parkinson-Syndrom handelt es sich um eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Dieses hypokinetisch-rigide Syndrom weist neben den motorischen Kardinalsymptomen als häufigste psychiatrische Symptome und Frühsymptome depressive Störungen auf. Durchschnittlich 40% der Parkinson-Patienten leiden an depressiven Episoden.

Die bedeutende Rolle der Depression im Rahmen des IPS begründet sich durch mehrere Faktoren. Als ein, wenngleich unspezifisches Frühsymptom, kann sie entscheidend zur frühen Diagnosestellung und Therapie des IPS beitragen. Depressionen führen zu einer überproportional starken Beeinträchtigung der Lebensqualität unabhängig vom Grad der motorischen Behinderung. Die pathophysiologischen Mechanismen der Parkinson assoziierten Depression sind bislang noch nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit war es, das ungenügende Verständnis dieser Pathomechanismen zu erweitern.

In dieser Studie wurde eine selektive Degeneration dopaminergener Neurone in der VTA und SNc der Ratte herbeigeführt und die Effekte dieses Neuronenverlustes auf die Entwicklung von LH-Verhalten der Tiere untersucht. Post mortem erfolgte mittels stereologischer Auszählung eine Gruppeneinteilung entsprechend dem Ausmaß der dopaminergen Läsion in der SNc einerseits und in der VTA andererseits. Anschließend wurde die Läsionsgröße mit den Verhaltensergebnissen korreliert.

Die Hypothese aus der Einleitung, dass das dopaminerge System, insbesondere die VTA, einen entscheidenden Einfluss bei der Entwicklung der Parkinson assoziierten Depression spielt, konnte erstmals bestätigt werden. Darüber hinaus konnte die zentrale Frage dieser Arbeit beantwortet werden: nicht nur eine dopaminerge Läsion in der VTA, sondern auch eine nigrale Läsion beeinflusst die Entwicklung von LH-Verhalten. Erstmals konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass sowohl die dopaminerge Degeneration in der VTA als auch in der SNc die Wahrscheinlichkeit, LH-Verhalten zu entwickeln, erhöht. In einer Folgestudie erwies sich das Tiermodell auch als geeignet, um die Wirkung antidepressiver Pharmaka auf LH-Verhalten zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass im Tiermodell die Degeneration dopaminergener Zellen in der SNc und VTA zur Entwicklung depressiven Verhaltens bei Ratten beiträgt. Ob diese tierexperimentellen Resultate auf die klinische Situation übertragen werden können, macht weitere Studien erforderlich.

## Literaturverzeichnis

**Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, et al** (1999) Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67** (4), 492-496.

**Agid Y** (1991) Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* **337**, 1321-1323.

**Agren H, Reibring L, Hartvig P, et al** (1991) Low brain uptake of L-<sup>11</sup>C-5-hydroxytryptophan in major depression: A positron emission tomography on patients and healthy volunteers. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **83**, 449-455.

**Ahlskog JE and Muenter MD** (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* **16**, 448-458.

**Ainsworth K, Smith SE, Zetterstrom TS, Pei Q, Franklin M, Sharp T** (1998) Effect of antidepressant drugs on dopamine D1 and D2 receptor expression and dopamine release in the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **140**(4), 470-7.

**Aldenhoff J** (2000). *Psychobiologie der Depression*. *Nervenheilkunde* **5**, 280-285.

**Alexander GE, Crutcher MD, De Long MR** (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: Parallel substrates for motor, oculo-motor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Progr Brain Res* **85**, 119-146.

**Alexander GE, DeLong MR, Strick PL** (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* **9**, 357-81.

**Allain H, Schuck S, Mauduit N** (2000) Depression in Parkinson's disease. *BMJ* **320**(7245), 1287-8.

**Amsterdam JD and Mozley PD** (1992) Temporal lobe asymmetry with iofetamine (IMP) SPECT imaging in patients with major depression. *Journal of Affective Disorders* **24**, 43-53.

**Andersen J, Aabro E, Gulmann N, Hjelmsted A, Pedersen HE** (1980) Anti-depressive treatment in Parkinson's disease: a controlled trial of the effect of nortriptyline in patients with Parkinson's disease treated with L-Dopa. *Acta Neurol Scand* **62**, 210-219.

**Anguenot A, Loll PY, Neau JP, Ingrand P, Gil R** (2002) Depression and Parkinson's Disease: study of a series of 135 Parkinson's patients. *Can J Neurol Sci* **29**(2), 139-46.

**Barone P, Scarzella L, Marconi R, et al** (2006) Pramipexole versus sertraline in the treatment of depression in Parkinson's disease : A national multicenter parallel-group randomized study. *J Neurol* **253(5)**, 601-7.

**Beck AT and Steer RA** (1987) Beck Depression Inventory - Manual. San Antonio: The Psychological Association.

**Becker T, Becker G, Seufert J, et al** (1997) Parkinson's disease and depression: evidence for an alteration of the basal limbic system detected by transcranial sonography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**, 590-595.

**Bezard E, Imbert C and Gross CE** (1998) Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic. *Rev Neurosci* **9**, 71-90.

**Bieliauskas LA and Glantz RH** (1989) Depression type in Parkinson disease. *J Clin Exp Neuropsychol* **(5)**, 597-604.

**Brown AS and Gershon S** (1993) Dopamine and depression. *J Neural Transm Gen* **91(2-3)**, 75-109.

**Brown RG, MacCarthy B, Gotham AM, Der GJ, Marsden CD** (1988) Depression and disability in Parkinson's disease: a follow-up of 132 cases. *Psychol Med* **18(1)**, 49-55.

**Buchwald B, Angersbach D, Jost WH** (2007) Improvements in motor and non-motor symptoms in parkinson patients under ropinirole therapy. *Fortschr Neurol Psychiatr* **75(4)**, 236-41.

**von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, et al** (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* **15(4)**, 473-90.

**Cantello R, Aguggia M, Gilli M, et al** (1989) Major depression in Parkinson's disease and the mood response to intravenous methylphenidate: possible role of the "hedonic" dopamine synapse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **52(6)**, 724-31.

**Ceravolo R, Nuti A, Piccinni A, et al** (2000) Paroxetine in Parkinson's disease: effects on motor and depressive symptoms. *Neurology* **55(8)**, 1216-1218.

**Chan-Palay V, Asan E** (1989) Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol* **287(3)**, 373-92.

**Contreras-Vidal JL, Stelmach GE** (1995) A neural model of basal ganglia-thalamocortical relations in normal and parkinsonian movement. *Biol Cybern* **73(5)**, 467-76.

**Cummings JL** (1992) Depression and Parkinson's disease: a review. *Am J Psychiatry* **149**, 443-454.

**Drevets WC und Raichle ME** (1992) Neuroanatomical circuits in depression: Implications for treatment mechanisms. *Psychopharmacological Bulletin* **28**, 261.

**Ebert D, Ebmeier KP** (1996) The role of the cingulate gyrus in depression: from functional anatomy to neurochemistry. *Biol Psychiatry* **39(12)**, 1044-50.

**Ehmann TS, Beninger RJ, Gawel MJ, Riopelle RJ** (1990) Depressive symptoms in Parkinson's disease: a comparison with disabled control subjects. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **3(1)**, 3-9.

**Faber R und Trimble MR** (1991) Electroconvulsive therapy in Parkinson's disease and other movement disorders. *Mov Dis* **6**, 293-303.

**Fallon JH und Moore RY** (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* **180(3)**, 545-80.

**Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF** (2005) Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* **2(3)**, 495-503.

**Gambarana C, Masi F, Tagliamonte A, Scheggi S, Ghiglieri O, De Montis MG** (1999) A chronic stress that impairs reactivity in rats also decreases dopaminergic transmission in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *J Neurochem* **72(5)**, 2039-46.

**Gasser T** (1998) Genetics of Parkinson's disease. *Clin Genet* **54**, 259-265.

**George MS, Ketter TA, Post RM** (1993) SPECT and PET imaging in mood disorders. *J Clin Psychiatry* **54 Suppl**, 6-13.

**Goodwin GM** (1997) Neuropsychological and neuroimaging evidence for the involvement of the frontal lobes in depression. *J Psychopharmacol* **11(2)**, 115-22.

**Goetz CG** (1986) Charcot on Parkinson's disease. *Mov Disord* **1(1)**, 27-32.

**Gotham AM, Brown RG, Marsden CD** (1986) Depression in Parkinson's disease: a quantitative and qualitative analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **49(4)**, 381-9.

**Gundersen HJ and Jensen EB** (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* **147 (3)**, 229–263.

**Guttman M, Boileau I, Warsh J, et al** (2007) Brain serotonin transporter binding in non-depressed patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* **14(5)**, 523-8.

**Haltenhof H und Schröter C** (1994) Depression beim Parkinson-Syndrom - eine Literaturübersicht. *Fortschr Neurol Psychiatr* **62**, 94-101.

**Hamilton M** (1960) A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **23**, 56-62.

**Hauser RA, Zesiewicz TA** (1997) Sertraline for the treatment of depression in Parkinson's disease. *Mov Dis* **12(5)**, 756-759.

**Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ** (1980) Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine and DOPA. *Pharmacol Biochem Behav* **12**, 185-188.

**Henderson R, Kurlan R, Kersun JM, Como P** (1992) Preliminary examination of the comorbidity of anxiety and depression in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **4 (3)**, 257-64.

**Henn FA, Vollmayr B** (2005) Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci Biobehav Rev* **29(4-5)**, 799-804.

**Hitzemann R** (2000) Animal models of psychiatric disorders and their relevance to alcoholism. *Alcohol Res Health* **24(3)**, 149-58.

**Hobson P, Holden A, Meara J** (1999) Measuring the impact of Parkinson's disease with the Parkinson's disease quality of life questionnaire. *Age Ageing* **28(4)**, 341-6.

**Hoehn MM and Yahr MD** (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* **17(5)**, 427-442

**Huber SJ, Freidenberg DL, Paulson GW, Shuttleworth EC, Christy JA** (1990) The pattern of depressive symptoms varies with progression of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **53(4)**, 275-8.

**Hwang DY, Fleming SM, Ardayfio P, et al** (2005) 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **25(8)**, 2132-7.

**Jackson RL, Alexander JH, Maier SF** (1980) Learned helplessness, inactivity, and associative deficits: effects of inescapable shock on response choice escape learning. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **6(1)**, 1-20.

**Jagust WJ, Reed BR, Martin EM, Eberling JL, Nelson-Abbott RA** (1992) Cognitive function and regional cerebral blood flow in Parkinson's disease. *Brain* **115**, 521-537.

**Jancovic J** (2000) Complications and limitations of drug therapy for Parkinson's disease. *Neurology* **55**, 2-6.

**Javoy-Agid F, Agid Y** (1980). Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* **30(12)**, 1326-30.

**Jellinger K** (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* **14(3)**, 153-97.

**Jellinger KA** (1999) Post mortem studies in Parkinson's disease - is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J Neural Transm Suppl* **56**, 1-29.

**Juckel G, Mendlin A, Jacobs BL** (1999) Electrical stimulation of rat medial prefrontal cortex enhances forebrain serotonin output: implications for electroconvulsive therapy and transcranial magnetic stimulation in depression. *Neuropsychopharmacology* **21(3)**, 391-8.

**Karlsen KH, Larsen JP, Tandberg E, Maeland JG** (1999) Influence of clinical and demographic variables on quality of life in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66(4)**, 431-435.

**Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A** (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* **152(2)**, 259-77.

**Koob GF, Stinus L, Le Moal M** (1981) Hyperactivity and hypoactivity produced by lesions to the mesolimbic dopamine system. *Behav Brain Res* **3(3)**, 341-59.

**Kostic VS, Filipovic SR, Lecic D, Momcilovic D, Sokic D, Sternic N** (1994) Effect of age at onset on frequency of depression in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg*



Psychiatry **57(10)**, 1265-7.

**Krack P, Kumar R, Ardouin C**, et al (2001) Mirthful laughter induced by subthalamic nucleus stimulation. *Mov Disord* **16(5)**, 867-75.

**Kupsch A, Earl C** (1999) Neurosurgical interventions in the treatment of idiopathic Parkinson disease: neurostimulation and neural implantation. *J Mol Med* **77(1)**, 178-84.

**Lang AE, Lozano AM** (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* **339(15)**, 1044-53.

**Leentjens AF, Van den Akker M, Metsemakers JF, Lousberg R, Verhey FR** (2003) Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. *Mov Disord* **18(4)**, 414-8.

**Lees AJ** (1989) The on-off phenomenon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry Suppl*, 29-37.

**Lemke MR** (2002) Depression und Morbus Parkinson. UNI-MED Verlag, Bremen

**Lemke MR, Fuchs G, Gemende I**, et al (2004) Depression and Parkinson's disease. *J Neurol* **251 Suppl 6**, 24-7.

**Lemke MR und Reiff J** (2001) Therapie der Depression bei Parkinson-Patienten. *Arzneimitteltherapie* **19**, 324-330.

**Leonard BE, Tuite M** (1981) Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int Rev Neurobiol* **22**, 251-86.

**Levin BE, Llabre MM, Weiner WJ** (1988) Parkinson's disease and depression: psychometric properties of the Beck Depression Inventory. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **51**, 1401-1404.

**Lieberman A** (2006) Depression in Parkinson's disease -- a review. *Acta Neurol Scand* **113(1)**, 1-8.

**Maier SF, Watkins LR** (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* **29(4-5)**, 829-41.

**Maricle RA, Nutt JG, Valentine RJ, Carter JH** (1995) Dose-response relationship of levodopa with mood and anxiety in fluctuating Parkinson's disease: A double-blind,

placebo-controlled study. *Neurology* **45**, 1757-1760.

**Mayberg HS** (1997) Limbic-cortical dysregulation: A proposed model of depression. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **9**, 471-481.

**Mayeux R, Stern Y, Sano M, Williams JB, Cote LJ** (1988) The relationship of serotonin to depression in Parkinson's disease. *Mov Dis* **3**, 237-244.

**McCance-Katz EF, Marek KL, Price LH** (1992) Serotonergic dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. *Neurology* **42(9)**, 1813-1814.

**Meissner W, Harnack D, Hoessle N, et al** (2004) High frequency stimulation of the entopeduncular nucleus has no effect on striatal dopaminergic transmission. *Neurochem Int* **44(4)**, 281-6.

**Mendez MF, Adams NL, Lewandowski KS** (1989) Neurobehavioral changes associated with caudate lesions. *Neurology* **39(10)**, 1410-1.

**Menza MA, Sage J, Marshall E, Cody R, Duvoisin R** (1990) Mood changes and "on-off" phenomena in Parkinson's disease. *Mov Disord* **5(2)**, 148-51.

**Miyasaki JM, Shannon K, Voon V, et al** (2006) Practice Parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **66(7)**, 996-1002.

**Moellentine C, Rummans T, Ahlskog JE, et al** (1998) Effectiveness of ECT in patients with parkinsonism. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **10(2)**, 187-193.

**Musty RE, Jordan MP, Lenox RH** (1990). Criterion for learned helplessness in the rat: a redefinition. *Pharmacol Biochem Behav* **36(4)**, 739-44.

**Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A** (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* (**60**), 277-90.

**Narushima K, Kosier JT, Robinson RG** (2003) A reappraisal of poststroke depression, intra- and inter-hemispheric lesion location using meta-analysis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **15(4)**, 422-30.

**Nissenbaum H, Quinn NP, Brown RG, Toone B, Gotham AM, Marsden CD** (1987) Mood swings associated with the "on-off" phenomena in Parkinson's disease. *Psychol*

Med **17**, 899-904.

**Olds ME, Jacques DB, Kopyov O** (2006) Relation between rotation in the 6-OHDA lesioned rat and dopamine loss in striatal and substantia nigra subregions. *Synapse* **59(8)**, 532-44.

**O'Keane V and Dinan TG** (1991) Prolactin and cortisol responses to d-Fenfluramine in Major depression: Evidence for diminished responsivity of central serotonergic function. *American Journal of Psychiatry* **148**, 1009-1015.

**Overmier JB and Seligman MEP** (1967) Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J Comp Physiol Psychol* **63**, 28-33.

**Parkinson J** (1817) *An essay on the shaking palsy*. Whittingham and Rowland, London.

**Paxinos G and Watson C** (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.

**Porrino LJ, Goldman-Rakic PS** (1982) Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP. *J Comp Neurol* **205(1)**, 63-76.

**Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M** (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **229(2)**, 327-36.

**Price KS, Farley IJ, Hornykiewicz O** (1978) Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between striatal and limbic dopamine. *Adv Biochem Psychopharmacol* **19**, 293-300.

**Reichmann H, Brecht MH, Koster J, Kraus PH, Lemke MR** (2003) Pramipexole in routine clinical practice: a prospective observational trial in Parkinson's disease. *CNS Drugs* **17 (13)**, 965-73.

**Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D** (2005) Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain* **128(Pt 6)**, 1314-22.

**Ring HA, Bench CJ, Trimble MR, Brooks DJ, Frackowiak RS, Dolan RJ** (1994) Depression in Parkinson's disease: a positron emission study. *Br J Psychiatry* **165**, 333-339.

**Robins AH** (1976) Depression in patients with Parkinsonism. *Br J Psychiatry* **128**, 141-145.

**Sachs CH, Jonsson G** (1975) Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol* **24**, 1-8.

**Sapolsky RM** (1996) Why stress is bad for your brain. *Science* **273(9)**, 749.

**Sauer H and Oertel WH** (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**, 401-415.

**Schildkraut JJ** (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* **122(5)**, 509-22.

**Scott PA, Cierpial MA, Kilts CD, Weiss JM** (1996) Susceptibility and resistance of rats to stress-induced decreases in swim-test activity: a selective breeding study. *Brain Res* **725(2)**, 217-30.

**Schmitz C, Hof PR** (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* **130(4)**, 813-31.

**Seligman MEP** (1974) Depression and learned helplessness. In R.J. Friedman & M.M. Katz (Eds.), *The psychology of depression: Contemporary theories and research*. Washington, DC: Winston-Wiley.

**Shaw KM, Lees AJ, Stern GM** (1980) The impact of treatment with levodopa on Parkinson's disease. *Q J Med* **49(195)**, 283-93.

**Shiba M, Bower JH, Maraganore DM, et al** (2000) Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* **15**, 669-677.

**Shumake J and Gonzalez-Lima F** (2003) Brain systems underlying susceptibility to helplessness and depression. *Behav Cogn Neurosci Rev* **2(3)**, 198-221.

**Simons JA** (1996) Fluoxetine in Parkinson's disease. *Mov Dis* **11(5)**, 581-582.

**Slaughter JR, Slaughter KA, Nichols D, Holmes SE, Martens MP** (2001) Prevalence, clinical manifestations, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. **13(2)**, 187-96.

**Snaith RP, Hamilton M, Morley S, Humayan A, Hargreaves D, Trigwell P** (1995) A scale for the assessment of hedonic tone the Snaith-Hamilton Pleasure Scale. *Br J Psychiatry* **167** (1), 99-103.

**Soares JC, Mann JJ** (1997) The anatomy of mood disorders--review of structural neuroimaging studies. *Biol Psychiatry* **41**(1), 86-106.

**Starkstein SE, Preziosi TJ, Berthier ML, Bolduc PL, Mayberg HS, Robinson RG** (1989) Depression and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Brain* **112**, 1141-1153.

**Starkstein SE, Preziosi TJ, Bolduc PL, Robinson RG** (1990a) Depression in Parkinson's disease. *J Nerv Ment Dis* **178**, 27-31.

**Starkstein SE, Preziosi TJ, Forrester AW, Robinson RG** (1990b) Specificity of affective and autonomic symptoms of depression in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **53**, 869-873.

**Steiner B, Winter C, Hosman K, Siebert E, et al** (2005) 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* **199**(2), 291-300.

**Steur EN, Ballering LA** (1997) Moclobemide and selegiline in the treatment of depression in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**, 547-558.

**Stockmeier CA, Shapiro LA, Dille GE** (1997) Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression--postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* **18**(18), 7394-401.

**Takamori K, Yoshida S, Okuyama S** (2001a) Availability of learned helplessness test as a model of depression compared to a forced swimming test in rats. *Pharmacology* **63**(3), 147-53.

**Takamori K, Yoshida S, Okuyama S** (2001b) Repeated treatment with imipramine, fluvoxamine and tranylcypromine decreases the number of escape failures by activating dopaminergic systems in a rat learned helplessness test. *Life Sci* **69**(16), 1919-26.

**Tandberg E, Larsen JP, Aarsland D, Cummings JL** (1996) The occurrence of depression in Parkinson's disease. A community-based study. *Arch Neurol* **53**(2), 175-9.

**Tanner CM and Langston JW** (1990) Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* **40** (10 suppl 3), 17-30.

**Telner JI and Singhal RL** (1984) Psychiatric progress. The learned helplessness model of depression. *J Psychiatr Res* **18**(3), 207-15.

**Tesei S, Antonini A, Canesi M, Zecchinelli A, Mariani CB, Pezzoli G** (2000) Tolerability of paroxetine in Parkinson's disease: a prospective study. *Mov Disord.* **15**(5), 986-989.

**Thiebot MH, Martin P, Puech AJ** (1992) Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. *Br J Psychiatry Suppl* (**15**), 44-50.

**Torack RM, Morris JC** (1988) The association of ventral tegmental area histopathology with adult dementia. *Arch Neurol* **45**(5), 497-501.

**Uhl GR, Hedreen JC, Price DL** (1985) Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* **35**(8), 1215-8.

**Ungerstedt U** (1968) 6-Hydroxy- dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* **5**, 107-110.

**Ungerstedt U and Arbuthnott GW** (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research* **24**, 485-493.

**Ungerstedt U** (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* **367**, 95-122.

**Vollmayr B and Henn FA** (2001) Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. *Brain Res Protoc* **8**(1), 1-7.

**Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, Gass P, Spanagel R, Henn F** (2004). Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning. *Behav Brain Res* **150**(1-2), 217-21.

**Weissman MM and Myers JK** (1978) Affective disorders in a US urban community. *Archives of General Psychiatry* **35**, 1304-1311.

**Wichmann T and DeLong MR** (1996) Functional and pathophysiological models of the

basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* **6(6)**, 751-758.

**Willner P** (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* **83(1)**, 1-16.

**Winter C, v. Rumohr A, Mundt A, et al** 2007 Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. *Behav Brain Res* **184(2)**, 133-41.

**Wittchen HU** (1994) Lifetime risk of depression. *Br J Psychiatry Suppl* **26**, 16-22.

**Yamamoto M** (2001) Depression in Parkinson's disease: its prevalence, diagnosis, and neurochemical background. *J Neurol* **248 Suppl 3**, III5-11.

**Zogg W** (2000) Review of several different forms of psychotherapy in treatment of depression. *Therapeutische Umschau* **57**, 62-70.

## **Danksagung**

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die mich während meiner Promotion fachlich, materiell und emotional unterstützt haben.

An allererster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Kupsch für die freundliche Annahme als Doktorand und die Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Christine Winter für ihren großen Enthusiasmus und unerschütterlichen Optimismus bei der Themenstellung und Durchführung, für die intensive Begleitung und die kritische Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Morgenstern und bei Herrn Prof. Dr. Georg Juckel möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir die Infrastruktur ihrer Laboratorien überlassen haben, und damit die Voraussetzung für den experimentellen Teil geschaffen haben.

Danken möchte ich auch Herrn Thomas Lee für die Unterstützung bei der Erstellung der Cut-off-Kriterien, Herrn Dominik Petrus für die Mitwirkung bei der stereologischen Auszählung und Frau Julia Klein, deren unmittelbare Folgenstudien interessante Aspekte für die Diskussion meiner Doktorarbeit lieferten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des pharmakologischen/neurologischen Labors für anregende Diskussionen und die gute und kollegiale Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt insbesondere Frau Renate Winter für die geduldigen Anleitungen und Ihre Unterstützung bei den Labortechniken und Frau Christiane Kölske für ihre freundliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinem Freund und meiner Familie für die moralische Unterstützung und beständige Liebe.



## **Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Anke von Rumohr, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Die Rolle der dopaminergen Degeneration in VTA und SNc in der Entwicklung depressiven Verhaltens im Tiermodell

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

Unterschrift