

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Einfluss der Transplantation von Embryonalzellen auf die Geometrie  
des extrazellulären Raumes im Striatum von Ratten mit 6-OHDA  
induziertem Parkinsonismus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Florian Olshausen  
aus München

Datum der Urkundenverleihung: 22.9.2006

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Morgenstern

2. Gutachter: Prof. Dr. J.P.Huston

3. Gutachter: PD Dr. C. Rundfeldt

1	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2	<b>Fragestellung</b> .....	<b>7</b>
3	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>8</b>
3.1	<b>Der Morbus Parkinson im Menschen</b> .....	<b>8</b>
3.1.1	Epidemiologie .....	8
3.1.2	Pathophysiologie .....	8
3.1.3	Therapie.....	9
3.1.4	Experimentelle Ansätze.....	9
3.2	<b>Das dopaminerge System der Ratte</b> .....	<b>11</b>
3.2.1	Entwicklung .....	11
3.2.2	Anatomie .....	11
3.3	<b>Tiermodelle des Morbus Parkinson</b> .....	<b>12</b>
3.3.1	6-OHDA-Modell .....	12
3.3.2	MPTP Modell.....	13
3.4	<b>Transplantation</b> .....	<b>14</b>
3.4.1	Orthotope Transplantate .....	14
3.4.2	Intrastriatale und intranigrale Transplantate .....	15
3.4.3	Heterotope Transplantate .....	15
3.4.3.1	Transplantation von solidem mesencephalen Gewebe.....	16
3.4.3.2	Transplantation von Zellsuspensionen .....	17
3.4.3.3	Kontrolle des Transplantationserfolges.....	18
3.4.4	Verhaltenseffekte nach Suspensionstransplantation .....	19
3.4.5	Morphologische Effekte der Suspensionstransplantate.....	20
3.4.5.1	Efferente Projektionen des Transplantates .....	20
3.4.5.2	Afferenzen des Transplantates .....	22
3.4.6	Physiologische und biochemische Charakteristika und Effekte der Transplantate.....	23
3.5	<b>Das Konzept der <i>Volume transmission</i></b> .....	<b>26</b>
3.5.1	Definition der Begriffe <i>Wiring transmission</i> und <i>Volume transmission</i> .....	26
3.5.2	<i>Volume transmission</i> im zentralen Nervensystem .....	28
3.5.2.1	Freisetzung aus Neuronen .....	28

3.5.2.2	Der extrazelluläre Raum als Medium der Diffusion .....	29
3.5.2.3	Zielrezeptoren – Lokalisation.....	30
3.5.3	<i>Volume transmission</i> in verschiedenen Transmittersystemen.....	30
3.5.4	<i>Volume transmission</i> im nigrostriatalen System .....	31
3.5.5	<i>Volume transmission</i> im Striatum nach Läsion durch 6-OHDA oder MPTP .....	33
3.5.6	<i>Volume transmission</i> nach Transplantation fetaler Zellen .....	34
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>37</b>
4.1	<b>Studiendesign.....</b>	<b>37</b>
4.2	<b>Unilaterale 6-OHDA-Läsion .....</b>	<b>38</b>
4.3	<b>Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten .....</b>	<b>39</b>
4.4	<b>Transplantation.....</b>	<b>40</b>
4.4.1	Herstellung der Zellsuspension für die Transplantation .....	40
4.4.2	Ablauf der Transplantation.....	41
4.5	<b>Histologie.....</b>	<b>42</b>
4.5.1	Perfusion.....	42
4.5.2	Immunohistochemie .....	42
4.5.2.1	Anfärbung der Tyrosinhydroxylase .....	43
4.5.2.2	Anfärbung des Glial Fibrillary Acidic Protein.....	43
4.5.3	Histologische Analyse der Transplantate .....	44
4.5.4	Rekonstruktion des Elektrodentracks.....	45
4.6	<b>Tetramethylammonium-Methode .....</b>	<b>46</b>
4.6.1	Prinzip Ionensensitiver Elektroden .....	46
4.6.2	Theoretisches Prinzip der Diffusion im extrazellulären Raum .....	47
4.6.2.1	Volume Averaging .....	48
4.6.2.2	Geometrie des extrazellulären Raumes .....	49
4.6.2.3	Uptake .....	49
4.6.3	Herstellung der Elektroden.....	51
4.6.4	Kalibrierung der Elektroden.....	52
4.6.5	Experimenteller Ablauf der TMA <sup>+</sup> -Messungen .....	53
4.7	<b>Statistische Analyse.....</b>	<b>54</b>

<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>56</b>
5.1	<b>Rotationsverhalten .....</b>	<b>56</b>
5.2	<b>Immunohistochemische Analyse.....</b>	<b>57</b>
5.2.1	Läsion .....	57
5.2.2	Makro-Transplantation und -Scheintransplantation.....	58
5.2.3	Mikro-Transplantation und -Scheintransplantation .....	59
5.3	<b>Diffusionsparameter .....</b>	<b>63</b>
5.3.1	Läsion und Kontrolle.....	63
5.3.2	Transplantierte und scheintransplantierte Tiere .....	63
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
6.1	<b>Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten .....</b>	<b>67</b>
6.2	<b>Diffusionsparameter .....</b>	<b>68</b>
6.2.1	Diffusionsparameter in lädierten Arealen .....	68
6.2.2	Diffusionsparameter bei transplantierten Tieren.....	69
6.2.3	Unterschiede zwischen mikro – und makrotransplantierten Tieren.....	70
6.2.4	Schlußfolgerung .....	71
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>89</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>90</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>91</b>

## Einleitung

Zu Beginn der modernen Neurowissenschaften standen sich zwei Theorien zur Informationsverarbeitung im zentralen Nervensystem (ZNS) gegenüber. Auf der einen Seite die Neuronendoktrin, ursprünglich vorgeschlagen von Waldeyer (1836 – 1921) und Cajal (1852 – 1934), auf der anderen Seite die retikuläre Theorie, deren bekanntester Vertreter Golgi (1844 – 1926) war. Die Neuronendoktrin bezeichnete die Nervenzellen als die anatomischen, physiologischen, metabolischen und genetischen Grundbausteine des Nervensystems, die durch den Aktivitätsfluss zwischen den einzelnen Nervenenden miteinander verbunden sind und somit nur seriell kommunizieren [Waldeyer, 1891; Cajal, 1967]. Golgi behauptete, dass, aufgrund der Darstellung feinsten Netzwerke in histologischen Präparaten des ZNS, eine Kontinuität zwischen den Zellen nicht ausgeschlossen werden könne und dementsprechend auch ein paralleler Aktivitätsfluss möglich sei [Golgi, 1891; Golgi, 1891; Golgi, 1967].

Nach heutigem Kenntnisstand hatten beide Theorien ihre Berechtigung. Die Entdeckung der Synapse mit Hilfe der Elektronenmikroskopie schien im Wesentlichen die Neuronendoktrin zu bestätigen [Sherrington, 1906]. Man weiß heute aber auch, dass elektrische Signale unabhängig von Synapsen über Ephapsen weitergeleitet werden können, dass *Gap Junctions* existieren, die eine Synchronisierung von Zellverbänden erlauben, dass eine Vielzahl von Botenstoffen im ZNS nicht nur an klassischen Synapsen sondern auch an Varikositäten entlang der Nervenfasern freigesetzt werden und dass diese im Extrazellulärraum (EZR) zu ihren Zielzellen diffundieren und deren Aktivität organisiert beeinflussen können [Nicholson, 2000]. Die retikuläre Theorie findet also insofern ihre Berechtigung, als das Ausmaß und die Art der Vernetzung zwischen den Zellen des ZNS von großer Bedeutung für den Ablauf der Informationsverarbeitung sind, die sowohl seriell über Synapsen, als auch parallel, wie z.B. durch Diffusion, erfolgen kann [Zoli, et al., 1998]. Eine Vielzahl von Autoren hat in den letzten Jahrzehnten die Existenz von unterschiedlichen Übertragungsarten vorgeschlagen und untersucht, die nicht an synaptische Strukturen gebunden sind [Nicholson, 1979; Bach-y-Rita, 1994; Zoli, et al., 1998].

1985 hat die Gruppe um Agnati, Fuxe und Zoli erstmals eine umfassende, von der Zellart unabhängige duale Klassifikation der interzellulären Kommunikation im ZNS vorgeschlagen. Sie stellen die *Wiring transmission* (WT), einer an zelluläre Strukturen gebundene Informationsübertragung, die *Volume transmission* (VT) gegenüber, welche Informationen

v.a. durch Diffusion im extrazellulären Raum übermittelt [Agnati, et al., 1985; Agnati, et al., 1995]. Für Neuropeptide wie z.B. Dynorphin und dem Gas Stickstoffmonoxid konnte die VT bereits nachgewiesen werden [Fuxe, et al., 1994]. Aber auch für klassische Transmitter wie Glutamat, Acetylcholin und die monoaminergen Systeme gibt es experimentelle Hinweise [Narumi, et al., 1978; Stone, et al., 1989; Ridet, et al., 1993; Stjarne, et al., 1994; Descarries, et al., 2000].

Das nigrostriatale System wurde in den letzten Jahrzehnten im Zusammenhang mit dem Morbus Parkinson (MP) intensiv erforscht. Die nach ihrem Entdecker James Parkinson benannte Erkrankung ist bedingt durch eine chronische Degeneration dopaminerger Neurone der Substantia nigra deren Genese bis heute ungeklärt ist. Die Tatsache, dass die Kardinalsymptome Rigor, Tremor und Hypokinese erst auftreten nachdem bereits über 50 % der Neurone untergegangen sind [Jellinger, 1986], weist darauf hin, dass es kompensatorische Mechanismen gibt, die das fehlende Dopamin (DA) auszugleichen vermögen. Etliche dieser Mechanismen zielen auf eine vermehrte Freisetzung und verlängerte Verweildauer von DA im EZR ab, was im Sinne einer kompensatorisch verstärkten Volumentransmission im Krankheitsfall interpretiert werden kann [Bezard, et al., 1998]. Die medikamentöse Substitutionstherapie des MP zeigt nach einer Therapiedauer von durchschnittlich 5 Jahren einen Wirkungsverlust, der eine Steigerung der Dosis und der Nebenwirkungen zur Folge hat [Lieberman, 1993]. Dies führte in den siebziger Jahren zu den ersten Erfolg versprechenden Versuchen dopaminerge Zellen durch Transplantation (TP) embryonaler mesencephaler Zellen zu ersetzen [Björklund, et al., 1979; Perlow, et al., 1979].

Diese Experimente basierten auf dem 6-Hydroxydopamin-(6-OHDA)-Modell des MP [Ungerstedt, 1968]. Die Substanz 6-OHDA wird unilateral in das Gehirn injiziert und führt zum Untergang der dopaminerger Neurone in der Substantia nigra (SN) der betroffenen Hirnhälfte des Versuchstieres. Dieses einseitige Defizit führt zu einem durch DA-Agonisten beeinflussbaren und quantifizierbaren Rotationsverhalten [Ungerstedt, et al., 1970], welches durch eine erfolgreiche TP mit Aufhebung des dopaminergen Defizits, rückgängig gemacht werden kann [Björklund, et al., 1980]. Die überlebenden transplantierten Zellen sind sowohl in der Lage DA zu produzieren als auch ihre aussprossenden Fasern in das Wirtsgewebe zu integrieren und synaptische Kontakte auszubilden. Der Reinnervation des Striatums des Empfängers wird im Allgemeinen die zu beobachtende funktionelle Verbesserung zugeschrieben [Herman, et al., 1994].

Es gibt in der Literatur aber auch Hinweise auf durch das Transplantat hervorgerufene Effekte die außerhalb des reinnervierten Gebietes liegen, typisch für Dopamin sind und mit einer

extrasynaptischen Diffusion von Dopamin aus dem Transplantat heraus in Verbindung gebracht werden können [Schneider, et al., 1994; Vuillet, et al., 1994; Strömberg, et al., 2000]. Der Eingriff der TP zieht lokale Reaktionen im Gehirn des Wirtes nach sich, wie z.B. Veränderungen in der extrazellulären Matrix [Barker, et al., 1996; Roitbak, et al., 1999] und die Astrogliose an der Grenze zwischen Transplantat und Wirtsgewebe [Nikkhah, et al., 1994; Barker, et al., 1996]. Dies hat Veränderungen in der Geometrie des extrazellulären Raumes, dem Medium der Diffusion, zur Folge [Sykova, et al., 1999] und kann somit die VT von DA aus dem Transplantat beeinflussen.

## **Fragestellung**

In dieser Studie sollten die Diffusionsbedingungen im extrazellulären Raum nach TP von Embryonalzellen in das Striatum von 6-OHDA lädierten Ratten untersucht werden. Die TP erfolgte auf zwei verschiedene Arten: Bei der Makro-Transplantation (Makro-TP) wurde eine Stahlkanüle verwendet um zwei Depots einer Zellsuspension im Striatum anzulegen, während bei der Mikro-Transplantation (Mikro-TP) eine Glaskanüle verwendet wurde um mehrere Depots dieser Zellsuspension auf einer größeren Fläche des Striatums zu verteilen. Als Verhaltenstest zur Evaluierung der Läsion und TP wurde das Amphetamin-induzierte Rotationsverhalten verwendet.

Die Geometrie des extrazellulären Raumes wird durch die Parameter Volumenfraktion  $\alpha$ , Tortuosität  $\lambda$ , und den unspezifischen *Uptake*  $k'$  beschrieben. Aus diesen Werten können Rückschlüsse auf die räumlichen Bedingungen der Diffusion gezogen werden. Man bestimmt sie mit der Tetramethylammonium-Methode [Nicholson, et al., 1981], die es ermöglicht die Konzentration des Ions Tetramethylammonium ( $\text{TMA}^+$ ) im extrazellulären Raum in Echtzeit zu bestimmen. Abschließend wurde jedes Tier immunohistochemisch untersucht und die nach Art der TP eingeteilten Gruppen miteinander bzw. mit lädierten und unbehandelten Kontrolltieren verglichen.

# Literaturübersicht

## Der Morbus Parkinson im Menschen

### Epidemiologie

In Deutschland leiden ca. 250.000 Menschen an MP. Die Prävalenz liegt bei 100 – 200 / 100.000, die Inzidenz wird auf 20 / 100.000 Einwohner geschätzt. Mit 70 – 80 % ist der primäre bzw. idiopathische MP am häufigsten. Sekundäre Formen können nach Einnahme von Neuroleptika, hypoxischen oder traumatischen Hirnschädigungen und im Zuge anderer degenerativer Krankheiten wie z.B. der Multisystematrophie vorkommen. Der MP ist eine Krankheit des höheren Lebensalters und gewinnt damit vor dem Hintergrund der Alterstruktur unserer Gesellschaft ständig an Bedeutung [Masuhr, et al., 1998].

### Pathophysiologie

Im Jahre 1817 beschrieb James Parkinson erstmals die Symptomtrias dieses hypokinetisch – hypertonen Syndroms: Tremor, Rigor und Akinese. Diese Kardinalsymptome werden mit Fortschreiten der Erkrankung von vegetativen Symptomen wie z.B. Seborrhoe, Opstipation oder Hypersalivation, sowie psychopathologischen Phänomenen begleitet [Masuhr, et al., 1998].

In pathologischen Untersuchungen entdeckte man Veränderungen im Zytoskelett der melaninhaltigen, DA-produzierenden Neurone der Substantia Nigra Pars Compacta (SNPc) und deren Untergang. Die eindeutige Verbesserung der Symptomatik nach Substitution von DA mit L-Dioxyphenylalanin (L - DOPA) belegte den kausalen Zusammenhang von DA-Mangel und Symptomatik [Birkmayer, et al., 1961].

Die Ursache für die chronische Degeneration dieser Neurone ist bis heute unklar. Man vermutet ein multifaktorielles Geschehen und macht unter anderem eine abnorm vermehrte Bildung freier Radikale für den Zelluntergang verantwortlich [Youdim, et al., 1997].

Die komplexe Verschaltung des nigrostriatalen Systems mit Thalamus und Kortex bedingt die sensomotorischen Symptome dieser Erkrankung. DA übernimmt in diesem Schaltkreis die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Inhibition und Disinhibition des Thalamus. Im Falle

eines MP verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten einer Inhibition, die für die Symptome Rigor und Akinese verantwortlich gemacht wird. Der Tremor, der bei 70 % der Patienten vor allem zu Beginn der Krankheit auftritt wird als Ausdruck einer vom Thalamus kompensatorisch gesteigerten Aktivität verstanden.

## **Therapie**

Die Therapie des MP besteht vor allem aus der medikamentösen Substitution von DA und symptomatischen Maßnahmen. Die Pharmakotherapie besteht aus einer kombinierten Gabe von L-DOPA, das durch die Tyrosinhydroxylase in den Zielzellen zu DA verstoffwechselt wird, in Kombination mit einem peripheren DOPA-Dekarboxylase-Hemmer, der die peripheren Nebenwirkungen verringert und gleichzeitig die intrazerebrale Konzentration erhöht. Des Weiteren können Monoaminoxidase-B-Hemmer, die die Abbaurate des Dopamins verlangsamen, DA-Agonisten sowie Anticholinergika zum Einsatz kommen. Weiterhin problematisch bleibt der nach ca. fünfjähriger Behandlung auftretende Wirkungsverlust von L-DOPA und die Zunahme der Nebenwirkungen, vor allem die eventuell nach Dosissteigerung auftretenden Hyperkinesien, die eine Anpassung der Therapie komplizieren [Lieberman, 1993].

Neben der medikamentösen Therapie gibt es neurochirurgische Versuche die Symptomatik des MP zu verbessern. Neben den selten angewendeten läsionalen Verfahren, der Pallidotomie und der ventrolateralen Thalamotomie, haben sich vor allem hochfrequente Stimulationsverfahren durchgesetzt, bei denen eine Elektrode und ein vom Patienten bedienbarer Schrittmacher implantiert werden [Diederich, et al., 1997].

## **Experimentelle Ansätze**

Die klinisch experimentelle TP als Therapie des MP mit dem Ziel die abgestorbenen Zellen funktionell zu ersetzen, wurde Ende der achtziger Jahre erstmals am Menschen durchgeführt. Madrazo et al. transplantierten homologes Nebennierenmark in das Striatum mit konsekutiver Verbesserung des Rigors und der Akinese [Madrazo, et al., 1987]. Diese Technik wird heute wegen schwerer Nebenwirkungen als obsolet betrachtet [Diederich, et al., 1997]. Die TP von fetalen Zellen wurde erstmals 1990 in Schweden von Lindvall et al. durchgeführt [Lindvall, et

al., 1990]. Seitdem hat man weltweit ca. 300 Patienten fetales Mittelhirngewebe mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen transplantiert. Ein Problem bei der Evaluation dieser Veröffentlichungen ergibt sich aus den Unterschieden bei der Durchführung dieser Experimente. Diese reichen von Alter und Menge der embryonalen Zellen, über unterschiedliche Methoden der Herstellung und Lagerung, bis hin zu verschiedenen Zielstrukturen und Transplantationstechniken als auch stark variierenden Studiendesigns. Die Mehrheit dieser Studien berichten neben einem unterschiedlich ausgeprägtem Überleben des Transplantates von Verbesserungen ähnlich der Pharmakotherapie [Lindvall, 1998]. Rigor und die akinetischen *Off*-Phasen sind verringert, auch nach Absetzen der Medikamente. Die verbleibenden *Off*-Phasen werden von den Patienten als erträglicher beschrieben, sowohl subjektiv als auch objektiv nach Evaluation anhand der *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPRDS) [Langston, et al., 1992].

Freed et al. publizierten 2001 die Ergebnisse der ersten Doppel-Blind-Studie am Menschen. Die Studie zeigte, dass Verbesserungen in jüngeren Patienten (< 60 Jahre) nach ca. 1 Jahr zu beobachten waren, während in älteren Patienten (> 60 Jahre) bei vergleichbarer Krankheitsdauer nur geringe Verbesserungen beobachtet werden konnten [Freed, et al., 2001]. Trotz der Darstellung dieser Ergebnisse als Rückschlag in den Medien [Vogel, 2001] darf nicht übersehen werden, dass hier nur eine Technik der Gewinnung und Kryokonservierung embryonalen Gewebes getestet wurde, die Patienten keine Immunsuppressiva erhielten und die postoperative Evaluierung auf rein subjektiven Patientenangaben basierte [Hagell, et al., 2001].

Die TP ist 25 Jahre nach den ersten Studien immer noch weit entfernt davon klinisch relevant zu werden. Das liegt zum einen an dem gesellschaftlichen Spannungsfeld aus Medizin, Religion und Politik hinsichtlich der Verpflichtung zum Schutz ungeborenen Lebens, zum anderen an der Tatsache, dass viele wissenschaftliche Aspekte weiter unklar bleiben. Die genauen Faktoren, die das Überleben der embryonalen Zellen in der Kultur als auch im Gehirn beeinflussen, sind unbekannt und es ist noch nicht klar wie viele Zellen und welche Lokalisation das beste Ergebnis erzielen, was aber Bedingung für eine optimale Operationstechnik ist [Lindvall, 1999].

Neuere Forschungen gehen nicht nur diesen Fragen nach, sondern suchen auch nach Alternativen. Die Applikation von wachstumsfördernden Faktoren und die Inkubation des Transplantates mit Antioxidantien sind Modifikationen alter Ansätze mit viel versprechenden Ergebnissen [Brundin, et al., 2000]. Die Verwendung von Stammzellen unterschiedlicher Potenz [Snyder, et al., 2005], ebenso wie die Verwendung von Xenotransplantaten [Brevig, et

al., 2001] oder gentechnisch modifizierten Zellen [Jiao, et al., 1993] sind Ansätze, die intensiv erforscht und älteren Modellen gegenübergestellt werden müssen.

## **Das dopaminerge System der Ratte**

### **Entwicklung**

Erste dopaminerge Neurone sind bei der Ratte ab dem 13. Schwangerschaftstag nach immunohistochemischer Anfärbung der Tyrosinhydroxylase (TH) darstellbar [Specht, et al., 1981]. Die mitotischen Teilungen sind zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen und die Migration der Zellen zu ihrem Bestimmungsort hat begonnen. Aus einer Keimzone ventrolateral des Aquäduktus cerebri in der ventralen Flexur kommend, bilden die Zellen um den 17. Trächtigkeitstag eine ventrale und dorsale Gruppe der Substantia Nigra, die sich perinatal in Pars compacta und Pars reticulata der Substantia Nigra differenzieren. Die Ausbildung der nigrostriatalen Projektion erfolgt ab dem 14. Trächtigkeitstag entlang dem medialen Vorderhirnbündel (MFB) und weist im Striatum eine von ventrolateral nach dorsomedial zunehmende Innervation auf. Die Entwicklung des dopaminergen mesotelencephalen Systems ist etwa 20 Tage nach der Geburt abgeschlossen [Nikkhah, 1994].

### **Anatomie**

Das mesotelencephale, dopaminerge System kann nach dem Zielgebiet der Projektion in drei Anteile eingeteilt werden: das nigrostriatale, das mesolimbische und das mesocorticale System. Im ventralen Mesencephalon (VM) liegen die drei anatomisch abgrenzbaren und u.a. nach der Nomenklatur von Dahlström und Fuxe [Dahlström, et al., 1964] benannten Ursprungsgebiete für diese Projektionen, die sich an den Efferenzen in jeweils verschiedenem Ausmaß beteiligen: Die Area tegmentalis ventralis (VTA; A 10), die Substantia nigra (A 9) mit Pars compacta (SNPc) und Pars reticulata (SNPr) und der Nucleus retrorubralis (A 8).

Das nigrostriatale System entsteht im Wesentlichen aus Zellen in der ventralen Schicht der SNPc mit Anteilen aus der SNPr und dem ventrolateralen Teil der VTA. Diese Projektion

läuft entlang dem MFB und endet überwiegend im dorsalen Teil des Striatums. Die mesolimbische Projektion hat ihren Ursprung vor allem in der VTA, aber auch Zellen aus der dorsalen Schicht der SNPc und des Nucleus retrorubralis sind daran beteiligt. Es wird in Teile der Amygdala, des aus Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium bestehenden ventralen Striatums projiziert. Geringere Anteile der Efferenz erreichen auch den Bulbus olfactorius, die Stria terminalis oder das Septum. Das mesocorticale System entspringt aus zerstreuten Zellen der VTA, der medialen SNPc und des Nucleus retrorubralis, zieht entlang dem MFB und innerviert den präfrontalen Kortex, den Gyrus cingulatus und die entorhinalen sowie suprarhinalen Kortizes. Die Anzahl der dopaminergen Neurone in den Arealen A 8, A9 und A 10 wird auf etwa 40.000 bei der Ratte und 450.000 beim Menschen geschätzt [German, et al., 1983]. Diese Schätzung wird durch stereotaktische Untersuchungen gestützt, die von 15.000 TH-positiven Zellen in der SN einer Hemisphäre berichten [Janson, et al., 1993]. Addiert man die ca. 10.000 Neurone pro VTA kommt man bei der Ratte auf etwa 50.000 TH-positiven Zellen je VM was mit Ausstrichen von fetalem VM übereinstimmt. Etwa 8 – 10 % dieser Zellen waren TH-positiv [Nikkhah, et al., 1993].

## **Tiermodelle des Morbus Parkinson**

Die Tatsache der Degeneration von dopaminergen Zellen beim Morbus Parkinson ahmen die nachfolgend vorgestellten Modelle nach, indem Stoffe appliziert werden, die zum selektiven Zelltod dopaminergener Neurone im VM führen. Zwei Modelle haben in den letzten Jahren besondere Bedeutung erlangt: Das unilaterale 6-OHDA-Modell und das 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-(MPTP)-Modell.

### **6-OHDA-Modell**

Die lokale Applikation des Neurotoxins 6-OHDA in die SNPc oder das MFB bewirkt eine spezifische Zerstörung von nigrostriatalen dopaminergen Neuronen [Ungerstedt, 1968].

In den dopaminergen Nervenendigungen wird dieses Toxin, das v.a. über den Dopamintransporter (DAT) in die Zellen gelangt [Gonzalez-Hernandez, et al., 2004], zu reaktiven Chinonen, Wasserstoffperoxid und anderen zytotoxischen Metaboliten verstoffwechselt, die eine Lipidperoxidation und Proteindenaturierung mit konsekutivem

Zelltod bewirken [Hefti, et al., 1980]. Bilaterale Läsionen, die dem eigentlichen MP am nächsten kommen würden, sind wegen des aphagischen und kataleptischen Zustandes der Tiere und der damit einhergehenden Zwangsernährung über den gesamten Untersuchungszeitraum wenig praktikabel [Ungerstedt, 1971]. Die unilaterale Läsion bewirkt ein Ungleichgewicht von Dopamin zwischen der lädierten und gesunden Hemisphäre. Dieses Ungleichgewicht ist die Ursache für Haltungsasymmetrien und ein nach Gabe von DA-Agonisten induziertes Rotationsverhalten [Ungerstedt, et al., 1970]. Indirekte DA-Agonisten wie Amphetamin lösen durch Steigerung der Freisetzung von DA auf der nicht-lädierten Seite ipsilaterale Rotationen aus, während direkte Agonisten durch die Stimulation hypersensitiver Rezeptoren auf der lädierten Seite ein kontralaterales Rotationsverhalten hervorrufen [Herman, et al., 1994]. Das Ausmaß dieses Drehverhaltens kann in sogenannten Rotametern gemessen werden [Ungerstedt, et al., 1970]. Um ein Rotationsverhalten mit Apomorphin auszulösen müssen mehr als 90 % der dopaminergen Nervenendigungen zerstört sein, während Amphetamin bereits ab einem Läsionsgrad von 50 % Rotationen induziert [Hefti, et al., 1980]. Der Läsionsgrad wird durch Vergleich der TH-Aktivität oder des DA-Gehaltes zwischen der lädierten und der nicht-lädierten Seite bestimmt [Hefti, et al., 1980].

Anderweitige Folgen der 6-OHDA-Läsion betreffen die sensomotorische Integration was sich zum einen im inadäquaten Gebrauch der Vorderpfoten auf der kontralateralen Seite zeigt und zum anderen in der inadäquaten motorischen Reaktion der Tiere auf exogene Stimuli [Ramachandran, et al., 2002].

## **MPTP Modell**

Berichte über das Auftreten von Parkinsonismus bei jungen Erwachsenen, die eine mit Meriperidin-Analoga kontaminierte Designerdroge eingenommen hatten, führten in den 80er Jahren zu Untersuchungen des zugrundeliegenden Prozesses [Langston, et al., 1983].

MPTP wird nach systemischer Applikation über die Blut-Hirnschranke in das Gehirn transportiert und in Gliazellen in 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP<sup>+</sup>) umgewandelt. MPP<sup>+</sup> gelangt über den DAT in die dopaminergen Neurone und bewirkt in den Mitochondrien eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, die den Zelltod zur Folge hat [Elsworth, et al., 1989]. Die MPTP-Läsion findet heute überwiegend als bilaterales Modell des MP bei Primaten [Redmond, et al., 1986] seine Anwendung. Probleme bei der Anwendung des

Modells ergeben sich jedoch aus der partiell reversiblen Wirkung und einer möglichen spontanen Genesung [Elsworth, et al., 1989].

## **Transplantation**

In den siebziger Jahren wurden von verschiedenen Gruppen allogene Transplantationen in unterschiedlichen Bereichen des ZNS durchgeführt, die alle ein Überleben des Transplantates und eine Integration in die Umgebung beschrieben [Björklund, et al., 1976; Lund, et al., 1976]. Weltweites Aufsehen erregten die von Björklund und Perlow unabhängig durchgeführten Versuche, die bewiesen, dass Transplantate mesencephalen, embryonalen Gewebes funktionelle Verbesserungen im 6-OHDA Modell des MP bewirken können [Björklund, et al., 1979; Perlow, et al., 1979].

Die TP von fetalen Zellen ist eine in der Literatur ausgiebig dokumentierte Methode mit viel versprechenden Ergebnissen [Herman, et al., 1994]. Es gibt verschiedene methodische Ansätze eine Reinnervation des mit 6-OHDA lädierten Striatums und eine funktionell relevante Wiederherstellung der Dopaminproduktion zu erreichen.

Man unterscheidet zwischen orthotoper TP in die SNpc, einer Kombination von Transplantaten in die SNpc und das Striatum, sowie der am meisten angewendeten, heterotopen TP in das Striatum.

### **Orthotope Transplantate**

Orthotope Transplantationen in die SN zeigen im Vergleich zur heterotopen TP eine geringere Verbesserung der Verhaltensdefizite. Eine Studie von Nikkhah et al. zeigte zwar eine extensive Reinnervation der SNpc und eine Tendenz zur Verbesserung des Apomorphin-induzierten Rotationsverhaltens, aber ein komplett unbeeinflusstes Rotationsverhalten nach Gabe von Amphetamin [Nikkhah, et al., 1994]. Das sensomotorische Verhalten, z.B. der Gebrauch der Vorderpfoten, zeigt nach intranigraler Transplantation größere Defizite als nach intrastriataler [Olsson, et al., 1995].

Der Grund für die ungenügende Rekonstruktion des nigrostriatalen Systems wird vor allem auf die ontogenetisch ausgereifte Umgebung zurückgeführt, die es den Zellen erschwert ihre Axone in das Striatum einzuwachsen zu lassen. Unterstützt wird dies durch eine Arbeit bei der

in bilateral lädierten, neonatalen Ratten nach intranigraler TP, im Gegensatz zu adulten Ratten, nicht nur ein Einwachsen von Fasern in das Striatum beobachtet wurde, sondern auch eine Verbesserung des Verhaltens [Nikkhah, et al., 1995]. In adulten Ratten versucht man mit sogenannten Brücken-Transplantaten, die aus Wachstumsfaktoren sezernierenden Schwanzzellen bestehen, das Einwachsen der dopaminergen Fasern in das Striatum mit bedingtem Erfolg zu fördern [Wilby, et al., 1999].

### **Intrastriatale und intranigrale Transplantate**

Ein anderer Ansatz ist die Kombination von intrastriatalen mit intranigralen Transplantaten. Bei dieser Methode wurde in adulten Tieren ein vereinzelt Aussprossen von Fasern entlang des MFB in das rostrale Striatum beobachtet [Mendez, et al., 2000]. Weiterhin wurde nicht nur eine signifikante Verbesserung des Amphetamin-induzierten Rotationsverhaltens verzeichnet, sondern auch Verbesserungen im sensomotorischen Verhalten. Nach Entfernung des intranigralen Transplantates verschlechterte sich das sensomotorische Verhalten der Tiere wieder [Ramachandran, et al., 2002]. Mukhida et al. haben in einer Studie Tiere mit Transplantaten im Striatum, der SNPc und dem Nucleus subthalamicus mit Tieren verglichen, die nur in das Striatum und die SNPc transplantiert worden waren. Während sich das Verhalten der Tiere nach Gabe von Amphetamin nicht unterschied, zeigte sich bei den dreifach transplantierten Tieren eine signifikante Verbesserung im Gebrauch der Vorderpfoten [Mukhida, et al., 2001]. Dies belegt, dass die Wahl des Transplantationsortes ein wesentlicher Faktor bei der Entwicklung einer optimalen Methode ist [Ramachandran, et al., 2002].

### **Heterotope Transplantate**

In der Literatur überwiegt die TP von mesencephalem Gewebe in das Striatum [Björklund, et al., 1979; Perlow, et al., 1979; Björklund, 1992; Herman, et al., 1994; Lindvall, 1998; Brundin, et al., 2000]. Das Transplantat enthält allerdings nicht nur dopaminerge Zellen sondern auch andere Neurone sowie Gliazellen. Der Anteil der dopaminergen Neurone an der Gesamtzahl der transplantierten Zellen wird auf etwa 0,1 % - 2 % geschätzt [Brundin, et al., 1985; Gagnon, et al., 1991; Herman, et al., 1991]. Aufgrund der Tatsache, dass etwa 80 % der

dopaminergen Neurone in der ersten Woche nach der TP absterben, dürfte der eigentliche Anteil noch geringer sein [Brundin, et al., 1985; Herman, et al., 1994; Barker, et al., 1996].

### *Transplantation von solidem mesencephalen Gewebe*

Eine Möglichkeit native Gewebestücke zu transplantieren besteht in der intraventrikulären TP. Die Seitenventrikel bieten sich beim MP aufgrund ihrer engen Beziehung zum Striatum als natürlicher Transplantationsort an. Die intraventrikuläre TP von mesencephalen Gewebestücken bietet einige Vorteile:

Der Schaden für das striatale Gewebe ist minimal und der Liquor cerebrospinalis kann sowohl als Nährmedium für das Transplantat bis zur Vervollständigung der Vaskularisation, als auch als Medium für die Verbreitung von Transmittern dienen. Die Überlebensraten der intraventrikulär transplantierten Zellen sind dementsprechend gut [Freed, 1985]. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass diese Transplantate ein beträchtliches Größenwachstum zeigen, eng mit der Ventrikelwand verwachsen sind, das Ependym durchwachsen und dass ihre Axone bis zu 2 mm in das Striatum aussprossen [Strömberg, et al., 2000]. Unter dem Aspekt einer klinischen Anwendung erscheint es problematisch, dass die Reinnervation auf das mediale Striatum begrenzt bleibt. Ein anderer Nachteil kann sich daraus ergeben, dass das Ventrikelsystem für Immunzellen zugänglicher ist als das Hirngewebe [Sloan, et al., 1990], was dazu führen kann das intraventrikuläre Transplantate nicht so lange überleben wie z.B. intrazerebrale Transplantate [Sloan, et al., 1990].

Eine Alternative stellt die Schaffung einer Kortexhöhle auf der dorsalen Oberfläche des Caudatoputamens dar. Die Höhle wird durch Absaugen von Kortex und Corpus callosum geschaffen [Björklund, et al., 1979]. Die mit dieser Technik einhergehenden entzündlichen Prozesse und Mechanismen zur Wundreparatur können jedoch auf das die transplantierten Zellen übergreifen und die Integration in das Wirtsgewebe negativ beeinflussen, da in diesem Fall das Transplantat durch die ausgedehnte Verletzung der Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen zugänglicher wird [Broadwell, et al., 1994]. Die Implantation unter Sichtkontrolle, die damit einhergehende genaue Positionierung eines oder mehrerer Transplantate und die für spätere Untersuchungen leichte Zugänglichkeit sind als Vorteile zu nennen. Die Überlebensrate der Zellen und das Ausmaß der Reinnervation sind vergleichbar mit der intraventrikulären TP [Stenevi, et al., 1985]. Auch diese Methode ist mit dem Problem einer randständigen Reinnervation verbunden [Björklund, et al., 1979]. Innerhalb der

reinnervierten Gebiete wurde sowohl die Ausbildung von Efferenzen als auch von Afferenzen beobachtet [Mahalik, et al., 1985]. Beide Techniken zur TP von soliden Gewebeblöcken zeigen bis zum Auftreten erster Verhaltenseffekte eine Latenzzeit von ungefähr 2 - 6 Monaten [Brundin, et al., 1987].

### *Transplantation von Zellsuspensionen*

Björklund et al. führten 1980 die TP von Zellsuspensionen aus ventralem Mesencephalon ein, und zeigten, dass diese Zellsuspensionen im Wirtstriatum überleben und funktionelle Effekte ausüben [Björklund, et al., 1980]. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit dopaminerge Zellen per Injektion direkt in das Striatum einzupflanzen. Je nach Art der Präparation bestehen diese Suspensionen entweder aus Zellhaufen von ca. 100 Zellen oder aus Einzelzellsuspensionen. Letztere zeigen zwar eine bessere Integration in das Wirtsgewebe, haben aber den Nachteil, dass durch den ausführlichen Prozess der Dissoziation ein größerer Anteil der Zellen schon vor der TP abstirbt [Watts, et al., 1998]. 150 überlebende dopaminerge Neurone reichen aus, um funktionelle Effekte zu bewirken, was bei einem 0,1 – 2 % Anteil dopaminerger Zellen heißt, dass die Suspension etwa 150.000 vitale Zellen enthalten sollte, um eine Kompensation zu erreichen [Yurek, et al., 1990].

Es gibt zwei Möglichkeiten die Suspension zu injizieren. Die Makro-TP, die beide Arten der Suspension zur Anwendung bringen kann, und die Mikro-TP, die sich wegen des geringeren Durchmessers der Injektionskanüle nur für die Einzelzellsuspension eignet [Nikkhah, et al., 1994].

### Makro-Transplantation

Bei der öfter angewendeten Makro-TP werden mittels einer Stahlkanüle mit einem Durchmesser von ca. 0,5 mm zwei Depots entlang eines Injektionskanals gesetzt [Björklund, et al., 1983], was im Vergleich zur Mikro-TP ein größeres lokales Trauma nach sich zieht. Ähnlich der TP von solidem Gewebe wachsen die Axone ca. 2 mm weit in die Umgebung ein und führen damit zu einer teilweisen Reinnervation des Striatums [Doucet, et al., 1990]. Die Überlebensrate dieser Transplantate ist sehr gut und die Integration in das Wirtsgewebe besser und großflächiger als bei der TP von soliden Gewebestücken. Die TH-positiven Zellen ordnen sich überwiegend am Übergang vom Transplantat zum Empfänger an [Nikkhah, et al., 1994; Nikkhah, et al., 1994; Barker, et al., 1996], können aber auch vereinzelt in das Striatum des

Empfängers migrieren [Doucet, et al., 1989]. Dementsprechend ist der Grad der Reinnervation und die Ausbildung von Kontakten mit kortikalen und striatalen Zellen des Wirtes in der Nähe des Transplantates relativ hoch [Doucet, et al., 1989; Doucet, et al., 1990], nimmt aber zur Peripherie hin ab [Schmidt, et al., 1981], was die niedrige Gesamtkonzentration von DA von 10-20 % der Normalwerte im Striatum erklärt [Gagnon, et al., 1991].

### Mikro-Transplantation

Bei der Mikro-TP wird eine Glaskapillare verwendet um mehrere Injektionskanäle mit 2 - 3 Depots kleineren Volumens [Nikkhah, et al., 1994] anzulegen. Dies führt zu einem größeren Bereich der Reinnervation bei gleichzeitig geringerem Trauma pro Stichkanal im Gewebe [Nikkhah, et al., 1994]. Eine vergleichende Studie hat gezeigt, dass bei der Mikro-TP ein größerer Teil des Striatums reinnerviert wird, die Axone teilweise über längere Distanzen auswachsen und auch eine Verbesserung der feinmotorischen Fähigkeiten erreicht werden konnte [Nikkhah, et al., 1993]. Des Weiteren wurde eine erhöhte Überlebensrate der dopaminergen Neurone festgestellt, was neben der verbesserten Reinnervation mit zu der erhöhten DA-Konzentration im Striatum beitrug, die etwa 25 – 35 % der normalen Werte betrug [Nikkhah, et al., 1994].

Für die verbesserten Parameter nach Mikro-TP wird im Wesentlichen das geringere Trauma im Wirtsgewebe und die pro Injektionskanal verringert auftretenden reaktiven Veränderungen wie z.B. die Astrogliose, verantwortlich gemacht. Dies erlaubt eine vereinfachte und großflächigere Interaktion zwischen Transplantat und Empfänger und gegenüber der Makro-TP eine verbesserte Integration des Transplantates [Nikkhah, et al., 1993; Nikkhah, et al., 1994; Nikkhah, et al., 1994]. Die Suspensionstransplantate zeigen gegenüber implantierten Gewebestücken mit ca. 3 – 6 Wochen sowohl eine signifikant verkürzte Latenzzeit bis zum Auftreten von ersten Verhaltenseffekten [Brundin, et al., 1987], als auch ein scheinbar größeres Ausmaß derselben [Nikkhah, et al., 1993].

### *Kontrolle des Transplantationserfolges*

Die immunohistochemische Markierung der TH, des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Katecholaminsynthese, mittels monoklonaler Antikörper ist die gängige Methode der histologischen Evaluierung des dopaminergen Transplantates [Asan, 1993]. Hierbei lassen

sich Lage des Transplantates, Lokalisation und Anzahl überlebender dopaminerger Zellen, das Auswachsen von Fasern aus dem Transplantat, sowie die Integration des transplantierten Gewebes darstellen [Freund, et al., 1985; Jaeger, 1985; Clarke, et al., 1988; Sesack, et al., 1994; Yung, et al., 1995; Descarries, et al., 1996]. Diese histologischen Ergebnisse können dann in Beziehung zu funktionellen Parametern gesetzt werden um quantitative Aussagen in Abhängigkeit vom Transplantationserfolg zu ermöglichen [Rioux, et al., 1991]. Die funktionelle Evaluierung der Transplantate erfolgt durch Verhaltensversuche, welche die Ausprägung der motorischen Symptome nach der Induktion des MP mit der nach TP miteinander vergleichen.

### **Verhaltenseffekte nach Suspensionstransplantation**

Unterschiede zwischen den verschiedenen Transplantationstechniken hinsichtlich ihrer Verhaltenseffekte bestehen im Wesentlichen in quantitativer Hinsicht. Obwohl keine direkt vergleichenden Studien zwischen den Auswirkungen von solidem Gewebe bzw. der Zellsuspensionen auf das Verhalten existieren, scheint es als ob Suspensionstransplantate eine umfassendere und vor allem schnellere Besserung der Verhaltensdefizite bewirken würden [Brundin, et al., 1987; Nikkhah, et al., 1993; Nikkhah, et al., 1994].

Die deutlichsten Verbesserungen von läsonsbedingtem Verhalten lassen sich mit dem Rotationsmodell feststellen. Nach der TP von dopaminergen Zellen in das denervierte Striatum wird das Apomorphin-induzierte-Rotationsverhalten signifikant vermindert [Perlow, et al., 1979; Abrous, et al., 1993]. Rotationsverhalten, das durch selektive D1-Agonisten ausgelöst wird, verschwindet meist völlig, während die Effekte selektiver D2-Agonisten eher mit denen von Apomorphin vergleichbar sind [Herman, et al., 1991; Robertson, et al., 1991].

In den Wochen nach Transplantation lässt auch das Amphetamin-induzierte Rotationsverhalten allmählich nach, bis es zu einer vollen Kompensation kommt [Björklund, et al., 1979]. Häufig beobachtet man eine Überkompensation, bei der die transplantierten Tiere nach Gabe von Amphetamin eine Rotation kontralateral zur transplantierten Seite zeigen [Herman, et al., 1985]. Der genaue Mechanismus dieser Überkompensation ist nicht bekannt [Herman, et al., 1994].

Die läsonsbedingten sensomotorischen Defizite und der Einfluss der TP auf diese werden mit einer Vielzahl verschiedener Verhaltenstests ermittelt. Funktionsdefizite der kontralateral zur Läsion befindlichen Gliedmaßen können durch intrastriatale Transplantate, die auch laterale

Anteile des Striatums reinnervieren, signifikant beeinflusst werden [Mandel, et al., 1990]. Auch die läsionsbedingte asymmetrische Körperhaltung und Seitenbevorzugung im *T-Maze* werden durch Transplantate verbessert [Dunnett, et al., 1983]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen bleiben komplexere Funktionen, wie z.B. feinmotorischer Einsatz der Pfoten oder das sogenannte *Disengaging behaviour* von der TP unbeeinflusst [Mandel, et al., 1990; Abrous, et al., 1993]. Allerdings konnten Nikkhah et al. in einer Langzeitstudie einen Trend zur Verbesserung der Feinmotorik bei Tieren feststellen, die Mikrotransplantate erhalten hatten [Nikkhah, et al., 1998]. Einzig Mukhida et al. konnten zeigen, dass im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren, mittels einer dreifachen TP der Gebrauch der Vorderpfoten in signifikantem Ausmaß wiederhergestellt wird [Mukhida, et al., 2001]. Die nach bilateraler Läsion auftretende Aphagie und Katalepsie werden jedoch auch durch multiple Transplantate nicht gemildert [Dunnett, et al., 1983]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verhaltenseffekte der Transplantate nicht nur von vielen Faktoren, wie z.B. der Technik der Transplantation oder der Komplexität des Verhaltens, abhängen, sondern auch, dass diese Effekte auf Teilaspekte des dopaminergen Systems beschränkt bleiben.

## **Morphologische Effekte der Suspensionstransplantate**

### *Efferente Projektionen des Transplantates*

Die nach der TP zu beobachtende Reinnervation des Striatums ist ähnlich der physiologischen Innervation. Es wird eine homogene, dichte Innervation beobachtet, die zwar zur Peripherie hin abnimmt, aber dennoch, wie immunohistochemische Studien belegen, synaptische Kontakte mit den Zielzellen des Striatums, den mittelgroßen, mit zahlreichen *spine*-tragenden Dendriten ausgestatteten Projektionsneuronen ausbildet [Freund, et al., 1985; Mahalik, et al., 1985; Clarke, et al., 1988]. Diese, als *en passant* bezeichneten synaptischen Kontakte, sind symmetrisch und überwiegend an den Schäften sowie *spines* der Dendriten des Empfängers lokalisiert, wobei sich nach der TP die Synapsen im Vergleich zum normalen Striatum vermehrt an den Schäften der Dendriten befinden [Freund, et al., 1985; Clarke, et al., 1988]. Die anatomische Rekonstruktion zwischen dopaminergen Neuronen und ihren postsynaptischen Zielen wurde auch für Substanz P- und Neuropeptid Y-haltige Interneurone [Mendez, et al., 1991; Vuillet, et al., 1994] gezeigt. Es ist umstritten, ob die Transplantate synaptische Kontakte mit cholinergen Interneuronen ausbilden, da, obwohl die Wiederherstellung der inhibitorischen Kontrolle über diese Neurone beschrieben wurde

[Dawson, et al., 1991; Jackisch, et al., 1991], die Existenz von Synapsen [Freund, et al., 1985] nicht bestätigt werden konnte [Clarke, et al., 1988].

Es ist bekannt, dass der Grad der Reinnervation sowie die Anzahl der überlebenden Zellen mit dem Ausmaß der funktionellen Verbesserung korrelieren [Björklund, 1992; Herman, et al., 1994]. Bis heute ist fraglich, inwieweit das aus dem Transplantat freigesetzte DA seinen Effekt über Synapsen oder durch Diffusion hervorruft, da z.B. gentechnisch modifizierte Zellen, die kein Faserwachstum zeigen, auch funktionelle Effekte haben [Jiao, et al., 1993]. Die Ausbildung von Efferenzen hängt sowohl von der Zahl der überlebenden dopaminergen Neurone als auch von der Fläche der Reinnervation ab. Beide Kriterien können bis heute nur unbefriedigend erfüllt werden. Das Ausmaß der Reinnervation, bezogen auf die gesamte Fläche eines Frontalschnittes durch das transplantierte Striatum, liegt zwischen 36 – 60 % der Kontrollwerte [Doucet, et al., 1990; Dawson, et al., 1991]. Ein Grund für das spärliche Auswachsen dopaminerg Fasern aus dem Transplantat scheint der Grad des lokalen Traumas und die damit einhergehende Immunreaktion im Gewebe zu sein, wie die verbesserten Ergebnisse nach Anwendung der Mikro-TP zu belegen scheinen [Nikkhah, et al., 1994]. Allerdings sollte dementsprechend auch ein gewisser Unterschied zwischen der Makro-TP und der TP von soliden Gewebestücken zu beobachten sein, was nicht der Fall ist. Nach der TP in lädierte Ratten kurz nach Geburt kann man, im Vergleich zu adulten Ratten, höhere Überlebensraten der Zellen, eine vermehrte Migration in das Striatum des Empfängers sowie ein weitläufiges Aussprossen von Fasern beobachten [Herman, et al., 1991]. Nach TP von humanem, fetalen Gewebe in lädierte Ratten wurde eine spezifische Reinnervation des lädierten Striatums beobachtet [Strömberg, et al., 1992]. Demgegenüber zeigte die TP in intakte Striata ein kaum nennenswertes Faserwachstum [Doucet, et al., 1990].

Es scheint also Regelprozesse für die Integration des Transplantates zu geben, mit dem Ziel die natürliche Verschaltung wiederherzustellen. Diese sind vor allem abhängig vom Ausmaß des Zell- bzw. Transmitterdefizits, dem Bedarf und vom Alter des Empfängers. Einige dieser Kontrollmechanismen scheinen auch, zumindest während der Fetalzeit, unabhängig von der Spezies zu sein.

Beispielhaft seien z.B. wachstumshemmende Faktoren (NI-35, NI-250) genannt, die, produziert von adulten Oligodendrozyten, in einem *in vitro*-Versuch für den Wachstumsstopp von Hinterhornzellen neugeborener Ratten verantwortlich waren [Bandtlow, et al., 1990]. Ein anderer *in vitro*-Versuch verglich das Wachstum von Axonen in einer einschichtigen mit einer mehrschichtigen Zelllage [Fawcett, 1994]. Je enger der EZR war, desto schwieriger gestaltete sich das Wachstum der Axone. Fawcett et al. führen dies vor allem auf die Existenz von

Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen zurück, die die wachstumsfördernden Effekte von Laminin behindern. McKeon et al. zeigten, dass das Wachstum der Axone sich verbessert wenn das Gewebe mit Chondroitinase vorbehandelt wurde [McKeon, et al., 1991].

Die Unterschiede zwischen adultem und fetalem Gewebe hinsichtlich der Produktion von Wachstumsfaktoren [Strömberg, et al., 1993], der Expression von chemotaktischen Molekülen [Taipale, et al., 1997] und die unterschiedliche Geometrie des EZR [Sykova, 2001] sind als Beispiele zu sehen für die komplexe Kontrolle des Wachstums im ZNS generell und vor allem nach invasiven Eingriffen durch den zusätzlichen Einfluss immunologischer [Sloan, et al., 1991], sowie proapoptotischer [Boonman, et al., 1999] Regelkreise.

### *Afferenzen des Transplantates*

Mesencephale dopaminerge Neurone *in situ* erhalten Afferenzen aus verschiedensten Regionen des ZNS, wie z.B. dem Striatum, Pallidum, Nucleus raphe oder dem Mesencephalon selbst [Gerfen, 1992]. Da die fetalen Zellen des Transplantates sich in einer ektopen Lokalisation entwickeln, ist die Frage nach der Ausbildung von Afferenzen und einer kontrollierten Freisetzung von DA aus dem Transplantat ein wichtiger Punkt. Trotz ausgeprägter Wundreaktion konnten in transplantierten Gewebestücken funktionelle Afferenzen beschrieben werden, die sich aber vor allem zwischen Zellen innerhalb des Transplantates ausbildeten [Jaeger, 1985; Bolam, et al., 1987].

Doucet et al. haben in einer Studie mit Zellsuspensionen gezeigt, dass das Transplantat sowohl von lokalen cholinergen Interneuronen als auch von kortikalen glutamatergen und mesencephalen serotonergen Zellen Afferenzen erhält [Doucet, et al., 1989]. Ein weiterer morphologischer Hinweis auf eine eventuell vorhandene regulierende Innervation ist die Expression von diversen Rezeptoren auf transplantierten, dopaminergen Zellen, wie z.B. muskarinerge [Dawson, et al., 1991] oder glutamaterge [Todaka, et al., 1999]. Außerdem wurde beobachtet, dass TH-positive Dendriten in das Neuropil des Wirtes einwachsen und dort synaptische Kontakte bilden [Mahalik, et al., 1985; Clarke, et al., 1988]. Allerdings werden vor allem Neurone nahe der Randzone und nicht im Zentrum des Transplantates innerviert.

Elektrophysiologische Messungen liefern weitere funktionelle Hinweise auf Afferenzen. Moukhles et al. beobachteten, dass nach intraperitonealer Applikation von Glutamat-Antagonisten und DA-Antagonisten die Reaktion dopaminerger Neurone in transplantierten Striata verglichen mit denen normaler Kontrolltiere keinen Unterschied zeigte, was auf eine ähnliche Regulierung der DA Neurone hinweist [Moukhles, et al., 1994]. Auch die Aktivierung transplanteder Neurone nach Stimulation verschiedener Hirnregionen wie z.B. des präfrontalen Kortex konnte erfolgreich demonstriert werden [Fisher, et al., 1991]. Allerdings wurde in einer neueren Studie dokumentiert, dass dopaminerge Neurone Glutamat als Kotransmitter verwenden und somit ein Teil der beobachteten glutamatergen Merkmale möglicherweise nicht auf afferente Kontakte zurückzuführen sind [Sulzer, et al., 1998].

Neben der Kontrolle durch Afferenzen werden dopaminerge Neurone über eine lange inhibitorische striato-nigrale *Feedback*-Schleife und eine kurze inhibitorische *Feedback*-Schleife über präsynaptische Autorezeptoren vom D2-Typ reguliert. Im Gegensatz zu der langen Schleife konnte für die kurze Schleife gezeigt werden, dass nach Applikation von DA-Agonisten bzw. Antagonisten eine Verringerung bzw. Steigerung der Freisetzung von DA beobachtet werden konnte, was für eine funktionierende Autoregulation spricht [Strecker, et al., 1987]. Obwohl eine Wiederherstellung des nigrostriatalen Systems bis heute nicht erreicht werden konnte, zeigt die teilweise erreichte Rekonstruktion Übereinstimmungen mit den physiologischen Verhältnissen, was eine basale Freisetzung von DA zur Folge hat, die ausreichend für die Verbesserung einiger Symptome zu sein scheint.

### **Physiologische und biochemische Charakteristika und Effekte der Transplantate**

In transplantierten Neuronen werden, im Vergleich zur physiologischen Entladungsaktivität, Unterschiede, wie z.B. vermehrt Signale vom *Burst*-Typ beobachtet [Grace, et al., 1984; Grace, et al., 1984]. Da diese Charakteristika in ihrer Ausprägung mit der Maturation der Neurone abnehmen, werden diese Aktivitäten als fetale Eigenschaften interpretiert [Herman, et al., 1994]. Unter dem Aspekt eines Mangels an afferenter Kontrolle sowie der Beobachtung von Gonon, dass Entladungen vom *Burst*-Typ mit ihrem verlängertem Aktionspotential zu einer erhöhten extrazellulären Konzentration unter physiologischen Bedingungen führen [Gonon, 1997], würde diese Art der Entladung auf eine basal erhöhte Freisetzung von DA im transplantierten Striatum abzielen.

*In-vivo*-Mikrodialysestudien sowie voltammetrische Untersuchungen zeigen, dass die Transplantate in der Lage sind, die DA-Konzentration nahe dem Transplantat auf normale Werte zu steigern, diese aber zur Peripherie hin abnehmen [Wang, et al., 1994]. Strömberg et al. konnten mittels elektrochemischen Messungen zeigen, dass die Verweildauer von extrazellulärem DA im transplantierten Striatum gegenüber dem normalen erhöht ist, bedingt durch einen relativen Mangel an DAT im lädierten Striatum [Strömberg, et al., 1991], was im Sinne einer vermehrten Diffusion verstanden werden könnte. Auf die gleiche Weise kann auch der gegenüber normalen nigrostriatalen Neuronen gesteigerte *Turnover* von DA interpretiert werden [Herman, et al., 1985; Jackisch, et al., 1991]. Allerdings muss hierbei auch die Anwesenheit von dopaminergen Neuronen aus der Area 10 berücksichtigt werden, die generell einen erhöhten *Turnover* haben [Cooper, et al., 1991].

Ein allgemein anerkannter Effekt ist die Normalisierung der nach Läsion erhöhten Expression des D2-Rezeptors [Dawson, et al., 1991; Rioux, et al., 1991] und der entsprechenden mRNA [Chritin, et al., 1996]. Dieses Phänomen kann interessanterweise auch außerhalb des reinnervierten Areals beobachtet werden [Strömberg, et al., 2000]. Demgegenüber steht aber die oft beobachtete Hypersensitivität nach Gabe von D2-Agonisten [Rioux, et al., 1991], was durch verbleibende hypersensitive Rezeptoren außerhalb des reinnervierten Gebietes erklärt werden könnte [Herman, et al., 1994].

Die Effekte sowohl der Läsion als auch der TP auf den D1-Rezeptor werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Obwohl in Verhaltensversuchen eine Hypersensitivität [Herman, et al., 1994] nach Läsion zu sehen ist, wurde sowohl eine kompensatorische Steigerung des D1-Rezeptors mit entsprechender Normalisierung nach TP dokumentiert [Gagnon, et al., 1991], als auch die Abwesenheit wesentlicher Veränderungen nach Läsion [Savasta, et al., 1988]. Die Läsion des nigrostriatalen Systems zieht Veränderungen in nahezu allen Transmittersystemen des Striatums nach sich, wie z.B. bei dem Tachykinin Substanz P (SP), Enkephalin, Dynorphin, GABA und Neuropeptid Y (NPY).

Enkephalin<sup>+</sup>- und einige GABA<sup>+</sup>- Zellen werden von dopaminergen Afferenzen inhibiert und zeigen einen Anstieg in ihren zellulären Aktivitäten nach der Läsion. Andere GABA<sup>+</sup>- und SP<sup>+</sup>- Zellen werden von DA erregt und reagieren mit einem Absinken ihrer Aktivität nach Denervierung des Striatums [Björklund, 1992]. Die TP beeinflusst erfolgreich die kompensatorischen Veränderungen in beiden Arten von GABAergen Zellen wie z.B. ein Absinken der Enzymaktivität [Segovia, et al., 1991]. Sowohl in reinnervierten als auch in nicht-reinnervierten Gebieten kann eine Normalisierung der striatalen Konzentration und Synthese von Enkephalin beobachtet werden [Cenci, et al., 1993]. Im Gegensatz dazu bleibt

der Einfluss auf SP-positiven Zellen auf ein Gebiet nahe dem Transplantat beschränkt und zeigt selbst dort nur eine eingeschränkte Wiederherstellung [Cenci, et al., 1993]. NPY [Moukhles, et al., 1992; Vuillet, et al., 1994] und Dynorphin [Cenci, et al., 1993] zeigen beide eine Tendenz zur Normalisierung ihres Metabolismus nach TP, auch in nicht-reinnervierten Gebieten, wobei der Grad der Normalisierung von Dynorphin die Ausgangswerte nicht wiedererlangt.

Insgesamt stellt die TP die basale Aktivität des Striatums und der verschiedenen striatalen Transmittersysteme in groben Zügen und unterschiedlichem Ausmaß wieder her. Interessant ist, dass diese Effekte auch nicht-reinnervierte Bereiche des Striatums betreffen. Dennoch darf nicht vergessen werden, dass viele Studien auf künstlicher externer, also elektrophysiologischer oder pharmakologischer Stimulation des Transplantates beruhen, und nicht bekannt ist, inwieweit physiologische Stimulationen ausreichen um einen entsprechenden Effekt hervorzurufen.

## Das Konzept der *Volume transmission*

Kommunikation findet statt, wenn eine Nachricht von einem Sender in ein Signal kodiert wird und dieses über einen Kommunikationskanal an einen Empfänger gelangt, der es wieder in die ursprüngliche Information dekodieren kann [Shannon, et al., 1949]. Aufbauend auf dieser allgemeinen Definition hat die Gruppe um Agnati et al. erstmals eine umfassende, von der Zellart unabhängige Klassifikation der interzellulären Kommunikation im ZNS vorgeschlagen [Agnati, et al., 1985; Agnati, et al., 1986].

### Definition der Begriffe *Wiring transmission* und *Volume transmission*

Der Begriff *Wiring transmission* (WT) beschreibt die serielle Informationsweiterleitung von einem Sender zu einem Empfänger über einen Kommunikationskanal aus physisch identifizierbaren Strukturen deren Abstand dem des synaptischen Spalts entspricht. Das entscheidende Kriterium ist hierbei das Sender – Empfänger - Verhältnis von 1:1 [Agnati, et al., 1995]. Im Wesentlichen umfasst die WT also die synaptische Informationsübertragung und ist damit eine sichere und schnelle Art der Informationsübertragung (s. Tab. 1).

Der Begriff *Volume transmission* (VT) beschreibt die parallele, interzelluläre Kommunikation mittels der dreidimensionalen Diffusion von Botenstoffen im EZR mit einem Sender – Empfänger - Verhältnis von 1:n, wobei  $n > 1$  ist und über eine Distanz hinweg, die größer ist als der synaptische Spalt. Anhand der Länge der Diffusionsstrecke kann man die VT noch weiter unterteilen (s. Tab. 1). Es handelt sich um eine langsame und nicht zielgerichtete Art der Informationsübertragung, da die Geometrie des Extrazellulärraums und die Homöostase der Extrazellulärflüssigkeit durch eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. Aktivität der Zellen, pH-Wert und Temperatur beeinflusst werden [Agnati, et al., 1995]. Neben der Schnelligkeit und Sicherheit der Transmission unterscheiden sich beide Prinzipien auch durch einen unterschiedlich hohen Energieaufwand, in den Affinitäten der Rezeptoren und dementsprechend in den benötigten Transmitterkonzentrationen. Während WT vor allem zwischen Neuronen zur Anwendung kommt, kann VT Informationen zwischen allen Zellen des ZNS austauschen, solange diese sensitiv für das jeweilige Signal sind. Aus dieser Definition ergeben sich folgende Kriterien, die ein Signal erfüllen muss, um als VT-Signal zu gelten:

Es wird erstens aus einer Zelle des ZNS kontrolliert freigesetzt, es bewegt sich zweitens in wirksamen Konzentrationen über eine Distanz die größer ist als der synaptische Spalt, kann drittens selektive rezeptive Moleküle in mehr als einer Zelle aktivieren und bewirkt dadurch viertens eine physiologische Reaktion in den Zielzellen [Zoli, et al., 1998].

Übertragungsart	Verhältnis Quelle / Ziel	Abstand Quelle / Ziel	Übermittlungszeit Quelle / Ziel
<i>Wiring transmission</i>			
Quasi Kontinuität			
• Gap Junction	1 : 1	2 – 3 nm	µs
Morph. Verbindung			
• Geschlossene Synapse	1 : 1	20 – 50 nm	ms
• Membrane Juxtaposition	1 : 1	2 – 10 nm	ms
<i>Volume transmission</i>			
Diffusion			
Ionenströme	1 : n; n > 1 / n >> 1	100 nm – µm	ms – s
Parakrine Transmission			
• Offene Synapse	1 : n; n > 1 / n >> 1	100 nm – mm	ms – min
• Ohne Synapse	1 : n; n > 1 / n >> 1	µm – mm	s – min
Paraaxonale Transmission	1 : n; n >> 1	mm	min
Konvektion			
Paravaskulär	1 : n; n >> 1	mm – cm	min
Intrazerebrale Flüssigkeit	1 : n; n >> 1	mm – cm	min

**Tabelle 1:** Übertragungsarten im ZNS, übersetzt aus Zoli et al., 1998 [Zoli, et al., 1998];

## ***Volume transmission im zentralen Nervensystem***

### *Freisetzung aus Neuronen*

#### Freisetzung mittels Synapsen

In Neuronen sind bestimmte Eigenschaften der Synapse ausschlaggebend für Ihre Fähigkeit Informationen per VT weiterzuleiten. Zoli et al. teilen Synapsen in offene und geschlossene Synapsen mit diversen Intermediärformen ein [Zoli, et al., 1996]. Neben strukturellen Kriterien, wie z.B. die Verpackung der Synapse in Glia oder das Ausmaß der Opposition von *Release Sites* und Rezeptoren, sind vor allem die unterschiedliche Affinität intra- und extrasynaptischer Rezeptoren und ihr quantitatives Verhältnis entscheidend für die Art der Kommunikation einer Synapse.

Den Prototyp einer geschlossenen Synapse stellt die neuromuskuläre Endplatte mit ihren Invaginationen der postsynaptischen Membran, der hohen Konzentration von Acetylcholinesterase und der tausendfach geringeren Konzentration von extrasynaptischen Rezeptoren dar. Die offene Synapse als anderes Extrem ist die peptiderge Synapse, die auf die Diffusion der Botenstoffe ausgelegt ist. Die Vesikel sind meistens parasynaptisch gelagert, es gibt kaum *Uptake*-Mechanismen, Spaltung durch Proteasen im EZR kann zur Inaktivierung, aber auch zu aktiven Fragmenten führen, und die meisten Zielstrukturen sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit hoher Affinität. Zwischen diesen beiden Extremen gibt es verschiedene Intermediärformen, die z.B. in Abhängigkeit von ihrer Entladungsfrequenz von WT auf VT umstellen können [Zoli, et al., 1996].

#### Freisetzung ohne Synapsen

Neben der Freisetzung aus Synapsen gibt es in der Literatur Hinweise auf extrasynaptische Exozytose von Transmittervesikeln. Golding untersuchte die Verteilung von *large dense core vesicles* und teilt sie in drei verschiedene Sparten ein: synaptisch, parasynaptisch und extrasynaptisch, wobei das Verhältnis der unterschiedlichen Lokalisationen von System zu System variieren kann [Golding, 1994]. Prinzipiell enthalten diese Vesikel Neuropeptide. Allerdings werden auch Fälle beschrieben, in denen Monoamine in diesen Vesikeln mit Neuropeptiden kolokalisiert sind, wie z.B. Dopamin und Cholezystokinin im Striatum [Llona, et al., 1994]. Die zweite Vesikelform, die für die Freisetzung klassischer Transmitter wie Monoamine oder Aminosäuren verantwortlich gemacht wird, die *small vesicles*, befinden sich

überwiegend in den aktiven Zonen der Synapsen. Ausnahmen gibt es im Sinne von *small vesicle* enthaltenden Varikositäten ohne erkennbare synaptische Spezialisierung. Descarries et al. haben derartige Varikositäten auch im nigrostriatalen System beschrieben [Descarries, et al., 1996]. Zudem können Neurone, wie auch Astrozyten, die Richtung ihrer Transportproteine umkehren und sie für die Transmitterfreisetzung verwenden [Adam-Vizi, 1992].

### *Der extrazelluläre Raum als Medium der Diffusion*

Es werden unterschiedliche Techniken angewandt um den Transportweg der VT-Signale, den EZR, zu charakterisieren. Erste Untersuchungen wurden mit Monoaminen und Radiotraceren 1970 im Striatum durchgeführt [Bondareff, et al., 1970]. Bondareff und Kollegen hatten über die Diffusion von Molekülen entlang von Faserbündeln durch das Striatum, die Capsula externa und den Corpus callosum berichtet. Bjelke und Kollegen konnten dies bestätigen [Bjelke, et al., 1995]. Die rasche Verteilung von *Tracer*-Proteinen im ganzen Gehirn nach Applikation im subarachnoidalen Raum spricht dafür, dass zwischen dem extrazellulären Raum und dem paravaskulären Netzwerk ein Flüssigkeitstransport stattfindet, der sich wahrscheinlich entlang penetrierender Arteriolen bis zum Kapillarnetzwerk erstreckt und durch die Pulsationen der Gefäße begünstigt wird [Zoli, et al., 1999]. Untersuchungen mit Radionukliden unterstützen die These, dass der Fluss des Liquors in Abhängigkeit von der Systole pulsatil erfolgt und der Abfluss in die Blutbahn direkt unter Einbeziehung der paravaskulären und extrazellulären Kompartimente abläuft [Greitz, 1993]. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Möglichkeit für konvektive Flüssigkeitsbewegungen über alle Kompartimente des ZNS hinweg gegeben ist und dies als Hinweis auf eine entsprechende Nutzung aufgefasst werden kann.

Die in dieser Studie angewandte  $\text{TMA}^+$ -Methode untersucht im Gegensatz zu oben beschriebenen Methoden die Diffusion von  $\text{TMA}^+$  über eine Distanz von ca.  $200\mu\text{m}$  hinweg. Sie ermöglicht Aussagen über die geometrischen Bedingungen der Diffusion im EZR innerhalb dieser Distanz und damit auch eine gewisse quantitative bzw. qualitative Beschreibung des Diffusionsweges von  $\text{TMA}^+$  in den untersuchten Arealen [Nicholson, et al., 1981].

### *Zielrezeptoren – Lokalisation*

Beweise für die extrasynaptische Lokalisation von Zielrezeptoren gibt es in der Literatur einige. Sie werden allgemein als Transmitter-Rezeptor-Mismatch bezeichnet [Herkenham, 1991]. Immunohistochemische Studien haben gezeigt, dass in vielen Transmittersystemen die Orte, an denen der Transmitter gelagert wird, räumlich nicht mit den Orten membrangebundener Rezeptoren übereinstimmen. Für Substanz P wurde von Liu et al. gezeigt, dass nicht mehr als 15 % der Rezeptoren postsynaptisch lokalisiert sind [Liu, et al., 1994]. Metabotrope Glutamaterezeptoren wurden im Kortex des Kleinhirns an parasynaptischen Stellen gefunden, ionotrope unter anderem auf Fortsätzen der die Synapse umgebenden Gliazellen [Baude, et al., 1994; Nusser, et al., 1994]. Auch monoaminerge Rezeptoren wurden an nicht mit Synapsen assoziierten Strukturen vorgefunden wie z.B.  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren auf Astrozytenfortsätzen [Aoki, 1992] oder dopaminerge Rezeptoren auf striatalen Dendriten [Sesack, et al., 1994]. Herkenham beschreibt in einer Veröffentlichung zahlreiche weitere Beispiele, gibt aber auch zu bedenken, dass neben der VT auch andere Gründe für dieses Phänomen in Frage kommen. Zum einen können technische Probleme wie mangelnde Sensitivität der Antikörper, die erschwerte Penetration in den synaptischen Spalt oder Artefakte bei autoradiographischen Untersuchungen dafür verantwortlich sein. Auch die Anfärbung von Rezeptoren, die sich im axonalen Transport oder im Prozess der Verstoffwechslung befinden, muss als möglicher Grund erwähnt werden [Herkenham, 1991]. Der Nachweis der VT in einem Transmittersystem und damit die Auflösung des *Mismatch*-Phänomens wäre der Beweis der Funktionalität eines extrasynaptisch lokalisierten Rezeptors.

### ***Volume transmission in verschiedenen Transmittersystemen***

Es ist allgemein anerkannt, dass das Gas Stickstoffmonoxid (NO) als lipophiles Signalmolekül in benachbarte Zellen diffundieren kann und diese durch Aktivierung des Enzyms Guanylatcyclase beeinflusst [Garthwaite, et al., 1988]. Diese von zellulären Membranen unbehinderte Diffusion mit den bekannten Auswirkungen auf die Durchblutung oder die synaptische Plastizität [Gally, et al., 1990] stellt allerdings die Ausnahme dar. Eine

weitere Gruppe von Substanzen mit den für ein VT-Signal typischen Charakteristika sind die Neuropeptide, wie z.B. Dynorphin [Fuxe, et al., 1994].

Die Hinweise auf VT in monoaminergen Systemen beruhen zumeist auf dem Vorhandensein von Varikositäten, die nicht mit Synapsen verbunden sind. Der Grad der Verzweigung des jeweiligen Systems korreliert hierbei mit dem Ausmaß dieser nicht-synaptischen Varikositäten. Im Neokortex der Ratte bildet das eher eingeschränkte dopaminerge System vor allem synaptische Verbindungen aus, während die weit verzweigten Systeme von Noradrenalin, Acetylcholin und Serotonin (5-HT) ein hohes Vorkommen von nicht-synaptischen Varikositäten aufweisen [Descarries, et al., 2000]. Ein weiterer Hinweis ist das Vorkommen von monoaminergen Rezeptoren auf Astrozyten und die Auslösung einer physiologischen Reaktion in diesen Zellen. So wurde schon 1978 von Narumi et al. die Änderung der Zellform in von Norepinephrin beeinflussten Astrozyten *in vitro* beobachtet [Narumi, et al., 1978], während die Gruppe um Stone die Beeinflussung des Glukosestoffwechsels und die Freisetzung von sowohl neurotrophen Faktoren als auch lokalen Transmittern wie Taurin aus Astrozyten unter der Einwirkung von Noradrenalin beschreibt [Stone, et al., 1989].

Bestimmte Synapsen des sympathischen Systems der Ratte können Noradrenalin in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz vermehrt freisetzen, so dass es zur Interaktion mit extrasynaptischen Rezeptoren kommt [Stjarne, et al., 1994]. Im ventralen Horn des Rückenmarks dominieren im serotoninergen System eher synaptische Verbindungen und 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren mit niedriger Affinität, während im dorsalen Horn eher nicht synaptische Varikositäten und hochaffine 5-HT<sub>1</sub> Rezeptoren dominieren [Ridet, et al., 1993]. Es ist bekannt, dass Monoamine auch bei Modulationen eine Rolle spielen deren Etablierung eine längere Zeit in Anspruch nimmt und deren Wirkungen länger anhalten. Beispielfhaft seien hier der Schlaf-Wach-Rhythmus und die Nozi- bzw. Anti-Nozizeption genannt. Die langsamen und länger anhaltenden Effekte der VT wären ein dementsprechend möglicher Modulationsweg [Agnati, et al., 1995].

### ***Volume transmission im nigrostriatalen System***

Die dopaminergen Neurone der SNPc senden ihre hochgradig verzweigten Axone, die in Ratten ungefähr 250000 Varikositäten *en passant* über ihren gesamten Verlauf ausbilden [Bezard, et al., 1998], überwiegend zu den Dendriten mittelgroßer *spine* tragender GABA<sup>+</sup>-

Neurone, aber auch zu großen, cholinergen Interneuronen. Die deutliche Mehrheit dieser Varikositäten ist mit keinen erkennbaren synaptischen Strukturen assoziiert, während der andere Teil kleine symmetrische Synapsen *en passant* an den Schäften und *spines* der Zielneurone bildet [Groves, et al., 1994; Descarries, et al., 1996]. Neben dieser möglichen Quelle für DA als VT-Signal gibt es weitere Hinweise in der Literatur, die zeigen, dass die dopaminerge Innervation des Striatums einen dualen Charakter hat: synaptisch und extrasynaptisch.

Immunohistochemische Studien haben gezeigt, dass D1- und D2-Rezeptoren oftmals extrasynaptisch lokalisiert sind. D2-Rezeptoren wurden vor allem an den *spines* von Dendriten gefunden, wo sie zwar mit kleinen, symmetrischen TH-positiven Synapsen assoziiert waren, aber v.a. außerhalb von TH-positiven Membranstrukturen vorgefunden wurden [Sesack, et al., 1994]. D1-Rezeptoren wurden wie D2-Rezeptoren an Dendriten und dort kaum mit TH-positiven Strukturen assoziiert vorgefunden. Somit wäre eine anatomische Grundlage für die VT im nigrostriatalen System gegeben [Caille, et al., 1996]. Yung et al. zeigten, dass ungefähr die Hälfte beider dopaminergere Rezeptoren nicht mit Synapsen assoziiert sind, und dass fast ein Drittel der mit Synapsen assoziierten Rezeptoren etwas entfernt von der Synapse lokalisiert waren [Yung, et al., 1995]. Die *Clearance* von DA aus dem EZR erfolgt aufgrund des langsamen enzymatischen Abbaus vor allem durch den DAT [Zoli, et al., 1998]. Dieser Transporter ist überwiegend extrasynaptisch lokalisiert [Nirenberg, et al., 1996] damit implizierend, dass dopaminerge Varikositäten darauf ausgelegt sind, aus dem synaptischen Spalt heraus diffundiertes DA aufzunehmen, was auch amperometrisch belegt wurde [van Horne, et al., 1992].

Dopaminerge Neurone können zwei verschiedene Entladungsfrequenzen aufweisen: den sogenannten *Single-Spike-Modus*, der etwa 3-8 Hz beträgt [Grace, et al., 1984] und den sogenannten *Burst-Firing-Modus*, der etwa 15 Hz beträgt [Grace, et al., 1984]. Letzterer führt im Nucleus accumbens zu einer vermehrten Diffusion von DA aus dem synaptischen Spalt heraus [Garris, et al., 1994]. Gonon fand heraus, dass derart freigesetztes DA bis zu 12µm weit diffundieren kann [Gonon, 1997], was gleichbedeutend mit einer möglichen Beeinflussung von ca. 200 umgebenden dopaminergen Synapsen wäre [Zoli, et al., 1998].

Die Hemmung der Sekretion von Prolaktin (PRL) durch DA wurde genutzt, um die Funktionalität der VT zu untersuchen, indem homologe PRL-positive Zellen der Hypophyse in das Striatum transplantiert wurden [Bjelke, et al., 1988]. Das Ausmaß der PRL-positiven Zellen im Striatum war indirekt proportional zu der DA-Konzentration: Nach einer Läsion des Striatums mit 6-OHDA wurden vermehrt PRL-positive Zellen gefunden, während nach der

Injektion von Amphetamin weniger gefunden wurden [Bjelke, et al., 1989]. Unter diesen Bedingungen diffundiert DA demnach in ausreichender Konzentration aus dem synaptischen Spalt um funktionell wirksam zu werden [Agnati, et al., 1996].

### ***Volume transmission im Striatum nach Läsion durch 6-OHDA oder MPTP***

Die Läsion dopaminergener Neurone des Striatums führt zu kompensatorischen Veränderungen, die darauf abzielen, die DA-Konzentration im Striatum zu erhalten, und auf eine verstärkte Rolle der Diffusion im EZR unter diesen Bedingungen hinweisen [Bezard, et al., 1998].

Garris und Kollegen stellten fest, dass nach unilateraler Applikation von 6-OHDA in Ratten sowohl auf der lädierten als auch der gesunden Seite gleiche Konzentrationen von DA gemessen wurden [Garris, et al., 1997]. In Ratten, deren nigrostriatales System unilateral zu 95 % mittels 6-OHDA lädiert worden war, konnten nach Applikation von Amphetamin ebenfalls normale Konzentrationen von DA im lädierten Striatum gemessen werden, während in Ratten mit einer kompletten Läsion keine kompensatorische Erhöhung festgestellt werden konnte [Robinson, et al., 1988]. Castaneda et al. kamen bei Ratten mit einer bilateralen Läsion zum gleichen Ergebnis: solange 5 % der dopaminergen Neurone zur Synthese und Freisetzung befähigt sind wurden normale Konzentrationen gemessen [Castaneda, et al., 1990].

Die lokale Läsion dopaminergener Innervation im Striatum ermöglicht die Einteilung von innerhalb, neben und außerhalb der Läsion gelegenen Arealen [Zoli, et al., 1998]. Während außerhalb der Läsion gelegene Gebiete kaum eine Veränderung zeigten, wurden innerhalb bzw. neben der Läsion eine Hypertrophie von TH-positiven bzw. DAT-positiven Zellen beobachtet. Die Größe der Varikositäten als Orte der Freisetzung war vervierfacht. Somit würde eine erhöhte Syntheserate den hyperaktiven, vor allem extrasynaptischen Varikositäten mehr Transmitter zur Verfügung stellen und der zuerst widersprüchlich erscheinende Anstieg des DAT könnte durch eine Umkehrung der Transportrichtung in den extrazellulären Raum im Sinne einer verstärkten Freisetzung erklärt werden [Hitri, et al., 1994], wie es auch für andere Transmitter wie z.B. Glutamat gezeigt werden konnte [Adam-Vizi, 1992]. Dieser Fall der Steigerung des DAT in lädierten Gebieten ist allerdings die Ausnahme und muss mit der Tatsache der lokalen Läsion im Striatum in Verbindung gebracht werden.

Nach Applikation von 6-OHDA in das MFB wurde bisher immer ein Verschwinden des DAT im lädierten Striatum von Ratten beobachtet und diese Tatsache wird in der humanen Form

des MP zur Bestimmung der Progression der Krankheit [Lindvall, 1998] benützt. Giros und Kollegen haben daher *Knockout*-Mäuse untersucht, die keinen DAT exprimieren können (-/-DAT) und festgestellt, dass es in diesen Tieren zu spontaner Hyperlokomotion kommt obwohl Transmitterkonzentrationen und Rezeptoren kompensatorisch heruntergeregelt worden waren. Es wurde eine um das 100fache verlängerte Verweildauer von DA im EZR gemessen [Giros, et al., 1996], was die Rolle des DAT in der Regulation der extrazellulären DA-Konzentration unterstreicht.

Die Läsion von Katzen mit MPTP resultiert in einer heterogenen Läsion des Striatums, die vor allem die dorsolateralen Anteile des Striatums betrifft. Nach 4 - 6 Wochen kann eine spontane Genesung von dem induzierten motorischen Defizit beobachtet werden. Schneider et al. untersuchten unter Verwendung der Mikrodialyse die Diffusion von Dopamin im Striatum von Katzen nach Genesung von einer MPTP Injektion und verglichen sie mit einer unbehandelten Kontrollgruppe. In den MPTP-Katzen wurde eine Diffusion von DA bis zu 7,0 mm weit festgestellt, ebenso wie in gesunden, mit einem *Uptake*-Inhibitor vorbehandelten Katzen [Schneider, et al., 1994]. Dies wird noch von einer Studie unterstützt, die im selben Tiermodell mit einem retrograden *Tracer*-Protein untersucht hat, ob das dorsolaterale Striatum von verbliebenen dopaminergen Neuronen der SNPc reinnerviert wurde und dies nicht bestätigt fand [Rothblat, et al., 1994].

Im mit 6-OHDA unilateral lädierten Striatum der Ratte wurde von Bjelke und Mitarbeitern untersucht, ob die Applikation von Amphetamin Auswirkungen auf das denervierte Striatum hat wie sie typisch für DA wären. Zwar konnte die Mikrodialyse keine messbaren Ergebnisse auf der lädierten Seite liefern, aber es wurde eine ausgeprägte Reaktion bei der Expression von *c-Fos* beobachtet und eine für die Wirkung von DA typische Entladungsrate der striatalen Neurone aufgezeichnet. Dies könnte ein Hinweis auf die Diffusion von DA von der gesunden Seite auf die lädierte Seite sein um dort hypersensitive Rezeptoren zu aktivieren [Bjelke, et al., 1994].

### ***Volume transmission* nach Transplantation fetaler Zellen**

Die gängige Ansicht in der Literatur ist, dass die nach der TP zu beobachtenden Veränderungen und funktionellen Verbesserungen auf das Auswachsen dopaminerg Fasern und deren synaptische Integration zurückzuführen ist [Herman, et al., 1994]. Allerdings gibt es experimentelle Hinweise auf Effekte der transplantierten Zellen außerhalb des histologisch

verifizierten Bereiches der Reinnervation. Mittels einer Messung der 2-Deoxyglucose-Aktivität in 6-OHDA lädierten Ratten nach unilateraler TP in die SN, wurde eine metabolische Aktivität in der SNPr und im Striatum der kontralateralen Seite gefunden, was die Autoren über einen Zusammenhang zwischen TP und Aktivität des dopaminergen Systems auf der kontralateralen Seite spekulieren ließ [Zainos-Rosales, et al., 1993]. In bilateral lädierten Mäusen wurde nach unilateraler TP von Nebennierenmark in das Striatum festgestellt, dass trotz unilateral beschränkter Faseraussprossung die extrazellulären Konzentrationen von DA beidseitig angestiegen waren [Bohn, et al., 1990].

Reum und Morgenstern [Reum, et al., 1994] transplantierten in unilateral lädierten Ratten fetale Gewebestücke in die Seitenventrikel und fanden mit *in-vivo* voltammetrischen Messungen heraus, dass nach Stimulation des dopaminergen Systems durch Amphetamin die intakte Hemisphäre der Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren einen wesentlich geringeren Anstieg in der extrazellulären DA-Konzentration zeigte. Dieselbe Gruppe fand heraus, dass die TP Auswirkungen auf den DAT der kontralateralen Seite hat. Die Untersuchung des DAT an einer Synaptosomenpräparation aus dem nicht lädierten bzw. lädierten und dann transplantierten Striatum führte zu der Erkenntnis, dass die Anzahl der DAT nach TP auf der gesunden Seite reduziert wurde [Schafer, et al., 1995], was kurze Zeit später durch voltammetrische Untersuchungen *in vivo* belegt wurde [Reum, et al., 1995]. Der erste Hinweis, dass auch Zellsuspensionen das Striatum der unbehandelten Seite beeinflussen, wurde von Earl et al. erbracht. Nach Applikation von Amphetamin wurde auf der intakten Seite transplantierte Tiere ein wesentlich geringerer Anstieg in der extrazellulären DA Konzentration gemessen, als auf der intakten Seite von nur lädierten oder ganz unbehandelten Tieren [Earl, et al., 1996]. Auch in diesem Modell wurde eine reduzierte Anzahl des DAT auf der gesunden Seite gemessen [Earl, et al., 1996].

Schon einen Monat nach der TP sind dopaminerge Neurone in der Lage, eine Wiederherstellung der Dopamin-NPY-Interaktion im ganzen Striatum zu induzieren [Moukhles, et al., 1992]. Nachdem dieser Effekt in gleichem Ausmaß in Gebieten gefunden wurde, die sowohl sehr dicht als auch kaum reinnerviert waren, stellte sich die Frage, ob dies auf synaptische oder nicht-synaptische Mechanismen zurückzuführen ist. In einer anderen Studie wurden sowohl TH- als auch NPY-positiven Zellen dargestellt. Die Darstellung der morphologischen Assoziation beider Transmitter gelang einen Monat nach TP nur in dicht innervierten Gebieten, während drei Monate nach TP die Intensität der Färbung, wahrscheinlich auch aufgrund der Elongation dopaminerg Axone, deutlich nachließ. Dies lässt vermuten, dass die zuvor beobachtete schnelle und ausgedehnte Normalisierung der

Interaktion zwischen NPY und DA sowohl auf synaptische als auch auf diffusionsbedingte Wirkungen von DA zurückzuführen ist [Vuillet, et al., 1994].

Strömberg und Kollegen verwendeten die intraventrikuläre TP, um das transplantierte Striatum, von medial nach lateral, in ein reinnerviertes Gebiet und ein nicht-reinnerviertes Gebiet einzuteilen. Die Evaluierung der unterschiedlichen Auswirkungen einer lokalen Applikation von Quinpirol mittels elektroфизиологischer Methoden zeigte eine Normalisierung der Hypersensitivität der D2-Rezeptoren auch in nicht-reinnervierten Gebieten [Strömberg, et al., 2000].

# Material und Methoden

## Studiendesign

Im Alter von 7 Wochen wurde männlichen Wistar Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland; Antragsnr.: 5.2/315 G0160/99) das Toxin 6-OHDA intrazerebral verabreicht um ein unilaterales dopaminerges Defizit im Striatum der betroffenen Hemisphere zu induzieren. Eine unbehandelte Kontrollgruppe wurde unter normalen Bedingungen in derselben Tierkolonie weitergeführt. Fünf Wochen nach der Läsion erfolgte die Überprüfung durch Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten, wobei nur Ratten mit einem stabilen läsionsbedingtem Drehverhalten für weitere Untersuchungen herangezogen wurden. In der nachfolgenden Woche, also im Alter von 13 Wochen, wurden die Ratten in Gruppen aufgeteilt und mit fetalen Mittelhirnzellen aus 14 Tage alten Embryonen auf zwei Arten transplantiert: Eine Gruppe erhielt Makrotransplantate, die andere Mikrotransplantate, zwei andere Gruppen wurden analog scheintransplantiert. Eine weitere Gruppe wurde im lädierten Zustand belassen. 6 und 12 Wochen nach der Operation wurde erneut das Rotationsverhalten evaluiert, bevor dann, in den zu diesem Zeitpunkt 7 - 9 Monate alten Ratten, die Messung der Diffusionsparameter  $\alpha$ ,  $\lambda$  und  $k'$  erfolgte (s. Abb. 1). Direkt anschließend wurden die narkotisierten Tiere perfundiert und das Gehirn immunohistochemisch durch Anfärbung der TH bzw. des *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) untersucht. Dieses experimentelle Protokoll wurde von drei verschiedenen Gruppen mit jeweils 20-25 Ratten zeitlich versetzt durchlaufen. Jede dieser Kolonien wurde in die erwähnten Gruppen eingeteilt, so dass jede dieser Kolonien auch eine altersentsprechende Kontrollgruppe enthielt. Nur diejenigen Tiere, die die Experimente innerhalb dieses Zeitrahmens durchliefen und die Bedingungen der Experimente erfüllten, wurden in die abschließende statistische Analyse einbezogen.

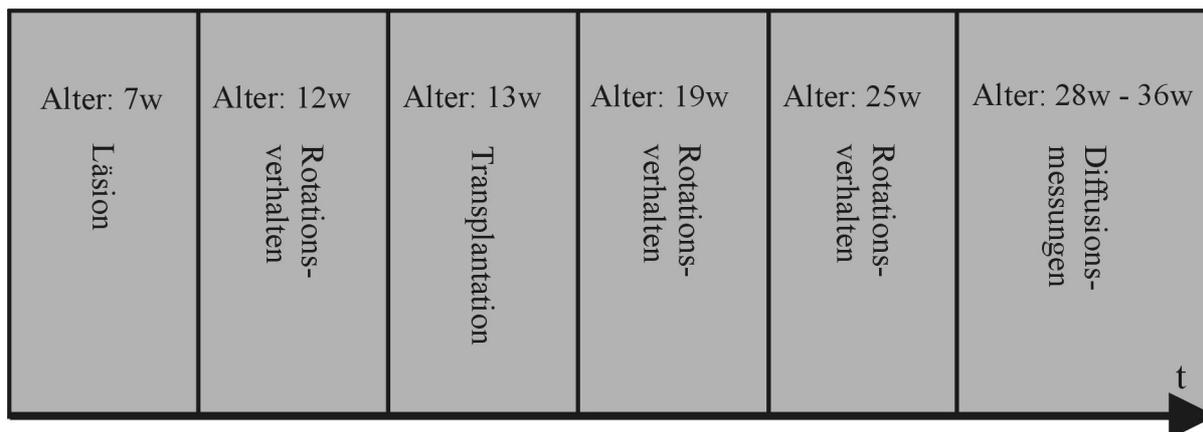


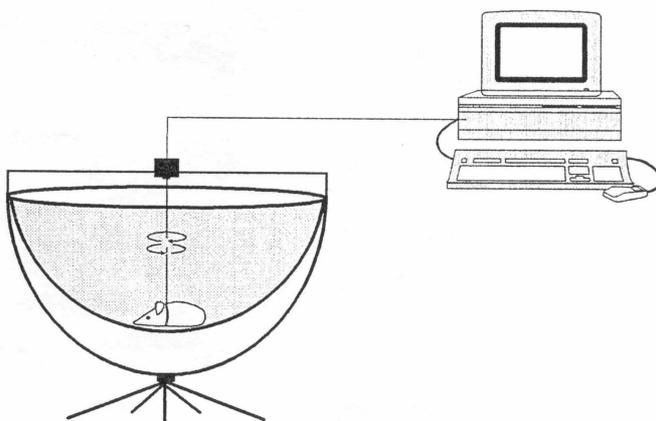
Abbildung 1: Zeitplan der Experimente

## Unilaterale 6-OHDA-Läsion

Im Alter von 7 Wochen erfolgte die Induktion des Hemiparkinsonismus. Hierzu wurden die Tiere 1 Stunde vor der Operation mit 25 mg / kg Desipramin und 50 mg / kg Pargylin vorbehandelt um die zielgerichtete Läsion sicherzustellen. Die Narkose erfolgte mit 35 mg / kg Pentobarbital i.p. Nach Überprüfung der Narkose wurden die Tiere in einen stereotaktischen Operationsrahmen eingespannt, dessen Inzisorstift adaptiert nach Paxinos und Watson gegenüber den Interauralstiften um 2,4 mm nach unten verschoben war [Paxinos, et al., 1986]. Es wurde ein 2 cm langer Hautschnitt mittels Scherenschlag in der Mitte des Kopfes gemacht und die Schädeldecke freipräpariert. Zur Nullpunkteinstellung wurde die Spitze der Injektionskanüle auf das Bregma eingestellt. Anschließend wurde die Kanüle 4,4 mm nach posterior und 1,1 mm nach lateral ausgerichtet. Mit Hilfe eines Dentalbohrers wurde ein ca. 1 mm großes Loch in die Schädeldecke gebohrt. Ausgehend von der Dura mater, dem Nullpunkt der ventralen Achse, wurde die Kanüle um 7,6 mm nach ventral in das MFB der linken Seite vorgeschoben und die Injektionslösung, bestehend aus 8 µg 6-OHDA-Hydrochlorid in 1 µl 0,9 % Natriumchlorid (NaCl) mit 0,1 % Ascorbinsäure, über 1 min verabreicht. Die Kanüle verblieb 5 min am Injektionsort um die Diffusion des Toxins in die Umgebung zu gewährleisten. Anschließend wurde die Wunde mit einer einreihigen Naht verschlossen und das Tier für die Aufwachphase auf eine Wärmeplatte (38 °C) gelegt.

## Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten

Zur Überprüfung bzw. Einschätzung der Läsion, als auch der durch das Transplantat bedingten funktionellen Genesung, wurde das Drehverhalten 5 Wochen nach Läsion und 6 sowie 12 Wochen nach der TP gemessen. Hierzu wurde den Ratten ein Gummiband über den Thorax gestreift und 2 mg / kg D-Amphetamin i.p. injiziert. Die Tiere wurden in ein halbkugelförmiges Plexiglas-Rotameter der Firma TSE (Bad Homburg, Deutschland) mit einem Durchmesser von 60 cm gesetzt und das Gummiband mittels einer Klemme über einen Draht mit dem Messwandler der digitalen Zählvorrichtung verbunden (s. Abb. 2). Das Rotationsverhalten wurde nach einer Vorlaufzeit von 15 min ab Injektion über einen Zeitraum von 60 min gemessen. Es wurde mit einem Drehfilter von 30° gearbeitet, das heisst jede Drehung über 30° sowohl ipsilaterale, bezogen auf die lädierte Seite, als auch kontralaterale, wurde gezählt. Dadurch konnten spontane alternierende Bewegungen von der Zählung ausgeschlossen werden. Die Anzahl der registrierten Bewegungen wurde für jede Seite mit 12 multipliziert, um die Anzahl der vollen 360° Umdrehungen in beide Richtungen zu erhalten. Aus diesen beiden Werten wurde anschließend die Nettoanzahl der Drehungen ermittelt. Tiere mit 5 Umdrehungen pro Minute oder mehr zur ipsilateralen Seite über einen Zeitraum von 30 min wurden als vollständig lädiert betrachtet und in der Studie belassen. Der Grad der Kompensation nach TP spiegelte sich in einer Reduktion bzw. Richtungsumkehr des Drehverhaltens wider.



**Abbildung 2:** Plexiglas-Rotameter der Firma TSE (Bad Homburg, D)

# Transplantation

## Herstellung der Zellsuspension für die Transplantation

Das Zellmaterial für die Herstellung des Transplantates wurde unter sterilen Bedingungen am 14. Gestationstag aus den Feten gewonnen. Hierzu wurden die trächtigen Muttertiere mit 400 mg / kg Chloralhydrat anästhesiert. Die Eröffnung des Abdomens erfolgte nach Überprüfung der Narkose sowie Rasur und Desinfektion der Bauchdecke mittels eines 4 – 6 cm langen Schnittes. Ein 1 cm langer Einschnitt an der gefäßarmen, großen Krümmung des Uterushornes diente zur Entnahme der Feten mitsamt der Fruchthüllen. Die Fruchthülle wurde mit einem Scherenschlag eingeschnitten, der Kopf des Embryos vom Rumpf getrennt und in eine Petrischale mit 4 °C kalter, steriler 0,9 %-NaCl-0,6 %-Glucose-Lösung gelegt.

Unter einem Mikroskop wurde das Schädeldach von kaudal nach rostral mit einer Mikroschere eröffnet und das Gehirn von der Basis abpräpariert. Das Stammhirn wurde von ventral durch einen Scherenschlag kaudal der Aufzweigung der Arteria basilaris abgetrennt um die mesencephale Flexur darzustellen und von den Hirnhäuten zu befreien. Aus der Flexur wurde ein dreieckiges Gewebestück entnommen, welches das zu transplantierende VM darstellte.

Die dissezierten ventralen Mesencephali wurden in Eppendorfgläsern, die eine 1 %ige Trypsin-Lösung mit 0,1 %-Desoxyribonuklease (DNase) enthielten, im 37 °C warmen Wasserbad 20 min lang inkubiert und anschließend viermal mit 0,1 %-DNase in steriler 0,9 %-NaCl-0,6 %-Glucose-Lösung gewaschen. Die Suspension der Gewebestücke erfolgte durch polierte Eppendorfpipetten mit abnehmendem Durchmesser. Zuerst wurden die ventralen Mesencephali 10 - 15-mal mit einer 1 mm Pipettenspitze titriert bis die Lösung milchig erschien. Dann wurde dieser Arbeitsvorgang mit einer 0,2 mm großen Pipette wiederholt. Anschließend wurde die Suspension bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 4 min zentrifugiert, der klare Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 7,5 µl 0,1 %-DNase pro VM in steriler 0,9 %-NaCl-0,6 %-Glucose-Lösung resuspendiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 4 °C abgedunkelt gelagert und innerhalb von 4 Stunden transplantiert.

Im Anschluß an die TP wurde zur Überprüfung der Viabilität der Zellen eine 0,01 %-Acridineorange und 0,01 %-Ethidiumbromid enthaltende Lösung hergestellt, die mit der Suspension im Verhältnis 1:5 vermischt wurde. Davon wurden 5 µl in eine Zählkammer

(Hämocytometer) gegeben und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit ultravioletterm Licht betrachtet. Durch Acridineorange grün angefärbte Zellen galten als vital, durch Ethidiumbromid rot gefärbte dagegen als abgestorben. Basierend auf der Auszählung wurde die Zelldichte der Suspension und die Viabilität als Anteil der vitalen Zellen in Prozent errechnet.

### **Ablauf der Transplantation**

Die Narkose der Tiere erfolgte mit 50 mg / kg Pentobarbital i.p. Die Tiere wurden in einem stereotaktischen Rahmen positioniert, dessen Inzisorstift auf -5,0 mm gegenüber der Interauralebene eingestellt war. In der Medianlinie des Kopfes wurde ein 1 - 2 cm langer Scherenschlag angelegt und das Schädeldach dargestellt. 10 % Wasserstoffperoxidlösung wurde verwendet, um einerseits Keimfreiheit und andererseits eine optimale Darstellung des Bregmas, als Nullpunkt für die Injektionskoordinaten zu erreichen. Die Injektionskanüle wurde auf das Bregma zentriert und sodann auf die jeweiligen Koordinaten (s. Tab. 2) eingestellt. Mit Hilfe eines Dentalbohrers wurde ein 1 mm großes Loch in die Schädeldecke gebohrt und die Dura mater als Nullpunkt für die ventrale Achse dargestellt. Um die Durchgängigkeit der Injektionskanüle zu gewährleisten wurde die Dura mater zuvor mit Hilfe einer scharfen Kanüle eingeritzt.

Für die Mikro-TP wurde eine Glaskapillare mit einem äußeren Durchmesser von ca. 0,08 mm verwendet, die auf die Kanüle einer 10- $\mu$ -Hamiltonspritze luftdicht aufgesetzt worden war. Es wurden vier Injektionskanäle angelegt mit jeweils zwei Depots à 0,5  $\mu$ l Volumen, das über eine halbe Minute hinweg intrazerebral injiziert wurde. Um der Suspension eine bessere Diffusion vom Injektionsort zu ermöglichen wurde eine Wartezeit von 3 min eingehalten.

Die Makro-TP wurde mit einer 10- $\mu$ l-Hamiltonspritze und einer 0,5 mm durchmessenden Stahlkanüle durchgeführt. Im Unterschied zur Mikro-TP wurde nur ein Injektionskanal mit zwei Depots à 2  $\mu$ l der Suspension angelegt, die über jeweils 2 min intrazerebral verabreicht wurden. Hierbei wurde die Kanüle vor dem Zurückziehen wegen des größeren Volumens 5 min vor Ort belassen. Scheintransplantierte Tiere erhielten jeweils nach demselben Protokoll die Injektionslösung (0,1 %-DNAse in 0,9 %-NaCl-0,6 %-Glucose-Lösung) ohne suspendierte Zellen.

Gruppe	Anterior- Posterior	Lateral	Ventral
Mikrotransplantation	0,0	2,2 / 3,2	5,0 / 4,0
	1,0	2,2 / 3,2	5,0 / 4,0
Makrotransplantation	1,0	2,6	5,5 / 4,4

**Tabelle 2:** Koordinaten für die TP in mm, adaptiert nach Paxinos und Watson [Paxinos, et al., 1986]

## Histologie

### Perfusion

Nach der Messung der extrazellulären Diffusionsparameter wurde die Narkose der Tiere zur Einleitung der Gewebefixierung auf 500 mg / kg Chloralhydrat erhöht. Mit einer Schere wurde den in Rückenlage fixierten Ratten ein länglicher Hautschnitt über den gesamten Thorax gesetzt. Sodann wurde der Thorax eröffnet, das rechte Herzohr eingeschnitten und über einen Einschnitt in der Herzspitze eine Knopfkanüle bis in den Pars ascendens der Aorta vorgeschoben. Zuerst wurden 80 ml einer Phosphat gepufferten NaCl-Lösung (0,1 M PBS: 0,042 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,008 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,15 M NaCl; pH 7,7) perfundiert, gefolgt von 200 ml eiskaltem, in PBS gelöstem 4 % Paraformaldehyd. Anschließend wurde der Kopf vom Rumpf des Tieres getrennt, das Gehirn mittels eines Rangeurs vom Foramen magnum her freipräpariert und mittels eines Spatels vorsichtig von der Schädelbasis abgelöst. Das Gehirn wurde in der Perfusionslösung nachfixiert und schließlich mittels 20 % Saccharose in PBS dehydriert und bis zur histologischen Weiterverarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### Immunohistochemie

Auf einem Gefriermikrotom wurden vom Gehirn 30 µm dicke, koronale Serienschnitte des Striatums und der SN angefertigt. Die Schnitte des Striatums wurden unter fünffacher Vergrößerung einzeln betrachtet. Hierbei wurde entschieden, ob ein Schnitt für die Darstellung der TH oder des GFAP verwendet werden würde, um eine ausgeglichene

Darstellung beider Aspekte des Transplantates zu erreichen. Jeder dritte oder vierte Schnitt wurde allerdings automatisch für die TH verwendet, um eine korrekte Auszählung der transplantierten Zellen zu gewährleisten. Ein weiterer Grund für diese manuelle Selektion war die Möglichkeit in den unbearbeiteten Schnitten mit Hilfe der Lichtbrechung Beginn und Ende des Elektrodentracks zu identifizieren, was die Einteilung der gemessenen Diffusionsparameter anhand der Lokalisation in Relation zum Transplantat ermöglichte (s. Abschnitt 4.5.3.2).

### *Anfärbung der Tyrosinhydroxylase*

Für die Anfärbung der Tyrosinhydroxylase wurden die Präparate zuerst dreimal in einem 0,05 M Tris Puffer (TB: 0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6) gewaschen und danach jeweils für 10 min in der Lösung geschwenkt. Um die Aktivität des Enzyms Peroxidase zu blocken wurden die Schnitte 15 min lang in eine 3 %-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-10 %-Methanol-Lösung gelegt, bevor sie wiederum dreimal gewaschen wurden und 1 Stunde mit einer Lösung aus 5 % Normalserum der Ziege und einer 0,3 %-Triton-TB-Mischung präinkubiert wurden.

Die erste Inkubation mit dem aus Kaninchen gewonnenen anti-bovinen TH-Antikörper (1:500, Calbiochem., Nottingham, UK) wurde in 2 % Ziegenserum mit TB bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Nach erneutem Spülen der Schnitte erfolgte die nächste Inkubation mit dem aus Ziegen gewonnenen, biotinierten Anti-Kaninchen-Immunglobulin G (1:200; Sigma, Deisenhofen, Germany) über 2 Stunden bevor die Schnitte wiederum gewaschen wurden. Die eigentliche farbgebende Reaktion erfolgte unter Sichtkontrolle mit 0,05 %-Diaminobenzidin in 0,05 M TB versetzt mit 0,03 %-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Abschließend wurden die Schnitte auf mit Gelatine überzogene Objektträger übertragen, in Alkohollösungen absteigender Konzentration dehydriert und eingedeckt.

### *Anfärbung des Glial Fibrillary Acidic Protein*

Für dieses Färbeprotokoll wurden die Schnitte zu Beginn dreimal in 0,1 M PBS gewaschen und für jeweils 10 min in der Lösung geschwenkt. Die Peroxidaseblockung erfolgte für 15 min in einer 0,06 %-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS-Lösung bevor die Schnitte viermal gewaschen wurden und für 1 Stunde in einer Mischung aus 5 % Normalserum vom Pferd und 0,2 % Triton in PBS

präinkubiert wurden. Anschließend wurde die erste Inkubation in 1:50-facher Verdünnung mit dem aus Mäusen gewonnenen anti-GFAP Antikörper (1:50, Boehringer-Mannheim, Germany), versetzt mit 0,1 % Albumin und 0,02 % Triton in PBS, bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

Nach dreimaligem Spülen mit PBS erfolgte die zweite Inkubation über 2 Stunden mit einem aus Pferden gewonnenen, biotinisierendem Anti-Maus-Immunglobulin G in 1:200-facher Verdünnung mit 0,02 % Triton in PBS. Sodann durchliefen die Schnitte nach erneutem Waschen eine letzte Inkubation mit einer *Vectorstain*-ABC-Lösung (Peroxidase behafteter Avidin-Biotin-Komplex, Vectastain Elite, *Vector Laboratories*, Burlingame, USA) in 1:100-facher Verdünnung mit 0,02 % Triton in PBS.

Nach einem abschließendem Waschvorgang wurden die Schnitte mit 0,05 %-3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (Sigma) in 0,05 M TB (pH 7,6) und 0,02 %-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 2 - 4 min angefärbt, auf mit Gelatine bedeckte Objektträger übertragen, dehydriert und eingedeckt.

## Histologische Analyse der Transplantate

In der SNPc wurde anhand von TH gefärbten Schnitten nach evtl. überlebenden Zellen gesucht, um die Qualität der Läsion auch anatomisch zu bestätigen. Im Striatum wurde das Transplantat anhand der TH- Schnitte qualitativ in seinen Dimensionen und dem Grad des Nervenfasernwachstums erfasst und quantitativ durch Zellzählung in jedem dritten bzw. vierten Schnitt, um die Gesamtzahl der überlebenden Zellen im Transplantat nach Abercrombie zu berechnen [Abercrombie, 1946].

### Gleichung 1

$$\text{Zellanzahl} = \frac{1}{2} \left\{ \left( \frac{\text{Zelldurchmesser}}{\text{Schnittdicke}} \cdot \text{Anzahl} \right) + \text{Anzahl} \right\} \cdot \frac{\text{Schnitte}_{\text{gesamt}}}{\text{Schnitte}_{\text{ausgewertet}}}$$

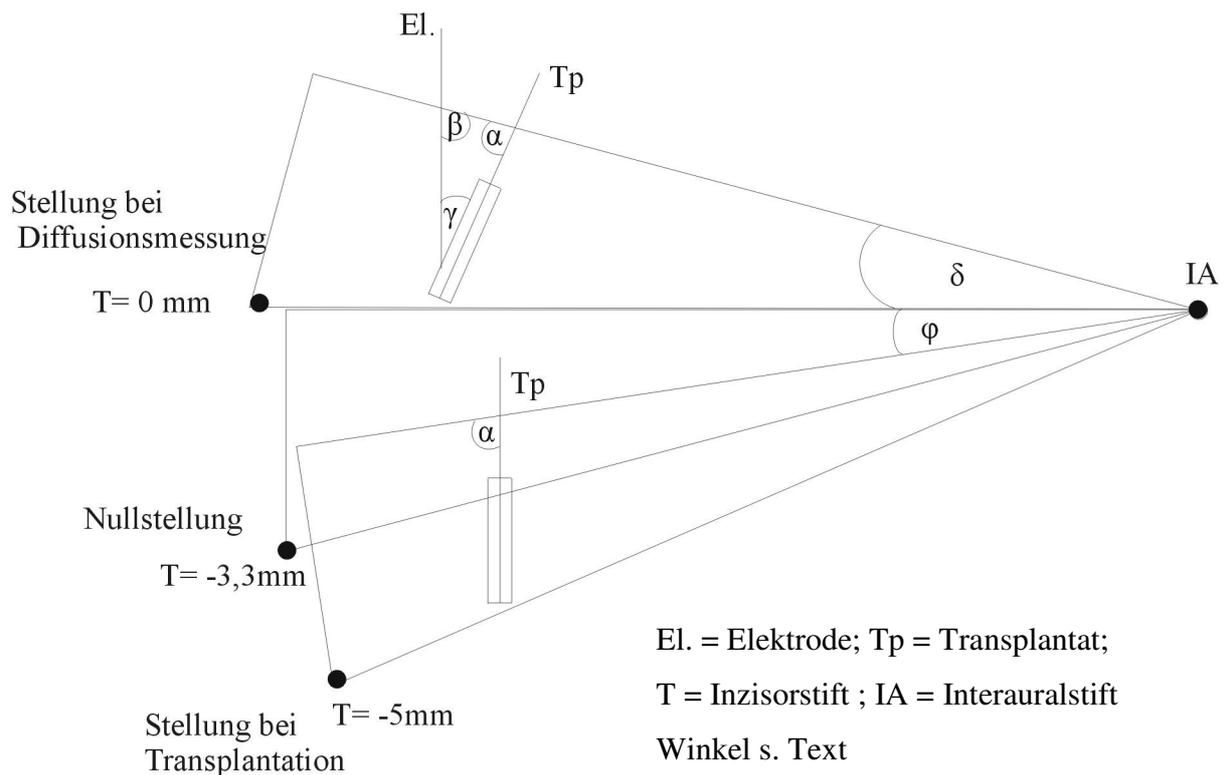
Die mit GFAP angefärbten Schnitte wurden zur Beurteilung der Astrogliose in und um das Transplantat herangezogen. Des Weiteren wurde mit ihrer Hilfe der Elektrodenkanal rekonstruiert, um die gemessenen Diffusionswerte in Relation zum Transplantat zu lokalisieren.

## Rekonstruktion des Elektrodentracks

Die Absenkung des Kopfes bei der Transplantation ( $T = -5,0 \text{ mm}$ ) aus der Nullstellung ( $T = -3,3 \text{ mm}$ ) um den Winkel  $\varphi = 3,2^\circ$  führt zu einem Winkel  $\alpha = 86,8^\circ$  zwischen Transplantat und Hirnoberfläche. Die Kopfstellung während den Experimenten ( $T = 0 \text{ mm}$ ,  $\delta = 6,3^\circ$ ) führt zu einem Winkel  $\beta = 83,7^\circ$  zwischen Elektrode und Hirnoberfläche, woraus folgt, dass der Winkel zwischen Elektrode und Transplantat  $\gamma = 9,5^\circ$  beträgt.

Durch Identifikation des Gewebeschnittes mit Beginn des Elektrodentracks konnte, bei bekannter Dicke der Gewebeschnitte, anhand der GFAP-Färbung die Position der Elektrode in Bezug zum Transplantat ermittelt werden [Paxinos, et al., 1986; Reum, et al., 2002].

**Abbildung 3:** Winkel zwischen Transplantat und der Messelektrode für TMA<sup>+</sup>



## Tetramethylammonium-Methode

Diese Methode benutzt ionensensitive Mikroelektroden (ISM) zur Bestimmung der Diffusionsbedingungen des Ions  $\text{TMA}^+$  innerhalb des EZR. Dabei wird eine iontophoretische Elektrode mit einer Mess- und Referenzelektrode verbunden und die Konzentrationsbedingungen Änderungen der Potentiale über die Zeit erfasst. Aus den experimentellen Daten werden mittels des Computerprogramms Voltoro unter Verwendung eines Simplex Algorithmus die Parameter zur Beschreibung der Geometrie des EZR ermittelt.

### Prinzip Ionensensitiver Elektroden

ISM messen ein Potential zwischen einer Lösung mit bekannter Konzentration des zu messenden Ions und der Meßlösung, im vorliegenden Fall die extrazelluläre Flüssigkeit. Dieses Potential baut sich über eine Membran auf, die im vorliegenden Fall aus einem Ionenaustauscher (Corning 477317) in der Spitze der Meßelektrode besteht. Die Referenzelektrode dient dazu, den Einfluss der Ionen im EZR auf das Potential über einen entsprechenden Schaltkreis herauszufiltern. Eine ideale Elektrode ist nur für das zu messende Ion selektiv. Das Verhalten dieser Elektrode wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben:

#### Gleichung 2

$$E = E_0 + s \log a_i$$

$E_0$  : Referenzpotential;  $s$  : Nernstsche Slope;  $a_i$  : Aktivität Ion i

Der Nernstsche Slope berechnet sich aus:

$$s = 2,303 \frac{RT}{z_i F} = 59,16 / z_i \text{ (mV), } 25^\circ\text{C}$$

wobei R die universelle Gaskonstante ist ( $R = 8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), T die Temperatur, z die Wertigkeit des Ions und F die Faraday Konstante ( $F = 9,6487 \times 10^4 \text{ C/mol}$ ).

Da eine Elektrode sich aber nie ideal verhält, v.a. nicht bei niedrigen Konzentrationen, wurde die Nikolsky-Eisenmann-Gleichung zur Beschreibung des Verhaltens einer ISM eingeführt:

**Gleichung 3**

$$E = E_0 + s \log \left( a_i + \sum_j K_{ij}^{Pot} (a_j)^{z_i/z_j} \right)$$

wobei K der Selektivitätsfaktor ist,  $a_i$  die Aktivität des zu messenden Ions i,  $a_j$  die Aktivität des interferierenden Ions j,  $z_i$  bzw.  $z_j$  die Wertigkeit des jeweiligen Ions [Ammann, 1986].

In der Praxis kann man die Aktivität durch die Konzentration ersetzen, da Aktivitäten schwierig zu bestimmen sind und die ISM nach Konzentration kalibriert wird. Im vorliegenden Fall ist der Selektivitätsfaktor, bedingt durch den Ionenaustauscher, vor allem durch  $K^+$  geprägt und somit keine Summe sondern eine Zahl, die z.B. durch die *Fixed Interference Method* bestimmt werden kann [Ammann, 1986; Nicholson, 1993]. Aufgrund dieser Überlegung kann Gleichung 2 dargestellt werden als:

**Gleichung 4**

$$\Delta E = s \log \left[ \frac{(c_1 + K)}{(c_0 + K)} \right]$$

wobei  $c_0$  bzw.  $c_1$  Konzentrationen von  $TMA^+$  zu verschiedenen Zeitpunkten sind.

**Theoretisches Prinzip der Diffusion im extrazellulären Raum**

Das physikalische Prinzip der Diffusion beruht im mikroskopischen Bereich auf der Tatsache, dass Moleküle in einer Lösung mit Wassermolekülen kollidieren und sogenannte *Random walks* ausführen, die nach einer unendlichen Zeitspanne zu einer homogenen Verteilung innerhalb der Lösung führen würden. Betrachtet man eine freie Lösung ohne zelluläre Obstruktionen, so wird die Konzentrationsänderung eines zugefügten Stoffes zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort dieser Lösung adäquat durch das 2. Ficksche Gesetz beschrieben:

**Gleichung 5**

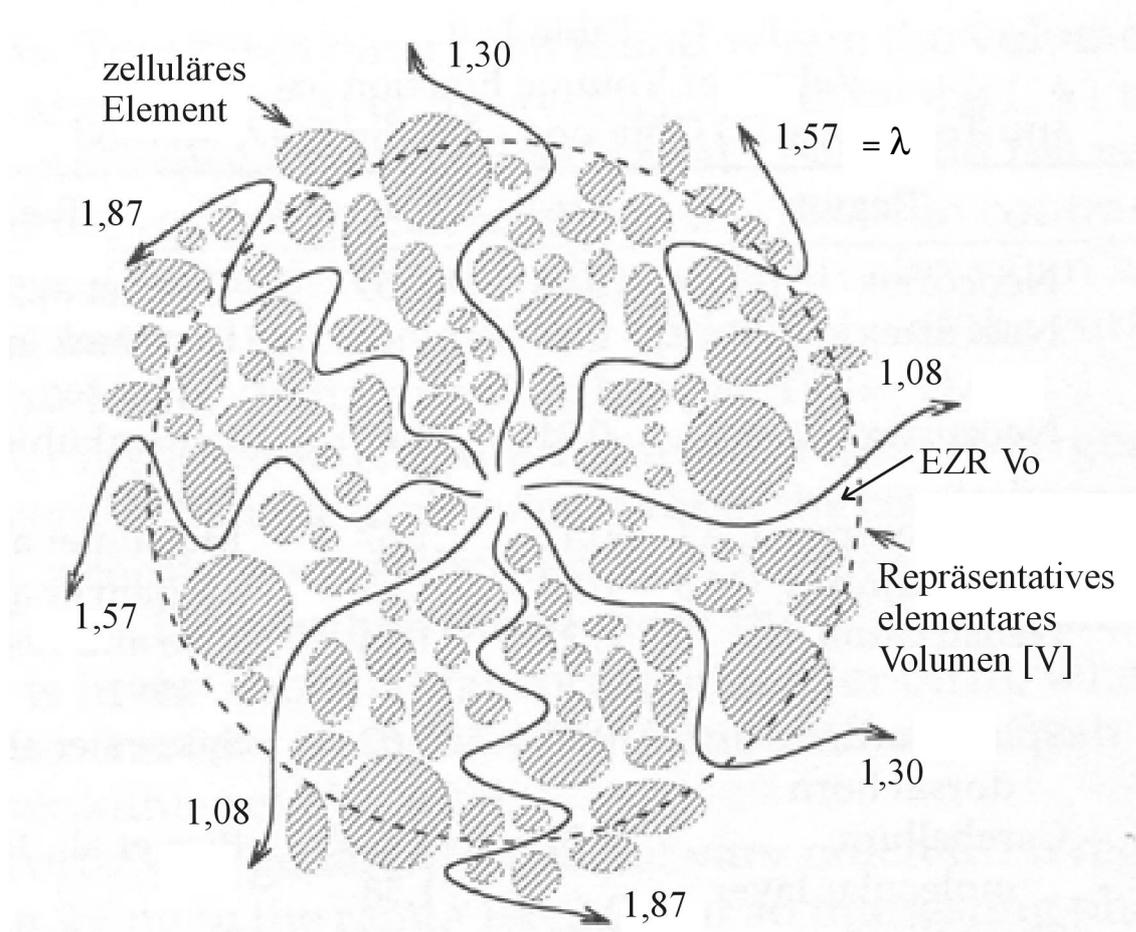
$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)$$

wobei x die räumliche Variable ist, t die Zeit und C die Konzentration.

Betrachtet man die Diffusion ausgehend von einem Punkt Q in einem komplexen Medium, wie z.B. dem EZR, ergeben sich einige Modifikationen dieser Gleichung [Nicholson, et al., 2000].

### Volume Averaging

In einem Interzellulärspalt, als mikroskopische Dimension, kann man unter Vernachlässigung der extrazellulären Matrix annehmen, dass Moleküle zwar frei diffundieren können, aber aufgrund der Unterschiede in den Begrenzungen der einzelnen Interzellulärspalten, wären die gemessenen Konzentrationen nicht repräsentativ, weil sie aufgrund der Abhängigkeit vom Raum stark variieren würden. Um dieses Problem in porösen Medien rechnerisch auszugleichen wird das sogenannte *Volume Averaging* angewendet [Whitaker, 1969]. Dabei betrachtet man ein repräsentatives, elementares Volumen (REV, s. Abb. 4) dessen Dimension groß genug sein muss, um eine statistisch sinnvolle Mittelung der die Diffusion beschreibenden Variablen zu ermöglichen [Nicholson, et al., 1981].



**Abbildung 4:** Darstellung des repräsentativen elementaren Volumens  $V$ , des extrazellulären Raums  $V_0$ , des Parameters  $\alpha$  ( $\alpha = V_0/V$ ) und dem Parameter  $\lambda$ . Nach Rice et al., 1995 [Rice, et al., 1995].

### *Geometrie des extrazellulären Raumes*

Die Gewebestruktur des Gehirns wird in der Beschreibung der Diffusion durch zwei dimensionslose Parameter berücksichtigt: die Volumenfraktion  $\alpha$  und die Tortuosität  $\lambda$ .

Die Volumenfraktion  $\alpha$  ist definiert als der Anteil des EZR am gesamten Volumen des Gewebes bezogen auf das REV (s. Abb. 4).

#### **Gleichung 6**

$$\alpha = \frac{V_0}{V} ; 0 \leq \alpha \leq 1$$

Die Tortuosität  $\lambda$  steht für das Ausmaß der Obstruktion, die im EZR diffundierende Substanzen überwinden müssen. Einfach ausgedrückt ist sie das Verhältnis von dem Weg um eine Sphäre (Radius =  $r$ ) herum ( $\pi r$ ), zu dem Weg mitten hindurch ( $2r$ ), also beispielhaft ca. 1,57 (s. Abb. 4). Ein Medium ohne Obstruktion hätte eine Tortuosität von  $\lambda = 1$ . Die Tortuosität beeinflusst vor allem den Diffusionskoeffizienten  $D$ . Man drückt dies durch einen *apparent diffusioncoefficient*  $D^*$  aus:

#### **Gleichung 7**

$$D^* = \frac{D}{\lambda^2} \Rightarrow \lambda = \sqrt{\frac{D}{D^*}}$$

### *Uptake*

Der Begriff *Uptake*, bezogen auf die Diffusion von  $\text{TMA}^+$ , beschreibt die Tatsache, dass ein gewisser Anteil des Ions den EZR verlässt. Da  $\text{TMA}^+$  keinen spezifischen Transportmechanismen unterliegt und bei den verwendeten Konzentrationen im EZR verbleibt, kann man annehmen, dass der Mechanismus v.a. mit dem Verlust über Membranen, wie z.B. der Blut-Hirn-Schranke, identisch ist [Nicholson, 1992]. Damit hängt der unspezifische *Uptake*  $k'$  von  $\text{TMA}^+$  linear von der Konzentration und der Volumenfraktion  $\alpha$  ab.

#### **Gleichung 8**

$$f(C) = \alpha k' C$$

Eine weitere Möglichkeit des Verlusts von  $\text{TMA}^+$  ist der sogenannte *Bulk Flow* ausgedrückt als Skalarprodukt:

**Gleichung 9**

$$BF = v \nabla C$$

Hierunter versteht man den Fluss der interzellulären Flüssigkeit von den Kapillaren in die cerebrospinale Flüssigkeit bzw. zu den Lymphgefäßen. Diese Theorie entstand durch Studien mit Radiotraceren, in denen z.B. die Bewegungen von Dextran entlang des Corpus callosum beobachtet wurden [Bjelke, et al., 1995]. Aufgrund der geringen Geschwindigkeit dieses Flusses scheint er bei kurzen Distanzen keine Rolle zu spielen [Nicholson, et al., 1998]. Letztlich ist diese Frage aber nicht geklärt.

Unter Berücksichtigung der oben erklärten Modifikationen erhält man basierend auf dem 2. Fickschen Gesetz die Formel zur makroskopischen Beschreibung der Diffusion im Gehirn ausgehend von einer iontophoretischen Quelle Q [Nicholson, et al., 1998; Nicholson, et al., 2000]:

**Gleichung 10**

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D^* \nabla^2 C + \frac{Q}{\alpha} - v \nabla C - \frac{f(C)}{\alpha}$$

wobei gilt: •  $D^* = \frac{D}{\lambda^2}$  ;  $Q = \frac{In}{F}$  ;  $f(C) = \alpha k' C$  ;

- $v$  = Vektor für Bulk Flow ;  $\nabla$  = Gradient Operator,  $\nabla^2 = 2.$  Ableitung
- $n$  = Transportnummer der Elektrode;  $F$  = Faradaykonstante
- $I$  = applizierter Strom

Unter Vernachlässigung des *Bulk Flows* und der Annahme eines linearen *Uptakes* kann Gleichung 10 für einen iontophoretischen Puls der Dauer  $d$  in einer symmetrischen Sphäre ( $r$ ,  $\theta$ ,  $\phi$ ) analytisch nach  $C$  aufgelöst und die Parameter  $\alpha$ ,  $\lambda$  und  $k'$  können bestimmt werden [Nicholson, et al., 1998; Nicholson, et al., 2000]:

**Gleichung 11**

$$C = \frac{Q\lambda^2}{8\pi D\alpha r} \left\{ e^{r\theta} \left[ g_1(r, t) - H(t-d)g_1(r, t, -d) \right] + e^{-r\theta} \left[ g_2(r, t) - H(t-d)g_2(r, t, -d) \right] \right\}$$

- wobei gilt:
- $\theta = \lambda \sqrt{\left(\frac{k'}{\alpha D}\right)}$
  - $g_1(r, t) = \operatorname{erfc}\left(\frac{r\lambda}{2\sqrt{Dt}} + \frac{\theta}{\lambda}\sqrt{Dt}\right)$
  - $g_2(r, t) = \operatorname{erfc}\left(\frac{r\lambda}{2\sqrt{Dt}} - \frac{\theta}{\lambda}\sqrt{Dt}\right)$
  - $H(t-d) = 1, t-d \geq 0; H(t-d) = 0, t-d \leq 0$ ; Heaviside step function

**Herstellung der Elektroden**

Für die extrazelluläre Messung von  $\text{TMA}^+$  wurden ISM verwendet, die aus ineinander verdrehten Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 2,0 mm bestanden (s. Abb. 5) [Nicholson, 1993]. Zwei Kapillaren unterschiedlicher Länge, zwischen 6 und 10 cm, wurden über einem Bunsenbrenner erhitzt, um  $360^\circ$  ineinander gedreht und ca. 3 mm auseinander gezogen. Durch Auseinanderziehen in einem vertikalen Elektrodenpuller entstanden zwei ISM mit jeweils einer ionenselektiven - und einer Referenzkammer sowie einer Spitzenlänge von 5 - 6 mm.

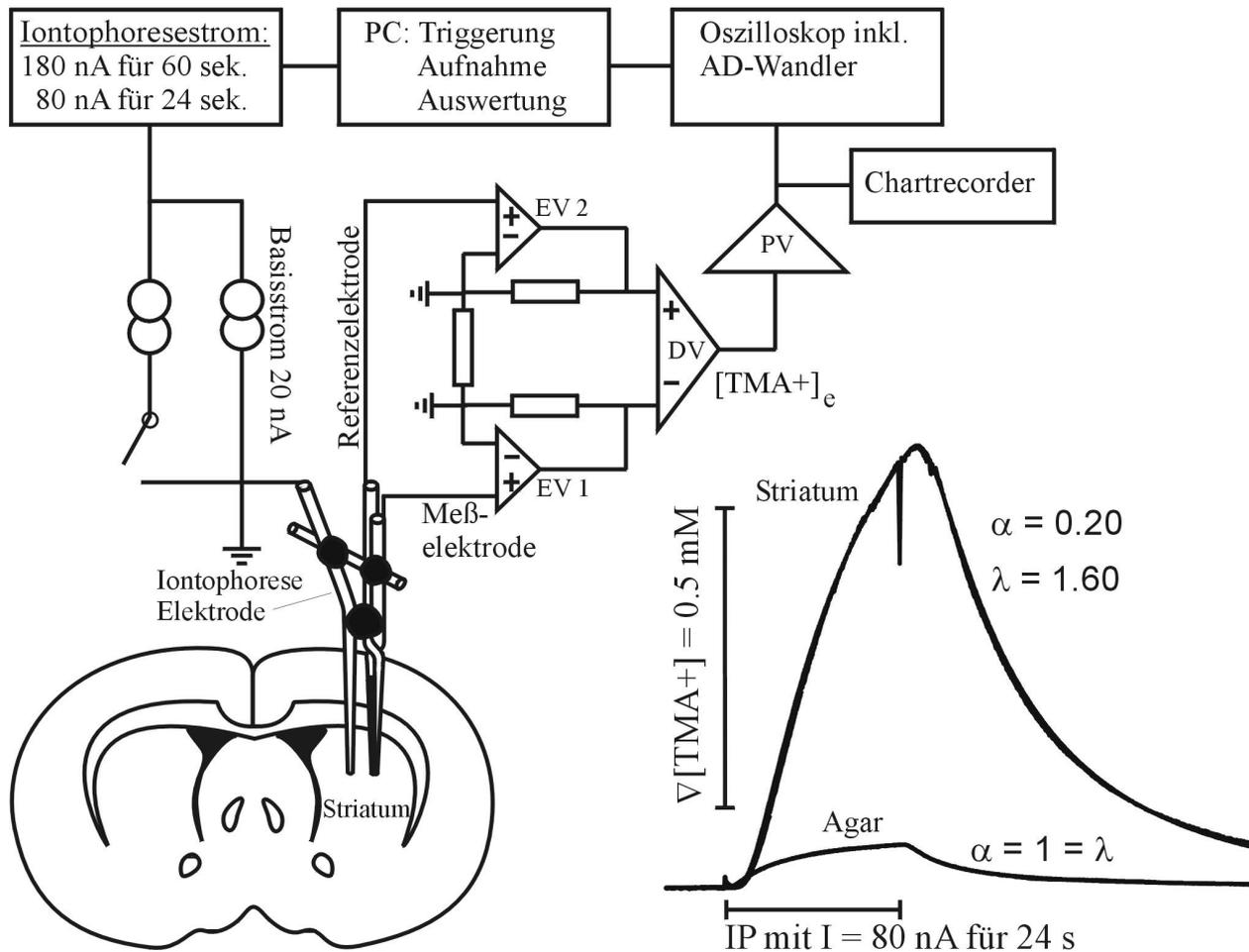
Um zu verhindern, dass der Ionenaustauscher später ausläuft wurde das Innere der ionenselektiven Spitze mit einer reaktiven Silikonverbindung lipophilisiert. Hierzu wurde die Spitze der Elektrode, nach Füllung der Referenzseite mit Aqua dest., in eine Lösung aus Tributylchlorosilan und 1-Chlor-naphtaline (1:22) getaucht und eine Flüssigkeitssäule von  $300\ \mu\text{m}$ - $500\ \mu\text{m}$  eingesogen. Anschließend wurden die Elektroden für eine Stunde bei  $200^\circ\text{C}$  in den Ofen gestellt und die Spitzen unter dem Mikroskop gebrochen um einen Durchmesser von ca.  $4\ \mu\text{m}$  zu erreichen. Die Füllung der Kammern erfolgte mit einer handelsüblichen 5 ml Spritze auf die ein Filter mit einer Porengröße von  $0,22\ \mu\text{m}$  aufgesteckt war, um Bakterien zu vermeiden. Nach Füllung der Referenzkammer mit 150 mM NaCl, wurde die Elektrodenspitze in den Ionenaustauscher (Corning 477317, 1 %-potassium-tetrakis-4-chlorophenylborate in 3-nitro-o-xylene) getaucht und eine Flüssigkeitssäule von ca.  $200\ \mu\text{m}$  -

500  $\mu\text{m}$  in die ionenselektive Seite eingesogen, bevor die Kammer mit 100 mM  $\text{TMA}^+$  aufgefüllt und eventuelle Luftblasen entfernt wurden.

Die Elektrode für die Iontophorese wurde aus Theta-Glas angefertigt, die Spitze um ca.  $30^\circ$  -  $45^\circ$  gebogen, analog zur Messelektrode gebrochen und die Kammer mit 100 mM  $\text{TMA}^+$  gefüllt. Nun wurden beide Elektroden in einer Halterung angeordnet und die Spitzen in einem Abstand von ca. 120  $\mu\text{m}$  parallel ausgerichtet. Mit Hilfe von kurzen Glasstückchen und Dentalzement (Duracryl) wurden die Elektroden zusammengeklebt. Im letzten Arbeitsschritt wurden mit Chlorid überzogene Silberdrähte in die Kammern eingeführt und mit Wachs verschlossen.

### **Kalibrierung der Elektroden**

Vor und nach jedem Experiment wurde die Elektrode kalibriert um die *electrode array transport number*  $n$  und den Diffusionskoeffizient  $D$  für  $\text{TMA}^+$  im freien Medium,  $\alpha = \lambda = 1$ , zu bestimmen. Dies geschah in 0,3 % Agar versetzt mit 150 mM NaCl, 3 mM KCl und 1 mM  $\text{TMA}^+$  um den Einfluss interferierender Ionen der extrazellulären Flüssigkeit so gering als möglich zu halten (s. Abb. 5).



**Abbildung 5:** Experimenteller Aufbau mit Darstellung der Kalibrierungskurve im Vergleich zum Striatum eines unbehandelten Kontrolltieres. EV: Eingangsverstärker; DV: Differentialverstärker; PV: Potentialverstärker.

### Experimenteller Ablauf der TMA<sup>+</sup>-Messungen

Die Ratte wurde mit 400 mg / kg Chloralhydrat anästhesiert und in einen stereotaktischen Rahmen fixiert dessen Inzisorstift auf einer Höhe mit den Interauralstiften war. Diese im Vergleich zur TP höhere Position führte zu einem dazu, dass die Elektrode auf das Transplantat in einem Winkel von 9,5° traf, zum anderen wurde die zu treffende Fläche des bei geneigter Kopfhaltung eingesetzten Transplantates vergrößert. Nach Entfernung der Schädelhaut und des Periosts wurde unter einem Mikroskop nach den alten Operationsnarben gesucht, um 1 mm anterior zu diesen das ca. 4 mm große Bohrloch anzulegen. Um zu überprüfen ob es sich um die richtigen Schädelimpressionen handelte wurden ausgehend vom Bregma die Transplantationskoordinaten eingestellt. Die Dura wurde mittels einer scharfen Kanüle entfernt und das offengelegte Gehirn mit 37 °C warmer Kalibrierungslösung bedeckt.

Zur Durchführung der Messungen wurde das Tier in einem Faraday-Käfig auf eine 37 °C warme Heizplatte gelegt, die Elektrode in den Nanostepper (SPI, Oppenheim, Deutschland) eingespannt und in die Kalibrierungslösung eingetaucht. Nach Abwarten einer stabilen *Baseline* bei einem Basisstrom von +20 nA, der eine konstante Konzentration von TMA<sup>+</sup> in der Elektrodenspitze und somit eine stabile *electrode array transport number*  $n$  gewährleistet, wurde die Elektrode in 200 µm Schritten in das Gehirn abgesenkt. Ab ca. 3 mm Tiefe galten die gemessenen Werte als striatal und wurden statistisch weiterverarbeitet. Werte aus dem Kortex und Corpus callosum wurden mit Kontrollwerten aus früheren Studien verglichen, um Position und Qualität der Elektrode abzuschätzen.

Die Diffusionsmessungen erfolgten entweder für 24 s bei einem Iontophoresestrom von +180 nA oder für 60 s bei +80 nA. Sowohl die Referenzpotentiale als auch die TMA<sup>+</sup>-Potentiale wurden durch einen Eingangsverstärker mit hohem Eingangswiderstand an einen Differentialverstärker weitergeleitet, um das Referenzpotential vom TMA<sup>+</sup>-Potential zu subtrahieren (s. Abb. 5). Aus den gemessenen Konzentrationskurven über die Zeit wurden die Parameter  $\alpha$ ,  $\lambda$ , der *apparent diffusioncoefficient*  $D^*$  von TMA<sup>+</sup> im Gewebe und der unspezifische *Uptake*  $k'$  bestimmt.

Dies geschah mit Hilfe des Computerprogramms VOLTORO (Nicholson, nicht veröffentlicht) das zur Analyse der Konzentrationskurven einen nicht-linearen Simplex Algorithmus [Caceci, et al., 1984] aufbauend auf Gleichung 11 verwendet [Rice, et al., 1995].

## Statistische Analyse

Die Analyse des Amphetamin-induzierten Rotationsverhaltens erfolgte für alle Tiere zu den im Kapitel Studiendesign erwähnten Zeitpunkten. Die transplantierten und scheintransplantierten Tiere wurden vor und nach der Operation durch wiederholte Einweg-Varianzanalysen und den *post hoc* Tukey-Test sowohl untereinander verglichen als auch den lädierten Tieren gegenübergestellt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Die Diffusionsparameter  $\alpha$ ,  $\lambda$ , und  $k'$  wurden für jedes einzelne Tier gemittelt. Die Werte der transplantierten und scheintransplantierten Tiere wurden anhand der Trackrekonstruktion in *innerhalb des Transplantates* und *außerhalb des Transplantates* eingeteilt und entsprechend gemittelt. Die erhaltenen Mittelwerte für ein Tier bzw. für ein Gebiet wurden den entsprechenden Gruppen zugeteilt und untereinander mittels einer Einwegvarianzanalyse bzw.

gegenüber Kontrolltieren mittels *post-hoc multiple comparison* (Dunnett's Test) verglichen, wobei wiederum  $P < 0,05$  als signifikant galt.

Aufgrund einer letztendlich geringen Tieranzahl in den beiden transplantierten Gruppen und dem offensichtlich fehlenden Unterschied bei den ermittelten Parametern erfolgte in der endgültigen Auswertung eine Zusammenführung der transplantierten Tiere in eine Gruppe.

## Ergebnisse

### Rotationsverhalten

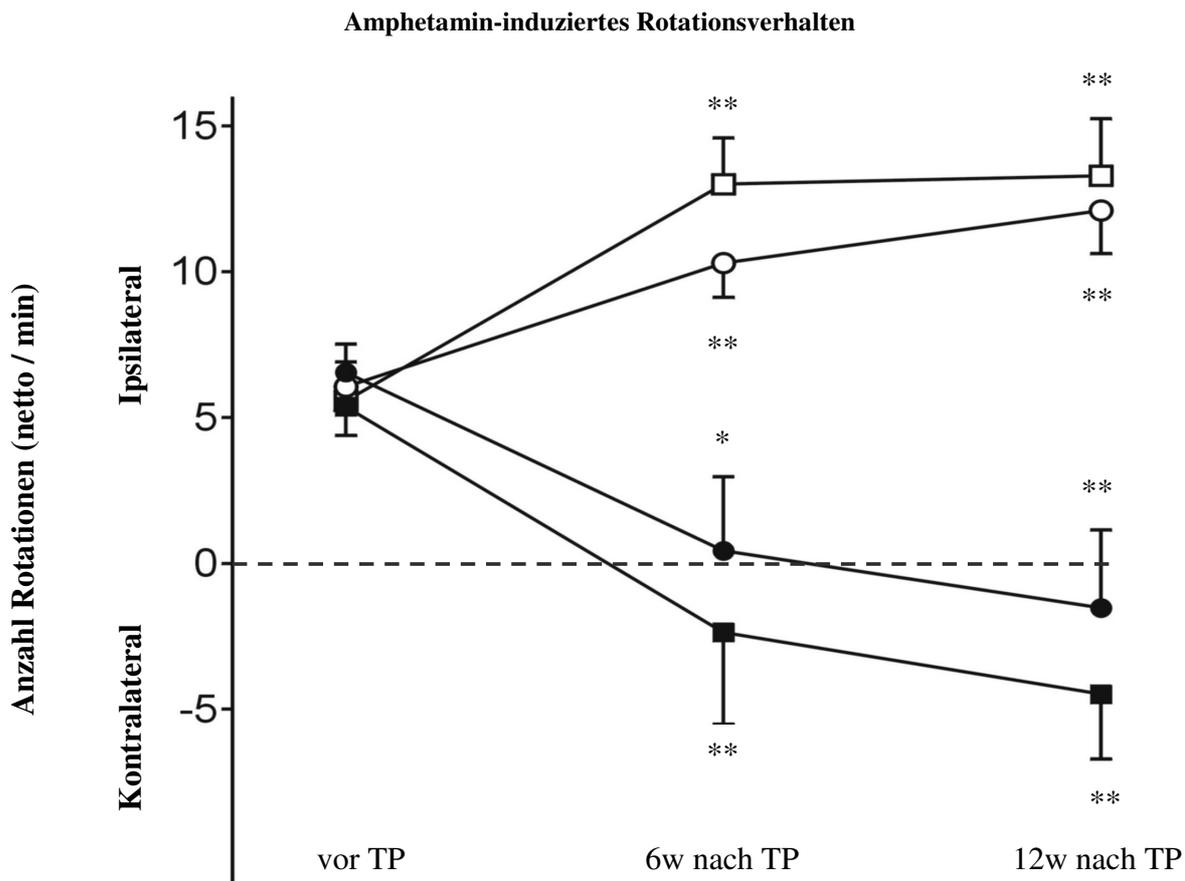
Die Gabe von Amphetamin führt bei lädierten Ratten zu einem ipsilateralen Rotationsverhalten bezogen auf die Seite des dopaminergen Defizits. Diese Rotationen werden als positiv registriert, während kontralaterale Rotationen dementsprechend als negative Werte registriert werden.

Fünf Wochen nach Läsion wurden bei allen Tieren ( $n = 46$ ) über 5 ipsilaterale Rotationen pro Minute gezählt. Nach TP reduzierte sich diese Zahl deutlich und bis 12 Wochen danach konnte bei beiden transplantierten Gruppen kontralaterale Rotationen beobachtet werden (s. Abb. 6 bzw. Tab. 3). Die scheintransplantierten Tiere zeigten 12 Wochen nach TP in beiden Gruppen eine stetig steigende Anzahl der ipsilateralen Rotationen.

Die Werte sämtlicher Gruppen wurden miteinander verglichen, weiterhin wurden Verlaufskontrollen innerhalb der Gruppen durchgeführt. Zwischen makro- bzw. mikrotransplantierten Tieren und zwischen den entsprechenden scheintransplantierten Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Allerdings fanden sich signifikante Unterschiede zwischen transplantierten und den entsprechend scheintransplantierten Tieren an beiden Zeitpunkten nach der TP.

Gruppe	Fallzahl n	vor TP	6w nach TP	12w nach TP
Makro-TP	13	$6,5 \pm 0,9$	$0,4 \pm 2,4$	$- 1,5 \pm 2,5$
Makro-STP	12	$6,0 \pm 0,7$	$10,3 \pm 1,1$	$12,1 \pm 1,4$
Mikro-TP	10	$5,4 \pm 0,9$	$- 2,4 \pm 2,9$	$- 4,5 \pm 2,1$
Mikro-STP	11	$5,6 \pm 1,3$	$13,0 \pm 1,5$	$13,3 \pm 1,8$

**Tabelle 3:** Anzahl der Rotationen pro Minute als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Ipsilaterale Drehung als positiv, kontralaterale Drehung als negativ registriert.

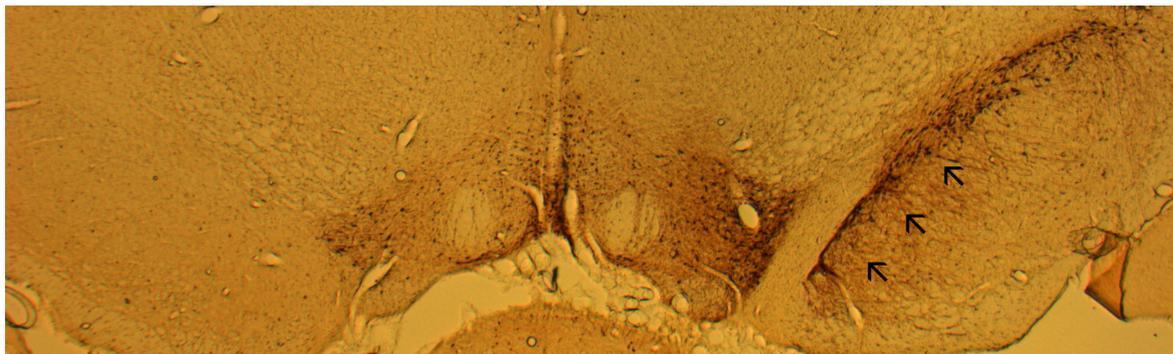


**Abbildung 6:** Anzahl der Rotationen nach Gabe von Amphetamin. Werte s. Tabelle 3.  
 ■ = Mikro-TP, □ = Mikro-STP, ● = Makro-TP, ○ = Makro-STP.  
 \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, Varianzanalyse mit wiederholtem Messungen und *post hoc-Tukey-Test*.

## Immunohistochemische Analyse

### Läsion

In allen Tieren, die für diese Studie verwendet worden waren, wurde eine nahezu komplette Degeneration der SNPc auf der Seite der Läsion beobachtet (s. Abb. 7). In einigen Tieren wurden vereinzelt noch TH-positive Zellen entdeckt, aber in einem Ausmaß, dass Sie funktionell nicht relevant erscheinen ließ [Hefti, et al., 1980]. Im entsprechenden Striatum dieser Tiere wurde, auch bei wenigen noch vorhandenen TH-positiven Zellen in der SNPc, eine deutlich verminderte Anfärbung der TH festgestellt.



**Abbildung 7:** Läsion der SNPc in der linken Hemisphäre. Pfeile weisen auf intakte Seite. 25-fache Vergrößerung

### **Makro-Transplantation und -Scheintransplantation**

In makrotransplantierten Tieren stellte sich das Transplantat histologisch als 2,0 - 2,5 mm lang und 0,2 – 0,4 mm breit dar. Die TH-positiven Zellen ordneten sich v.a. am Übergang vom Transplantat zum Gewebe des Empfängers an (s. Abb. 9A) und neigten zur Bildung von kleinen Zellhaufen (s. Abb. 9C). Die Axone der Zellen wuchsen sowohl ins Innere des Transplantates als auch in die Umgebung ein. Im Schnitt wurden die Axone ca. 250  $\mu$ m, vereinzelt aber auch bis zu 1 mm lang. Die mittlere Anzahl der überlebenden Zellen betrug nach Makro-TP 556 (Min = 140, Max = 991). Die TH-Färbung stellte sich bei den scheintransplantierten Tieren ähnlich der nach Läsion dar.

Die Anfärbung von GFAP zeigte eine vermehrte Gliose in der näheren Umgebung des Transplantates (s. Abb. 8A). Die Astrozyten bildeten eine Art Rahmen um das Transplantat mit einer Breite von ca. 150 – 300  $\mu$ m. Typischerweise konnte man einen 25 – 50  $\mu$ m breiten, im Vergleich zur Umgebung verstärkt angefärbten Bereich sehen, der dem Transplantat direkt angelagert war und in der Nähe von TH-positiven Zellhaufen am ausgeprägtesten war.

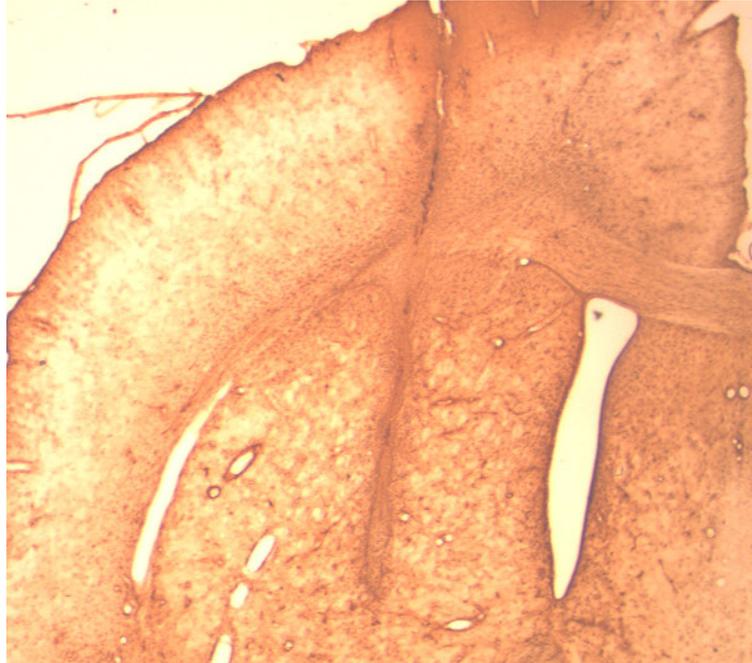
Nach Scheintransplantation stellte sich ein ähnliches Bild dar, wobei allerdings die gliotische Reaktion einen weniger scharf begrenzten Rahmen aus Astrozyten entlang des Perforationskanals bildete (s. Abb. 8B).

## **Mikro-Transplantation und -Scheintransplantation**

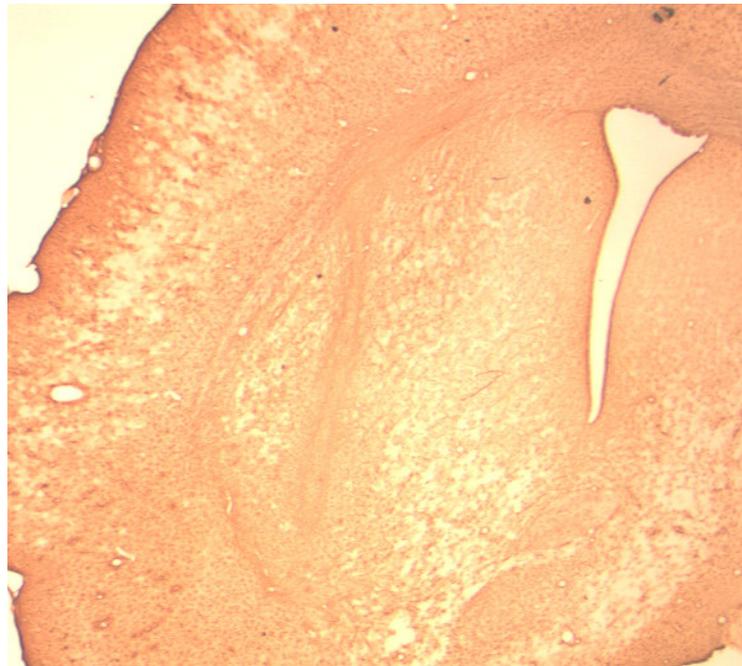
In mikrotransplantierten Tieren ließen sich zwar die beiden Perforationskanäle voneinander abgrenzen, aber die einzelnen Depots stellten sich konfluent dar. Im Vergleich zu den makrotransplantierten Tieren wurde insgesamt eine etwas homogenere Anordnung der TH-positiven Zellen innerhalb des Transplantates beobachtet. Die Zellen verteilten sich gleichmäßiger als bei den Makrotransplantaten, neigten aber auch zur Bildung von Zellhaufen. Die Anordnung der Zellen an der Peripherie des Transplantates war nicht so ausgeprägt wie bei den makrotransplantierten Tieren (s. Abb. 9A u. B). Im Schnitt wurden nach Mikro-TP 653 Zellen gezählt (Min = 208, Max = 1148). Das Faserwachstum schien, bezogen auf die Dichte, etwas ausgeprägter zu sein. Bezogen auf die Länge der Fasern konnte kein Unterschied zu den Makrotransplantaten festgestellt werden.

Die GFAP-Färbung stellte sich bei transplantierten und scheintransplantierten Tieren nahezu gleich dar. Im Gegensatz zu Nikkhah et al. [Nikkhah, et al., 1994] konnten wir keinen ausgeprägten Unterschied in der GFAP-Färbung nach Makro- oder Mikrotransplantation bzw. nach entsprechender Scheintransplantation sehen (s. Abb. 8).

**Abbildung 8: Färbung des *Glial fibrillary acidic Protein***



**Abbildung 8A:** Makrotransplantat, GFAP-Färbung. Deutlich erkennbarer Rahmen aus Astrozyten umgibt das Transplantat. 25-fache Vergrößerung



**Abbildung 8B:** Makroscheintransplantat, GFAP. 25-fache Vergrößerung



**Abbildung 8C:** Mikrotransplantat, GFAP. Ausgeprägte Astroglie. 25-fache Vergrößerung

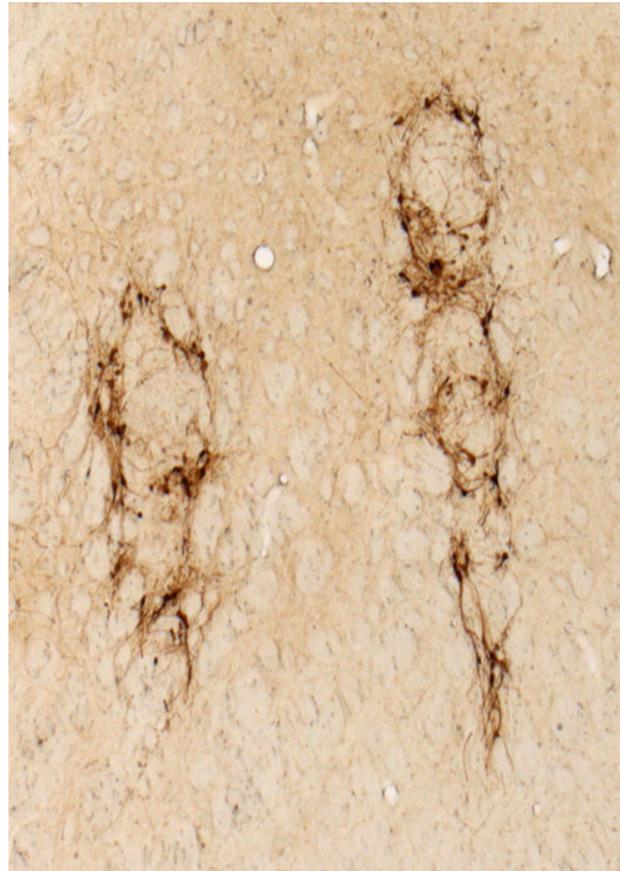


**Abbildung 8D:** Mikroscheintransplantat, GFAP. 25-fache Vergrößerung

### Abbildung 9: Färbung der Tyrosinhydroxylase



**Abbildung 9A:** Makrotransplantat, TH. Die Zellen ordnen sich in Haufen an der Peripherie des Transplantates. 100-fache Vergrößerung



**Abbildung 9B:** Mikrotransplantat, TH. Die Zellanordnung gleicht der in Abb.10A. 100-fache Vergrößerung



**Abbildung 9C:** Zellhaufen, Makro-TP, TH, 400-fache Vergrößerung.

## Diffusionsparameter

Die Parameter  $\alpha$ ,  $\lambda$  und  $k'$  wurden in allen Gruppen *in vivo* in verschiedenen Tiefen ermittelt. Alle 200  $\mu\text{m}$  wurde eine Messung durchgeführt. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der gemessenen Werte als Mittelwerte  $\pm$  SEM in den einzelnen Gruppen. Abb. 11 auf Seite 64 zeigt repräsentative Diffusionskurven, die im Striatum ermittelt wurden. Die Position dieser Diffusionskurven ist in Abbildung 10A – F auf Seite 63 als offener Kreis gekennzeichnet. Diese Abbildungen zeigen den Verlauf der Werte für ein Tier aus jeder Gruppe in Bezug zur Tiefe.

## Läsion und Kontrolle

Im Striatum der Kontrolltiere wurden, verglichen mit den Ergebnissen anderer Studien, für diese Hirnstruktur repräsentative Werte gemessen (s. Tab. 4). Die gemessenen Werte,  $\alpha = 0,19$ ,  $\lambda = 1,59$  und  $k' = 0,01 \text{ sec}^{-1}$  unterschieden sich unwesentlich von denen anderer Arbeitsgruppen sowohl *in vitro*,  $\alpha = 0,21$ ,  $\lambda = 1,54$  [Rice, et al., 1991], als auch *in vivo*,  $\alpha = 0,22$ ,  $\lambda = 1,54$  [Jansson, et al., 1999].

Bei den lädierten Tieren wurden für  $\alpha$  Werte um 0,14 bzw. für  $\lambda = 1,45$  ermittelt (s. Tab. 4). Es zeigt sich deutlich, dass die Kurve des lädierten Tieres wesentlich steiler verläuft als die des Kontrolltieres (s. Abb. 11, Läsion). Dies resultiert vor allem aus einem erniedrigten  $\alpha$ .

## Transplantierte und scheintransplantierte Tiere

Im Rahmen unserer statistischen Auswertung konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen makro- und mikrotransplantierten Tieren bzw. den jeweiligen scheintransplantierten Kontrolltieren feststellen. Dies stimmt mit der GFAP-Färbung überein, bei der auch keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden konnten. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Gruppe mit transplantierten Tieren und scheintransplantierten Tieren gebildet. Die Messwerte dieser beiden Gruppen wurden jeweils in *innerhalb des Transplantates* und *außerhalb des Transplantates* unterschieden und gesondert betrachtet. Repräsentative Experimente werden anhand der Diffusions- und Verlaufskurven dargestellt (s. Abb. 10C – F und Abb. 11).

In transplantierten Tieren wurden innerhalb des Transplantates sowohl für  $\alpha$  als auch für  $\lambda$  deutlich erhöhte Werte festgestellt, während außerhalb des Transplantates Werte ähnlich denen im lädierten Striatum gemessen wurden (s. Tab. 4). In der Darstellung des Verlaufs erkennt man, dass, in Übereinstimmung mit der GFAP-Färbung, die maximalen Werte beim Eintritt der Elektrode in das Transplantat gemessen wurden (s. Abb. 10C – F). Dies ist offenbar auf die ausgeprägte Astrogliose am Rand des Transplantates zurückzuführen (s. Abb. 8).

In lädierten Tieren und in transplantierten Tieren außerhalb des Transplantates waren  $\alpha$  und  $\lambda$  signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrollwerten. Werte für  $\alpha$  lagen bei 0,14 bzw. 0,15 und für  $\lambda$  zwischen 1,49 und 1,51.

Innerhalb des Transplantates bzw. Scheintransplantates lag der Mittelwert für  $\alpha$  bei 0,24, während  $\lambda$  bei scheintransplantierten Tieren 1,72 betrug und bei transplantierten Tieren 1,8.

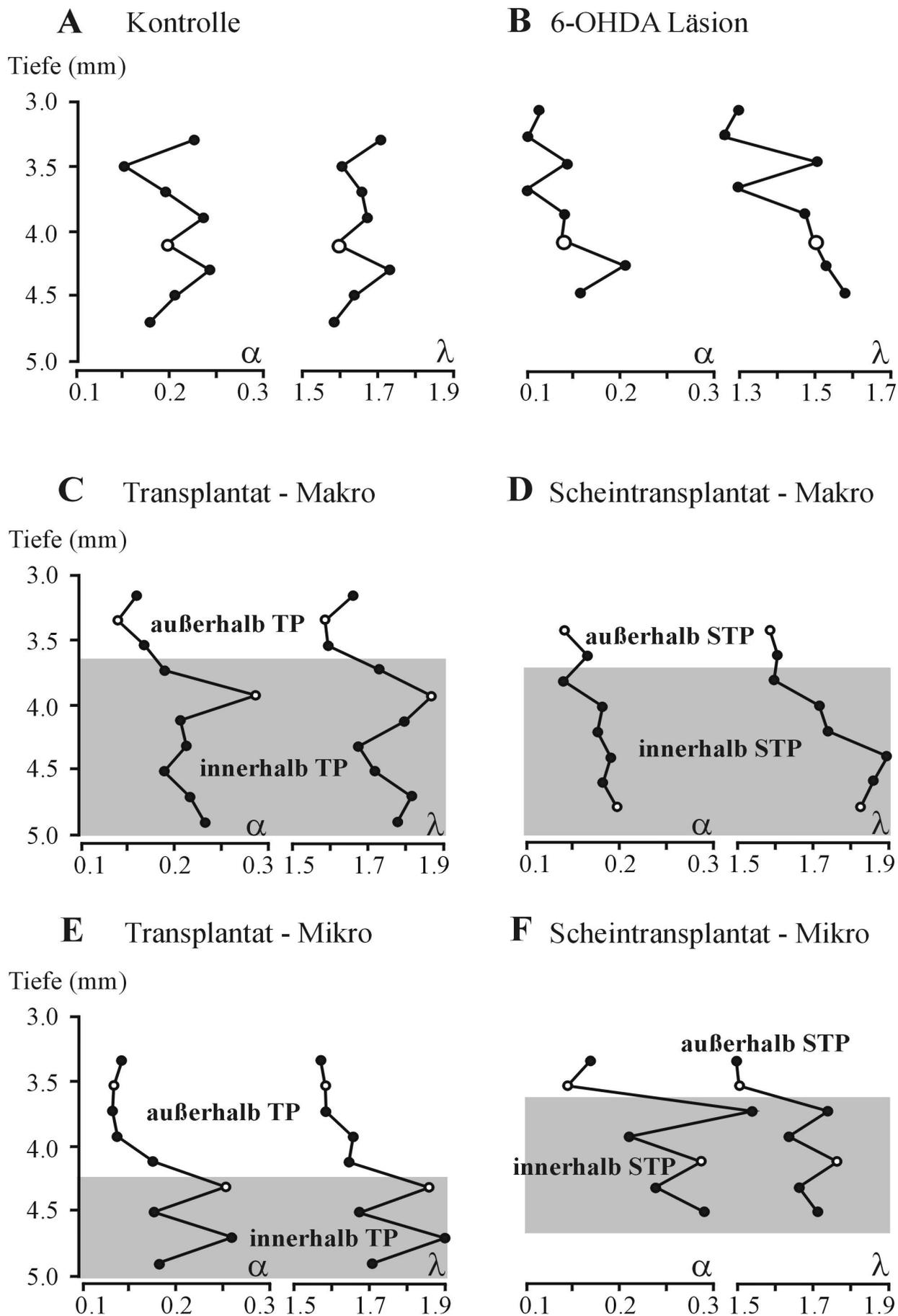
Der Vergleich des unspezifischen *Uptakes*  $k'$  zwischen den Gruppen bzw. mit den Kontrolltieren zeigte keine signifikanten Unterschiede.

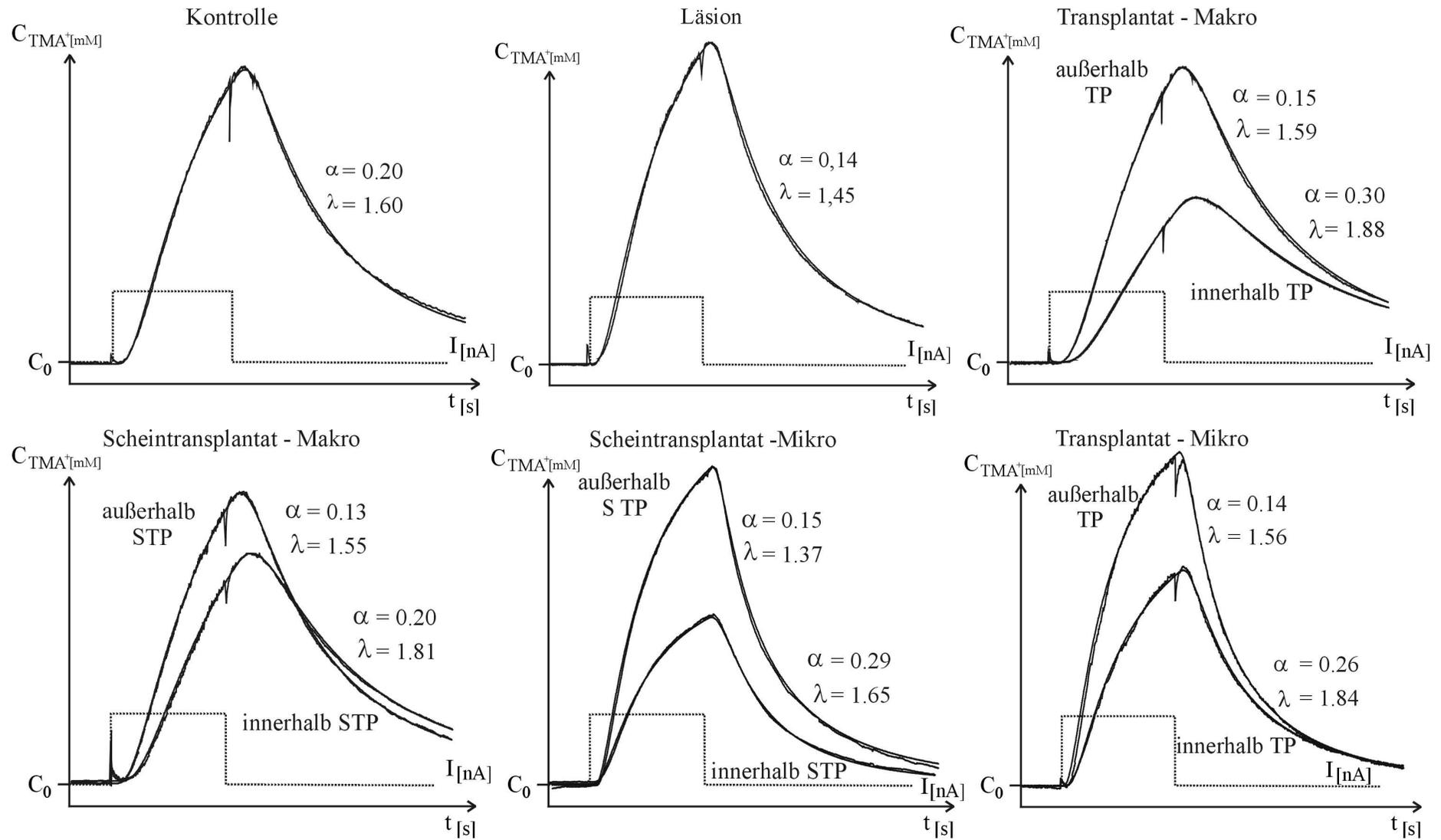
#### Ergebnistabelle der Diffusionsmessungen

Gruppe	n	N	$\alpha$	$\lambda$	$k' (x 10^{-3})$
<b>Kontrolle</b>	10	116	0,19 ± 0,03	1,59 ± 0,05	10 ± 4
<b>Läsion</b>	5	48	0,14 ± 0,02*	1,50 ± 0,06*	9 ± 3
<b>Transplantat</b>					
Innerhalb	8	68	0,24 ± 0,05*	1,80 ± 0,08*	6 ± 4
Außerhalb	9	91	0,15 ± 0,02*	1,51 ± 0,06*	9 ± 4
<b>Scheintransplantat</b>					
Innerhalb	5	41	0,24 ± 0,04*	1,72 ± 0,06*	10 ± 4
Außerhalb	6	54	0,14 ± 0,02*	1,49 ± 0,04*	9 ± 5

**Tabelle 4:** Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. n Anzahl der Tiere, N Anzahl der Messungen. Die Gruppe „Transplantat“ beinhaltet die Ergebnisse der Makro- und Mikro-TP, die Gruppe „Scheintransplantat“ die Werte der entsprechend scheintransplantierten Tiere. \* P < 0,05 vs. Kontrolle

**Abbildung 10:** Diffusionswerte  $\alpha$  und  $\lambda$  gegen die Tiefe. Jeweils ein Tier pro Gruppe.  
TP: Transplantat; STP: Scheintransplantat.





**Abbildung 11:** Repräsentative Diffusionskurven nach Gruppen. Gemessene und theoretische Kurven sind übereinander abgebildet.

I: Iontophoresestrom, Bassistrom: 20nA, Applikationsstrom: 100 nA für 24s.

## **Diskussion**

Ziel der Studie war es die Diffusionsbedingungen nach Makro-TP bzw. Mikro-TP im unilateralen 6-OHDA-Modell des MP zu evaluieren. Das Amphetamin-induzierte Rotationsverhalten zeigte die übliche Kompensation nach erfolgreicher TP, aber keinen Unterschied zwischen makro- und mikrotransplantierten Tieren. In der statistischen Analyse der Diffusionsparameter fand sich, übereinstimmend mit der Histologie, ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlich transplantierten Gruppen. Deutliche Unterschiede fanden sich zwischen dem Areal innerhalb und außerhalb des Transplantates sowie zwischen lädierten und transplantierten Tieren.

### **Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten**

Das Amphetamin-induzierte Rotationsverhalten diente in unseren Untersuchungen als funktionelle Erfolgskontrolle der Läsion bzw. Transplantation. Als Kriterium einer erfolgreichen Läsion galten  $\geq 5$  ipsilaterale Umdrehungen pro Minute [Hefti, et al., 1980], als Kriterium einer erfolgreichen TP die üblicherweise auftretende so genannte Überkompensation zur kontralateralen Seite hin. Sämtliche transplantierten Tiere zeigten eine Veränderung des Drehverhaltens von der ipsilateralen zur kontralateralen Seite hin, während die scheintransplantierten Tiere zunehmend zur ipsilateralen Seite hin rotierten. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer Vielzahl anderer Studien überein, die in verschiedenen Übersichtsartikeln zusammengefasst wurden [Björklund, 1992; Herman, et al., 1994]. In unserer Studie konnten wir im Drehverhalten keinen signifikanten Unterschied zwischen mikro – und makrotransplantierten Tieren feststellen. Wahrscheinlich beruht dies auf der Tatsache, dass sich die Anzahl der überlebenden TH-positiven Zellen bei beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Letzteres steht in Kontrast zu der Arbeit von Nikkhah und ist am ehesten auf methodische Abweichungen zurückzuführen (s. Abschnitt 6.2.3) [Nikkhah, et al., 1994]. Allerdings existieren in der Literatur auch keine Arbeiten die beide Techniken hinsichtlich der Auswirkungen auf die Rotation nach TP miteinander verglichen haben. Lediglich die Arbeitsgruppe von Nikkhah hat in einer Arbeit eine im Vergleich zu Makrotransplantaten verbesserte Feinmotorik beschrieben [Nikkhah, et al., 1993].

## Diffusionsparameter

### Diffusionsparameter in lädierten Arealen

Im Striatum von lädierten Tieren bzw. in den lädierten Arealen außerhalb der Transplantate oder Scheintransplantate konnten wir im Vergleich zu Kontrolltieren einen signifikanten Abfall von  $\lambda$  und  $\alpha$  beobachten. Ein verringertes  $\lambda$  bedeutet eine im Sinne der Obstruktion erleichterte Diffusion und ein verringertes  $\alpha$  führt zu einer relativen Konzentrationserhöhung der feigesetzten Substanz im nunmehr verkleinerten EZR. Dies legt den Schluss nahe, dass die geometrischen Bedingungen der Diffusion in DA-depletierten Arealen verbessert sind. Neben diesem räumlichen Aspekt wirkt sich die von Garris und van Horne beschriebene Reduktion der Anzahl von dopaminergen Wiederaufnahmetransportern, durch Verlängerung der Diffusionszeit, zusätzlich positiv auf die Transmitterkonzentration und die Diffusionsstrecke aus [van Horne, et al., 1992; Garris, et al., 1997]. Diese Aspekte wären ein Ansatzpunkt für die Erklärung der ausgedehnten Diffusion von DA über einige Millimeter in mit MPTP lädierten Katzen [Schneider, et al., 1994]. Morphologische Veränderungen des lädierten Striatums, die für den Abfall von  $\alpha$  und  $\lambda$  verantwortlich sein könnten, sind in der Literatur nicht dokumentiert. Veränderungen der Parameter aufgrund von Folgen des chirurgischen Eingriffes kämen für die lädierten Areale bei den transplantierten Tieren in Frage, erscheinen aber unwahrscheinlich, da sich diese Parameter von den nur lädierten Tieren, bei denen der Eingriff im medialen Vorderhirnbündel erfolgte, nicht unterscheiden. Gates et al. konnten auch keine histologisch erkennbaren Veränderungen beim Vergleich von 6-OHDA lädierten Tieren mit unbehandelten Kontrolltieren entdecken. Die in dieser Studie durchgeführten immunohistochemischen Untersuchungen von GFAP, Chondroitinsulfat und Tenascin zeigten keine Unterschiede [Gates, et al., 1996]. Jedoch könnte der Abfall der Tortuosität  $\lambda$  möglicherweise unter anderem auf die von Finkelstein et al. dokumentierte Reduktion der dopaminergen Nervenendigungen zurückzuführen sein [Finkelstein, et al., 2000]. Eine weitere Erklärung könnte der Verlust von dopaminergen *Spines* auf striatalen Neuronen in DA-denervierten Gebieten sein [Ingham, et al., 1998].

In der Literatur sind funktionelle Veränderungen beschrieben, die den Abfall von  $\alpha$  in lädierten Arealen erklären könnten. Strömberg et al. entdeckten eine vermehrte, spontane neuronale Aktivität im Striatum von lädierten Tieren [Strömberg, et al., 2000]. Svoboda et al. zeigten bei Versuchen am Rückenmark von Ratten, dass eine derartige neuronale Aktivität zu

einem Abfall der Volumenfraktion  $\alpha$  führt, der in Ausmaß und Dauer mit der Aktivität der Neurone positiv korrelierte [Svoboda, et al., 1991].

Eine vergleichbare Veränderung der Diffusionsparameter konnte bei der Beobachtung des Alterungsprozesses gemessen werden. In diesen Untersuchungen wurde der Abfall von  $\alpha$  und  $\lambda$  auf hypertrophierte Astrozyten mit verdickten Zellfortsätzen sowie einer Reduktion von Fibronectin zurückgeführt [Sykova, et al., 1998].

### **Diffusionsparameter bei transplantierten Tieren**

In transplantierten Tieren wurde ein Anstieg von  $\alpha$  und  $\lambda$  beobachtet, der signifikant über den Werten von Kontrolltieren lag. Dieser Anstieg wurde in allen transplantierten Gruppen, auch bei den scheintransplantierten Tieren, verzeichnet. Der gleichartige, von der Art der TP unabhängige Verlauf der Parameter legt die Vermutung nahe, dass die Verletzung des Gewebes und die daraus folgende Astroglieose hierfür verantwortlich sind. Dies stimmt überein mit Messungen in Stichwunden des Kortex [Roitbak, et al., 1999]. Der Anstieg von  $\alpha$  ist v.a. auf die Verletzung selbst und den damit einhergehenden Zelltod zurückzuführen, während der Anstieg von  $\lambda$  mit der Astroglieose und der veränderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zusammenhängt. Dieselben Erkenntnisse wurden auch bei der Untersuchung von kortikalen und tektalen Transplantaten gewonnen [Sykova, et al., 1999].

Reaktive Astrozyten wurden innerhalb und um das ganze Transplantat herum gefunden. Sie grenzten das Transplantat durch einen Rahmen von ca. 150 – 300  $\mu\text{m}$  Breite vom umgebenden Gewebe ab. Innerhalb dieses Rahmens fand sich am Übergang vom Transplantat zum Wirtsgewebe eine durchgehend intensivere Anfärbung von GFAP, was von Nikkhah und Barker ebenfalls beobachtet wurde [Nikkhah, et al., 1994; Barker, et al., 1996]. Diese Astrozyten produzieren vermehrt Moleküle der extrazellulären Matrix wie z.B. sulfatierte Proteoglykane, Tenascin und Vimentin [Barker, et al., 1996; Roitbak, et al., 1999]. Diese Moleküle können sowohl durch Obstruktion des EZR zu einem Anstieg von  $\lambda$  führen, als auch die umliegenden Zellen auseinanderschieben und auf diese Weise zu einem Anstieg von  $\alpha$  führen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen haben elektronenmikroskopische Untersuchungen von Bolam et al. gezeigt, dass transplantierte dopaminerge Zellen sich oftmals von Astrozyten und einem vergrößerten EZR umgeben darstellen und nur schwer Kontakt zum Wirtsgewebe herstellen können [Bolam, et al., 1987].

Was könnte diese Situation für funktionelle Konsequenzen haben? Der Anstieg von  $\alpha$  im Transplantat führt zu einer Konzentrationsabnahme von freigesetzten Neurotransmittern und damit zu einer geringeren Erfolgsrate und verlängerten Latenzzeit der Informationsübermittlung. Gleichmaßen wirkt sich der Anstieg von  $\lambda$  durch einen erschwerten Diffusionsweg aus [Sykova, et al., 1999]. Hinzu kommt, dass im Transplantat die Freisetzung von DA zwar sehr ausgeprägt ist [Earl, et al., 1996; Cragg, et al., 2000], die Aktivität des DAT allerdings ebenfalls. Die Folge eines erhöhten  $\alpha$  und  $\lambda$  bei vermehrter intrazellulärer Aufnahme von Dopamin wäre ein eingeschränktes Potential des Transplantates zur Freisetzung von Dopamin in das denervierte Striatum. Des Weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass endogene und exogene Botenstoffe erschwert in das Transplantat diffundieren können, um mit den Zellen zu interagieren. Dem stehen jedoch die verbesserten Diffusionsbedingungen in der lädierten Umgebung des Transplantates gegenüber wie auch die in diesen Gebieten verlängerte Persistenz von Dopamin im extrazellulären Raum. Diese Tatsache mag die verschlechterten Bedingungen der Freisetzung aus dem Transplantat in einem nicht quantifizierbaren Ausmaß aufheben [van Horne, et al., 1992; Garris, et al., 1997; Cragg, et al., 2000].

### **Unterschiede zwischen mikro – und makrotransplantierten Tieren**

Beim Vergleich der mikro- mit den makrotransplantierten Tieren konnten wir keinen Unterschied bezüglich der Diffusionsparameter feststellen. Gleiches gilt auch für die scheintransplantierten Tiere. Hinsichtlich des Drehverhaltens und der Anzahl überlebender dopaminergere Zellen nach TP wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Dies steht in Kontrast zu Nikkhah et al., der eine erhöhte Anzahl überlebender Zellen nach Mikrotransplantation beschrieb [Nikkhah, et al., 1994]. Zudem war in unseren makrotransplantierten Tieren das von Nikkhah beschriebene zentrale Areal, in welchem keine oder nur vereinzelt dopaminerge Zellen zu sehen waren, weniger stark ausgeprägt. In unserer Studie war die Histomorphologie nach den verschiedenen Transplantations-techniken sehr ähnlich. Die hier beschriebenen Abweichungen zu den Studien von Nikkhah et al. dürften jedoch v.a. methodische Ursachen haben. Wir transplantierten in beiden Gruppen allgemein geringere Zellzahlen als Nikkhah und Mitarbeiter. Des Weiteren benutzten wir bei der Mikro-TP eine etwas dickere Glaskapillare und legten nur vier Kanäle mit insgesamt 8 Zelldepots an, während Nikkhah 9 Kanäle mit 18 Zelldepots anlegte. Die Notwendigkeit hierzu ergab

sich aus der Frage nach der exakten Position der Messelektrode in Bezug zum Transplantat, die im Nachhinein histologisch geklärt werden musste. Allerdings ist es aus unserer Sicht unwahrscheinlich, dass Unterschiede in Größe, Form oder Zellzahl die Diffusionsparameter innerhalb des Transplantates signifikant verändern würden. Zum einen weil die Zahl der TH-positiven Zellen eines Tieres nicht mit den gemessenen Diffusionsparametern korrelierte [Reum, et al., 2002]. Zum anderen zeigten alle vier Transplantationsgruppen durchweg gleichsinnige, übereinstimmende Veränderungen.

## **Schlußfolgerung**

Das Ausmaß der Integration eines Transplantates in das Gewebe des Empfängers entscheidet über Erfolg oder Misserfolg einer TP. Dieser Prozess ist auf einen gut funktionierenden Stoffaustausch angewiesen, bei dem die Diffusion des freigesetzten Dopamins eine wesentliche Rolle spielt. Basierend auf unseren Ergebnissen stellt sich, bezogen auf die geometrischen Bedingungen der Diffusion im transplantierten Striatum, eine zwiespältige Situation dar. Auf der einen Seite steht das Gebiet des Transplantates mit vielen dopaminergen Zellen aber erschwerten Diffusionsbedingungen und auf der anderen Seite die zellarmen, lädierten Gebiete mit guten Diffusionsbedingungen für DA. Diese Situation sollte zu einer verbesserten Diffusion von DA in lädierten Gebieten des Striatums führen und das vor allem in makrotransplantierten Tieren. In mikrotransplantierten Tieren gäbe es jedoch zu bedenken, dass die Astroglie ab einer bestimmten Anzahl von Tracks zunehmend auch die Diffusionsbedingungen in lädierten Gebieten einschränken könnte. Zwar können auch wir die Beobachtung bestätigen, dass bei Verwendung einer Glaskapillare die Astroglie pro Injektionskanal geringer ausgeprägt ist [Nikkhah, et al., 1994; Brandis, et al., 1998], aber das Konzept der großflächigen Anlage von Injektionskanälen im Striatum mit so vielen Zellen wie möglich, sollte unter dem möglichen Aspekt einer ebenso großflächig durch Astroglie eingeschränkten VT kritisch betrachtet werden. Möglicherweise ist dies sogar einer der Gründe weshalb das bemerkenswerte Ausmaß der Reinnervation nach Mikrotransplantation nicht eindeutig mit der Verbesserung des sensomotorischen Verhaltens einhergeht [Nikkhah, et al., 1998].

Die funktionelle Rolle der VT von Dopamin in physiologischen und pathologischen Zuständen bleibt schwer einzuschätzen und es muss betont werden, dass sich die hier beschriebenen Ergebnisse einzig und allein auf die Diffusion des Ions  $\text{TMA}^+$  beziehen.

Diese Ergebnisse zeigen jedoch eindeutig, dass in traumatisierten Gebieten des Striatums im Zustand nach mechanischem Trauma unterschiedlichen Grades, die geometrischen Bedingungen der Diffusion deutlich verschlechtert sind während sie in lädierten Gebieten deutlich verbessert sind. Dies darf als weiterer Hinweis auf eine kompensatorische Rolle der VT im Zustand des MP verstanden werden [Bezard, et al., 1998].

Aus unserer Sicht wird es für den Erfolg dieses Therapieansatzes mitentscheidend sein eine ausgewogene Balance aus Zellzahl und deren sinnvoller Verteilung im Striatum oder auch in anderen Gebieten des nigrostriatalen Systems zu finden. Außerdem wird es von Bedeutung sein die immunologischen Reaktionen und Reparaturmechanismen im Striatum nach Transplantation eingehend zu charakterisieren, um Strategien zu entwickeln, die z.B. darauf abzielen das Ausmaß der Astrogliose zu verringern oder die Expression bestimmter Matrixmoleküle zu reduzieren. Dies würde nicht nur zur Verbesserung der Volumentransmission von Dopamin im Striatum, sondern auch zur verbesserten Diffusion von Medikamenten und zur erleichterten Integration der Zellen nach deren TP führen.

## Zusammenfassung

Die Kommunikationsformen im ZNS waren und sind Gegenstand intensiver Forschung. Es ist anerkannt, dass die transmitterabhängige Informationsübertragung nicht nur über Synapsen sondern auch durch Diffusion oder Konvektion erfolgen kann. Gerade für den Zustand des Morbus Parkinson (MP) und den Zustand nach Transplantation (TP) gibt es Hinweise auf eine gesteigerte *Volume transmission*, deren Bedingungen jedoch durch lokale reaktive Veränderungen im Gewebe des Empfängers, wie z.B. die Astrogliose, beeinflusst werden könnten.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Frage, inwieweit die TP von Zellsuspensionen die Geometrie des extrazellulären Raums verändert und damit Einfluss auf die Bedingungen der Diffusion von Dopamin (DA) nimmt.

Um diese Frage zu beantworten wurden Tiere im 6-OHDA-Modell des MP auf zwei verschiedene Arten transplantiert. Eine Gruppe von Tieren wurde mittels einer Stahlkanüle makrotransplantiert, eine andere mittels einer Glaskapillare mikrotransplantiert. Zum Vergleich wurden gänzlich unbehandelte, nur lädierte und entsprechend scheintransplantierte Tiere gleichen Alters herangezogen. Der Erfolg der Operationen wurde anhand des Drehverhaltens nach Applikation von Amphetamin beurteilt. Die Geometrie des extrazellulären Raums, die durch die Parameter Volumenfraktion  $\alpha$ , Tortuosität  $\lambda$  und dem unspezifische Uptake  $k'$  beschrieben wird, wurde nur in Tieren durchgeführt, die das ihrem Zustand entsprechende Drehverhalten zeigten. Die Parameter  $\alpha$ ,  $\lambda$  und  $k'$  wurden mit Hilfe der TMA<sup>+</sup>-Methode bestimmt. Abschließend wurde als Marker für dopaminerge Zellen die Tyrosinhydroxylase (TH) und als Marker für die Astrogliose das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) immunohistochemisch untersucht.

Das Drehverhalten der verschiedenen Gruppen entsprach den Erwartungen. Tiere nach Läsion, ebenso wie scheintransplantierte Tiere zeigten ein mit der Zeit zunehmendes ipsilaterales Drehverhalten, während sich in beiden transplantierten Gruppen ein kontralaterales Drehverhalten entwickelte. Die histologische Untersuchung der TH stimmte damit überein. In der Substantia nigra fanden sich wenn überhaupt nur vereinzelt TH-positive Zellen, während das Transplantat das typische Bild der kleinen, vor allem am Übergang zwischen Transplantat und Empfänger angeordneten Zellhaufen zeigte. Die GFAP-Färbung stellte sich in allen transplantierten und scheintransplantierten Gruppen ähnlich dar. Um das Transplantat herum fand sich ein Rahmen aus Astrozyten mit einem intensiv gefärbten, dem

Transplantat anliegendem Streifen. Übereinstimmend mit dem Befund der GFAP-Färbung konnte bei der statistischen Auswertung der Diffusionsparameter kein Unterschied zwischen den unterschiedlich transplantierten Tieren gefunden werden. Auch zwischen transplantierten und scheintransplantierten Tieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied, was uns zu einer Einteilung der Werte in Bezug zum Transplantat veranlasste.

Dabei zeigte sich im Vergleich zu Kontrolltieren eine Abnahme von  $\alpha$  und  $\lambda$  im Striatum von lädierten Tieren und in lädierten Arealen außerhalb des Transplantates bei transplantierten Tieren. Die innerhalb eines Transplantates gemessenen Werte für  $\alpha$  und  $\lambda$  waren in allen Gruppen gegenüber den Kontrollen erhöht, wobei die maximalen Werte vor allem bei Eintritt bzw. Austritt aus dem jeweiligen Transplantat dokumentiert wurden, was wiederum mit der GFAP Färbung übereinstimmt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in lädierten Arealen die Bedingungen für die Diffusion verbessert sind. Die Abnahme von  $\lambda$  steht für eine geringere Obstruktion, während die Abnahme von  $\alpha$  zu einer relativen Konzentrationserhöhung des Botenstoffes führt. Demgegenüber steht die gegensinnige Veränderung der Parameter innerhalb des Transplantates. Die Erhöhung von  $\alpha$  und  $\lambda$  muss im Sinne einer erhöhten Obstruktion und relativen Konzentrationsabnahme des Botenstoffes interpretiert werden. Es stehen sich also die verschlechterten Diffusionsbedingungen innerhalb des Transplantates und die verbesserten Diffusionsbedingungen in den lädierten Arealen des Striatums gegenüber.

Die Gründe für die Abnahme der Parameter in lädierten Arealen sind nicht eindeutig. Sowohl funktionelle Veränderungen als auch morphologische Einflüsse kämen in Frage. Die Gründe für die Erhöhung innerhalb der verschiedenen Transplantate sind eher nachvollziehbar. Die ähnliche Ausprägung der Astrogliose in all diesen Gruppen wäre eine naheliegende Erklärung, zumal ähnliche Ergebnisse auch in Studien mit Transplantaten im Kortex beschrieben wurden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollte die Strategie möglichst viele Injektionskanäle anzulegen, um eine möglichst großflächige Reinnervation zu erreichen, kritisch überdacht werden, da damit auch die Fläche der Astrogliose steigt. Aus unserer Sicht wird es für den Erfolg dieses Therapieansatzes mitentscheidend sein eine ausgewogene Balance aus Zellzahl und deren sinnvoller Verteilung im Striatum oder auch in anderen Gebieten des nigrostriatalen Systems zu finden.

Deshalb wäre es für die Zukunft wünschenswert durch *in vivo* Studien die funktionelle Rolle der Volumentransmission von Dopamin in physiologischen wie pathologischen Zuständen genauer zu charakterisieren.

## Abkürzungen

DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Wiederaufnahmetransporter
DNase	Desoxyribonuklease
EZR	Extrazellulärraum
GABA	$\gamma$ -Amino-Buttersäure
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ISM	Ionensensitive Mikroelektrode
i.p.	intraperitoneal
Makro-TP	Makro-Transplantation
Mikro-TP	Mikro-Transplantation
min	Minuten
MFB	Mediales Vorderhirnbündel
MP	Morbus Parkinson
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NaCl	Natriumchlorid
NPY	Neuropeptid Y
PBS	Phosphatpuffer-Lösung
s	Sekunden
SN	Substantia Nigra
SNPc	Substantia Nigra Pars compacta
SNPr	Substantia Nigra Pars reticulata
SP	Substanz P
TB	Tris-Puffer-Lösung
TH	Tyrosinhydroxylase
TMA <sup>+</sup>	Tetramethylammoniumchlorid
TP	Transplantation
u. a.	unter anderem
VT	<i>Volume transmission</i>
VTA	Area tegmentalis ventralis
WT	<i>Wiring transmission</i>

## Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M. (1946): Estimation of nuclear population from microtome sections, *Anat. Rec.* (Band 94), Seite 239-247.
- Abrous, D. N.; Torres, E. M. und Dunnett, S. B. (1993): Dopaminergic grafts implanted into the neonatal or adult striatum: comparative effects on rotation and paw reaching deficits induced by subsequent unilateral nigrostriatal lesions in adulthood, *Neuroscience* (Band 54), Nr. 3, Seite 657-68.
- Adam-Vizi, V. (1992): External Ca(2+)-independent release of neurotransmitters, *J Neurochem* (Band 58), Nr. 2, Seite 395-405.
- Agnati, L. F. und Fuxe, K. (1996): The impact of histological techniques in revealing brain function. Volume Transmission: from fluorescence histochemistry to confocal laser microscopy., Fuxe, K.; Hökfelt, L.; Olson, D.; Ottoson, A.; Dahlström, A. und Björklund, A., *Molecular Mechanisms of Neuronal Communication* Seite 251-277, Pergamon, Oxford.
- Agnati, L. F.; Fuxe, K. und Zoli, M. (1985): Considerazioni sulle interazioni tra sistema nervoso centrale e sistema endocrino, *Crescita* (Band 14), Seite 34 - 38.
- Agnati, L. F.; Fuxe, K.; Zoli, M.; Ozini, I.; Toffano, G. und Ferraguti, F. (1986): A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission, *Acta Physiol Scand* (Band 128), Nr. 2, Seite 201-7.
- Agnati, L. F.; Zoli, M.; Stromberg, I. und Fuxe, K. (1995): Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission, *Neuroscience* (Band 69), Nr. 3, Seite 711-26.
- Ammann, D. (1986): *Ion-selective Electrodes. Principles, Design, Applications.*, Springer, Berlin Heidelberg, ISBN: 0-387-16222-4(U.S.).
- Aoki, C. (1992): Beta-adrenergic receptors: astrocytic localization in the adult visual cortex and their relation to catecholamine axon terminals as revealed by electron microscopic immunocytochemistry, *J Neurosci* (Band 12), Nr. 3, Seite 781-92.
- Asan, E. (1993): Comparative single and double immunolabelling with antisera against catecholamine biosynthetic enzymes: criteria for the identification of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic structures in selected rat brain areas, *Histochemistry* (Band 99), Nr. 6, Seite 427-42.
- Bach-y-Rita, P. (1994): The brain beyond the synapse: a review, *Neuroreport* (Band 5), Nr. 13, Seite 1553-7.
- Bandtlow, C.; Zachleder, T. und Schwab, M. E. (1990): Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition, *J Neurosci* (Band 10), Nr. 12, Seite 3837-48.
- Barker, R. A.; Dunnett, S. B.; Faissner, A. und Fawcett, J. W. (1996): The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum, *Exp Neurol* (Band 141), Nr. 1, Seite 79-93.
- Baude, A.; Molnar, E.; Latawiec, D.; McIlhinney, R. A. und Somogyi, P. (1994): Synaptic and nonsynaptic localization of the GluR1 subunit of the AMPA-type excitatory amino acid receptor in the rat cerebellum, *J Neurosci* (Band 14), Nr. 5 Pt 1, Seite 2830-43.
- Bezard, E. und Gross, C. E. (1998): Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach, *Prog Neurobiol* (Band 55), Nr. 2, Seite 93-116.
- Birkmayer, W. und Hornykiewicz, O. (1961): Der L-Dioxyphenylalanin (=DOPA-) Effekt bei der Parkinson-Akinesie, *Wien Klin Wochenschr* (Band 73), Seite 787-788.

- Bjelke, B.; England, R.; Nicholson, C.; Rice, M. E.; Lindberg, J.; Zoli, M.; Agnati, L. F. und Fuxe, K. (1995): Long distance pathways of diffusion for dextran along fibre bundles in brain. Relevance for volume transmission, *Neuroreport* (Band 6), Nr. 7, Seite 1005-9.
- Bjelke, B.; Fuxe, K. und Agnati, L. F. (1988): Survival of adenohipophyseal homologous transplants in the rat striatum associated with prolactin-like immunoreactivity in the surrounding neuropil of the striatum, *Neurosci Lett* (Band 93), Nr. 2-3, Seite 139-45.
- Bjelke, B.; Fuxe, K. und Agnati, L. F. (1989): Increased diffusion of prolactin-like material into the brain neuropil from homologous adenohipophyseal transplants in the rat neostriatum after a 6-OH-dopamine induced degeneration of the mesostriatal dopamine neurons, *Neurosci Lett* (Band 107), Nr. 1-3, Seite 33-8.
- Bjelke, B.; Stromberg, I.; O'Connor, W. T.; Andbjer, B.; Agnati, L. F. und Fuxe, K. (1994): Evidence for volume transmission in the dopamine denervated neostriatum of the rat after a unilateral nigral 6-OHDA microinjection. Studies with systemic D-amphetamine treatment, *Brain Res* (Band 662), Nr. 1-2, Seite 11-24.
- Björklund, A. (1992): Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery, *Curr Opin Neurobiol* (Band 2), Nr. 5, Seite 683-9.
- Björklund, A.; Dunnett, S. B.; Stenevi, U.; Lewis, M. E. und Iversen, S. D. (1980): Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing, *Brain Res* (Band 199), Nr. 2, Seite 307-33.
- Björklund, A.; Schmidt, R. H. und Stenevi, U. (1980): Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra, *Cell Tissue Res* (Band 212), Nr. 1, Seite 39-45.
- Björklund, A. und Stenevi, U. (1979): Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants, *Brain Res* (Band 177), Nr. 3, Seite 555-60.
- Björklund, A.; Stenevi, U.; Schmidt, R. H.; Dunnett, S. B. und Gage, F. H. (1983): Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation, *Acta Physiol Scand Suppl* (Band 522), Seite 1-7.
- Björklund, A.; Stenevi, U. und Svendgaard, N. (1976): Growth of transplanted monoaminergic neurones into the adult hippocampus along the perforant path, *Nature* (Band 262), Nr. 5571, Seite 787-90.
- Bohn, M. C. und Kanuicki, M. (1990): Bilateral recovery of striatal dopamine after unilateral adrenal grafting into the striatum of the 1-methyl-4-(2'-methylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (2'CH<sub>3</sub>-MPTP)-treated mouse, *J Neurosci Res* (Band 25), Nr. 3, Seite 281-6.
- Bolam, J. P.; Freund, T. F.; Björklund, A.; Dunnett, S. B. und Smith, A. D. (1987): Synaptic input and local output of dopaminergic neurons in grafts that functionally reinnervate the host neostriatum, *Exp Brain Res* (Band 68), Nr. 1, Seite 131-46.
- Bondareff, W.; Routtenberg, A.; Narotzky, R. und McLone, D. G. (1970): Intra-striatal spreading of biogenic amines, *Exp Neurol* (Band 28), Nr. 2, Seite 213-29.
- Boonman, Z. und Isacson, O. (1999): Apoptosis in neuronal development and transplantation: role of caspases and trophic factors, *Exp Neurol* (Band 156), Nr. 1, Seite 1-15.
- Brandis, A.; Kuder, H.; Knappe, U.; Jodicke, A.; Schonmayr, R.; Samii, M.; Walter, G. F. und Ninkhah, G. (1998): Time-dependent expression of donor- and host-specific major histocompatibility complex class I and II antigens in allogeneic dopamine-rich macro- and micrografts: comparison of two different grafting protocols, *Acta Neuropathol (Berl)* (Band 95), Nr. 1, Seite 85-97.
- Brevig, T.; Meyer, M.; Kristensen, T.; Zimmer, J. und Holgersson, J. (2001): Xenotransplantation for brain repair: reduction of porcine donor tissue

- immunogenicity by treatment with anti-Gal antibodies and complement, *Transplantation* (Band 72), Nr. 2, Seite 190-6.
- Broadwell, R. D.; Baker, B. J.; Ebert, P. S. und Hickey, W. F. (1994): Allografts of CNS tissue possess a blood-brain barrier: III. Neuropathological, methodological, and immunological considerations, *Microsc Res Tech* (Band 27), Nr. 6, Seite 471-94.
- Brundin, P. und Björklund, A. (1987): Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain, Seil, F. J.; Herbert, E. und Carlson, M., *Progress in Brain Research* Seite 293-308, Elsevier Science Publishers B. V. Biomedical Division, Amsterdam.
- Brundin, P.; Isacson, O. und Bjorklund, A. (1985): Monitoring of cell viability in suspensions of embryonic CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival, *Brain Res* (Band 331), Nr. 2, Seite 251-9.
- Brundin, P.; Karlsson, J.; Emgard, M.; Schierle, G. S.; Hansson, O.; Petersen, A. und Castilho, R. F. (2000): Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches, *Cell Transplant* (Band 9), Nr. 2, Seite 179-95.
- Caceci, M. S. und Cacheris, W. P. (1984): Fitting Curves to data. The simplex algorithm is the answer., *Byte*, Nr. 05, Seite 340-362.
- Caille, I.; Dumartin, B. und Bloch, B. (1996): Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation, *Brain Res* (Band 730), Nr. 1-2, Seite 17-31.
- Cajal, S.R. (1967): The structure and connexions of neurons, *Nobel Lectures: Physiology and Medicine* (Band 1901 - 1921) Seite 220 - 253, Elsevier Publishing Company, New York.
- Castaneda, E.; Whishaw, I. Q. und Robinson, T. E. (1990): Changes in striatal dopamine neurotransmission assessed with microdialysis following recovery from a bilateral 6-OHDA lesion: variation as a function of lesion size, *J Neurosci* (Band 10), Nr. 6, Seite 1847-54.
- Cenci, M. A.; Campbell, K. und Bjorklund, A. (1993): Neuropeptide messenger RNA expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat striatum reinnervated by fetal dopaminergic transplants: differential effects of the grafts on preproenkephalin, preprotachykinin and prodynorphin messenger RNA levels, *Neuroscience* (Band 57), Nr. 2, Seite 275-96.
- Chritin, M.; Blanchard, V.; Raisman-Vozari, R.; Feuerstein, C.; Agid, Y.; Javoy-Agid, F. und Savasta, M. (1996): DA uptake sites, D1 and D2 receptors, D2 and preproenkephalin mRNAs and Fos immunoreactivity in rat striatal subregions after partial dopaminergic degeneration, *Eur J Neurosci* (Band 8), Nr. 12, Seite 2511-20.
- Clarke, D. J.; Brundin, P.; Strecker, R. E.; Nilsson, O. G.; Bjorklund, A. und Lindvall, O. (1988): Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: ultrastructural evidence for synapse formation using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry, *Exp Brain Res* (Band 73), Nr. 1, Seite 115-26.
- Clarke, D. J.; Dunnett, S. B.; Isacson, O.; Sirinathsinghji, D. J. und Bjorklund, A. (1988): Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions--I. Ultrastructural evidence of afferent synaptic inputs from the host nigrostriatal pathway, *Neuroscience* (Band 24), Nr. 3, Seite 791-801.
- Cooper, J. R.; Bloom, F. E. und Roth, R. H. (1991): *The Biochemical Basis for Neuropharmacology*, 6th. Auflage, Oxford University Press, New York, Oxford.
- Cragg, S. J.; Clarke, D. J. und Greenfield, S. A. (2000): Real-time dynamics of dopamine released from neuronal transplants in experimental Parkinson's disease, *Exp Neurol* (Band 164), Nr. 1, Seite 145-53.
- Dahlström, A. und Fuxe, K. (1964): Localization of monoamines in the lower brain stem, *Experientia* (Band 20), Nr. 7, Seite 398-9.

- Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Gage, F. H.; Fisher, L. J.; Hunt, M. A. und Wamsley, J. K. (1991): Downregulation of muscarinic receptors in the rat caudate-putamen after lesioning of the ipsilateral nigrostriatal dopamine pathway with 6-hydroxydopamine (6-OHDA): normalization by fetal mesencephalic transplants, *Brain Res (Band 540)*, Nr. 1-2, Seite 145-52.
- Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Gage, F. H.; Fisher, L. J.; Hunt, M. A. und Wamsley, J. K. (1991): Functional recovery of supersensitive dopamine receptors after intrastriatal grafts of fetal substantia nigra, *Exp Neurol (Band 111)*, Nr. 3, Seite 282-92.
- Descarries, L. und Mechawar, N. (2000): Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system, *Prog Brain Res (Band 125)*, Seite 27-47.
- Descarries, L.; Watkins, K. C.; Garcia, S.; Bosler, O. und Doucet, G. (1996): Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis, *J Comp Neurol (Band 375)*, Nr. 2, Seite 167-86.
- Diederich, N. J. und Alesch, F. (1997): [Neurosurgical methods in treatment of Parkinson disease. Current status], *Nervenarzt (Band 68)*, Nr. 6, Seite 466-76.
- Doucet, G.; Brundin, P.; Descarries, L. und Björklund, A. (1990): Effect of prior dopamine denervation on survival and fiber outgrowth from intrastriatal fetal mesencephalic grafts, *Eur J Neurosci*, Nr. 2, Seite 279-290.
- Doucet, G.; Murata, Y.; Brundin, P.; Bosler, O.; Mons, N.; Geffard, M.; Ouimet, C. C. und Björklund, A. (1989): Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon, *Exp Neurol (Band 106)*, Nr. 1, Seite 1-19.
- Dunnett, S. B.; Björklund, A.; Schmidt, R. H.; Stenevi, U. und Iversen, S. D. (1983): Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions in different forebrain sites, *Acta Physiol Scand Suppl (Band 522)*, Seite 29-37.
- Dunnett, S. B.; Björklund, A.; Schmidt, R. H.; Stenevi, U. und Iversen, S. D. (1983): Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V. Behavioural recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions, *Acta Physiol Scand Suppl (Band 522)*, Seite 39-47.
- Earl, C. D.; Marburger, A.; Schonfuss, D.; Sautter, J.; Strecker, S.; Yang, Z.; Kupsch, A.; Oertel, W. H. und Morgenstern, R. (1996): Foetal ventral mesencephalic cell suspension grafts to the 6-hydroxydopamine-lesioned rat reduce the rate of dopamine uptake in the contralateral striatum, *Neurosci Lett (Band 210)*, Nr. 3, Seite 185-8.
- Earl, C. D.; Reum, T.; Xie, J. X.; Sautter, J.; Kupsch, A.; Oertel, W. H. und Morgenstern, R. (1996): Foetal nigral cell suspension grafts influence dopamine release in the non-grafted side in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: in vivo voltammetric data, *Exp Brain Res (Band 109)*, Nr. 1, Seite 179-84.
- Elsworth, J. D.; Deutch, A. Y.; Redmond, D. E., Jr.; Taylor, J. R.; Sladek, J. R., Jr. und Roth, R. H. (1989): Symptomatic and asymptomatic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated primates: biochemical changes in striatal regions, *Neuroscience (Band 33)*, Nr. 2, Seite 323-31.
- Fawcett, J. (1994): Astrocytes and axon regeneration in the central nervous system, *J Neurol (Band 242)*, Nr. 1 Suppl 1, Seite S25-8.
- Finkelstein, D. I.; Stanic, D.; Parish, C. L.; Tomas, D.; Dickson, K. und Horne, M. K. (2000): Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra, *Neuroscience (Band 97)*, Nr. 1, Seite 99-112.
- Fisher, L. J.; Young, S. J.; Tepper, J. M.; Groves, P. M. und Gage, F. H. (1991): Electrophysiological characteristics of cells within mesencephalon suspension grafts, *Neuroscience (Band 40)*, Nr. 1, Seite 109-22.

- Freed, C. R.; Greene, P. E.; Breeze, R. E.; Tsai, W. Y.; DuMouchel, W.; Kao, R.; Dillon, S.; Winfield, H.; Culver, S.; Trojanowski, J. Q.; Eidelberg, D. und Fahn, S. (2001): Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease, *N Engl J Med* (Band 344), Nr. 10, Seite 710-9.
- Freed, W. J. (1985): Transplantation of tissues to the cerebral ventricles: Methodological details and rate of graft survival, Björklund, A. und Stenevi, U., *Neural Grafting in the Mammalian CNS* Seite 31-40, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Freund, T. F.; Bolam, J. P.; Björklund, A.; Stenevi, U.; Dunnett, S. B.; Powell, J. F. und Smith, A. D. (1985): Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study, *J Neurosci* (Band 5), Nr. 3, Seite 603-16.
- Fuxe, K.; Li, X. M.; Bjelke, B.; Hedlund, P. B.; Biagini, G. und Agnati, L. F. (1994): Possible mechanisms for the powerful actions of neuropeptides, *Ann N Y Acad Sci* (Band 739), Seite 42-59.
- Gagnon, C.; Bedard, P. J.; Rioux, L.; Gaudin, D.; Martinoli, M. G.; Pelletier, G. und Di Paolo, T. (1991): Regional changes of striatal dopamine receptors following denervation by 6-hydroxydopamine and fetal mesencephalic grafts in the rat, *Brain Res* (Band 558), Nr. 2, Seite 251-63.
- Gally, J. A.; Montague, P. R.; Reeke, G. N., Jr. und Edelman, G. M. (1990): The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 9, Seite 3547-51.
- Garris, P. A.; Ciolkowski, E. L.; Pastore, P. und Wightman, R. M. (1994): Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain, *J Neurosci* (Band 14), Nr. 10, Seite 6084-93.
- Garris, P. A.; Walker, Q. D. und Wightman, R. M. (1997): Dopamine release and uptake rates both decrease in the partially denervated striatum in proportion to the loss of dopamine terminals, *Brain Res* (Band 753), Nr. 2, Seite 225-34.
- Garthwaite, J.; Charles, S. L. und Chess-Williams, R. (1988): Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain, *Nature* (Band 336), Nr. 6197, Seite 385-8.
- Gates, M. A.; Laywell, E. D.; Fillmore, H. und Steindler, D. A. (1996): Astrocytes and extracellular matrix following intracerebral transplantation of embryonic ventral mesencephalon or lateral ganglionic eminence, *Neuroscience* (Band 74), Nr. 2, Seite 579-97.
- Gerfen, C. R. (1992): The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization, *Trends Neurosci* (Band 15), Nr. 4, Seite 133-9.
- German, D. C.; Schlusberg, D. S. und Woodward, D. J. (1983): Three-dimensional computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: from mouse to man, *J Neural Transm* (Band 57), Nr. 4, Seite 243-54.
- Giros, B.; Jaber, M.; Jones, S. R.; Wightman, R. M. und Caron, M. G. (1996): Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter, *Nature* (Band 379), Nr. 6566, Seite 606-12.
- Golding, D. W. (1994): A pattern confirmed and refined--synaptic, nonsynaptic and parasynaptic exocytosis, *Bioessays* (Band 16), Nr. 7, Seite 503-8.
- Golgi, C. (1891): La rete nervosa diffusa degli organi centrali del sistema nervoso. Suo significato fisiologico, *Rend. R. Ist. Lomb. Sci. Lett.* (Band 24), Seite 594 - 603.
- Golgi, C. (1891): La rete nervosa diffusa degli organi centrali del sistema nervoso. Suo significato fisiologico, *Rend. R. Ist. Lomb. Sci. Lett.* (Band 24), Seite 656 - 673.

- Golgi, C. (1967): The neuron doctrine - theory and facts, Nobel Lectures: Physiology and Medicine (Band 1901 -1921) Seite 189 - 217, Elsevier Publishing Company, New York.
- Gonon, F. (1997): Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo, *J Neurosci* (Band 17), Nr. 15, Seite 5972-8.
- Gonzalez-Hernandez, T.; Barroso-Chinea, P.; De La Cruz Muros, I.; Del Mar Perez-Delgado, M. und Rodriguez, M. (2004): Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons, *J Comp Neurol* (Band 479), Nr. 2, Seite 198-215.
- Grace, A. A. und Bunney, B. S. (1984): The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing, *J Neurosci* (Band 4), Nr. 11, Seite 2877-90.
- Grace, A. A. und Bunney, B. S. (1984): The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing, *J Neurosci* (Band 4), Nr. 11, Seite 2866-76.
- Greitz, D. (1993): Cerebrospinal fluid circulation and associated intracranial dynamics. A radiologic investigation using MR imaging and radionuclide cisternography, *Acta Radiol Suppl* (Band 386), Seite 1-23.
- Groves, P. M.; Linder, J. C. und Young, S. J. (1994): 5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum, *Neuroscience* (Band 58), Nr. 3, Seite 593-604.
- Hagell, P. und Brundin, P. (2001): Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease, *J Neuropathol Exp Neurol* (Band 60), Nr. 8, Seite 741-52.
- Hefti, F.; Melamed, E. und Wurtman, R. J. (1980): Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization, *Brain Res* (Band 195), Nr. 1, Seite 123-37.
- Herkenham, M. (1991): Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations: implications for endocrine functions in brain., Fuxe, K. und Agnati, L. F., Volume Transmission in the Brain. Novel mechanisms for Neural Transmission. (Band 1) Seite 63-87, Raven Press, New York.
- Herman, J. P.; Abrous, D. N. und Le Moal, M. (1991): Anatomical and behavioral comparison of unilateral dopamine-rich grafts implanted into the striatum of neonatal and adult rats, *Neuroscience* (Band 40), Nr. 2, Seite 465-75.
- Herman, J. P. und Abrous, N. D. (1994): Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives, *Prog Neurobiol* (Band 44), Nr. 1, Seite 1-35.
- Herman, J. P.; Choulli, K. und Le Moal, M. (1985): Activation of striatal dopaminergic grafts by haloperidol, *Brain Res Bull* (Band 15), Nr. 6, Seite 543-6.
- Herman, J. P.; Choulli, K. und Le Moal, M. (1985): Hyper-reactivity to amphetamine in rats with dopaminergic grafts, *Exp Brain Res* (Band 60), Nr. 3, Seite 521-6.
- Hitri, A.; Hurd, Y. L.; Wyatt, R. J. und Deutsch, S. I. (1994): Molecular, functional and biochemical characteristics of the dopamine transporter: regional differences and clinical relevance, *Clin Neuropharmacol* (Band 17), Nr. 1, Seite 1-22.
- Ingham, C. A.; Hood, S. H.; Taggart, P. und Arbuthnott, G. W. (1998): Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway, *J Neurosci* (Band 18), Nr. 12, Seite 4732-43.
- Jackisch, R.; Duschek, M.; Neufang, B.; Rensing, H.; Hertting, G. und Herman, J. P. (1991): Long-term survival of intrastriatal dopaminergic grafts: modulation of acetylcholine release by graft-derived dopamine, *J Neurochem* (Band 57), Nr. 1, Seite 267-76.
- Jaeger, C. B. (1985): Cytoarchitectonics of substantia nigra grafts: a light and electron microscopic study of immunocytochemically identified dopaminergic neurons and fibrous astrocytes, *J Comp Neurol* (Band 231), Nr. 1, Seite 121-35.

- Janson, A. M. und Moller, A. (1993): Chronic nicotine treatment counteracts nigral cell loss induced by a partial mesodiencephalic hemitransection: an analysis of the total number and mean volume of neurons and glia in substantia nigra of the male rat, *Neuroscience* (Band 57), Nr. 4, Seite 931-41.
- Jansson, A.; Mazel, T.; Andbjør, B.; Rosen, L.; Guidolin, D.; Zoli, M.; Sykova, E.; Agnati, L. F. und Fuxe, K. (1999): Effects of nitric oxide inhibition on the spread of biotinylated dextran and on extracellular space parameters in the neostriatum of the male rat, *Neuroscience* (Band 91), Nr. 1, Seite 69-80.
- Jellinger, K. (1986): The pathology of Parkinson's disease, Fahn, S. T. und Marsden, C. D., *The pathology of Parkinson's disease*, Butterworths, London.
- Jiao, S.; Gurevich, V. und Wolff, J. A. (1993): Long-term correction of rat model of Parkinson's disease by gene therapy, *Nature* (Band 362), Nr. 6419, Seite 450-3.
- Langston, J. W.; Ballard, P.; Tetrud, J. W. und Irwin, I. (1983): Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis, *Science* (Band 219), Nr. 4587, Seite 979-80.
- Langston, J. W.; Widner, H.; Goetz, C. G.; Brooks, D.; Fahn, S.; Freeman, T. und Watts, R. (1992): Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT), *Mov Disord* (Band 7), Nr. 1, Seite 2-13.
- Lieberman, A. (1993): Treatment of Parkinson's disease, *Curr Opin Neurol Neurosurg* (Band 6), Nr. 3, Seite 339-43.
- Lindvall, O. (1998): Update on fetal transplantation: the Swedish experience, *Mov Disord* (Band 13 Suppl 1), Seite 83-7.
- Lindvall, O. (1999): Cerebral implantation in movement disorders: state of the art, *Mov Disord* (Band 14), Nr. 2, Seite 201-5.
- Lindvall, O.; Brundin, P.; Widner, H.; Rehnström, S.; Gustavii, B.; Frackowiak, R.; Leenders, K. L.; Sawle, G.; Rothwell, J. C.; Marsden, C. D. und et al. (1990): Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease, *Science* (Band 247), Nr. 4942, Seite 574-7.
- Liu, H.; Brown, J. L.; Jasmin, L.; Maggio, J. E.; Vigna, S. R.; Mantyh, P. W. und Basbaum, A. I. (1994): Synaptic relationship between substance P and the substance P receptor: light and electron microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 3, Seite 1009-13.
- Llona, I.; Annaert, W. G.; Jacob, W. und De Potter, W. P. (1994): Co-storage in large 'dense-core' vesicles of dopamine and cholecystinin in rat striatum, *Neurochem Int* (Band 25), Nr. 6, Seite 573-81.
- Lund, R. D. und Hauschka, S. D. (1976): Transplanted neural tissue develops connections with host rat brain, *Science* (Band 193), Nr. 4253, Seite 582-4.
- Madrazo, I.; Drucker-Colin, R.; Diaz, V.; Martinez-Mata, J.; Torres, C. und Becerril, J. J. (1987): Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease, *N Engl J Med* (Band 316), Nr. 14, Seite 831-4.
- Mahalik, T. J.; Finger, T. E.; Stromberg, I. und Olson, L. (1985): Substantia nigra transplants into denervated striatum of the rat: ultrastructure of graft and host interconnections, *J Comp Neurol* (Band 240), Nr. 1, Seite 60-70.
- Mandel, R. J.; Brundin, P. und Björklund, A. (1990): The importance of graft placement and task complexity for transplant-induced recovery of simple and complex sensorimotor deficits in dopamine denervated rats, *Eur J Neurosci*, Nr. 2, Seite 888-894.
- Masuhr, K.F. und Neumann, M. (1998): Parkinson-Krankheit, *Neurologie*, 4. Auflage, Seite 189 - 197, Hippokrates Verlag, Stuttgart.

- McKeon, R. J.; Schreiber, R. C.; Rudge, J. S. und Silver, J. (1991): Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes, *J Neurosci* (Band 11), Nr. 11, Seite 3398-411.
- Mendez, I.; Baker, K und Hong, M (2000): Simultaneous intrastriatal and intranigral grafting (double grafts) in the rat model of Parkinson's disease, *Brain Research Reviews* (Band 32), Nr. 1, Seite 328-339.
- Mendez, I.; Elisevich, K. und Flumerfelt, B. (1991): Dopaminergic innervation of substance P-containing striatal neurons by fetal nigral grafts: an ultrastructural double-labeling immunocytochemical study, *J Comp Neurol* (Band 308), Nr. 1, Seite 66-78.
- Moukhles, H.; Forni, C.; Nieoullon, A. und Daszuta, A. (1994): Regulation of dopamine levels in intrastriatal grafts of fetal mesencephalic cell suspension: an in vivo voltammetric approach, *Exp Brain Res* (Band 102), Nr. 1, Seite 10-20.
- Moukhles, H.; Nieoullon, A. und Daszuta, A. (1992): Early and widespread normalization of dopamine-neuropeptide Y interactions in the rat striatum after transplantation of fetal mesencephalon cells, *Neuroscience* (Band 47), Nr. 4, Seite 781-92.
- Mukhida, K.; Baker, K. A.; Sadi, D. und Mendez, I. (2001): Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants, *J Neurosci* (Band 21), Nr. 10, Seite 3521-30.
- Narumi, S.; Kimelberg, H. K. und Bourke, R. S. (1978): Effects of norepinephrine on the morphology and some enzyme activities of primary monolayer cultures from rat brain, *J Neurochem* (Band 31), Nr. 6, Seite 1479-90.
- Nicholson, C. (1979): Brain microenvironment as a communication channel, Schmitt, F. O. und Worden, F. G., *The Neurosciences: Fourth Study Program* Seite 457 - 476, MIT Press, Cambridge, MA.
- Nicholson, C. (1992): Quantitative analysis of extracellular space using the method of TMA+ iontophoresis and the issue of TMA+ uptake, *Can J Physiol Pharmacol* (Band 70 Suppl), Seite S314-22.
- Nicholson, C. (1993): Ion-selective microelectrodes and diffusion measurements as tools to explore the brain cell microenvironment, *J Neurosci Methods* (Band 48), Nr. 3, Seite 199-213.
- Nicholson, C. (2000): Volume transmission in the year 2000, *Prog Brain Res* (Band 125), Seite 437-46.
- Nicholson, C.; Chen, K. C.; Hrabetova, S. und Tao, L. (2000): Diffusion of molecules in brain extracellular space: theory and experiment, *Prog Brain Res* (Band 125), Seite 129-54.
- Nicholson, C. und Phillips, J. M. (1981): Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum, *J Physiol* (Band 321), Seite 225-57.
- Nicholson, C. und Sykova, E. (1998): Extracellular space structure revealed by diffusion analysis, *Trends Neurosci* (Band 21), Nr. 5, Seite 207-15.
- Nikkhah, G. (1994): Microtransplantation of nigral dopamine neurons in a rat model of Parkinson's disease, University of Lund, Lund, Sweden.
- Nikkhah, G.; Bentlage, C.; Cunningham, M. G. und Bjorklund, A. (1994): Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model, *J Neurosci* (Band 14), Nr. 6, Seite 3449-61.
- Nikkhah, G.; Cunningham, M. G.; Cenci, M. A.; McKay, R. D. und Bjorklund, A. (1995): Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway, *J Neurosci* (Band 15), Nr. 5 Pt 1, Seite 3548-61.

- Nikkhah, G.; Cunningham, M. G.; Jodicke, A.; Knappe, U. und Bjorklund, A. (1994): Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model, *Brain Res* (Band 633), Nr. 1-2, Seite 133-43.
- Nikkhah, G.; Duan, W. M.; Knappe, U.; Jodicke, A. und Bjorklund, A. (1993): Restoration of complex sensorimotor behavior and skilled forelimb use by a modified nigral cell suspension transplantation approach in the rat Parkinson model, *Neuroscience* (Band 56), Nr. 1, Seite 33-43.
- Nikkhah, G.; Odin, P.; Smits, A.; Tingstrom, A.; Othberg, A.; Brundin, P.; Funa, K. und Lindvall, O. (1993): Platelet-derived growth factor promotes survival of rat and human mesencephalic dopaminergic neurons in culture, *Exp Brain Res* (Band 92), Nr. 3, Seite 516-23.
- Nikkhah, G.; Olsson, M.; Eberhard, J.; Bentlage, C.; Cunningham, M. G. und Bjorklund, A. (1994): A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: a detailed account of the methodology, *Neuroscience* (Band 63), Nr. 1, Seite 57-72.
- Nikkhah, G.; Rosenthal, C.; Falkenstein, G. und Samii, M. (1998): Dopaminergic graft-induced long-term recovery of complex sensorimotor behaviors in a rat model of Parkinson's disease, *Zentralbl Neurochir* (Band 59), Nr. 2, Seite 97-103.
- Nirenberg, M. J.; Vaughan, R. A.; Uhl, G. R.; Kuhar, M. J. und Pickel, V. M. (1996): The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons, *J Neurosci* (Band 16), Nr. 2, Seite 436-47.
- Nusser, Z.; Mulvihill, E.; Streit, P. und Somogyi, P. (1994): Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization, *Neuroscience* (Band 61), Nr. 3, Seite 421-7.
- Olsson, M.; Nikkhah, G.; Bentlage, C. und Bjorklund, A. (1995): Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test, *J Neurosci* (Band 15), Nr. 5 Pt 2, Seite 3863-75.
- Paxinos, G. und Watson, C. (1986): *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, New York.
- Perlow, M. J.; Freed, W. J.; Hoffer, B. J.; Seiger, A.; Olson, L. und Wyatt, R. J. (1979): Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system, *Science* (Band 204), Nr. 4393, Seite 643-7.
- Ramachandran, A. C.; Bartlett, L. E. und Mendez, I. M. (2002): A multiple target neural transplantation strategy for Parkinson's disease, *Rev Neurosci* (Band 13), Nr. 3, Seite 243-56.
- Redmond, D. E.; Sladek, J. R., Jr.; Roth, R. H.; Collier, T. J.; Elsworth, J. D.; Deutch, A. Y. und Haber, S. (1986): Fetal neuronal grafts in monkeys given methylphenyltetrahydropyridine, *Lancet* (Band 1), Nr. 8490, Seite 1125-7.
- Reum, T. und Morgenstern, R. (1994): Fetal mesencephalic grafts influence the dopamine release in the non-lesioned striatum of 6-OHDA-lesioned rats: a behavioral and in vivo voltammetric study, *Neurosci Lett* (Band 173), Nr. 1-2, Seite 172-6.
- Reum, T.; Olshausen, F.; Mazel, T.; Vorisek, I.; Morgenstern, R. und Sykova, E. (2002): Diffusion parameters in the striatum of rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions and with fetal mesencephalic grafts, *J Neurosci Res* (Band 70), Nr. 5, Seite 680-93.
- Reum, T.; Schonfuss, D.; Schafer, U.; Marburger, A.; Drandarevski, N. und Morgenstern, R. (1995): Fetal mesencephalic grafts decrease the rate of dopamine uptake in the non-lesioned striatum of unilaterally 6-OHDA lesioned rats: an in vivo voltammetric study, *Neurosci Lett* (Band 198), Nr. 3, Seite 218-22.

- Rice, M. E. und Nicholson, C. (1991): Diffusion characteristics and extracellular volume fraction during normoxia and hypoxia in slices of rat neostriatum, *J Neurophysiol* (Band 65), Nr. 2, Seite 264-72.
- Rice, M. E. und Nicholson, C. (1995): Diffusion and Ion Shifts in the Brain Extracellular Microenvironment and their Relevance for Voltammetric Measurements, Boulton, A.; Baker, G. und Adams, R.N., *NeuroMethods: Voltammetric Methods in Brain Systems* (Band 27) Seite 27-79, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Ridet, J. L.; Rajaofetra, N.; Teilhac, J. R.; Geffard, M. und Privat, A. (1993): Evidence for nonsynaptic serotonergic and noradrenergic innervation of the rat dorsal horn and possible involvement of neuron-glia interactions, *Neuroscience* (Band 52), Nr. 1, Seite 143-57.
- Rioux, L.; Gaudin, D. P.; Bui, L. K.; Gregoire, L.; DiPaolo, T. und Bedard, P. J. (1991): Correlation of functional recovery after a 6-hydroxydopamine lesion with survival of grafted fetal neurons and release of dopamine in the striatum of the rat, *Neuroscience* (Band 40), Nr. 1, Seite 123-31.
- Rioux, L.; Gaudin, D. P.; Gagnon, C.; Di Paolo, T. und Bedard, P. J. (1991): Decrease of behavioral and biochemical denervation supersensitivity of rat striatum by nigral transplants, *Neuroscience* (Band 44), Nr. 1, Seite 75-83.
- Robertson, G. S.; Fine, A. und Robertson, H. A. (1991): Dopaminergic grafts in the striatum reduce D1 but not D2 receptor-mediated rotation in 6-OHDA-lesioned rats, *Brain Res* (Band 539), Nr. 2, Seite 304-11.
- Robinson, T. E. und Whishaw, I. Q. (1988): Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats, *Brain Res* (Band 450), Nr. 1-2, Seite 209-24.
- Roitbak, T. und Sykova, E. (1999): Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis, *Glia* (Band 28), Nr. 1, Seite 40-8.
- Rothblat, D. S. und Schneider, J. S. (1994): Spontaneous functional recovery from parkinsonism is not due to reinnervation of the dorsal striatum by residual dopaminergic neurons, *Brain Res Bull* (Band 34), Nr. 3, Seite 309-12.
- Savasta, M.; Dubois, A.; Benavides, J. und Scatton, B. (1988): Different plasticity changes in D1 and D2 receptors in rat striatal subregions following impairment of dopaminergic transmission, *Neurosci Lett* (Band 85), Nr. 1, Seite 119-24.
- Schafer, U.; Reum, T.; Schonfuss, D.; Marburger, A. und Morgenstern, R. (1995): Grafts modulate dopamine transporters of the non-lesioned striatum, *Neuroreport* (Band 6), Nr. 14, Seite 1833-6.
- Schmidt, R. H.; Bjorklund, A. und Stenevi, U. (1981): Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites, *Brain Res* (Band 218), Nr. 1-2, Seite 347-56.
- Schneider, J. S.; Rothblat, D. S. und DiStefano, L. (1994): Volume transmission of dopamine over large distances may contribute to recovery from experimental parkinsonism, *Brain Res* (Band 643), Nr. 1-2, Seite 86-91.
- Segovia, J.; Castro, R.; Notario, V. und Gale, K. (1991): Transplants of fetal substantia nigra regulate glutamic acid decarboxylase gene expression in host striatal neurons, *Brain Res Mol Brain Res* (Band 10), Nr. 4, Seite 359-62.
- Sesack, S. R.; Aoki, C. und Pickel, V. M. (1994): Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets, *J Neurosci* (Band 14), Nr. 1, Seite 88-106.
- Shannon, C. E. und Weaver, W. (1949): *The mathematical theory of communication*, University of Illinois Press, Urbana.

- Sherrington, C. S. (1906): *The Integrative Action of the Nervous System*, Yale University Press, New Haven, CT.
- Sloan, D. J.; Baker, B. J.; Puklavec, M. und Charlton, H. M. (1990): The effect of site of transplantation and histocompatibility differences on the survival of neural tissue transplanted to the CNS of defined inbred rat strains, *Prog Brain Res* (Band 82), Seite 141-52.
- Sloan, D. J.; Wood, M. J. und Charlton, H. M. (1991): The immune response to intracerebral neural grafts, *Trends Neurosci* (Band 14), Nr. 8, Seite 341-6.
- Snyder, B. J. und Olanow, C. W. (2005): Stem cell treatment for Parkinson's disease: an update for 2005, *Curr Opin Neurol* (Band 18), Nr. 4, Seite 376-85.
- Specht, L. A.; Pickel, V. M.; Joh, T. H. und Reis, D. J. (1981): Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny, *J Comp Neurol* (Band 199), Nr. 2, Seite 233-53.
- Stenevi, U.; Kromer, L. F.; Gage, F. H. und Björklund, A. (1985): Solid neural grafts in intracerebral transplantation cavities, Björklund, A. und Stenevi, U., *Neural Grafting in the Mammalian CNS* Seite 41-51, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Stjarne, L.; Bao, J. X.; Gonon, F. und Msghina, M. (1994): Nerve activity-dependent variations in clearance of released noradrenaline: regulatory roles for sympathetic neuromuscular transmission in rat tail artery, *Neuroscience* (Band 60), Nr. 4, Seite 1021-38.
- Stone, E. A. und Ariano, M. A. (1989): Are glial cells targets of the central noradrenergic system? A review of the evidence, *Brain Res Brain Res Rev* (Band 14), Nr. 4, Seite 297-309.
- Strecker, R. E.; Sharp, T.; Brundin, P.; Zetterstrom, T.; Ungerstedt, U. und Björklund, A. (1987): Autoregulation of dopamine release and metabolism by intrastriatal nigral grafts as revealed by intracerebral dialysis, *Neuroscience* (Band 22), Nr. 1, Seite 169-78.
- Strömberg, I.; Björklund, L.; Johansson, M.; Tomac, A.; Collins, F.; Olson, L.; Hoffer, B. und Humpel, C. (1993): Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo, *Exp Neurol* (Band 124), Nr. 2, Seite 401-12.
- Strömberg, I.; Bygdeman, M. und Almqvist, P. (1992): Target-specific outgrowth from human mesencephalic tissue grafted to cortex or ventricle of immunosuppressed rats, *J Comp Neurol* (Band 315), Nr. 4, Seite 445-56.
- Strömberg, I.; Gerhardt, G.; van Horne, C.; Bygdeman, M.; Olson, L. und Hoffer, B. (1991): Electrophysiological and in vivo electrochemical recordings in rats intraventricular human xenografts, Lindvall, O.; Björklund, A. und Widner, H., *Intracerebral Transplantation in Movement Disorders. Experimental Basis and Clinical Experiences* Seite 303 - 311, Elsevier, Amsterdam.
- Strömberg, I.; Kehr, J.; Andbjør, B. und Fuxe, K. (2000): Fetal ventral mesencephalic grafts functionally reduce the dopamine D2 receptor supersensitivity in partially dopamine reinnervated host striatum, *Exp Neurol* (Band 164), Nr. 1, Seite 154-65.
- Sulzer, D.; Joyce, M. P.; Lin, L.; Geldwert, D.; Haber, S. N.; Hattori, T. und Rayport, S. (1998): Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro, *J Neurosci* (Band 18), Nr. 12, Seite 4588-602.
- Svoboda, J. und Sykova, E. (1991): Extracellular space volume changes in the rat spinal cord produced by nerve stimulation and peripheral injury, *Brain Res* (Band 560), Nr. 1-2, Seite 216-24.
- Sykova, E. (2001): Glial diffusion barriers during aging and pathological states, *Prog Brain Res* (Band 132), Seite 339-63.

- Sykova, E.; Mazel, T. und Simonova, Z. (1998): Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging, *Exp Gerontol* (Band 33), Nr. 7-8, Seite 837-51.
- Sykova, E.; Roitbak, T.; Mazel, T.; Simonova, Z. und Harvey, A. R. (1999): Astrocytes, oligodendroglia, extracellular space volume and geometry in rat fetal brain grafts, *Neuroscience* (Band 91), Nr. 2, Seite 783-98.
- Taipale, J. und Keski-Oja, J. (1997): Growth factors in the extracellular matrix, *Faseb J* (Band 11), Nr. 1, Seite 51-9.
- Todaka, K.; Ishida, Y.; Hashiguchi, H.; Nishimori, T. und Mitsuyama, Y. (1999): Cellular distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in fetal ventral mesencephalon transplants in the dopamine-depleted striatum of a rat, *Exp Neurol* (Band 160), Nr. 2, Seite 394-401.
- Ungerstedt, U. (1968): 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons, *Eur J Pharmacol* (Band 5), Nr. 1, Seite 107-10.
- Ungerstedt, U. (1971): Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system, *Acta Physiol Scand Suppl* (Band 367), Seite 95-122.
- Ungerstedt, U. und Arbuthnott, G. W. (1970): Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system, *Brain Res* (Band 24), Nr. 3, Seite 485-93.
- van Horne, C.; Hoffer, B. J.; Stromberg, I. und Gerhardt, G. A. (1992): Clearance and diffusion of locally applied dopamine in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rat striatum, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 263), Nr. 3, Seite 1285-92.
- Vogel, G. (2001): Parkinson's research. Fetal cell transplant trial draws fire, *Science* (Band 291), Nr. 5511, Seite 2060-1.
- Vuillet, J.; Moukhles, H.; Nieoullon, A. und Daszuta, A. (1994): Ultrastructural analysis of graft-to-host connections, with special reference to dopamine-neuropeptide Y interactions in the rat striatum, after transplantation of fetal mesencephalon cells, *Exp Brain Res* (Band 98), Nr. 1, Seite 84-96.
- Waldeyer, W. (1891): Über einige neuere Forschungen in Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (Band 17), Seite 1352 - 1356.
- Wang, Y.; Wang, S. D.; Lin, S. Z. und Liu, J. C. (1994): Restoration of dopamine overflow and clearance from the 6-hydroxydopamine lesioned rat striatum reinnervated by fetal mesencephalic grafts, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 270), Nr. 2, Seite 814-21.
- Watts, C.; Hurelbrink, C. und Dunnett, S. B. (1998): Method of preparation of the donor tissue affects functional outcome in a rodent model of Parkinson's disease., *Soc. Neurosci. Abstr.* 223.1.
- Whitaker, S. (1969): Fluid motion in porous media, *Ind engng Chem* (Band 61), Seite 14-28.
- Wilby, M. J.; Sinclair, S. R.; Muir, E. M.; Zietlow, R.; Adcock, K. H.; Horellou, P.; Rogers, J. H.; Dunnett, S. B. und Fawcett, J. W. (1999): A glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting clone of the Schwann cell line SCTM41 enhances survival and fiber outgrowth from embryonic nigral neurons grafted to the striatum and to the lesioned substantia nigra, *J Neurosci* (Band 19), Nr. 6, Seite 2301-12.
- Youdim, M.B.H. und Riederer, P. (1997): Freie Radikale und die Parkinson-Krankheit, *Spektrum der Wissenschaft* (Band 3), Seite 52-60.
- Yung, K. K.; Bolam, J. P.; Smith, A. D.; Hersch, S. M.; Ciliax, B. J. und Levey, A. I. (1995): Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy, *Neuroscience* (Band 65), Nr. 3, Seite 709-30.
- Yurek, D. M. und Sladek, J. R., Jr. (1990): Dopamine cell replacement: Parkinson's disease, *Annu Rev Neurosci* (Band 13), Seite 415-40.

- Zainos-Rosales, A.; Aguilar-Roblero, R.; Mendoza-Ramirez, J. L. und Drucker-Colin, R. (1993): 2-Deoxyglucose autoradiographic evidence that fetal substantia nigra grafts exert contralateral effects in 6-hydroxydopamine-lesioned animals who recover motor asymmetries, *Neurosci Lett* (Band 156), Nr. 1-2, Seite 99-104.
- Zoli, M. und Agnati, L. F. (1996): Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses, *Prog Neurobiol* (Band 49), Nr. 4, Seite 363-80.
- Zoli, M.; Jansson, A.; Sykova, E.; Agnati, L. F. und Fuxe, K. (1999): Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology, *Trends Pharmacol Sci* (Band 20), Nr. 4, Seite 142-50.
- Zoli, M.; Torri, C.; Ferrari, R.; Jansson, A.; Zini, I.; Fuxe, K. und Agnati, L. F. (1998): The emergence of the volume transmission concept, *Brain Res Rev* (Band 26), Nr. 2-3, Seite 136-47.

## Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Florian Olshausen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss der Transplantation von Embryonalzellen auf die Geometrie des extrazellulären Raumes im Striatum von Ratten mit 6-OHDA induziertem Parkinsonismus“ 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: 22.09.05

Unterschrift:

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

- 12 / 2002            T.Reum, F.Olshausen, T.Mazel, I.Vorisek, R.Morgenstern, E.Sykova.  
"Diffusion parameters in the striatum of rats with 6-hydroxydopamine  
induced lesions and with fetal mesencephalic grafts."  
(J Neurosci Res. 2002 Dec 1;70(5):680-93.)
- 03 / 2001            Kongress der Deutschen Gesellschaft für Physiologie, Poster  
Abstract Book S. R 265, P42-2
- 11 / 2000            Kongress der Society of Neuroscience in New Orleans, Poster  
Abstract Book Volume 26 Part 1, Seite 870, Session 328.3
- 11 / 2000            Europäische Studentenkonzferenz der Charité, Vortrag  
Abstract Book S.68, Session: Degenerative Gehirnerkrankungen